

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE SANTE

Thèse

Pour l'obtention du grade de
Docteur en chimie théorique, physique, analytique

**Développements de méthodes d'analyse des
plastifiants de type phtalates et des acides biliaires
dans des matrices biologiques - applications dans
différents contextes physiopathologiques**

Présentée et soutenue par

Amandine DESCAT

Le 6 décembre 2023 à 14 h

Thèse dirigée par le **Pr Jean-François GOOSSENS** et le **Pr Anne TAILLEUX**

Membres du jury

Pr Pierre Chaminade, PU, Univ. Paris Saclay – *Rapporteur*

Pr Franck Saint-Marcoux, PU-PH, Univ. Limoges – *Rapporteur*

Pr Arlette Baillet-Guffroy, PU émérite, Univ. Paris Saclay – *Présidente de jury*

Dr Mostafa Kouach, Ingénieur de Recherche, Univ. Lille – *Invité*

Pr Jean-François Goossens, PU, Univ. Lille – *Co-directeur de thèse*

Pr Anne Tailleux, PU, Univ. Lille – *Co-directrice de thèse*

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur [Pierre Chaminade](#), directeur de LIP(SYS)² à la faculté de pharmacie de l'Université de Paris Saclay, et le Professeur et Praticien Hospitalier [Franck Saint-Marcoux](#) au laboratoire de Toxicologie de la faculté de pharmacie de l'Université de Limoges, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie chaleureusement la Professeure [Arlette Baillet-Guffroy](#) de la faculté de pharmacie de l'Université de Paris Saclay, qui me fait l'honneur de siéger dans mon jury de thèse en qualité d'examinatrice. Je remercie le Docteur [Mostafa Kouach](#), ingénieur de recherche au PSM-GRITA, qui me fait le plaisir de siéger dans mon jury de thèse en tant que membre invité.

Je remercie tout particulièrement la Professeure [Delphine Allorge](#), Doyen de la faculté de pharmacie de l'Université de Lille, d'avoir examiné mon travail lors des Comités de Suivi Individuel, pour ses conseils précieux et son soutien.

Je remercie le Professeur [Pascal Odou](#), directeur de l'ULR7365 GRITA, de m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein de l'équipe tout en poursuivant mes missions d'ingénieure d'études.

Je remercie le Professeur [Bart Staels](#), directeur de l'U1011 INSERM, de m'avoir accueillie en tant que doctorante au sein de son équipe de recherche, et des échanges toujours très enrichissants que nous avons pu partager.

Je souhaite remercier ma co-directrice de thèse, la Professeure [Anne Tailleur](#), professeure de biochimie à la faculté de pharmacie de l'Université de Lille et chercheuse au sein de l'U1011 INSERM. Merci pour ton encadrement, ton investissement tout au long de ce travail mais aussi ton énergie et ta bienveillance. De belles années de collaboration derrière nous, mais aussi devant nous, je l'espère !

Je remercie mon co-directeur de thèse et responsable, le Professeur [Jean-François Goossens](#), professeur de chimie analytique à la faculté de pharmacie de Lille et responsable du Plateau de Spectrométrie de Masse de l'ULR7365 GRITA. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir incitée à me lancer dans une reprise d'études en 2014 ! Une très belle aventure dans laquelle je me suis toujours sentie soutenue et qui s'achève par ce travail de thèse. Qui aurait-pu le prédire ? Merci de tes conseils et de ton soutien, j'ai beaucoup appris à tes côtés.

Je souhaite remercier [Nadia Benyahia](#), directrice du développement et de la gestion prévisionnelle des compétences à l'Université de Lille, qui s'est toujours montrée disponible pour me recevoir, m'a aidée et soutenue dès ma reprise d'études en 2014.

Mon cher ami le Docteur [Mostafa Kouach](#), ingénieur de recherche au PSM-GRITA, qui m'a pris sous son aile depuis mon arrivée au laboratoire en 2012 et qui m'a tant appris sur la spectrométrie de masse ! Nous avons vécu des rires, des pleurs, du stress, de la joie et aussi de vrais moments d'amitié. Merci pour ton soutien sans faille.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique de la faculté de pharmacie de l'Université de Lille, Pr [Catherine Foulon](#), Pr [Emmanuelle Lipka](#), Dr [Cécile Danel](#) et tout particulièrement au Dr [Marie Lecœur](#), avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur le développement du dosage des plastifiants. Merci au Dr [Nadège Schifano](#), qui a pris son envol pour rejoindre l'IUT de Chimie de Lille depuis plusieurs années, de m'avoir soutenue avant même que j'arrive au laboratoire en 2012 !

Je n'oublie évidemment pas [Romain Regnault](#), technicien supérieur au laboratoire de chimie analytique (bientôt ASI, je l'espère !), avec qui je partage mon quotidien au laboratoire depuis 2019, mon co-équipier de la prévention. Merci de m'avoir aidée à venir à bout de tous ces produits chimiques à évacuer, de m'avoir protégée des araignées du bunker, d'avoir été un soutien moral en égayant les repas du midi et d'oublier ta carte si souvent (ah non, pas ça !).

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe GRITA et tout particulièrement le Dr [Laurence Goossens](#), une chimiste hors pair, et [Nicole Godisiabo](#) de son aide indéfectible pour les commandes et la gestion des comptes qui est rarement simple !

Je remercie l'ensemble des membres de l'U1011 pour leur accueil bienveillant. Merci à [Emmanuelle Vallez](#), avec qui j'ai le plaisir de travailler depuis plusieurs années, à [Isabelle Coquelle](#), qui m'a beaucoup aidée lors de mes manips en culture cellulaire et à [Nathalie Hennuyer](#), qui n'a pas compté ses heures pour me soutenir ! Je remercie également [Delphine Eberlé](#) et [Lucie Marousez](#) pour leur riche collaboration sur le développement du dosage des acides biliaires dans le lait maternel.

Je remercie nos collègues de l'UMR 8576 CNRS de l'Université de Lille, particulièrement le Professeur [Tony Lefebvre](#), professeur de biochimie à l'Université de Lille, ainsi que [Céline](#)

[Schulz](#), ingénieure d'études, pour leur collaboration et leur aide dans la mise en place d'études *in vitro*.

Je tiens à remercier [Brigitte Callens](#), ingénieure d'études au sein du PSM GRITA à la retraite, qui m'a toujours fait profiter de son expérience et qui m'a passé le relais de la prévention au laboratoire. Merci pour ta bienveillance et ton amitié Tata Brigitte !

Merci à [Fatiha Cherik](#), adjointe technique au PSM GRITA durant de longues années, pour son amitié sincère !

Je tiens à remercier [Paul-Emile Hecquet](#), technicien au PSM GRITA durant quelques années. Merci pour ton professionnalisme, ta bonne humeur et les souvenirs que nous avons ensemble pour la naissance d'Alexandre !

Un grand merci à ma Tantine [Aurélie Thelliez](#), que j'ai finalement réussi à convertir à la chimie analytique !! Merci pour ton amitié, ton soutien infailible et tous nos souvenirs au labo et ailleurs !

Merci aux stagiaires que j'ai accueilli au laboratoire, qui ont contribué à l'avancement de ce travail de thèse, [Laura](#), [Savignien](#), [Nadjla](#), [Alexandre](#), [Lylia](#) et tout particulièrement [Chloé](#), qui a passé de nombreux mois au laboratoire.

Merci à mes amis de l'IUT de chimie, [Lucie](#), [Marianne](#), [Anthony](#), [Vincent](#), [Edouard](#), [Rémi](#), [Tomy](#), [Fabien](#), [Ilyasse](#) et [Gilles](#), qui répondent toujours présent depuis toutes ces années.

Merci à [Aurélie](#), avec qui j'ai partagé les années de licence mais aussi un séjour à Helsinki, à Amsterdam et bientôt à Bruxelles !

Merci aux [Tantines](#) du Master 1 pour leur amitié, leur bonne humeur, nos folles discussions et bientôt pour Tantines&TantinesInc !

Merci à mes amis du Master 2, [Hichem](#), [Merzouk](#) et [Zak](#), avec qui j'ai passé quelques mois incroyables à Paris !

Je remercie bien évidemment mes voisins, [Bérangère](#), [Rémy](#) et [Gabriel](#), avec qui nous avons vécu tellement d'aventures ! Entre soirées et inondations, nos vies sont bien remplies !

Je remercie de tout mon cœur [Ma Loute](#), mon meilleur ami pour la vie, avec qui j'ai vécu... des dingeries ?! Tu as toujours été là pour moi et je sais que tu le seras toujours. Merci d'avoir porté mes pierres quand j'en avais besoin, merci de prendre soin de moi et de me faire autant rire ! Ces confinements resteront à tout jamais gravés dans ma mémoire et dans mon cœur. Petite pensée pour Papaye, qui a régulièrement participé à mes réveils difficiles.

Évidemment, merci à [Olivier](#), mon chéri depuis 14 ans déjà... Nous sommes partis de loin et nous avons avancé ensemble, nous hissant vers le haut mutuellement. Je ne serai jamais allée au bout de ce long chemin sans toi. Tant de sacrifices, de moments incroyables vécus à deux, de voyages, de festivals, de soirées endiablées (ou à réviser !). Nous avons surmonté tant d'épreuves ensemble, Lyon, Paris, Vesoul, Lille, notre vie aux quatre coins de la France qui s'apaise enfin. Nous n'avons jamais eu peur de nous lancer ensemble dans des projets un peu fous. Celui-ci touche à sa fin mais je ne doute pas qu'il y en aura d'autres.

Je remercie ma [famille](#) de Picardie et ma [belle-famille](#) de Mayenne, qui m'ont toujours soutenue, même quand je venais passer un weekend à travailler !

Une immense pensée pour mes [grands-parents](#), Aimée, Josépha, Georges et Roger, qui, j'en suis sûre, auraient été très fiers de moi.

Je termine évidemment ces remerciements par les essentiels, ceux à l'origine, ceux qui m'ont accueillie il y a 32 ans, [Maman](#), [Papa](#). Vous avez toujours été présents pour moi, de l'école, à la natation, au conservatoire ou en concert, un soutien indéfectible. Vous avez toujours été fiers de moi et vous n'avez jamais eu peur de me le dire. Pour ça, merci. Nous avons partagé des moments difficiles ces dernières années mais ça n'efface en rien tous les moments de bonheur passés, présents et à venir. Je vous aime.

Table des matières

Table des illustrations.....	12
Liste des abréviations.....	16
Introduction générale	20
Contexte scientifique	22
1 Les plastifiants	22
1.1 Le plastique et ses additifs	22
1.2 Les plastifiants.....	23
1.2.1 Généralités	23
1.2.2 Les structures et propriétés physico-chimiques des plastifiants.....	26
1.3 Applications médicales du PVC plastifié.....	32
1.4 Migration et exposition au plastifiants	33
1.4.1 Voie orale	40
1.4.2 Voie respiratoire.....	41
1.4.3 Voie cutanée.....	42
1.4.4 Voie iatrogène	42
1.5 Méthodes d'analyse des plastifiants dans différents milieux complexes	43
1.5.1 Techniques de préparation des échantillons biologiques pour le dosage des plastifiants	44
1.5.2 Méthodes d'identification et de quantification	48
1.6 Pharmacocinétique des plastifiants	50
1.6.1 Absorption.....	51
1.6.2 Distribution.....	51
1.6.3 Métabolisme.....	52
1.6.4 Élimination.....	55
1.7 Effets des plastifiants sur la santé humaine	55
1.7.1 Effets sur le foie	56
1.7.2 Effets sur le rein.....	58
1.7.3 Effets sur la thyroïde	58
1.7.4 Effets sur le système reproducteur	58
1.7.5 Effets sur le système neurologique	59
1.7.6 Effets sur le système respiratoire.....	59
1.7.7 Effets sur le système cardiovasculaire.....	60
1.7.8 Impact sur l'obésité et le diabète de type 2	60
2 Les acides biliaires (AB)	62
2.1 Structures et propriétés physico-chimiques	62
2.2 Cycle entéro-hépatique.....	65
2.3 Synthèse hépatique des AB.....	67
2.4 Sécrétion hépatique des AB	67
2.5 Transformation des AB par le microbiote intestinal	69
2.6 Réabsorption intestinale des AB	70
2.7 Recapture hépatique des AB.....	71
2.8 Rôles physiopathologiques des AB.....	71
2.9 Variations physiologiques des AB.....	75
2.10 Variations des AB dans des contextes pathologiques.....	76
2.11 Méthodes d'analyse des AB	80
2.11.1 Dosage enzymatique	80
2.11.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	81
2.11.3 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	82
3 Objectifs	83
Matériels et Méthodes.....	86
4 Expérimentations en chimie analytique	86

4.1	Conditions d'analyse du DEHP, MEHP, DINCH et MINCH par LC-MS/MS	86
4.2	Conditions d'analyse du DEHT par LC-UV.....	87
4.3	Conditions d'analyse des métabolites primaires et secondaires du DEHT par LC-MS/MS	87
4.4	Procédures d'extraction des plastifiants et de leurs métabolites de matrices biologiques.....	88
4.4.1	Extraction du DEHP, MEHP, DINCH et MINCH de produits sanguins labiles	88
4.4.2	Extraction du DEHT et du MEHT de produits sanguins labiles	88
4.4.3	Extraction des métabolites du DEHT de lysat cellulaire (HepG2)	89
4.5	Conditions d'analyse du C4, marqueur de la synthèse des AB, par LC-MS/MS	89
4.6	Conditions d'analyse des AB par LC-MS/MS	89
4.7	Conditions d'analyse d'AB dérivés du LCA par LC-MS/MS	90
4.8	Procédures d'extraction du C4 de matrices biologiques.....	91
4.8.1	Extraction du C4 du plasma.....	91
4.8.2	Extraction du C4 de lysat cellulaire (HepG2)	91
4.9	Procédures d'extraction des AB de matrices biologiques	92
4.9.1	Extraction des AB du plasma	92
4.9.2	Extraction des AB de lysat cellulaire (HepG2)	92
4.9.3	Extraction des AB du foie	92
4.9.4	Extraction des AB du contenu caecal	93
4.9.5	Extraction d'AB dérivés du LCA, l'isoallo-LCA et le 3-oxo-LCA, du contenu caecal	94
4.9.6	Extraction des AB de la bile et du liquide intestinal	95
4.9.7	Extraction des AB des urines	95
4.9.8	Extraction des AB du lait maternel	96
5	Expérimentations en pharmacologie cellulaire et moléculaire	96
5.1	Culture cellulaire	96
5.2	Incubation des cellules HepG2 avec les plastifiants et leurs métabolites primaires.....	97
5.3	Transfection transitoire des cellules HEK293 et activation de TGR5	97
5.4	Transfection transitoire des cellules Cos-7 et activation de FXR.....	98
5.5	Transfection transitoire des cellules HEK293 et activation de PPAR α	99
	Résultats	102
6	Développements analytiques pour la quantification des plastifiants et de leurs métabolites	102
6.1	Développement du dosage par LC-MS/MS du DEHP, du DINCH, du MEHP et du MINCH dans les produits sanguins labiles : Publication 1.....	102
6.1.1	Introduction.....	104
6.1.2	Materials and methods	106
6.1.3	Results and discussion	113
6.1.4	Conclusion	124
6.2	Développement du dosage par LC-UV du DEHT et du MEHT dans les produits sanguins labiles : Publication 2	129
6.2.1	Introduction.....	131
6.2.2	Materials and methods	133
6.2.3	Results and discussion	137
6.2.4	Conclusion	145
6.3	Développement du dosage des métabolites secondaires du DEHT par LC-MS/MS dans un lysat cellulaire	149
6.4	Mesure de l'activité du DEHP, du DEHT et de leurs métabolites sur le récepteur PPAR α	156
7	Développements analytiques pour la quantification des acides biliaires	159
7.1	Développement du dosage par LC-MS/MS du C4	159
7.2	Développement du dosage par LC-MS/MS des AB	161
7.2.1	Optimisation de la méthode LC-MS/MS pour la quantification des AB	161
7.2.2	Cas particulier d'AB dérivés du LCA.....	166
7.3	Mesure de l'activité des AB conjugués aux acides aminés et des dérivés du LCA sur les récepteurs h-FXR et h-TGR5.....	173

7.3.1	Mesure de l'activité des AB conjugués aux acides aminés et des dérivés du LCA sur le récepteur h-FXR	173
7.3.2	Mesure de l'activité des AB conjugués aux acides aminés et des dérivés du LCA sur le récepteur h-TGR5	174
7.4	Applications dans les matrices biologiques étudiées	175
7.4.1	Développement du dosage du C4 dans le plasma	176
7.4.2	Développement du dosage du C4 dans du lysat cellulaire	177
7.4.3	Développement du dosage des AB dans le plasma	177
7.4.4	Développement du dosage des AB dans du lysat cellulaire	178
7.4.5	Développement du dosage des AB dans le foie	179
7.4.6	Développement du dosage des AB dans le contenu caecal	182
7.4.7	Développement du dosage d'AB dérivés du LCA dans le contenu caecal	184
7.4.8	Développement du dosage des AB dans les urines	186
7.4.9	Développement du dosage des AB dans le lait maternel : Publication 3	189
8	Applications dans le contexte de la maladie cardiométabolique	212
8.1	Étude des AB dans le contexte de la NASH	212
8.2	Les AB, des biomarqueurs prédictifs du diabète de type 2 ?	216
8.3	Étude des AB dans le contexte de l'obésité et de la chirurgie bariatrique	219
	<i>Discussion et perspectives</i>	<i>228</i>
	<i>Bibliographie</i>	<i>236</i>

Table des illustrations

Figure 1 : Illustration des trois théories du procédé de plastification (Adaptée de Bocqué et al. (11)).....	24
Figure 2 : Domaines d'applications du plastique en Europe en 2020 (12).....	25
Figure 3 : Structure chimique du PVC	25
Figure 4 : Structures chimiques générales des familles de plastifiants associés au PVC	26
Figure 5 : Structures chimiques du DEHP, du DNOP et du DINP	27
Figure 6 : Structure chimique du DEHT	28
Figure 7 : Structure chimique du TOTM	29
Figure 8 : Structure chimique du DINCH	29
Figure 9 : Structure chimique du DEHA.....	30
Figure 10 : Structure chimique du DINA.....	30
Figure 11 : Structure chimique de l'ATBC.....	30
Figure 12 : Schématisation de la migration des plastifiants du contenant (DM) vers le contenu	34
Figure 13 : Sources et voies d'exposition aux plastifiants chez l'humain	39
Figure 14 : Étapes de l'extraction en phase solide SPE (D'après le webinaire- RESTEK Solutions pour la préparation d'échantillons).	45
Figure 15 : Étapes de l'extraction liquide-liquide LLE (Schéma adapté de Soares et al. (80))	46
Figure 16 : Illustration du prélèvement par SPME (Adaptée de Laaks et al. (85)).....	47
Figure 17 : Métabolisme des phtalates	53
Figure 18 : Structures chimiques des plastifiants et de leurs métabolites primaires et secondaires	54
Figure 19 : Effets de l'exposition aux plastifiants sur la santé humaine	56
Figure 20 : Récepteurs cibles du DEHP et du MEHP	59
Figure 21 : Structure chimique du marqueur circulant de la synthèse des AB, le C4.....	62
Figure 22 : Structures chimiques des AB primaires étudiés	63
Figure 23 : Structures chimiques des AB secondaires étudiés.....	64
Figure 24 : A : Structure tridimensionnelle des AB ; B : Hydrophobicité des AB (155)	65
Figure 25 : Cycle entéro-hépatique	66
Figure 26 : Voies du métabolisme des AB.....	68
Figure 27 : Les transporteurs des AB dans le cycle entéro-hépatique	69
Figure 28 : Rôle de signalisation cellulaire des AB impliquant les récepteurs FXR et TGR5	72
Figure 29 : Contextes physiologiques et physiopathologiques de variation des acides biliaires chez l'humain.....	79
Figure 30 : Principe du dosage enzymatique des acides biliaires	81
Figure 31 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de dosage des AB	83
Figure 32 : Objectifs de ce travail de thèse	85
Figure 33 : Protocole de mesure d'activation d'un récepteur par transfection transitoire	98
Figure 34 : Spectre HRMS et analyse élémentaire du 5-OH-MEHT en mode d'ionisation négatif.....	149
Figure 35 : A : Chromatogramme des métabolites du DEHT, transitions MRM quantifiantes et qualifiantes (en rouge) et conditions chromatographiques. B : Gradient d'élution.	151
Figure 36 : Courbe de calibration du 5-OH-MEHT de 5 à 400 nM.....	152
Figure 37 : Chromatogramme représentant l'analyse des métabolites du DEHT dans un échantillon de lysat cellulaire issu de cellules HepG2 incubées avec du DMSO	153
Figure 38 : Chromatogramme représentant l'analyse des métabolites du DEHT dans un échantillon de lysat cellulaire issu de cellules HepG2 incubées avec du DEHT à 50 μ M (500 nmol) durant 48 h	154

Figure 39 : Chromatogramme représentant l'analyse des métabolites du DEHT dans un échantillon de lysat cellulaire issu de cellules HepG2 incubées avec du MEHT à 50 μ M (500 nmol) durant 48 h	155
Figure 40 : Courbes dose-réponse et EC ₅₀ du DEHP, DEHT, MEHP et MEHT sur le récepteur PPAR α humain. Wy14643 à 10 μ M comme référence. n = 3.	157
Figure 41 : Chromatogramme du C4 et du C4-d7, transitions MRM quantifiantes (en rouge), conditions chromatographiques et gradient d'élution.	160
Figure 42 : Courbe de calibration du C4 de 1 à 200 nM	161
Figure 43 : Chromatogramme des AB, conditions chromatographiques et gradient d'élution	165
Figure 44 : Courbe de calibration de 1,5 à 2000 nM et chromatogramme du GDCA	166
Figure 45 : Structures chimiques du 3-oxo-LCA, isoallo-LCA et LCA	166
Figure 46 : Greffage des phases stationnaires F5 et POLAR C ₁₈	167
Figure 47 : Chromatogramme de l'isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA obtenue sur la phase stationnaire POLAR C ₁₈	170
Figure 48 : Chromatogramme de l'isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA obtenue sur la phase stationnaire F5	171
Figure 49 : Courbes de calibration de l'isoallo-LCA et du 3-oxo-LCA de 5 à 500 nM	172
Figure 50 : Courbes dose-réponse et EC ₅₀ du Phe-CA, Tyr-CA, Leu-CA, isoallo-LCA, 3-oxo-LCA sur le récepteur FXR humain. GW4064 à 1 μ M comme référence. n = 3.	174
Figure 51 : Courbes dose-réponse et EC ₅₀ du Phe-CA, Tyr-CA, Leu-CA, isoallo-LCA, 3-oxo-LCA sur le récepteur TGR5 humain. LCA à 10 μ M comme référence. n = 3	175
Figure 52 : Chromatogramme obtenu après extraction du C4 à partir de plasma	176
Figure 53 : Chromatogramme obtenu après extraction du C4 à partir de lysat cellulaire issu de cellules HepG2	177
Figure 54 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de plasma	178
Figure 55 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de lysat cellulaire issu de cellules HepG2. Concentrations en AB présentées dans le tableau	179
Figure 56 : Rendements d'extraction des 7 AB-deutérés à partir de foie selon les 3 protocoles testés	180
Figure 57 : Effets de matrice des 7 AB-deutérés à partir de foie selon les 3 protocoles testés	180
Figure 58 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de foie de souris	181
Figure 59 : Rendements d'extraction des 7 AB-deutérés à partir de contenu caecal selon le protocole testé	182
Figure 60 : Effets de matrice des 7 AB-deutérés à partir de contenu caecal selon le protocole testé	183
Figure 61 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de contenu caecal de souris	183
Figure 62 : Chromatogramme obtenu après essais d'extraction de l'isoallo-LCA et du 3-oxo-LCA à partir de contenu caecal de souris. Les transitions MRM deux AB dérivés du LCA sont indiquées en rouge	184
Figure 63 : Chromatogramme obtenu après essais d'extraction avec ajout dosé de 125 nM de l'isoallo-LCA et du 3-oxo-LCA à partir de contenu caecal de souris. Les transitions MRM deux AB dérivés du LCA sont indiquées en rouge.	185
Figure 64 : Rendements d'extraction des 7 AB-deutérés à partir d'urine selon les 3 protocoles testés	186
Figure 65 : Effets de matrice des 7 AB-deutérés à partir d'urine selon les 3 protocoles testés	187

Figure 66 : Effets de matrice de 6 AB-deutérés (sans CA-d4) à partir d'urine selon les 3 protocoles testés	187
Figure 67 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir d'urine.....	188
Figure 68 : Résumé graphique extrait de la publication Grzych et al. (2021) JEHP Reports.	212
Figure 69 : Résumé graphique de la publication Chávez-Talavera et al. (2020) Metabolism Clinical and Experimental.....	216
Figure 70 : Résumé graphique de la publication Marciniak et al. (2021) Am J Physiol Endocrinol Metab.....	222
Figure 71 : Résumé graphique de la publication Lalloyer et al. (2023) Journal of Hepatology	225

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des principaux plastifiants associés au PVC dans les dispositifs médicaux.....	31
Tableau 2 : NOAEL et DNEL du DEHP et de ses plastifiants alternatifs	38
Tableau 3 : Taux d'absorption des plastifiants chez l'humain selon différentes voies d'exposition.....	51
Tableau 4 : Demi-vies et pourcentages d'excrétion des plastifiants et de leurs métabolites dans les urines.....	55
Tableau 5 : Temps de rétention et paramètres de spectrométrie de masse pour l'analyse des métabolites du DEHT.....	150
Tableau 6 : Paramètres optimisés de la source ESI pour l'analyse des métabolites du DEHT	150
Tableau 7 : LOD et LOQ des métabolites du DEHT	152
Tableau 8 : Temps de rétention et paramètres de spectrométrie de masse pour l'analyse du C4	159
Tableau 9 : Paramètres optimisés de la source ESI pour l'analyse du C4.....	160
Tableau 10 : Temps de rétention, paramètres de spectrométrie de masse, limites de détection (LOD) et limites de quantification (LOQ) des AB.....	162
Tableau 11 : Paramètres optimisés de la source ESI pour l'analyse des AB.....	164
Tableau 12 : Paramètres de spectrométrie de masse (transitions MRM et énergie de collision EC) du LCA et de ses dérivés	167
Tableau 13 : Comparaison des performances de deux phases stationnaires (F5 et POLAR C ₁₈) pour la séparation de l'isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA	168

Liste des abréviations

AB : Acides biliaires
AB-AA : Acides biliaires conjugués aux acides aminés
ACN : acétonitrile
ADME : Absorption/Distribution/métabolisme/élimination
AJ : Apport journalier
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique
ARMED : Assessment and risk management of medical devices in plasticized polyvinylchloride
ATBC : Citrate tributylque d'acétyl
C18/C8 : Phase stationnaire en silice greffée avec des chaînes octadécyles/octyles
C4 : 7 α -hydroxy-4-cholestén-3-one
CAR : Constitutive Androstane Receptor
CGR : Concentré de globules rouges
CMR : Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique
CP : Concentré plaquettaire
CS : Calibration standard
CV : Coefficient de variation
CXP : Cell Exit Potential
CYP27A1 : Cytochrome P450 family 27 sub-family A member 1
CYP7A1 : Cytochrome P450 family 7 sub-family A member 1
CYP8B1 : Cytochrome P450 family 8 sub-family B member 1
DAD : Détecteur à barrettes de diodes
DCHP : Dicyclohexylphthalate
DEHA : Adipate di-2-éthylhexyle
DEHP : Phtalate de di-2-éthylhexyle
DEHT : Téréphtalate de di-2-éthylhexyle
DINA : Adipate diisononyle
DINCH : Hexahydrophthalate de diisononyle
DINP : Phtalate de diisononyle
DJT : Dose journalière tolérable
DM : Dispositifs médicaux
DMP : Phtalate de diméthyle
DNEL : Dose dérivée sans effet
DNOP : Phtalate de di-n-octyle
DP : Declustering Potential
DT2 : Diabète de type 2
EC : Energie de collision
EC50 : Concentration efficace médiane
EI : Etalon interne
EMA : European Medicines Agency
EP : Entrance Potential
ESI : Ionisation par électrospray
eV : Électronvolt
FGF15/19 : Fibroblast Growth Factor 15/19
FGFR4 : Fibroblast Growth Factor Receptor 4
FIA : Flow Injection Analysis
FID : Détection par ionisation de flamme

FXR : Farnesoid X Receptor
 GC : Chromatographie en phase gazeuse
 GLP-1 : Glucagon like peptide-1
 HepG2 : Lignée cellulaire humaine d'hépatocarcinome
 HLB : Phase stationnaire composée de polymère poly(divinylbenzène-co-N-vinylpyrrolidone)
 HOMA-IR : Homeostasis Model Assessment of Insulino Resistance
 HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
 HSSE : Extraction par adsorption en espace de tête
 IE : Impact électronique
 IMC : Indice de masse corporelle
 IR : Insulino-résistance
 IS : internal standard
 ISO : International Organization for Standardization
 J : Jour
 L : Litre
 LBP : Produits sanguins labiles
 LC : Chromatographie en phase liquide
 Leu : Leucine
 LLE : Extraction en phase liquide
 LMA : Limites de migration acceptables
 LOD : Limite de Détection
 LOQ : Limite de Quantification
 m/z : Masse/charge
 ME : Matrix effect (effets de matrice)
 MRM : Multiple Reaction Monitoring
 MS : Spectrométrie de masse simple
 MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
 NAD : Nicotinamide adenine dinucléotide
 NADH : Nicotinamide adenine dinucléotide réduite
 NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique
 NASH : Non-alcoholic Steatohepatitis
 NOAEL : Dose sans effet indésirable observé
 PBS : Phosphate Buffer Saline
 PE : Polyéthylène
 Phe : Pénylalanine
 PP : Polypropylène
 PPAR : Récepteur nucléaire activé par des proliférateurs de peroxysomes
 PS : Polystyrène
 PU : Polyuréthane
 PVC : Polychlorure de vinyle
 PXR : Pregnane X Receptor
 QI : Quotient intellectuel
 RSD : Relative standard deviation
 RYGB : Roux-en-Y Gastric Bypass
 S/B : Signal/bruit
 SBSE : Extraction par adsorption sur un barreau d'agitation
 SIM : Single Ion Monitoring
 SPE : Extraction en phase solide
 SPME : Micro-extraction en phase solide
 ST : Sang total

TDAH : Trouble de l'attention, de l'hyperactivité et de l'impulsivité
TGR5 : Récepteur membranaire couplé à une protéine G
TOTM : Triméllitate de trioctyle
 t_R : Temps de rétention
Tyr : Tyrosine
UE : Union Européenne
UV : Ultra-Violet
VDR : Vitamin D Receptor
VS : Validation standard
 $\mu\text{M}/\text{nM}$: micromol/litre ou nmol/litre

Introduction générale

Ce travail de thèse s'articule autour de deux grands axes que j'ai pu étudier en réalisant ma thèse à temps partiel, en collaboration avec l'U1011 INSERM, en parallèle de mon poste d'ingénieure d'études au sein de l'ULR7365 GRITA.

1) Les plastifiants, y compris les phtalates, ont été identifiés comme cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques (CMR) de catégorie 1b et comme perturbateurs endocriniens. Le di-2-éthylhexyle phtalate (DEHP) est l'un des plastifiants les plus courants et est généralement associé au polychlorure de vinyle (PVC) dans les dispositifs médicaux. Le DEHP n'étant pas lié de manière covalente au PVC, il peut facilement migrer dans des matrices lipophiles et atteindre ensuite la circulation sanguine. Il est métabolisé par le foie en mono-2-éthylhexyle phtalate (MEHP), tout aussi toxique. Ces dernières années, des plastifiants alternatifs au DEHP ont été développés, tels que l'hexahydrophthalate de diisononyl (DINCH) et le di-2-éthylhexyl téréphtalate (DEHT), qui sont métabolisés *in vivo* respectivement en ester mono-isononylique de l'acide cyclohexane-1,2-dicarboxylique (MINCH) et en mono-2-éthylhexyl téréphtalate (MEHT).

2) Les acides biliaires (AB) constituent une large famille de stéroïdes composée de nombreuses molécules. Ils sont synthétisés dans le foie et l'intestin et représentent la voie principale de catabolisme du cholestérol. Le 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) est le marqueur circulant de la synthèse des AB. Les AB jouent un rôle essentiel dans l'absorption des lipides mais également dans la signalisation cellulaire, étant ligands du récepteur nucléaire « Farnesoid X receptor » (FXR) et du récepteur membranaire couplé aux protéines G, TGR5. Ces récepteurs, et donc leurs ligands, sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose, des lipides et de la dépense énergétique. Toute modulation du profil des AB peut donc conduire à une modification de l'homéostasie métabolique.

De manière intéressante, des données de la littérature ont montré que des phtalates et leurs métabolites modulent l'activité du récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR α), régulateur clé de l'homéostasie métabolique et de l'expression de l'enzyme du gène codant la CYP7A1 (enzyme majeure de la synthèse hépatique des AB). Les plastifiants

pourraient donc avoir un potentiel impact sur le profil des AB et de ce fait, contribuer à la régulation de l'homéostasie métabolique.

Afin d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse, des développements analytiques ont été menés pour quantifier les plastifiants, leurs métabolites mais aussi les AB dans diverses matrices. Des essais préliminaires *in vitro* visant à évaluer l'activité des différents plastifiants sur le récepteur PPAR α ont été mis en place.

Ce manuscrit se divise en cinq parties. La première partie (contexte scientifique) correspond à un état de l'art, d'une part, à propos des plastifiants et, d'autre part, des AB. La deuxième partie (matériels et méthodes) décrit les aspects expérimentaux mis en place au cours de ce travail de thèse. La troisième partie (résultats) présente les résultats obtenus sous forme, notamment, de trois articles dont je suis auteur principal. La quatrième partie (applications) met en lumière, par le biais de quatre articles dont je suis co-auteur, les applications du dosage des AB dans le contexte de la maladie cardiométabolique. La cinquième partie (discussion générale) discute des principaux résultats obtenus et présente les perspectives de ce travail.

Contexte scientifique

1 Les plastifiants

1.1 Le plastique et ses additifs

Depuis 2004, le monde a produit autant de plastique qu'au cours du demi-siècle précédent, et l'on estime que la masse totale de plastiques vierges fabriqués s'élève à 8,3 milliards de tonnes. Les emballages représentent environ un tiers de tous les plastiques utilisés (1).

En 2021, la production mondiale de plastique a été de 390 millions de tonnes. La Chine en produit le tiers et l'Europe environ 15 % (58 millions de tonnes), principalement produits en Allemagne, Italie et France (2).

Les matières plastiques englobent les thermoplastiques, les thermodurcissables et les élastomères. Les thermoplastiques sont des matériaux pouvant être déformés par la chaleur, de manière réversible, et dont le durcissement a lieu lors du refroidissement. Le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS) et le polychlorure de vinyle (PVC) en sont des exemples. Les thermodurcissables, quant à eux, sont des matériaux qui se rigidifient par chauffage, de manière irréversible. A titre d'exemple, les polyuréthanes (PU) en font partie. Les élastomères sont des matériaux aux propriétés élastiques qui peuvent être déformés de manière réversible à température ambiante. Les caoutchoucs naturels (latex) et synthétiques (nitrile, néoprène) en sont des exemples (3).

Le plastique est devenu un matériau de choix de par sa résistance, sa légèreté et son faible coût. Son procédé de fabrication permet une production à grande échelle, c'est pourquoi ses usages sont très variés (4).

De nombreux produits de notre quotidien, domestiques ou professionnels, sont faits de plastique et utilisés dans des domaines alimentaires, médicaux ou encore industriels. Cette multitude de produits engendre une exposition humaine au plastique, aussi bien d'un point de vue écologique que sanitaire. Il fait l'objet de nombreuses études depuis ces dernières années, notamment à causes des additifs qui lui sont associés (5).

En effet, les produits manufacturés en plastique, particulièrement les thermoplastiques, nécessitent une association entre une matrice constituée par un polymère et des substances chimiques, les additifs. Sans l'adjonction de certains constituants, la matière brute ne pourrait être exploitée. Le rôle des additifs est de conférer des caractéristiques particulières aux produits finis, de permettre la transformation de la matière plastique, d'augmenter sa durée de vie ou de baisser son coût de production (6). A titre d'exemples, des catalyseurs, durcisseurs et solvants peuvent être ajoutés afin d'amorcer ou catalyser les réactions de polymérisation ou de réticulation. Les colorants, pigments et plastifiants ont, quant à eux, pour but de modifier les propriétés intrinsèques du matériau tels que l'aspect, la souplesse, la flexibilité (7).

La production de matière plastique nécessite donc l'ajout de nombreuses substances chimiques. Les teneurs en additifs sont très variables, allant de quelques dixièmes de pourcent à plus de 100 % de la masse du polymère. Les plastifiants représentent la majorité des additifs utilisés, avec des teneurs pouvant atteindre jusqu'à 70 % (masse/masse) (8).

1.2 Les plastifiants

1.2.1 Généralités

Les plastifiants sont des substances chimiques organiques relativement peu volatiles à l'état liquide ou solide et dont la masse molaire est comprise entre 200 et 600 g/mol. La norme ISO 472 de 2013 appliquée aux plastifiants leur accorde la définition suivante : « substances de volatilité faible ou négligeable, incorporées à un plastique, destinées à abaisser son intervalle de ramollissement, faciliter sa mise en œuvre et augmenter sa flexibilité ou son extensibilité » (9). En effet, afin de conférer une souplesse et une flexibilité à la matière plastique, notamment au PVC, des plastifiants y sont additionnés et y sont liés de manière non covalente.

Dans le but de mieux comprendre le procédé de plastification, trois théories sont avancées : la théorie de la lubrification, la théorie des gels et la théorie du volume libre. Elles sont illustrées dans la Figure 1.

- La théorie de la lubrification postule que le plastifiant réduit les forces de liaisons en s'insérant entre deux chaînes de polymères.
- La théorie des gels part du principe que la rigidité d'un polymère provient d'une structure tridimensionnelle. Le plastifiant agirait en brisant un certain nombre de ponts interchaînes.

- La théorie du volume libre suppose que les plastifiants augmentent le volume libre en s'intercalant entre les chaînes macromoléculaires et favorisent ainsi le déplacement des chaînes les unes par rapport aux autres.

Les modifications de la structure tridimensionnelle de la matrice dans laquelle sont incorporés les plastifiants conduisent à la déformation plastique des matériaux, leur apportant souplesse et flexibilité (10).

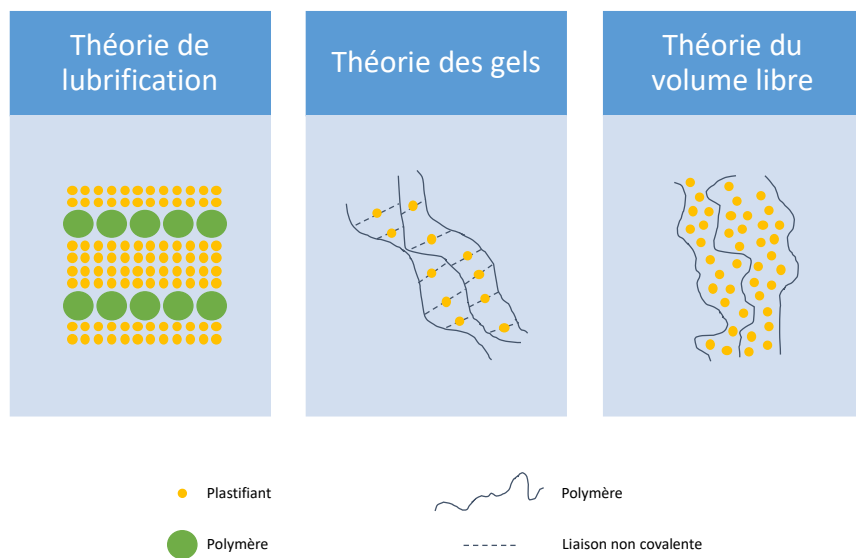
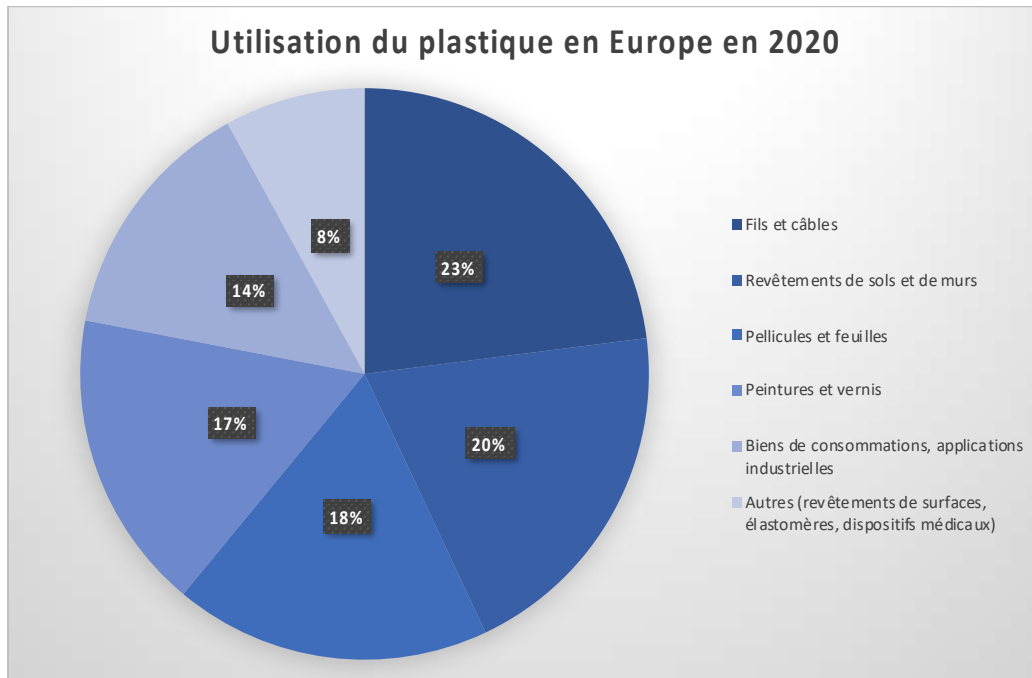


Figure 1 : Illustration des trois théories du procédé de plastification (Adaptée de Bocqué et al. (11))

Au vu des propriétés qu'ils confèrent à la matière plastique, les plastifiants sont très largement utilisés et leur production mondiale ne cesse de croître, s'élevant à 7,5 millions de tonnes pour l'année 2020. Leurs applications sont très variées et leurs parts de marché ont été répertoriées pour le marché européen par IHS Markit. Elles sont présentées en Figure 2.

Les plastifiants sont très souvent utilisés en association au PVC, qui compte à lui seul pour 85 % de la consommation totale en plastifiants en Europe (11).



Source : 2020 IHS and European Plasticizers estimates

Figure 2 : Domaines d'applications du plastique en Europe en 2020 (12)

La structure chimique du PVC est présentée en Figure 3.

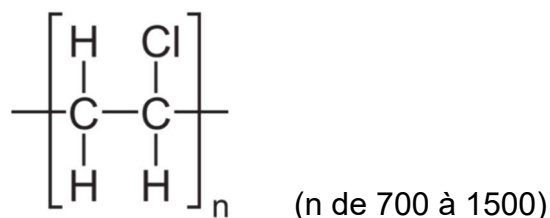


Figure 3 : Structure chimique du PVC

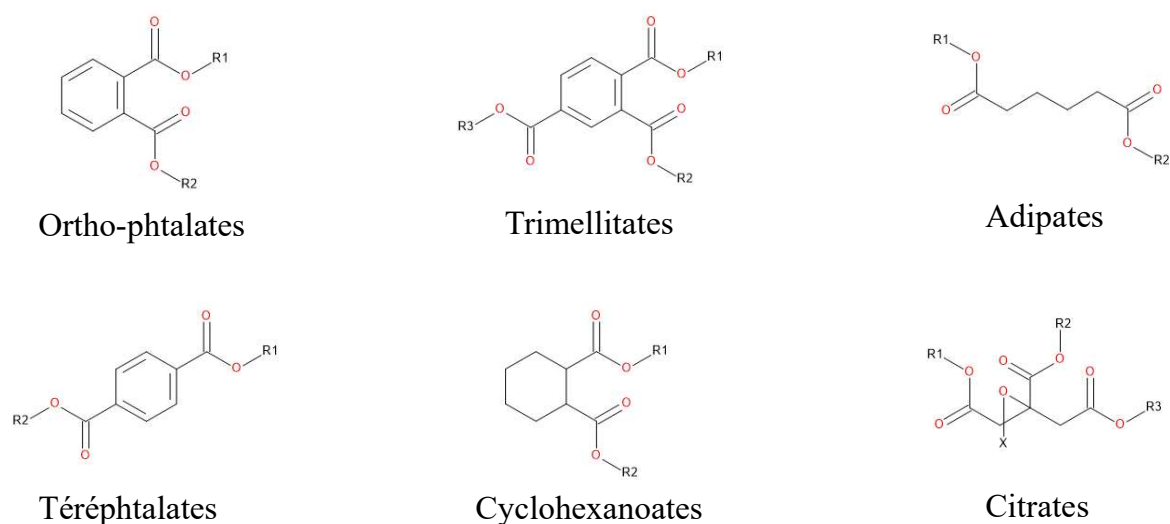
Il existe une cinquantaine de plastifiants disponibles sur le marché, tous issus de la pétrochimie ou de la biomasse. Le choix du plastifiant se fait selon son champ d'application et divers critères qui lui sont propres tels que son efficacité à assouplir la matière plastique, sa stabilité, sa toxicité ou encore son coût. Les tendances observées sur le marché montrent une forte disparité, les plastifiants issus de la pétrochimie étant majoritairement utilisés. La famille des esters de l'acide phtalique (les ortho-phtalates et les téréphtalates) domine le marché avec 69 % de parts de marché. Les cyclohexanoates, les benzoates et les trimellitates se partagent 22 % de parts de marché. La part restante regroupe tous les autres plastifiants (12).

1.2.2 Les structures et propriétés physico-chimiques des plastifiants

Au vu de la grande diversité de plastifiants commercialisés, il s'avère complexe d'en faire une description exhaustive. Afin de refléter au mieux les plastifiants utilisés dans notre domaine d'application, nous présenterons uniquement les plastifiants associés au PVC, notamment ceux présents dans les dispositifs médicaux.

Leurs structures sont très diverses et les principaux plastifiants utilisés dans ce domaine sont les phtalates, les trimellitates, les cyclohexanoates et les hydrocarbures aliphatiques acycliques (adipates, citrates) (11,13).

Leurs structures chimiques générales sont présentées en Figure 4.



*Figure 4 : Structures chimiques générales des familles de plastifiants associés au PVC
(R1 et R2 : chaînes alkyles de longueurs variables)*

Leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leurs usages seront décrits dans les paragraphes suivants.

1.2.2.1 Les phtalates

Les phtalates forment un groupe de composés chimiques industriellement synthétisés, non-persistants, introduits dans les années 1920 sur le marché mondial (14).

Ils sont synthétisés par réaction de l'anhydride phtalique avec un alcool, variant par sa chaîne carbonée (C1 à C13). Plus le phtalate est ramifié, plus il possède d'isomères et plus il est hydrophobe (14).

Ce sont des composés lipophiles avec un bas point de fusion et un haut point d'ébullition, ce qui leur confère des propriétés idéales pour apporter de la flexibilité au PVC, notamment (15). Dans certains produits, leur taux peut atteindre 60 % du produit fini.

Il est possible de distinguer les ortho-phthalates et les téréphtalates, qui se différencient par une isomérisation de position des fonctions esters.

1.2.2.2 Les ortho-phthalates

La structure des ortho-phthalates (communément appelés phthalates) comporte un cycle benzénique substitué par deux fonctions esters en ortho, chacune liée à un groupement alkyle de longueur variable (R1 et R2). La structure commune aux phthalates est représentée en Figure 4.

Deux groupes peuvent être définis :

- Les phthalates de bas poids moléculaire dont les chaînes alkyles comportent un à six atomes de carbone tel que le phthalate de diméthyle (DMP).
- Les phthalates de haut poids moléculaire dont les chaînes alkyles comportent sept à treize atomes de carbone tels que le phthalate de di-2-éthylhexyle (DEHP), le phthalate de di-n-octyle (DNOP) ou le diisononyle (DINP).

Leurs structures chimiques sont présentées en Figure 5.

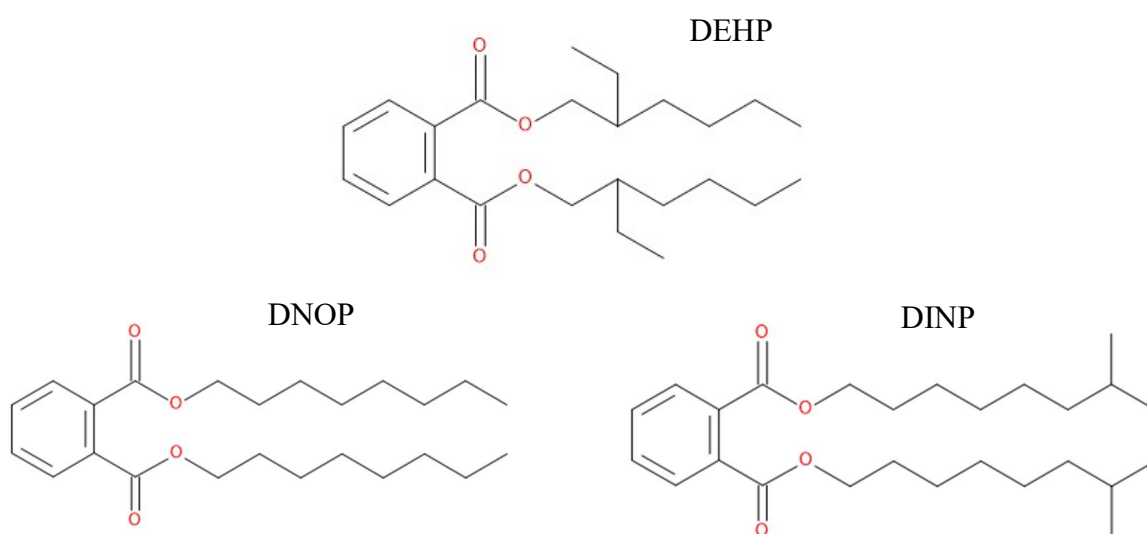


Figure 5 : Structures chimiques du DEHP, du DNOP et du DINP

Les phtalates constituent la famille de plastifiants la plus utilisée, notamment le DEHP qui a été synthétisé pour la première fois en 1933 (14). Ils sont largement employés dans les emballages alimentaires, les cosmétiques, les jouets et les dispositifs médicaux. Les phtalates de haut poids moléculaire apportent flexibilité et durabilité au polymère. Ceux de bas poids moléculaire permettent le maintien des couleurs, des parfums ou de la brillance du matériau (14).

1.2.2.3 Les téréphtalates

La structure des téréphtalates comporte un cycle benzénique substitué par deux fonctions esters en para, chacune liée à un groupement alkyle de longueur variable (R1 et R2). La structure chimique commune aux téréphtalates est présentée en Figure 4.

Le téréphtalate le plus répandu est le téréphtalate de di-2-éthylhexyle (DEHT). Sa structure chimique est présentée en Figure 6.

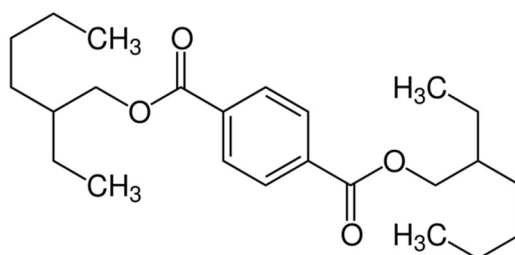


Figure 6 : Structure chimique du DEHT

Il s'agit d'un isomère de position du DEHP qui pourrait être considéré comme un composé alternatif à celui-ci. En effet, de par la toxicité avérée du DEHP (développé dans la partie 1.1.8), des plastifiants alternatifs tel que le DEHT ont été développés pour le remplacer. Il est utilisé dans les jouets, la formulation de peinture et les dispositifs médicaux (11).

1.2.2.4 Les trimellitates

Les trimellitates ont une structure proche de celle des phtalates. Leur structure comporte un noyau benzénique substitué par trois fonctions esters fonctionnalisées par des groupements alkyles, R1, R2 et R3. Leur structure commune est présentée en Figure 4.

Le trimellitate de trioctyle (TOTM) est le plus utilisé, notamment dans les dispositifs médicaux, associé au PVC. Sa structure est présentée en Figure 7.

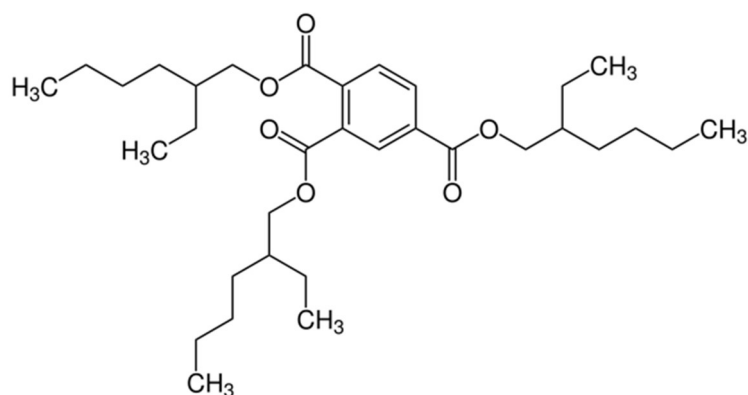


Figure 7 : Structure chimique du TOTM

1.2.2.5 Les cyclohexanoates

Les cyclohexanoates sont des hydrocarbures aliphatiques cycliques. La structure chimique commune à ces plastifiants est présentée en Figure 4.

L'hexahydrophthalate de diisononyle (DINCH) appartient à cette famille. Sa structure est présentée en Figure 8.

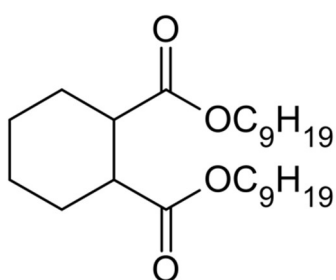


Figure 8 : Structure chimique du DINCH

Il est utilisé dans la fabrication des dispositifs médicaux, comme plastifiant alternatif au DEHP, dans les jouets, dans les emballages alimentaires et dans les cosmétiques (11).

1.2.2.6 Les adipates

Les adipates sont des diesters aliphatiques acycliques. Les di-2-ethylhexyl adipate (DEHA) et le diisononyl adipate (DINA) en font partie. Leurs structures chimiques sont présentées en Figure 9 et Figure 10.

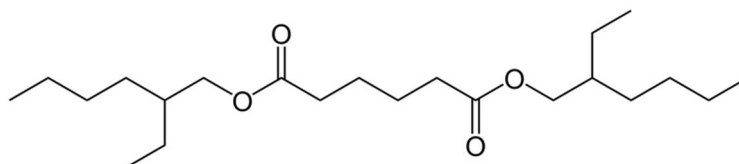


Figure 9 : Structure chimique du DEHA

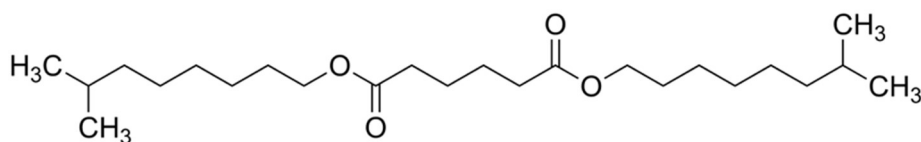


Figure 10 : Structure chimique du DINA

Ils sont utilisés dans la fabrication des jouets, des gants, des tubulures ou encore comme émoullients (11).

1.2.2.7 Les citrates

Les citrates sont des triesters aliphatiques acycliques.

A titre d'exemple, le citrate tributylque d'acétyle (ATBC) appartient à cette famille. Sa structure chimique est présentée en Figure 11.

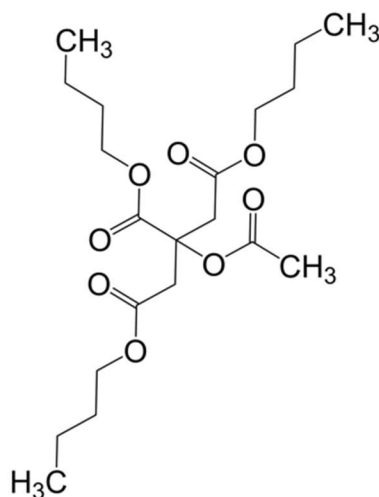


Figure 11 : Structure chimique de l'ATBC

Ils sont principalement utilisés dans la fabrication des dispositifs médicaux, des jouets et des emballages alimentaires (11).

1.2.2.8 Les propriétés physico-chimiques des plastifiants

La proportion de plastifiants introduits lors de la plastification a un fort impact sur son efficacité. Cette dernière dépend également du type de plastifiant utilisé : sa performance est étroitement liée aux propriétés physico-chimiques des plastifiants.

Ces propriétés vont également impacter la migration du plastifiant utilisé dans un dispositif médical (contenant), par exemple, vers les fluides en contact (contenu). Cet aspect sera développé dans la partie 1.1.4.

Le Tableau 1 présente les principales propriétés physico-chimiques des plastifiants décrits ci-dessus (16) (11).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des principaux plastifiants associés au PVC dans les dispositifs médicaux

	DEHP	DEHT	DEHA	DINP	DINCH	TOTM
Masse molaire (g/mol)	390.56	390.56	370.57	418.61	424.65	546.78
Densité (g/cm ³) à 20 °C	0.98	0.98	0.92	0.97	0.95	0.99
Point de fusion (°C)	-50.0	-67.2	-67.8	-54.0	-54.0	-43
Point d'ébullition (°C)	385	363	214	424	245	283
Pression de vapeur (Pa à 25 °C)	7.6 x 10 ⁻⁴	2.4 x 10 ⁻⁴	5.5 x 10 ⁻³	1.7 x 10 ⁻⁵	1.3 x 10 ⁻⁴	3.1 x 10 ⁻³
log kw (à 25 °C)	7.5	8.3	8.4	9.5	10.0	8.0
Solubilité dans l'eau (mg/L à 25 °C)	2.5 x 10 ⁻³	2.4 x 10 ⁻⁴	5.5 x 10 ⁻³	1.7 x 10 ⁻⁵	8.8 x 10 ⁻⁶	3.1 x 10 ⁻³

Le choix du plastifiant utilisé lors de la fabrication d'un produit va s'effectuer selon trois critères liés à la plastification : son efficacité, sa compatibilité et sa durabilité.

- L'efficacité se traduit comme la capacité d'un plastifiant à réduire la rigidité d'un polymère. Les plastifiants possédant une structure aromatique vont permettre d'augmenter le volume libre au sein du polymère alors que les structures linéaires vont améliorer la mobilité à l'échelle moléculaire en s'intercalant entre les chaînes du polymère. La nature des chaînes alkyles ainsi que la masse molaire du plastifiant sont également des paramètres importants à prendre en compte pour juger de l'efficacité de la plastification.

- La compatibilité correspond à l'aptitude d'un plastifiant à se mélanger et à rester dispersé au sein du polymère. Elle dépend du pouvoir de solvation d'un plastifiant. Les plastifiants possédant une structure aromatique présentent un excellent pouvoir de solvation en favorisant les interactions électriques avec le polymère.

- La durabilité est représentée par la pérennité des propriétés plastifiantes qui sont propres au produit plastifié. Les plastifiants à haut poids moléculaire, peu volatils, permettent de conserver ces propriétés plus longtemps. Les chaînes alkyles ramifiées conditionnent également une meilleure durabilité.

En fonction de l'application souhaitée, certains critères seront privilégiés et le choix du plastifiant se révélera complexe mais essentiel (17) (18).

1.3 Applications médicales du PVC plastifié

Chaque année en Europe, environ 30 000 tonnes de PVC plastifiés sont utilisées pour la fabrication de dispositifs médicaux (DM) stériles ou non stériles, principalement des tubulures flexibles et des gants à usage médical (19).

Les DM stériles fabriqués en PVC plastifiés (20) sont :

- Les tubulures pour perfusion, transfusion ou nutritons parentérale et entérale
- Les circuits de type CEC (circulation extracorporelle), ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) ou les lignes d'hémodialyse
- Les canules veineuses, artérielles, aortiques et de trachéotomie
- Les sondes
- Les poches de perfusion sanguine, de transfusion sanguine et de recueil d'urine
- Les cathéters
- Les tubulures d'oxygénothérapie (circuit des respirateurs)

Les DM non stériles fabriqués en PVC plastifiés sont (19):

- Les masques et les lunettes nasales
- Les gants médicaux

Les plastifiants autorisés dans la fabrication des DM sont spécifiés par la Pharmacopée Européenne et le règlement européen 2017/745 relatif aux DM fixe à 0,1 % (m/m) la teneur maximale autorisés en additifs classés Cancérigènes Mutagènes Reprotoxiques (CMR) 1a ou 1b et en perturbateurs endocriniens (21).

1.4 Migration et exposition au plastifiants

Les plastifiants sont liés de manière non covalente au polymère (matière plastique), ce qui engendre une migration élevée s'ils sont placés au contact d'une solution favorisant ce phénomène telles que des solutions hydroalcooliques (15). Le simulant le plus utilisé afin d'étudier cette migration est un mélange eau/éthanol 50/50 (v/v), mimant les caractéristiques physico-chimiques d'une émulsion lipidique (22). Après 24 heures de contact entre ce simulant et un matériau en PVC-DEHP utilisé dans les DM, 1/8^{ième} du DEHP initialement présent dans le DM avait migré dans le simulant (23). Ce relargage est une problématique bien connue, aussi bien dans le domaine alimentaire, cosmétique ou encore médical. Les plastifiants sont susceptibles de diffuser du contenant vers le contenu, atteignant ainsi l'organisme humain (24) (25) (19). Nous nous intéresserons plus particulièrement à cette problématique dans le contexte des DM.

Le DEHP est le phtalate le plus utilisé sur le marché de par ses propriétés de plastification inégalées, mais aussi celui qui suscite le plus de préoccupations en matière de santé publique (25). En effet, son relargage est très important en présence d'une solution favorisant ce phénomène et il présente de nombreux effets néfastes sur la santé humaine, sur lesquels nous reviendrons en détails dans la partie 1.1.7. Il est classé CMR 1B depuis 2008 par UE *regulation* 1272/2008 (26) et son usage a été interdit dans les jouets et les produits de puériculture (27) (28). En dehors de la France, qui a interdit l'utilisation du DEHP depuis 2015 dans certains services de soins comme la pédiatrie, le DEHP reste le plastifiant le plus utilisé dans les DM en Europe, même si l'utilisation du TOTM, DINCH, ATBC, DINP, DEHT et DEHA a augmenté (29).

Depuis 2015, il est demandé de favoriser son remplacement par des plastifiants alternatifs en tenant compte de leur efficacité, de leur relargage et de leur toxicité (30).

Le remplacement du DEHP n'est pas chose facile, notamment dans les DM, parce qu'il favorise la conservation à la fois des globules rouges, en stabilisant les membranes cellulaires, et du concentré plaquettaire préparés tous deux dans des dispositifs de transfusion (31).

Les plastifiants alternatifs les plus utilisés sur le marché, notamment ceux présents dans les dispositifs médicaux, sont le TOTM, le DINCH, le DINP, le DEHT, le DEHA et l'ATBC (11) (32) (33) (20).

Le TOTM est le plastifiant alternatif le plus utilisé actuellement en France, notamment dans les tubulures de DM (29).

Des facteurs divers peuvent accentuer la migration du plastifiant dans les DM (Figure 12) : la nature du plastifiant, la température, les débits de perfusion, le pH, le temps de contact (15) et la lipophilie du contenu (24).

Les études de migration des plastifiants sont, pour la plupart, réalisées *ex vivo*. Elles nécessitent l'utilisation d'un simulant qui permet de mimer la situation réelle à étudier. Dans le cadre des DM, ce simulant peut-être du sang, un solvant ou un mélange de solvants. Le mélange de solvants est le plus couramment utilisé, il s'agit généralement d'un mélange eau/éthanol (50/50, volume/volume). Il est représentatif des émulsions lipidiques (22).

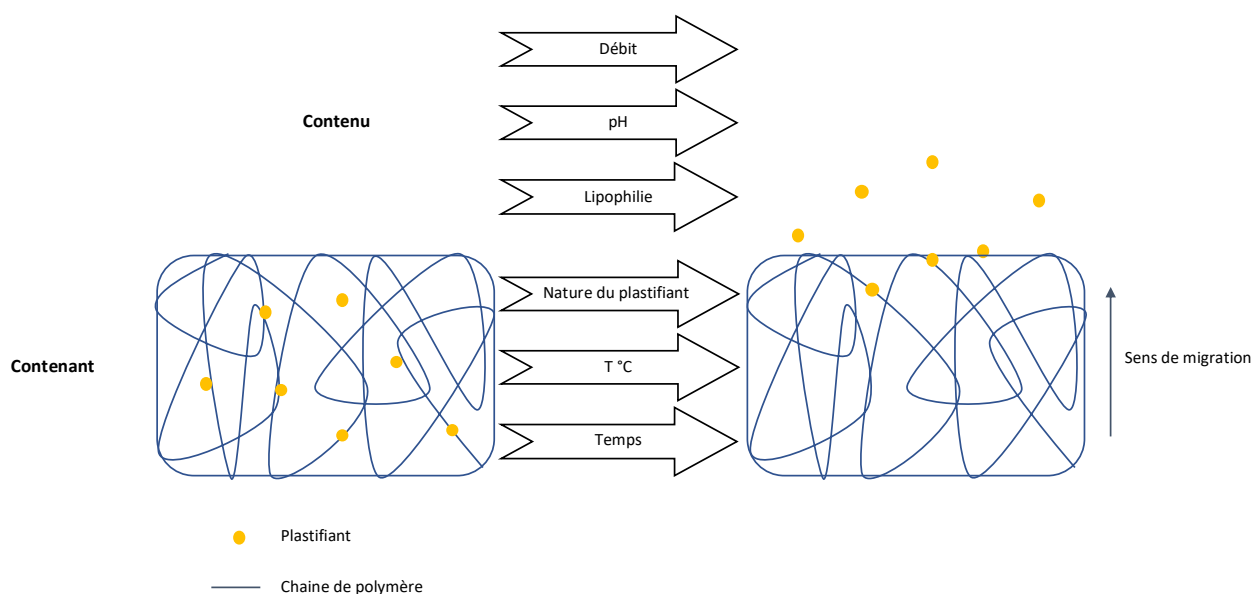


Figure 12 : Schématisation de la migration des plastifiants du contenant (DM) vers le contenu

- La nature du plastifiant : Pour un même DM, les plastifiants ne migrent pas tous de façon identique (23). Le DEHP migre d'avantage que les autres plastifiants, de par ses propriétés physico-chimiques. Certains plastifiants alternatifs tels que le DEHA et l'ATBC présentent une migration similaire à celle du DEHP dans un simulant composé d'un mélange eau/éthanol 50/50 (v/v). A l'inverse, le DINCH, le DINP, de DEHT et le TOTM migrent moins (19), notamment le TOTM qui présente un relargage 350 fois moins important que celui du DEHP dans une matrice sanguine (34).
- La température : La température influence la quantité de plastifiant relargué dans le contenu du matériel plastifié. Par exemple, le pourcentage de relargage du DEHP est positivement corrélé aux conditions de stockage des poches de nutrition parentérale (35). Il a été montré qu'après 24 h de stockage d'une poche de nutrition parentérale à 4°C, 35 mg de DEHP sont dosés dans la solution. Lorsque la même poche est stockée 24 h à température ambiante, 80 mg de DEHP sont dosés dans la solution de nutrition parentérale. La migration du DEHP est donc limitée à basse température.
- Les débits de perfusion : Lors d'une perfusion, plus le débit augmente, plus le volume perfusé est important et plus la quantité de plastifiant reçue est élevée pour une même durée de perfusion. *Bernard et al.* (36) a étudié l'influence du débit sur la migration de divers plastifiants dans des sets d'infusion. Un débit d'infusion passant de 8 mL/h à 100 mL/h augmente d'un facteur 7 la migration du TOTM dans le simulant (eau/éthanol 50/50 v/v). La migration du DEHT, DINCH et DINP est respectivement augmentée d'un facteur 3,6, 3,4 et 2,3. Pour une même durée de perfusion, plus le débit est élevé, plus le patient est exposé aux plastifiants (36).
- Le temps de contact : Plus le temps de contact entre le contenant et le contenu est long, plus le relargage semble être important. Une étude menée sur des poches de sang plastifiées en DEHP montre une migration plus importante du plastifiant dans le sang après 21 jours de contact plutôt qu'après 24 h de contact (37). La même observation a été relevée dans le domaine vestimentaire : plus le contact du vêtement plastifié est long, plus la quantité de plastifiant retrouvé sur la peau est importante (38).
- Le pH : Le pH de la solution en contact avec le produit plastifié peut influencer la quantité de plastifiant relargué dans la solution elle-même. Cette problématique est aussi bien retrouvée

dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (39). En effet, la migration des phtalates a été étudiée dans de l'eau minérale en bouteille en fonction du pH. Les phtalates de bas poids moléculaires sont facilement hydrolysés à pH acide ou basique alors qu'ils le sont beaucoup moins à pH neutre, favorisant ainsi leur migration.

- La lipophilie du contenu : Les solutions lipophiles, comme les solutions parentérales, sont capables de favoriser la libération de davantage de composés lipophiles (comme le DEHP ou le DEHA) des DM (35).

Les limites de migration acceptables se définissent par la quantité maximale acceptable de plastifiant pouvant migrer d'un contenant vers un contenu. Il n'existe pour le moment pas de réglementation régissant les limites de migration acceptables des plastifiants dans les DM mais le règlement UE 2017/745 (21) spécifie que les substances reconnues CMR ou perturbatrices endocriniennes ne doivent pas excéder une concentration de 0,1 % (masse/masse) dans les DM. Dans le cas contraire, des justifications doivent être apportées, notamment sur l'absence d'alternative possible.

Récemment, dans le cadre du projet ARMED (Assessment and risk management of medical devices in plasticized polyvinylchloride) qui a pour but d'évaluer et gérer les risques liés aux DM en PVC plastifié, un modèle de migration du DEHP et des plastifiants alternatifs dans les DM de perfusion a été développé et des limites de migration acceptables (LMA) ont été définies (40). Le calcul a été décrit ainsi :

$$LMA (mg/dm^2) = \frac{DNEL (mg/kg/j)}{2 (L/j) * 13 (dm^2)} * 60$$

Avec DNEL (*Derived No Effect Level* (dose dérivée sans effet)) : Le seuil maximal d'exposition à la substance auquel l'humain peut être soumis sans danger pour sa santé. L : litre et j : jour.

Il s'appuie sur le postulat qu'un adulte de 60 kg est susceptible de recevoir 2 litres de médicaments par jour *via* une surface de 13 dm² de tubulures en PVC plastifié.

Les plastifiants, et particulièrement le DEHP, sont omniprésents dans notre environnement quotidien. En effet, une majorité des produits qui nous entourent sont constitués de plastique additionné de plastifiants, aussi bien pour un usage domestique que professionnel. Il est possible

d'être exposé aux plastifiants de manière directe, lors de l'utilisation des produits, ou de manière indirecte, par la dissémination des plastifiants dans les milieux environnants.

L'exposition globale aux plastifiants dans la population mondiale n'est pas facile à estimer. Pour cela, il est tout d'abord nécessaire de disposer de valeurs de référence :

- L'apport journalier (AJ ou DI en anglais) permet d'évaluer le niveau d'exposition aux composés chimiques, toutes voies d'exposition confondues. La plupart du temps, cette valeur est déterminée par une méthode de *biomonitoring* sur une cohorte de la population. Les métabolites urinaires des plastifiants sont dosés et sommés afin d'estimer l'AJ en $\mu\text{g/kg/j}$.
- La dose sans effet indésirable observé (NOAEL de l'anglais *No Observed Adverse Effect Level*) correspond à la dose la plus élevée d'une substance chimique ne produisant aucun effet nocif observable. Elle est déterminée par des études de toxicité chez l'animal.
- La dose dérivée sans effet (DNEL, de l'anglais *Derived No-Effect Level*) est une valeur toxicologique de référence qui représente le seuil maximal d'exposition à la substance auquel l'être humain peut être soumis sans danger pour sa santé. Elle est élaborée à partir de la dose critique déterminée par la NOAEL et elle est souvent 100 à 1000 fois plus faible que celle-ci, par sécurité.
- La dose journalière tolérable (DJT ou TDI de l'anglais *Tolerable Daily Intake*) est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la dose d'une substance pouvant être ingérée tout au long d'une vie sans risque sanitaire notable. Les DJT des plastifiants sont représentées par leurs DNEL par voie orale.

Les NOAEL du DEHP et de ses plastifiants alternatifs ont été en partie déterminées chez la souris (19) et les DNEL moyennes sont disponibles (41) pour une administration à long terme, toute voie d'exposition confondue (voie orale, respiratoire et cutanée). Elles sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : NOAEL et DNEL du DEHP et de ses plastifiants alternatifs

mg / kg masse corporelle / j	NOAEL toxicité par dose répétée ou toxicité chronique	NOAEL génotoxicité	NOAEL cancérogénicité	NOAEL reprotoxicité	DNEL moyenne
DEHP	29/36 male / femelle	n.d.	98	4,8	0,30
DINP	15	n.d.	112	50	79,90
DINCH	107/389 male/femelle	n.d.	40/200 male/femelle	1000	16,00
DEHT	584/617 male/femelle	n.d.	79/102 male/femelle	458/747 male/femelle	4,92
DEHA	40	n.d.	n.d.	200	6,23
TOTM	100/1000 male/femelle	n.d.	n.d.	100/1000 male/femelle	4,45

Les données concernant la génotoxicité des plastifiants est méconnue. Chez l'animal, de grandes disparités des NOAEL liées au sexe ont été mises en évidence. Les DNEL fixées chez l'humain sont inférieures à 6,5 mg / kg de masse corporelle / jour pour le DEHP, le DEHT, le DEHA et le TOTM. Les DNEL de DINP et du DINCH ont été fixées comme inférieures à 80 mg / kg de masse corporelle/ jour.

Divers paramètres peuvent influencer le niveau d'exposition aux plastifiants chez l'être humain comme l'âge, le genre, le lieu de résidence ou encore le travail (24).

- L'âge : Les niveaux d'exposition aux plastifiants diminuent avec l'âge. Les enfants semblent plus exposés que les adultes (42) (43). Cela peut être expliqué par leur contact répété avec les jouets qu'ils vont facilement porter à la bouche. Leur exposition *via* l'alimentation est également particulièrement importante puisqu'ils sont à un stade crucial de croissance et de développement (44) (45).
- Le genre : Les femmes semblent être plus exposées aux plastifiants *via* les produits de soin et les cosmétiques, qu'elles utilisent plus largement que les hommes de manière générale. Il a été montré que les métabolites de plastifiants tels que le DEHP ont été retrouvés en concentrations plus importantes dans les urines provenant de femmes (46) (47).
- Le lieu de résidence : Le pays de résidence est un paramètre d'exposition à ne pas négliger, puisque la législation concernant l'utilisation des plastifiants est différente selon les régions du monde. De plus, le lieu de vie, urbain ou rural, peut faire varier les niveaux d'exposition

aux plastifiants. Par exemple, des concentrations plus élevées en métabolites du DEHP ont été retrouvées chez des Autrichiens vivant en milieu urbain (48).

- Le travail : Certains métiers peuvent favoriser l'exposition à de nombreuses substances dangereuses pour la santé humaine, tel que le DEHP. Il a été montré que les travailleurs d'usine d'incinération de déchets et de l'industrie plastique présentaient des taux particulièrement élevés de métabolites de plastifiants (49).

Il apparaît donc évident que les sources d'exposition sont vastes et que l'exposition aux plastifiants peut survenir *via* différentes voies (Figure 13).

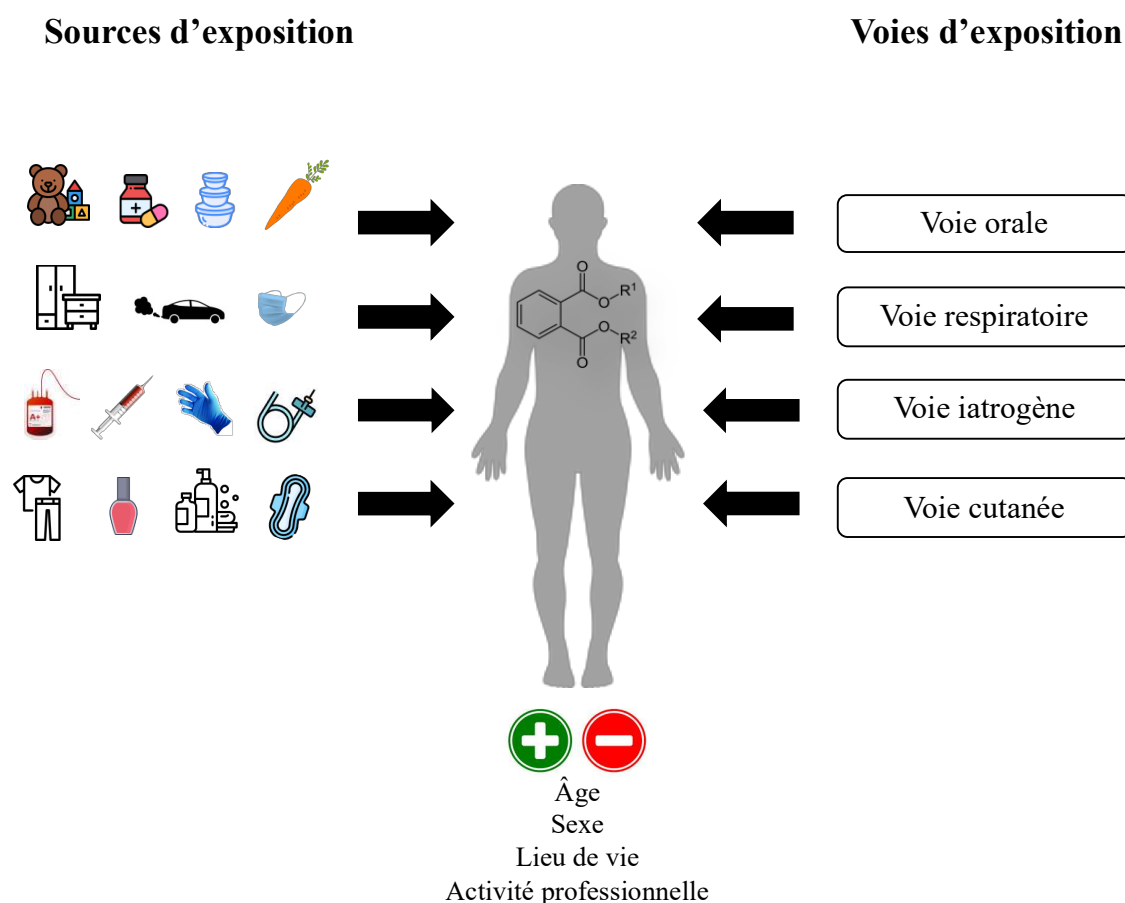


Figure 13 : Sources et voies d'exposition aux plastifiants chez l'humain

1.4.1 Voie orale

La voie orale est une des principales voies d'exposition aux plastifiants de la population générale (25). Les sources de contamination liées à cette voie sont l'alimentation, certains médicaments, les jouets destinés aux enfants en bas âge et la poussière.

- L'alimentation : Les études concernant la présence de plastifiants dans les denrées alimentaires sont nombreuses (50) (51) (52) (53). Ils ont été dosés dans les boissons, les produits laitiers, les poissons, les viandes, les fruits ou encore les légumes. Le DEHP est le plastifiant majoritairement détecté, allant jusqu'à des concentrations de 5,9 mg / kg dans le poisson commercialisé sur le marché belge (52). Il a également pu être détecté dans des légumes et des fruits cultivés sous serre en Chine (51). Le plastique utilisé pour la construction de la serre est suspecté de migrer dans l'air, processus favorisé par la chaleur, contaminant ainsi les cultures.

La contamination de ces aliments peut provenir de l'air environnant, du procédé industriel de fabrication mais aussi des emballages alimentaires. En effet, les plastifiants présents dans les emballages peuvent migrer vers les aliments (53) et les contaminer. Une étude italienne montre que la contamination au DEHP d'un aliment après emballage augmente de 113 % (50). Les aliments gras (huiles végétales, poissons) favorisent la contamination, la lipophilie étant un paramètre impactant positivement la migration des plastifiants. Le lait maternel est ainsi un milieu qui peut être contaminé par des plastifiants suite à l'alimentation (54). Les nourrissons, dès leur naissance, sont susceptibles de subir ce type de contamination.

- Les médicaments : Le secteur pharmaceutique utilise des polymères pour l'obtention de formes galéniques particulières comme les comprimés enrobés ou les formes orodispersibles. Les plastifiants permettent de rendre le polymère plus modelable et ils participent également à la cinétique de libération du principe actif (55).
- Les jouets : L'exposition aux plastifiants peut également survenir par migration des plastifiants dans la salive. Les jeunes enfants, qui portent facilement leurs jouets en plastique à la bouche, sont particulièrement exposés (56). Bien que le DEHP soit dorénavant interdit dans les articles de puériculture en Europe, l'exposition aux plastifiants alternatifs demeure importante.

- La poussière : L'air intérieur peut être plus ou moins chargé en poussière. Cette poussière est une source de contamination aux plastifiants, qui s'adsorbe sur ces particules. Les poussières peuvent être ingérées, notamment par les jeunes enfants qui passent beaucoup de temps proches du sol (57).

1.4.2 Voie respiratoire

La voie respiratoire est la deuxième voie d'exposition aux plastifiants de la population générale. Les plastifiants peuvent être libérés dans l'atmosphère, étant des composés semi-volatils.

- La poussière : La poussière est une source de contamination par voie orale, mais plus largement, par voie respiratoire. L'adsorption des phtalates sur les particules de poussière favorise l'exposition de la population générale par cette voie (58). Cependant, les plastifiants ne sont pas des substances persistantes et leur dégradation est favorisée par le rayonnement solaire (59).
- L'urbanisation : La présence des plastifiants dans l'air est principalement liée à l'activité humaine. Les concentrations en plastifiants dans l'air sont plus importantes dans le milieu urbain, de par la densité de population et les émissions issues des transports (60).
- L'air intérieur : La qualité de l'air intérieur est dépendante de nombreux facteurs : le bâti, l'ameublement, le revêtement de sol, l'aération. Elle est variable selon les lieux : l'hôpital, l'industrie, le logement. Il s'avère que les professionnels du corps médical sont particulièrement exposés aux plastifiants présents dans l'air intérieur tels que le DEHP ou le DNOP (61). Ceci s'expliquerait par le temps passé à l'hôpital, le nombre de DM et autres matériels en plastique ou encore le port du masque chirurgical.
Les sols en PVC plastifiés, qui relarguent des quantités élevées de plastifiants lors de fortes chaleurs, participent également à la pollution de l'air intérieur (62).
- Les cosmétiques : Certains produits cosmétiques favorisent la volatilisation des plastifiants et contaminent les voies respiratoires. Les vernis à ongles, les laques ou encore les déodorants en spray sont responsables de l'exposition aux plastifiants par inhalation (63).

1.4.3 Voie cutanée

L'exposition aux plastifiants par la voie cutanée n'est pas à négliger. Notre peau est en contact direct quotidien avec des produits contenant des plastifiants.

- Les cosmétiques : Les plastifiants contenus dans les cosmétiques en spray sont principalement inhalés. Cependant, les cosmétiques tels que les lotions, les crèmes, les déodorants en bille, les shampoings ou encore les gels douche sont appliqués directement sur l'épiderme. Dans ces produits, les plastifiants sont utilisés comme agents émollients, agents humectant, agents de fixation de couleur, agent parfumant ou comme solvant (64). Les produits à formule sans rinçage comme les déodorants ou les parfums contiennent de fortes concentrations en plastifiants (65). Les produits d'hygiène féminine sont particulièrement concernés puisqu'ils contiennent des phtalates et sont directement en contact avec les muqueuses (66). La réglementation concernant les produits cosmétiques n'est pas identique sur tous les marchés, c'est pourquoi des différences de concentrations en plastifiants ont été notées entre le marché Européen (contamination de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$) et le marché Nord-Américain (concentration de l'ordre du mg / kg) (67) (68).
- Les vêtements : Le port de vêtements, bien que nécessaire, est une source de contamination aux plastifiants. La migration des plastifiants vers l'épiderme a été démontrée par *Gong et al.* qui détecte un taux de plastifiants significativement plus faible sur une peau nue plutôt que sur une peau ayant été en contact avec des vêtements (69). Les gants de protection en nitrile, vinyle ou néoprène, portés dans le milieu professionnel relarguent également des plastifiants, notamment associés à l'usage de solvants (70). Le DEHP n'a pas été détecté dans des gants en nitrile, néoprène ou latex. Cependant, la quantité de DEHP présente dans des gants en vinyle peut atteindre jusqu'à 4 % (masse / masse) (71). Néanmoins, l'usage de gants de protection s'avère indispensable pour la sécurité des manipulateurs.

1.4.4 Voie iatrogène

L'exposition aux plastifiants peut également avoir lieu *via* les DM utilisés lors de protocoles hospitaliers. Cette voie d'exposition concerne particulièrement les patients hospitalisés. Les plastifiants sont présents dans les poches de perfusion, de transfusion, de nutrition parentérale, de dialyse, les cathéters, les sondes nasogastriques, les tubulures... (72). L'exposition à ces sources est occasionnelle mais peut conduire à des taux d'exposition bien supérieurs à ceux

retrouvés dans l'environnement (19), ce qui est problématique, notamment pour les populations à haut risque tel que les nouveau-nés et les femmes enceintes (15). Bien que le DEHP ait été interdit dans les DM destinés aux unités néonatales, les nouveau-nés n'en restent pas moins exposés aux plastifiants alternatifs comme le TOTM, le DINP, l'ATBC, le DEHA, le DEHT ou encore le DINCH.

Certains actes médicaux présentent plus de risque de contamination que d'autres, tels que la transfusion sanguine, la nutrition parentérale ou encore la dialyse (19). Le relargage des plastifiants est variable selon le DM mais il est estimé, par exemple, que les tubulures fabriquées en PVC-DEHP relarguent jusqu'à 21 % de leur DEHP par jour d'utilisation, notamment dans les solutions lipophiles (24,35). Les patients hospitalisés en unité de soins intensifs, multi-perfusés, sont donc spécifiquement exposés, tout comme les donneurs de sang. Les donneurs de plaquettes semblent particulièrement contaminés au DEHP, probablement à cause de la procédure d'aphérèse. Les donneurs présentent une AJ de 32 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ contre 6,2 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{j}$ pour les non-donneurs (42).

Les conditions de stockage des DM (température, durée) peuvent également aggraver cette exposition puisqu'elles peuvent favoriser la migration du plastifiant dans le contenu du DM, qui sera par la suite administré au patient (15).

1.5 Méthodes d'analyse des plastifiants dans différents milieux complexes

Afin de pouvoir mesurer l'exposition aux plastifiants, il est nécessaire de développer des méthodes d'analyse adaptées. Elles se décomposent en trois étapes successives : la préparation de l'échantillon, la séparation des analytes d'intérêt et leur détection. Il est indispensable que les méthodes développées soient sélectives, reproductibles, exactes, précises et suffisamment sensibles pour quantifier les plastifiants, en particulier dans les matrices biologiques.

Nous ne nous intéresserons, dans cette partie, qu'aux techniques analytiques permettant de doser les plastifiants et leurs métabolites dans des matrices biologiques. Les méthodes permettant leur dosage dans les matériaux des DM ne seront pas abordées.

Il est tout d'abord essentiel d'être vigilant à la contamination des échantillons par les plastifiants ubiquitaires dans le laboratoire lors de leur recueil, leur préparation et de leur analyse. Ils peuvent être présents dans les dispositifs de prélèvement, les dispositifs de stockage, les solvants, les consommables en plastique, le matériel en verre, les appareils d'analyse ainsi que dans l'air du laboratoire (73). C'est en partie pourquoi la majorité des études préfère quantifier

les métabolites des plastifiants plutôt que les plastifiants eux-mêmes, les métabolites étant les meilleurs indicateurs d'exposition aux plastifiants (73).

L'urine est considérée comme la matrice biologique contenant les plus fortes concentrations de métabolites, 30 à 100 fois plus que dans le sang, du fait de leur métabolisme relativement rapide (74). De plus, il s'agit d'une matrice biologique facilement accessible de manière non invasive.

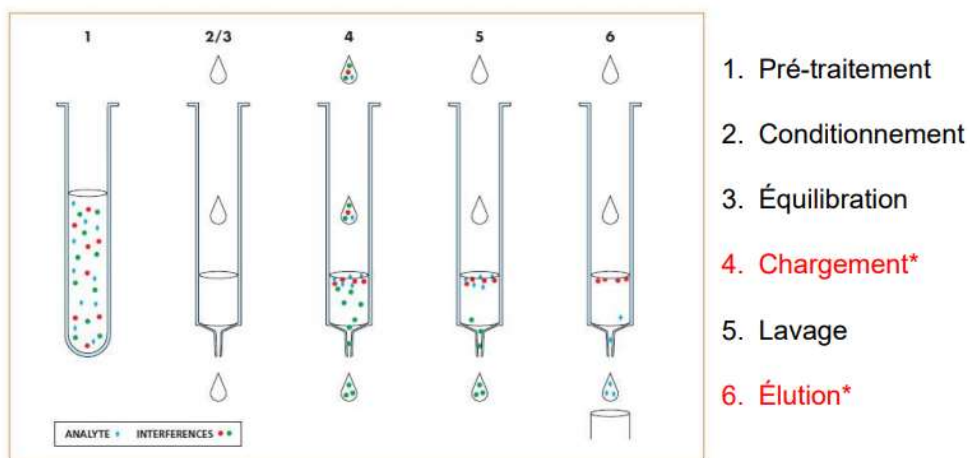
Il existe tout de même de larges études épidémiologiques qui quantifient les plastifiants dans le sang ou le lait maternel (14). Bien que le recueil d'un échantillon sanguin soit plus invasif, les concentrations sanguines permettent d'estimer les concentrations en plastifiants circulants, essentielles dans les études de toxicocinétiques. Quant aux concentrations retrouvées dans le lait maternel, elles sont le reflet du niveau d'exposition aux plastifiants de la mère et de l'enfant mais aussi de l'équilibre entre l'exposition, le taux de clairance métabolique et le passage dans le lait maternel (74).

La préparation des échantillons biologiques est une étape clé de la méthode analytique. En effet, les interférents provenant de la matrice biologique peuvent mettre à mal l'exactitude et la précision de la méthode. L'utilisation d'un standard interne (le plus souvent isotope stable de l'analyte d'intérêt), lorsque cela est possible, permet de corriger les variations dues à la préparation des échantillons.

1.5.1 Techniques de préparation des échantillons biologiques pour le dosage des plastifiants

1.5.1.1 *Extraction en phase solide*

L'extraction en phase solide (SPE) est une technique de préparation des échantillons qui permet d'extraire les composés d'intérêt de la matrice par rétention de ceux-ci sur une phase stationnaire, contenue dans une cartouche. La procédure d'extraction comprend quatre grandes étapes successives : le conditionnement/équibration de la phase stationnaire à l'aide d'un solvant adapté, le chargement de l'échantillon pré-traité ou non, le lavage afin d'éluer les interférents potentiels et l'élution des plastifiants d'intérêt (Figure 14). Le pré-traitement de l'échantillon biologique peut consister en une simple dilution, une précipitation de protéines ou une extraction liquide-liquide.



* Étapes critiques en termes de maîtrise du débit

Figure 14 : Étapes de l'extraction en phase solide SPE (D'après le webinaire- RESTEK Solutions pour la préparation d'échantillons).

L'analyte d'intérêt est représenté en bleu alors que les interférences sont représentées en rouge et vert. Le pré-traitement de l'échantillon (étape 1) consiste en une simple dilution, une précipitation de protéines ou une extraction liquide-liquide

La rétention des analytes est conditionnée par leur structure chimique et la composition de la phase stationnaire. Des phases stationnaires de différentes propriétés physico-chimiques sont disponibles sur le marché, ce qui permet de choisir la phase la plus appropriée à la rétention des analytes étudiés. La rétention des plastifiants est obtenue grâce à des phases stationnaires apolaires. Il s'agit en général de silice greffée par des chaînes octadécyles (C18) (75) ou de polymère poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone (HLB) (76,77).

L'élution des interférents, provenant de l'adsorbant ou de la matrice biologique, et celle des analytes d'intérêt s'obtiennent grâce à des solvants de force d'élution différentielle. Les plastifiants sont le plus souvent élués grâce à de l'acétonitrile, du méthanol, de l'acétate d'éthyle ou encore de l'heptane.

Une étape d'évaporation peut être ajoutée en fin de procédure afin de concentrer l'échantillon avant injection sur un instrument d'analyse.

La SPE est une des techniques les plus utilisées pour l'extraction de plastifiants de matrices biologiques telles que le lait maternel, l'urine ou encore le sang (75) (76) (77) (78) (79). Les rendements d'extraction obtenus grâce à la SPE sont compris entre 81 et 100 % pour des plastifiants tels que le DEHP et le DNOP.

Cependant, il a été rapporté que la phase stationnaire des cartouches SPE pouvaient être une source de contamination aux plastifiants. Il est recommandé de les rincer grâce à un solvant organique avant toute utilisation (73,74). La SPE en-ligne permet de réduire les contaminations en limitant le traitement et la manipulation des échantillons par automatisation de la procédure en couplage avec les instruments d'analyse (80).

1.5.1.2 Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide (LLE) est réalisée au moyen de solvants organiques non miscibles avec la solution aqueuse contenant l'échantillon. Le choix des solvants dépend des propriétés physico-chimiques des analytes à extraire. Comme présenté dans la Figure 15, les deux phases non miscibles sont mises en contact par agitation : l'échantillon en solution aqueuse et le solvant d'extraction. Les deux phases seront séparées par décantation.

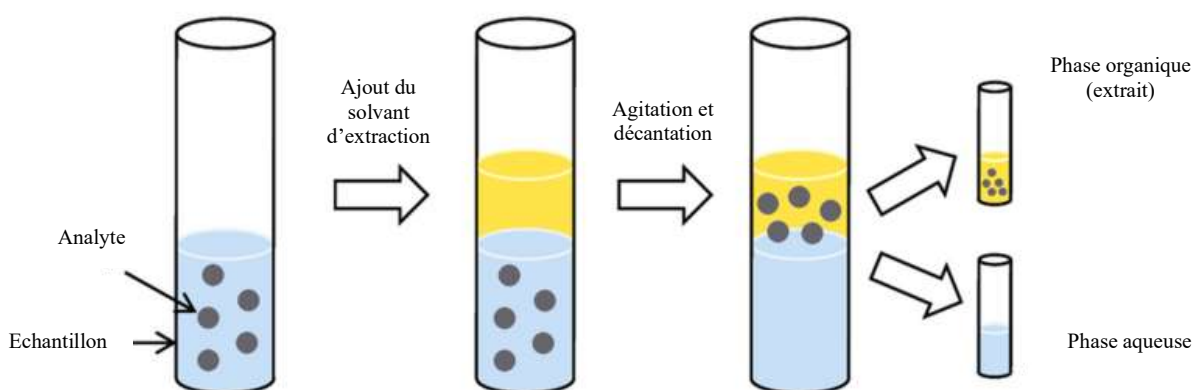


Figure 15 : Étapes de l'extraction liquide-liquide LLE (Schéma adapté de Soares et al. (80))

Afin d'obtenir une extraction optimale des composés d'intérêt, ces derniers doivent présenter une grande affinité pour le solvant d'extraction, affinité obtenue en maîtrisant le pH de la solution aqueuse (analytes sous forme moléculaire).

Cette technique est simple à mettre en œuvre et demande peu de matériel. Cependant, afin d'extraire au mieux les plastifiants des matrices biologiques, plusieurs extractions successives sont bien souvent nécessaires pour obtenir des rendements d'extraction satisfaisants.

De faibles volumes de solvants sont suffisants pour extraire les plastifiants des matrices biologiques. Les solvants majoritairement employés sont l'hexane, l'heptane, le cyclohexane

ou encore l'acétate d'éthyle (81–84). Les rendements d'extraction obtenus grâce à la LLE sont de l'ordre de 80 % pour le DEHP et le DINCH.

1.5.1.3 Micro-extraction par adsorption-désorption

Il existe diverses techniques de micro-extraction par adsorption-désorption telles que la micro-extraction en phase solide (SPME), par adsorption en espace de tête (HSSE) et par adsorption sur un barreau d'agitation (SBSE). Il s'agit de techniques de préparation d'échantillons uniquement adaptées à une analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC). La SPME est la seule technique utilisée dans le cadre de l'extraction des plastifiants des matrices biologiques, je ne présenterai donc que celle-ci.

La technique SPME est réalisée à l'aide d'un film polymérique pour l'extraction des composés volatils. Le polymère adsorbant se présente sous forme de revêtement d'une fibre de silice ou de graphène, insérée dans une aiguille. L'aiguille est introduite dans un récipient clos dans lequel se trouve l'échantillon et immergée dans celui-ci (Figure 16). Les analytes chargés sur la fibre sont ensuite désorbés en ligne sous l'action de la chaleur directement dans l'injecteur du GC.

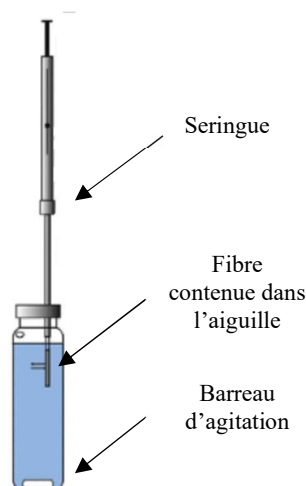


Figure 16 : Illustration du prélèvement par SPME (Adaptée de Laaks et al. (85))

L'extraction par SPME est simple et rapide. La fibre peut être réutilisée plusieurs fois mais elle peut être endommagée par les échantillons, ce qui mène à un manque de reproductibilité dans l'extraction. Elle a cependant été utilisée avec succès pour l'extraction des métabolites de plastifiants dans l'urine et le sérum, et a permis leur dosage par GC couplée à la spectrométrie de masse (MS) (85,86) (87).

Les procédures d'extraction constituent un travail pré-analytique indispensable, quelle que soit la méthode analytique choisie pour la séparation et la détection de nos composés d'intérêt. Elles permettent de minimiser les effets de matrice et de maximiser les rendements d'extraction.

Elles peuvent être suivies de diverses techniques d'analyses, qui permettront la quantification des plastifiants et de leurs métabolites dans des matrices biologiques. Pour cela, il est nécessaire de disposer de techniques d'analyses performantes. Il s'agit majoritairement de techniques séparatives couplées à différents détecteurs.

1.5.2 Méthodes d'identification et de quantification

1.5.2.1 *Techniques séparatives : chromatographie*

La chromatographie de partage permet de séparer des composés en mélange. Les analytes se séparent selon leur partage différentiel entre la phase stationnaire et la phase mobile. En chromatographie d'élution, la phase stationnaire est contenue dans une colonne et elle est caractérisée par son affinité pour les composés à séparer. La phase mobile peut être à l'état gazeux (GC) ou liquide (LC). Elle circule dans le système chromatographique afin de permettre la migration des composés jusqu'au détecteur. L'élution des analytes est liée à leurs propriétés physico-chimiques mais aussi à l'équilibre entre la phase stationnaire et la phase mobile.

Chromatographie en phase gazeuse (GC)

La GC est une technique séparative utilisant une phase mobile gazeuse pour séparer les composés en mélange. Les échantillons sont vaporisés dans l'injecteur puis atteignent la phase stationnaire grâce à la phase mobile, un gaz inerte appelé gaz vecteur, majoritairement de l'hélium. Cette technique s'applique à des molécules volatiles ou semi-volatiles et thermostables. La rétention des analytes est liée à la nature de la phase stationnaire, à sa longueur ainsi qu'à la température d'ébullition des analytes. Les colonnes chromatographiques capillaires contenant une phase stationnaire apolaire composée d'un film de polysiloxane fonctionnalisé par des groupements phényles et méthyles sont principalement utilisées pour l'analyse des plastifiants (47,84,87,88). La variation de température (gradient) appliquée à la phase stationnaire va permettre l'élution et la séparation des composés d'intérêt.

En ce qui concerne l'analyse des plastifiants par GC, il est souvent nécessaire de réaliser une étape de dérivation, en plus de la préparation des échantillons biologiques, afin d'améliorer la

volatilité des plastifiants semi-volatils (84,88). *Kim et al.* (84) réalise une alkylation suivie d'une silylation et *Kondo et al.* (88) utilise le diazométhane dans l'éther diéthylique pour dériver les phtalates. Cette étape est souvent longue et fastidieuse à mettre en place.

Chromatographie en phase liquide (LC)

La LC est une technique qui permet de séparer des composés en mélange grâce à une phase mobile liquide composée d'un mélange de solvants. Au contraire de la GC, elle est adaptée à l'analyse des composés non volatils et/ou thermolabiles. Les plastifiants sont principalement étudiés en chromatographie liquide à polarité de phase inversée (75,76,81,89–94). Dans cette configuration, les phases stationnaires sont apolaires, composées de silice greffée par des groupements alkyles de longueurs variables (C₈ et C₁₈) ou par des groupements phényles. La phase mobile est composée d'eau et de solvants organiques tels que l'acétonitrile ou le méthanol. La séparation chromatographique peut être effectuée selon deux modes : le mode isocratique (proportions de solvants constantes) et le mode gradient (proportions de solvants variables en fonction du temps). Le mode gradient est le plus utilisé pour la séparation des plastifiants car il permet de modifier la force éluante au cours du temps.

1.5.2.2 Détection

Afin d'identifier et de quantifier les composés d'intérêt séparés, la chromatographie est couplée à un détecteur. Pour l'analyse des plastifiants dans des matrices biologiques, la GC est couplée à la spectrométrie de masse (47,84,87,88) et la LC peut être couplée à un détecteur à barrette de diodes (81) ou à un spectromètre de masse (75,76,89–94). Ces détecteurs seront décrits dans les prochains paragraphes.

Détecteur à barrette de diodes (DAD)

Le DAD mesure en sortie du système chromatographique l'absorbance du rayonnement émis par les échantillons. Il est possible d'enregistrer le signal à plusieurs longueurs d'onde de manière simultanée. Les substances colorées émettent un signal dans le domaine du visible alors que les molécules possédant un groupement chromophore ont la capacité d'absorber l'énergie du rayonnement UV. L'analyse des plastifiants tel que le DEHP peut être réalisée dans le domaine de l'UV. Les longueurs d'ondes de mesure sont comprises entre 220 et 240 nm. Le DAD peut être couplé à la LC pour quantifier de manière sensible les plastifiants dans des matrices biologiques (81), même si cette détection a été très peu exploitée dans ce domaine.

Spectromètre de masse

Le spectromètre de masse est le détecteur de choix pour l'identification et la quantification des plastifiants et de leurs métabolites à l'état de traces dans des matrices biologiques (95,96). Il peut être couplé à la GC ou à la LC. Il est composé de trois éléments essentiels : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

- Les sources d'ionisation : La source d'ions à impact électronique (IE) est une source à ionisation dite « dure » : elle favorise la fragmentation des ions. Elle est utilisée lors d'un couplage avec la GC, formant des espèces (M^+) (47,84,87,88).

La source d'ionisation par électrospray (ESI) permet une ionisation dite « douce », elle fragmente très peu les ions, tout comme la source par ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Elles sont utilisées lors d'un couplage à la LC. Les analytes peuvent être ionisés en mode d'ionisation négatif $[M-H]^-$ ou en mode d'ionisation positif $[M+H]^+$. De manière générale, les plastifiants sont ionisés en mode d'ionisation positif alors que leurs métabolites sont ionisés en mode d'ionisation négatif (74).

- Les analyseurs : L'analyseur de masse permet de séparer les ions produits dans la source en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Les analyseurs les plus utilisés pour la quantification des plastifiants sont des quadripôles, simple (MS) ou triple (MS/MS). L'analyseur le plus utilisé pour l'identification des plastifiants est l'analyseur à trappe orbitale, qui est un spectromètre de masse de haute résolution (HRMS) (97).

L'analyseur MS/MS est principalement utilisé en mode multiple reaction monitoring (mode « MRM ») afin d'atteindre une très grande spécificité et de doser les plastifiants à l'état de traces (95,96).

1.6 Pharmacocinétique des plastifiants

La pharmacocinétique étudie le devenir des xénobiotiques, tels que les plastifiants, au cours du temps pour une exposition donnée. Les plastifiants sont absorbés, distribués dans l'organisme, métabolisés et éliminés, quelle que soit leur voie d'exposition. Ces différentes phases (absorption, distribution, métabolisme et élimination : ADME) seront détaillées dans les paragraphes suivants.

1.6.1 Absorption

L'absorption correspond à l'incorporation d'une substance dans l'organisme *via* la circulation systémique. Comme nous l'avons vu précédemment, les plastifiants peuvent entrer dans l'organisme par diverses voies. Leurs taux d'absorption chez l'être humain sont variables selon la voie, la durée et la fréquence d'exposition mises en jeu et sont décrits dans le Tableau 3 (19).

Tableau 3 : Taux d'absorption des plastifiants chez l'humain selon différentes voies d'exposition

Voie d'exposition	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM
Orale	50 %	100 %	90 %	n.d.	100 %	n.d.
Respiratoire	100 %	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Intraveineuse	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Cutanée	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,05 %	n.d.

Ces taux d'absorption ont été déterminés par suivi des plastifiants radio-marqués ou de leurs isotopes stables chez des volontaires sains (98). L'absorption du DEHP par voies respiratoire et intraveineuse est de 100 %. Les patients hospitalisés y sont très exposés *via* les DM utilisés pour des soins courants ou intensifs. Les données d'absorption des plastifiants alternatifs sont limitées.

1.6.2 Distribution

Une fois les plastifiants absorbés par l'organisme, ils atteignent la circulation systémique et sont distribués dans tout l'organisme, organes et tissus. Les plastifiants étant particulièrement lipophiles, ils peuvent être préférentiellement distribués vers les tissus et les composantes lipidiques. Ils sont distribués dans le foie, les reins, le sang, le cœur, le tissu adipeux ou encore les organes génitaux (99,100).

Le DEHP est largement distribué dans les tissus sans accumulation (101). Il a même été retrouvé dans le lait maternel (102). Le TOTM et le DINCH sont également distribués dans les tissus et les organes, notamment le foie (103,104). La distribution du DINP, DINCH, DEHA et DEHT n'est pas décrite précisément, mais leur voie métabolique étant semblable à celle du DEHP, le foie est potentiellement un organe cible de ces plastifiants alternatifs.

1.6.3 Métabolisme

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques et des voies par lesquelles les organismes vivants transforment les molécules. En ce qui concerne les molécules exogènes ou xénobiotiques, il permet de diminuer la lipophilie des composés en les rendant plus hydrophiles et polaires à l'aide de processus biochimiques, facilitant ainsi leur élimination par voie rénale (42,105–109). Ces produits de biotransformation sont appelés des métabolites. Ils sont obtenus par des réactions de fonctionnalisation (Phase I) et de conjugaison (Phase II). Les réactions de phase I sont des réactions d'hydrolyse et d'oxydation, catalysées par des estérases et les cytochromes P450. Les réactions de phase II consistent en la conjugaison d'un métabolite issu de la phase I, principalement une glucurono-conjugaison catalysée par des transférases. Elles permettent de rendre les métabolites plus hydrosolubles afin qu'ils soient facilement excrétés par voie rénale.

Les principaux sites de biotransformations des plastifiants sont le tube digestif, le sang, le foie, les reins et les poumons, menant à diverses métabolites (42,107–111).

L'étude des plastifiants a permis l'identification de métabolites primaires et secondaires (101). Ils se retrouvent majoritairement sous forme de monoesters dans le foie, après avoir été hydrolysés par les estérases tissulaires (42). L'exemple du schéma général du métabolisme des phtalates est présenté en Figure 17.

Le DEHP et ses plastifiants alternatifs empruntent des voies de métabolisme communes (103,105,110,111). Les structures chimiques des métabolites du DEHP, DINCH, TOTM, DEHT, DEHA et DINP sont présentées en Figure 18.

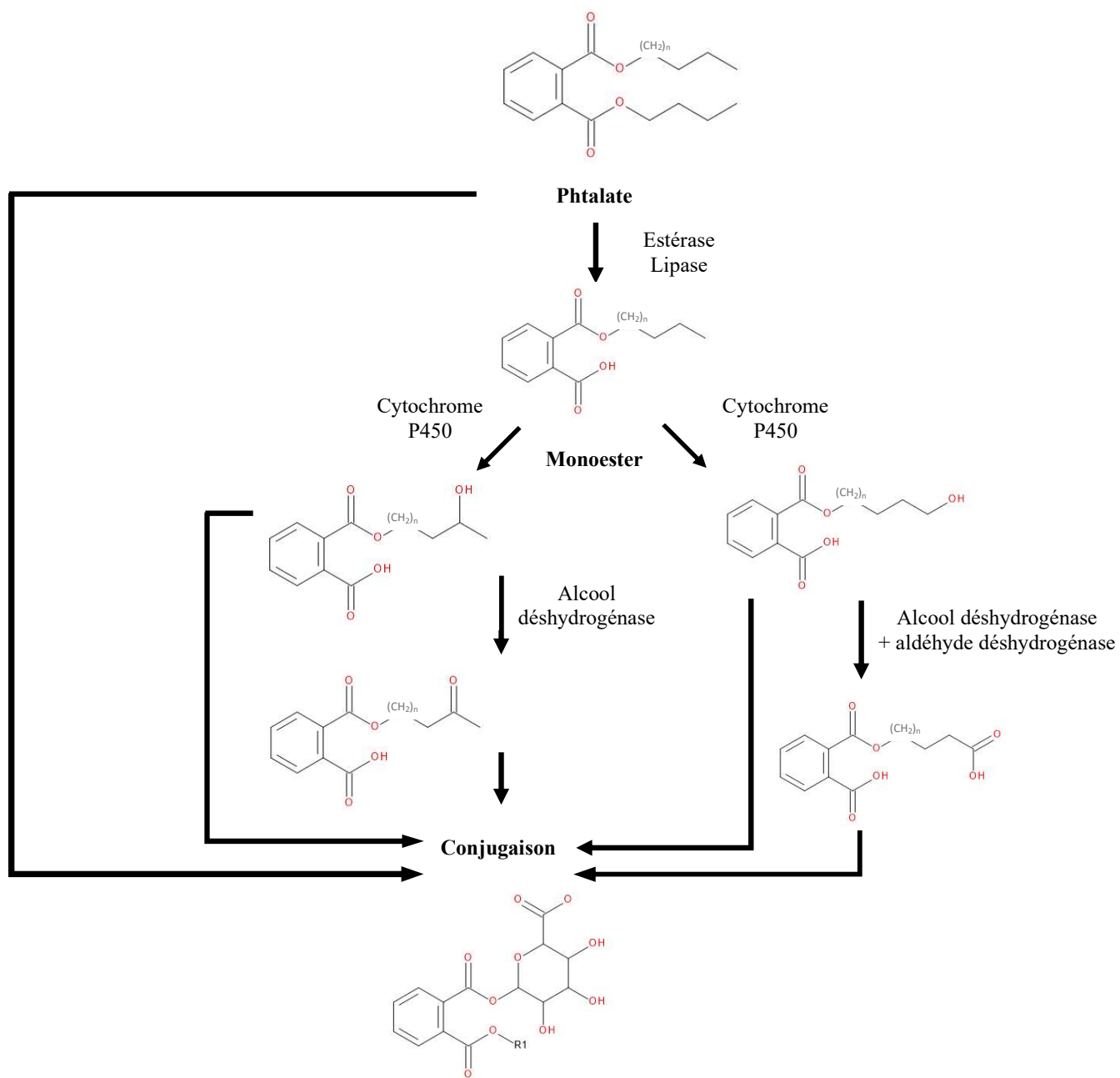


Figure 17 : Métabolisme des phtalates

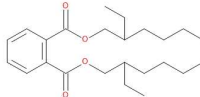
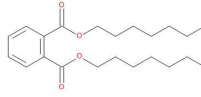
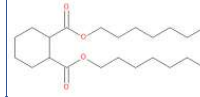
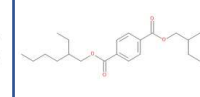
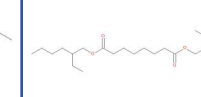
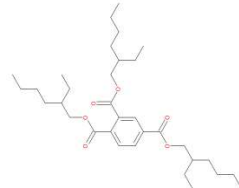
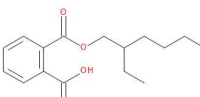
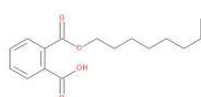
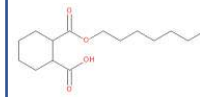
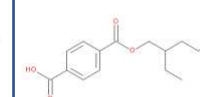
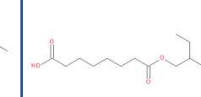
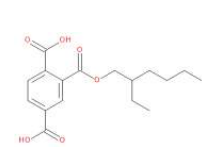
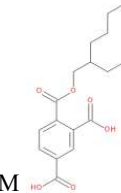
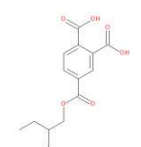
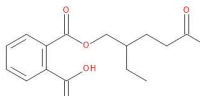
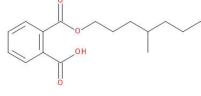
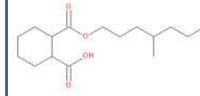
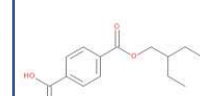
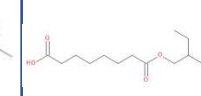
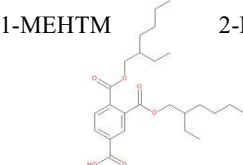
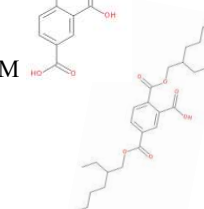
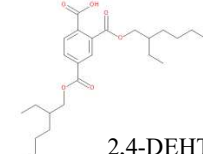
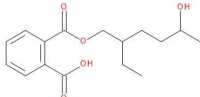
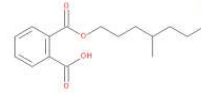
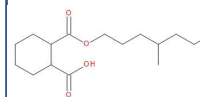
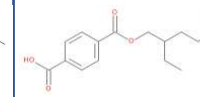
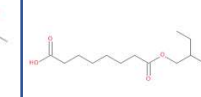
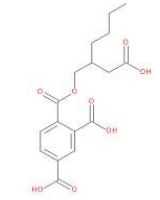
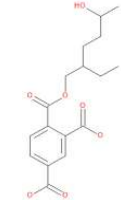
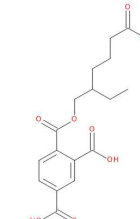
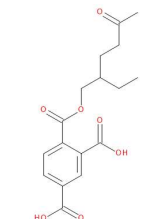
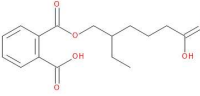
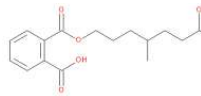
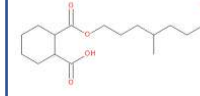
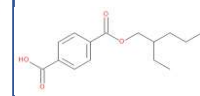
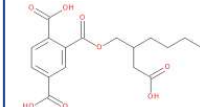
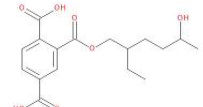
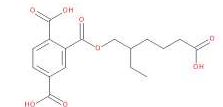
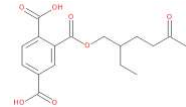
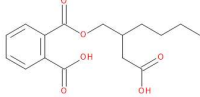
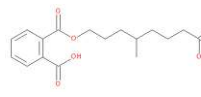
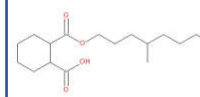
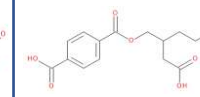
Plastifiants	 DEHP	 DINP	 DINCH	 DEHT	 DEHA	 TOTM			
Métabolites primaires	 MEHP	 MINP	 MINCH	 MEHT	 MEHA	 1-MEHTM	 2-MEHTM	 4-MEHTM	
Métabolites secondaires	 5-oxo-MEHP	 MMeOP	 MMeOCH	 5-oxo-MEHT	 MEOHA	 1,2-DEHTM	 1,4-DEHTM	 2,4-DEHTM	
	 5-OH-MEHP	 7-oxo-MMeOP	 7-oxo-MMeOCH	 5-OH-MEHT	 MEHHA	 2-cx-1-MMHTM	 5-OH-1-MEHTM	 5-cx-1-MEPTM	 5-oxo-1-MEHTM
	 5-cx-MEHP	 7-OH-MMeOP	 7-OH-MMeOCH	 5-cx-MEHT		 2-cx-2-MMHTM	 5-OH-2-MEHTM	 5-cx-2-MEPTM	 5-oxo-2-MEHTM
	 2-cx-MMHP	 7-cx-MMeOP	 7-cx-MMeOCH	 2-cx-MMHTP					

Figure 18 : Structures chimiques des plastifiants et de leurs métabolites primaires et secondaires

1.6.4 Élimination

Les métabolites formés en phase I peuvent être excrétés tel quel ou subir une conjugaison lors de la phase II. Les phtalates sont essentiellement éliminés par voie rénale. Leurs temps de demi-vie sont inférieurs à 24 h. Les temps de demi-vies et les pourcentages d'excrétion du DEHP, DINCH, TOTM, DEHT, DEHA, DINP et de leurs métabolites sont présentés dans le Tableau 4 (80,103,105,111–113).

Tableau 4 : Demi-vies et pourcentages d'excrétion des plastifiants et de leurs métabolites dans les urines

	DEHP	DINP	DINCH	DEHT	DEHA	TOTM
Demi-vie des métabolites	MEHP : 5h 5-OH-MEHP : 10h 5-oxo-MEHP : 10h 5-cx-MEHP : 12-15h 2-cx-MMHP : 24h	MINP : 3h 7-OH-MINP : 5h 7-oxo-MINP : 5h 7-cx-MINP : 5h	CHDA (diacide) : 3h MINCH : 2,5h 7-OH-MMeOCH : 2,5-3,5h 7-oxo-MMeOCH : 2,5-3,5h 7-cx-MMeOCH : 6h	5-OH-MEHT : 7h 5-oxo-MEHT : 7h 5-cx-MEHT : 7h 2-cx-MMHPT : 7h	MEHA : 0,77h	1-MEHTM : 4h 2-MEHTM : 5h 4-MEHTM : 5h
% de métabolites excrétés dans les urines	67 % de la dose de DEHP sont excrétés : MEHP : 5,9 % 5-OH-MEHP : 23,3 % 5-oxo-MEHP : 15 % 5-cx-MEHP : 18,5 % 2-cx-MMHP : 4,2 %	40 % de la dose de DINP sont excrétés : MMeOP : 2 % 7-OH-MINP : 20 % 7-oxo-MINP : 11 % 7-cx-MINP : 11 %	39,2 % de la dose de DINCH sont excrétés : CHDA : 23,7 % MINCH : 1 % 7-OH-MMeOCH : 10,7 % 7-oxo-MMeOCH : 2 % 7-cx-MMeOCH : 2 %	15,2 % de la dose de DEHT sont excrétés : MEHT : 0,02 % 5-OH-MEHT : 1,82 % 5-oxo-MEHT : 1 % 5-cx-MEHT : 13 % 2-cx-MMHPT : 0,29 %	n.d.	3,34 % de la dose de TOTM sont excrétés : 1-MEHTM : 0,3 % 2-MEHTM : 3,3 % 4-MEHTM : 0,04 %

Ces plastifiants sont majoritairement éliminés sous la forme de leurs métabolites secondaires. Le DEHT et le TOTM font exception en termes d'excrétion. En effet, les études montrent une fraction urinaire respectivement de 16 et 6 % de la dose administrée ayant été mesurée chez les individus exposés par voie orale (103,114). Cela suggère une élimination principalement par voie biliaire (108).

1.7 Effets des plastifiants sur la santé humaine

Les sources d'exposition aux plastifiants sont vastes et nombreuses, empruntant diverses voies dans l'organisme humain. Leur omniprésence n'est plus à démontrer et leur distribution dans de nombreux organes ainsi que leur métabolisme rapide inquiète les pouvoirs publics. En effet, il a été montré, par exemple, que le MEHP a une toxicité supérieure à sa molécule mère, le DEHP (14). Les effets sur la santé humaine du DEHP et de ses métabolites ont fait l'objet de nombreuses études ainsi que ceux des plastifiants alternatifs et de leurs métabolites, dans une

moindre mesure. La variété de leurs effets sont présentés en Figure 19 et seront abordés dans les paragraphes suivants.

Les études menées *in vivo* chez le rongeur et *in vitro* sur des modèles cellulaires permettent de montrer un lien de causalité entre pathologie et exposition aux plastifiants ainsi que d'expliquer les mécanismes moléculaires mis en jeu. Les études *in vivo* chez l'humain, quant à elles, ne peuvent montrer que des corrélations ou des associations, de par leurs nombreux facteurs confondants. Ces différents types d'études seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

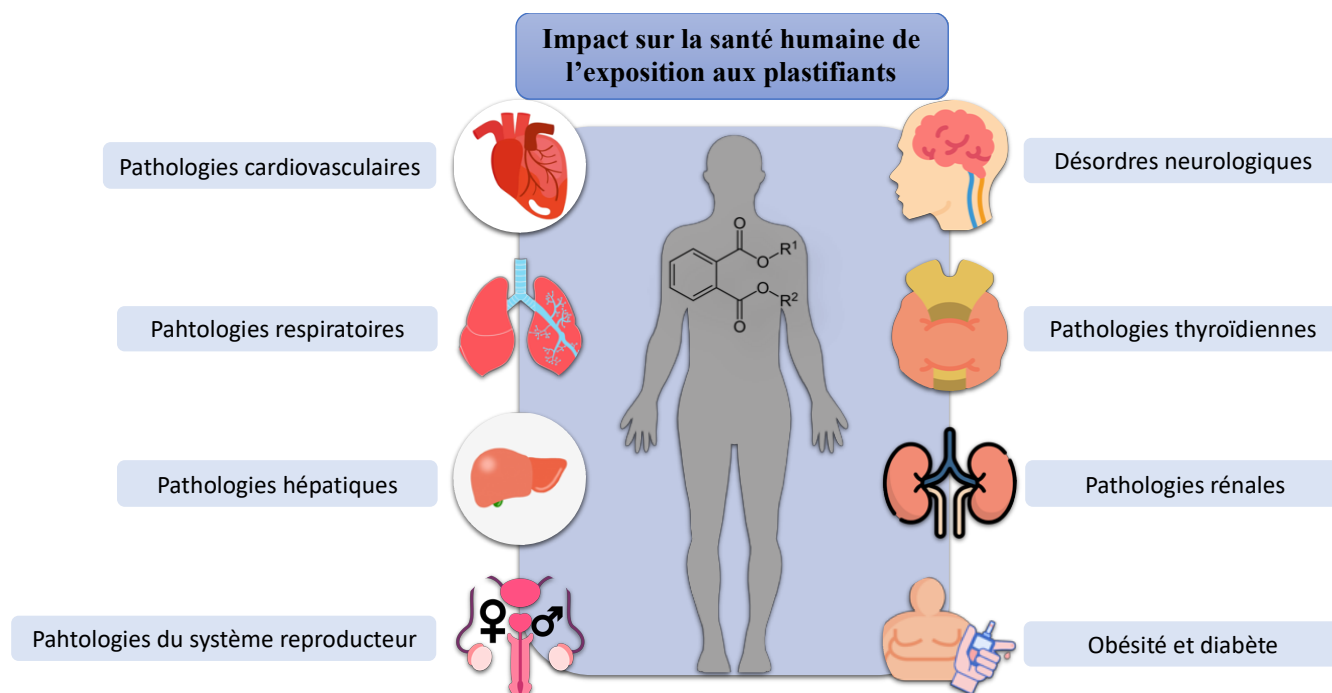


Figure 19 : Effets de l'exposition aux plastifiants sur la santé humaine

1.7.1 Effets sur le foie

Le foie est le principal organe du métabolisme des xénobiotiques. Par conséquent, il est également la cible de leur éventuelle toxicité.

Celle des plastifiants a été étudiée chez l'humain et une corrélation entre l'exposition aux phtalates et le développement de *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) a été mise en évidence (115). La NAFLD résulte, entre autres, de l'accumulation anormale de lipides dans les hépatocytes. *Milosevic et al.* (115) a étudié une cohorte de 305 patients divisés en trois groupes : patients obèses, patients atteints de diabète de type 2 non traités médicalement, patients contrôles de poids normal. Les métabolites de phtalates ont été dosés dans leurs urines et divers paramètres métaboliques dans leur sérum. Dans les trois groupes, on observe une

corrélation positive entre le taux de MEHP urinaire et les triglycérides (TG) sériques, et une corrélation négative entre ce taux de MEHP urinaire et les lipoprotéines de haute densité (HDL) sériques. Une association entre exposition aux phtalates et risque de développement de la NAFLD a ainsi été proposée.

Le TOTM et le DINP sont suspectés de provoquer des effets hépatotoxiques, notamment des lésions hépatiques (29). En effet, des souris traitées par voie intraveineuse par du TOTM à une dose de 400 mg / kg de poids corporel / j durant 5 jours ont présenté une accumulation de lipides dans le foie et une augmentation de leurs transaminases circulantes, marqueurs de lésions hépatiques. Des rats nourris au DINP durant 2 ans à une dose de 307 mg / kg de poids corporel / j (mâles) et 375 mg / kg de poids corporel / j (femelles) ont développé d'une spongieuse hépatique accompagnée d'autres signes d'hépatotoxicité (29).

Chez le rongeur, des études ont montré que l'exposition au DEHP par voie intrapéritonéale à une dose de 500 mg / kg de poids corporel / j favorise l'accumulation du cholestérol hépatique en perturbant son homéostasie (116), *via* le récepteur nucléaire activé par les proliférateurs de peroxysomes PPAR α (117). Il a été montré que le DEHP doit être métabolisé pour être actif sur ce récepteur, impliqué dans la régulation des lipides au niveau hépatique (118). *In vitro*, des essais de transfection transitoire sur des cellules COS-1 ont montré que le MEHP active le récepteur PPAR α humain à une concentration médiane (EC50) de 3,2 μ M et PPAR α murin à une EC50 de 0,6 μ M (119). L'étude récente menée par *Zhen et al.* chez des rats suggère que l'exposition au DEHP par gavage à une dose de 0,5 mg / kg de poids corporel / j perturbe l'homéostasie du cholestérol *via* un autre récepteur nucléaire : Farnesoid X Receptor (FXR), inhibant l'expression de la CYP7A1, enzyme impliquée dans la synthèse des acides biliaires (AB) et réduisant la conversion du cholestérol en AB (120). Cet aspect sera développé dans la deuxième partie du contexte scientifique de ce manuscrit.

Des études menées chez la souris ont montré que le DEHA et le TOTM altèrent le métabolisme lipidique et que leurs taux d'exposition sont corrélés avec l'augmentation du poids du foie (121,122). Le métabolite primaire du DEHA, le MEHA, a montré une cytotoxicité après incubation de cellules L929 (fibroblastes de souris) durant 7 jours avec du DEHA à 0,1 mg/mL (20,29,123,124).

Une exposition au DEHT chez le rat a montré une augmentation significative du poids du foie, de l'ordre de 11 % chez les mâles et 9 % chez les femelles, après les avoir nourris pendant 90 jours avec une dose de 1 % de DEHT (125).

1.7.2 Effets sur le rein

Les plastifiants étant éliminés principalement *via* les reins, ils sont fortement exposés à leur toxicité. Chez l'être humain, une corrélation entre le taux de métabolites du DEHP retrouvé dans les urines et une altération de la fonction rénale a été mise en évidence (126).

Lors d'une étude *in vitro* menée sur des cellules humaines, le DINCH s'est avéré néphrotoxique (127).

1.7.3 Effets sur la thyroïde

Les plastifiants, notamment les phtalates, ont un impact sur la glande thyroïde. Lors d'une étude menée chez 181 paires mères/filles, il a été montré chez des filles âgées de trois ans une corrélation inverse entre les taux de thyroxines libres, hormones produites par la glande thyroïde, et les taux urinaires de phtalates (chez la mère et la fille) (128,129).

Chez l'adulte, la perturbation des paramètres liés à la fonction thyroïdienne est corrélée avec les taux de métabolites de DEHP urinaires (130).

1.7.4 Effets sur le système reproducteur

Les phtalates sont reconnus comme étant des perturbateurs endocriniens, notamment le DEHP. En effet, ayant des structures chimiques similaires aux hormones endogènes (oestrogènes, androgènes et progestérone), ils interagissent avec les récepteurs nucléaires de ces hormones : les récepteurs aux oestrogènes ($ER\alpha$ et $ER\beta$) et les récepteurs aux androgènes (AR). Ils perturbent ainsi le système endocrinien en dérégulant l'expression des gènes cibles de ces récepteurs (15). Il a été montré *in vitro*, par exemple, que le MEHP (50 μ M) inhibe la production d'œstradiol dans l'ovaire en se fixant sur les récepteurs $PPAR\alpha$ et $PPAR\gamma$ (131). La Figure 20 représente les différentes cibles du DEHP et du MEHP.

Le MINCH, métabolite primaire du DINCH, est un faible agoniste de $PPAR\alpha$ et de $PPAR\gamma$ ($EC_{50} > 100 \mu$ M) (132,133).

Chez l'humain, des études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux phtalates, notamment au DEHP et à ses métabolites, était systématiquement associée à une diminution de la qualité du sperme et de son volume, ainsi qu'à une baisse de la production de spermatozoïdes et de testostérone (134).

Chez la femme, une étude multicentrique a montré une corrélation positive entre une forte concentration en métabolites du DEHP et le développement de l'endométriose (135)

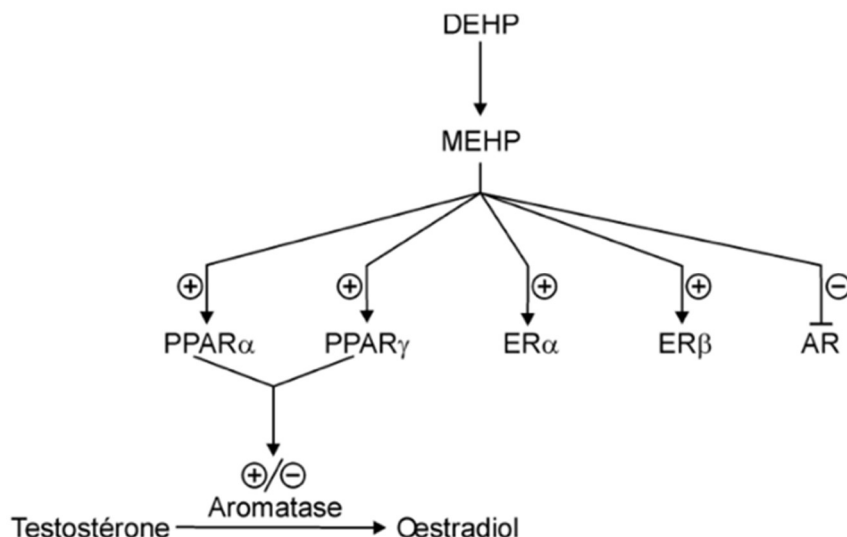


Figure 20 : Récepteurs cibles du DEHP et du MEHP
(PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, ER: Estrogen Receptor, AR: Androgen Receptor)

1.7.5 Effets sur le système neurologique

Quelques études se sont intéressées aux conséquences neurologiques de l'exposition aux plastifiants. Ils pourraient être des facteurs favorisant le développement des troubles de l'attention, de l'hyperactivité et de l'impulsivité (TDAH) (136,137). *Ku et al.* (136) a étudié chez 208 enfants âgés de 2, 5 ou 11 ans les traits de tempérament caractéristiques au TDAH ainsi que les taux de métabolites des phtalates dans leurs urines. Une concentration élevée des métabolites de phtalates a été associée à ces traits de tempérament. *Engel et al.* (137) est parvenu à la même observation auprès d'une cohorte de 297 enfants norvégiens. *Van Der Dries et al.* a observé les conséquences d'une exposition aux phtalates durant la grossesse sur le quotient intellectuel (QI) des enfants, sur une cohorte de 1282 paires de mères/enfants. Une corrélation positive a été établie entre un taux élevé de métabolites des phtalates urinaires chez la mère et un QI significativement plus bas chez la descendance (1,7 points en moyenne) (138).

1.7.6 Effets sur le système respiratoire

Les plastifiants sont présents dans l'air et la poussière présents dans les habitations. L'exposition *via* l'environnement intérieur a été étudiée chez l'humain et une corrélation positive a été établie avec le développement de pathologies respiratoires telles que l'asthme et la rhinoconjonctivite (139,140).

1.7.7 Effets sur le système cardiovasculaire

Des études transversales décrivent une association entre l'exposition aux plastifiants et les facteurs de risque cardiovasculaires. Une étude chinoise réalisée sur une cohorte de 474 patients montre que les patients avec des taux importants de DEHP dans le sang présentent une tension artérielle élevée (141).

Une autre étude clinique réalisée sur 540 patients hospitalisés montre que l'exposition au DEHP est positivement associée à la coronaropathie (142).

1.7.8 Impact sur l'obésité et le diabète de type 2

L'impact des plastifiants sur l'obésité a été étudié sur plusieurs cohortes, adultes et enfants. Une corrélation positive a été démontrée entre concentrations des métabolites urinaires du DEHP et indice de masse corporel (IMC) (143,144). *Kim & Park* (145) suggèrent que l'exposition au DEHP pourrait induire une adipogenèse *via* PPAR γ ainsi qu'une prédisposition à la perturbation du métabolisme lipidique et à l'obésité infantile, *via* PPAR α .

L'exposition au DEHP a également été associée à une insulino-résistance chez l'humain dans une cohorte de patients normaux (146). Les concentrations urinaires de ses métabolites sont positivement corrélées à l'index HOMA-IR (HOMeostasis Model Assessment of Insulino Resistance) dans une large cohorte regroupant des patients avec des taux d'IR variés (147).

En conclusion, les effets du DEHP et ses métabolites sur la santé humaine ont été largement étudiés. Cependant, il existe encore peu d'études concernant les plastifiants alternatifs au DEHP tels que le TOTM, le DEHA et le DEHT, alors que leur utilisation devient intensive ces dernières années. De plus, les études menées chez l'humain ne sont que des études de corrélation/d'association et non de causalité.

Le DEHT est actuellement considéré comme le plastifiant alternatif le plus prometteur parmi les différents phtalates. En effet, il a été montré, par exemple, qu'il est peu irritant lors d'une exposition cutanée (148) alors que le TOTM l'est légèrement (149). L'irritation cutanée du DEHT a été évaluée sur 18 sujets à l'aide de patches contenant la substance. Après 72h de port, les participants ont présenté un faible érythème rose (148).

Néanmoins, bien que le DEHT et ses métabolites aient été peu étudiés, ils n'ont pas été catégorisés comme reprotoxiques ni perturbateurs endocriniens (150). Ainsi il est donc

nécessaire de réaliser des études, aussi bien *in vitro*, pré-cliniques que cliniques. Nous avons choisi de nous intéresser particulièrement à ce plastifiant alternatif dans la suite de ce travail, en prenant le DEHP comme référence.

2 Les acides biliaires (AB)

2.1 Structures et propriétés physico-chimiques

Les AB sont des stéroïdes portant une chaîne latérale d'acide pentanoïque et des groupes hydroxyles potentiellement en position 3, 7 et 12 du cycle cholane. Ils sont constitués de 24 atomes de carbone. Ils peuvent être libres ou conjugués soit à la glycine (AB glyco-conjugués) soit à la taurine (AB tauro-conjugués). La diversité de la famille des AB repose sur la nature (H ou OH) et l'orientation (α ou β) de leurs substituants et de leur caractère libre ou conjugué. La majorité des espèces d'AB est représentée en Figure 22 et 23.

Le marqueur circulant de leur synthèse hépatique est le 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4). Sa structure est présentée en Figure 21.

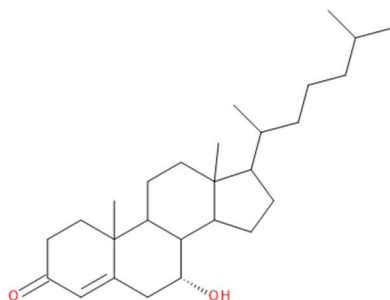


Figure 21 : Structure chimique du marqueur circulant de la synthèse des AB, le C4

Dans un article publié en 2020 dans la revue *Nature* (151), 3 AB conjugués à des acides aminés (AB-AA) ont été décrits (Figure 23). Il s'agit de l'acide cholique conjugué à la phénylalanine, la tyrosine et la leucine.

Récemment, 2 AB dérivés du LCA ont été décrits dans des articles publiés dans la revue *Nature* : le 3-oxo-LCA et l'isoallo-LCA (152,153). Leurs structures sont présentées en Figure 23. Leur intérêt biologique sera présenté par la suite.

AB primaires

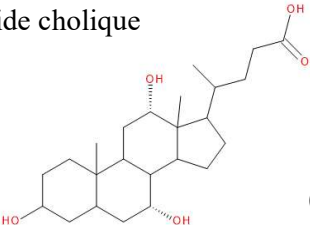
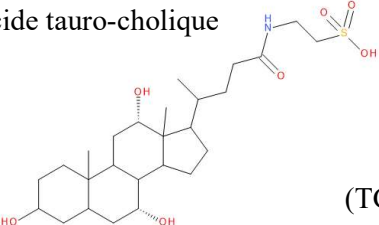
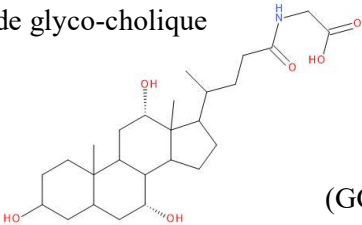
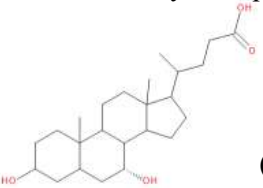
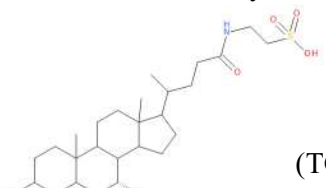
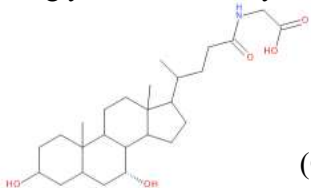
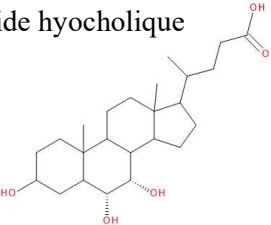
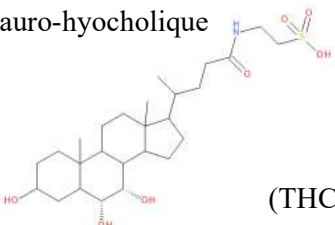
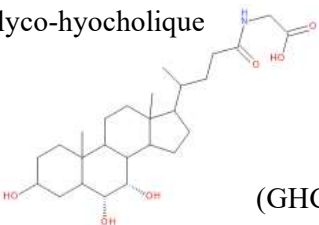
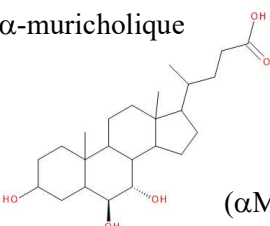
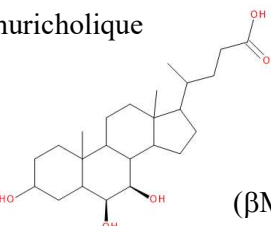
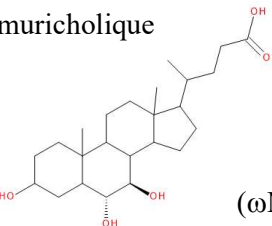
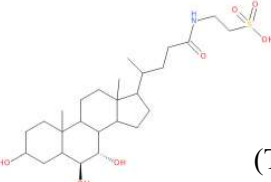
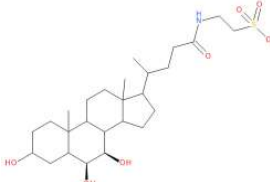
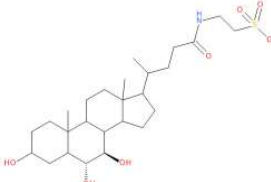
<p>Acide cholique</p>  <p>(CA)</p>	<p>Acide tauro-cholique</p>  <p>(TCA)</p>	<p>Acide glyco-cholique</p>  <p>(GCA)</p>
<p>Acide chenodésoxycholique</p>  <p>(CDCA)</p>	<p>Acide tauro-chenodésoxycholique</p>  <p>(TCDCA)</p>	<p>Acide glyco-chenodésoxycholique</p>  <p>(GCDCA)</p>
<p>Acide hyocholique</p>  <p>(HCA)</p>	<p>Acide tauro-hyocholique</p>  <p>(THCA)</p>	<p>Acide glyco-hyocholique</p>  <p>(GHCA)</p>
<p>Acide α-muricholique</p>  <p>(αMCA)</p>	<p>Acide β-muricholique</p>  <p>(βMCA)</p>	<p>Acide ω-muricholique</p>  <p>(ωMCA)</p>
<p>Acide tauro-α-muricholique</p>  <p>(TαMCA)</p>	<p>Acide tauro-β-muricholique</p>  <p>(TβMCA)</p>	<p>Acide tauro-ω-muricholique</p>  <p>(TωMCA)</p>

Figure 22 : Structures chimiques des AB primaires étudiés

AB secondaires

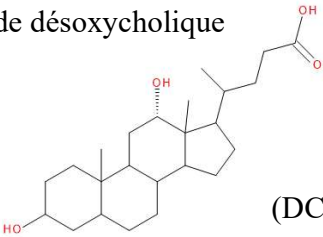
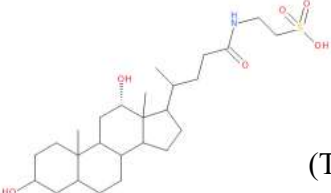
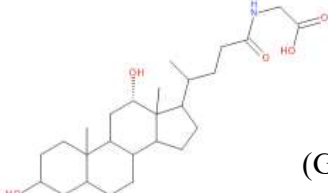
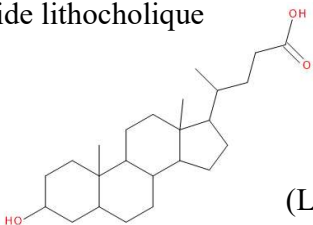
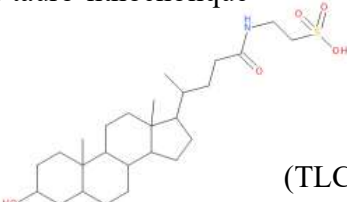
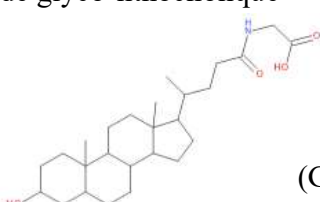
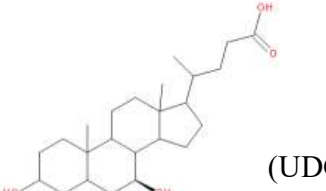
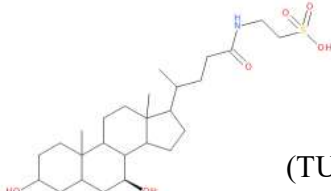
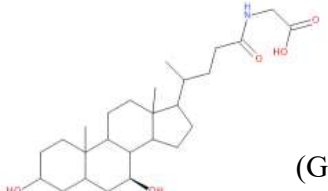
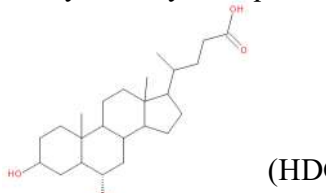
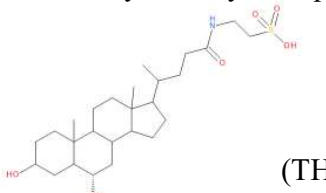
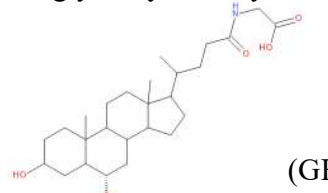
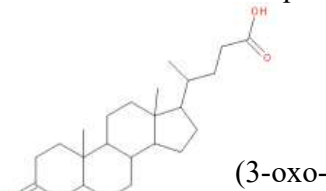
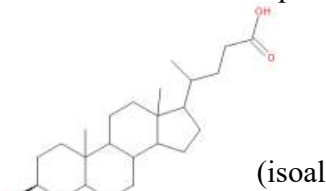
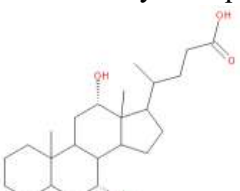
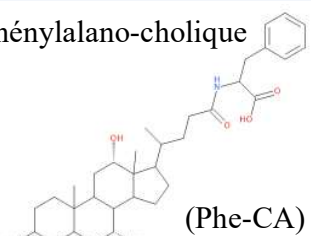
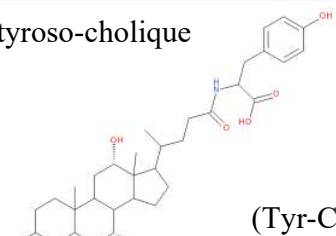
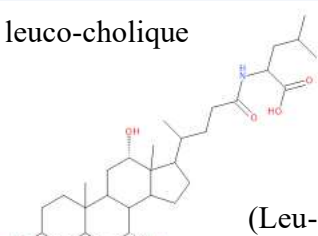
<p>Acide désoxycholique</p>  <p>(DCA)</p>	<p>Acide tauro-désoxycholique</p>  <p>(TDCA)</p>	<p>Acide glyco-désoxycholique</p>  <p>(GDCA)</p>
<p>Acide lithocholique</p>  <p>(LCA)</p>	<p>Acide tauro-lithocholique</p>  <p>(TLCA)</p>	<p>Acide glyco-lithocholique</p>  <p>(GLCA)</p>
<p>Acide ursodésoxycholique</p>  <p>(UDCA)</p>	<p>Acide tauro-ursodésoxycholique</p>  <p>(TUDCA)</p>	<p>Acide glyco-ursodésoxycholique</p>  <p>(GUDCA)</p>
<p>Acide hyodésoxycholique</p>  <p>(HDCA)</p>	<p>Acide tauro-hyodésoxycholique</p>  <p>(THDCA)</p>	<p>Acide glyco-hyodésoxycholique</p>  <p>(GHDCA)</p>
<p>Acide 3-oxo-lithocholique</p>  <p>(3-oxo-LCA)</p>	<p>Acide isoallo-lithocholique</p>  <p>(isoallo-LCA)</p>	<p>Acide iso-désoxycholique</p>  <p>(iso-DCA)</p>
<p>Acide phénylalani-cholique</p>  <p>(Phe-CA)</p>	<p>Acide tyroso-cholique</p>  <p>(Tyr-CA)</p>	<p>Acide leuco-cholique</p>  <p>(Leu-CA)</p>

Figure 23 : Structures chimiques des AB secondaires étudiés

Les AB sont des molécules amphiphiles puisqu'elles possèdent une partie hydrophobe (noyaux stérols) et une partie hydrophile (fonction carboxylique ou sulfonate). Leur structure tridimensionnelle (Figure 24A) ainsi que l'orientation et la position des groupes hydroxyles varient selon les AB et leur confèrent différents degrés d'hydrophobicité (Figure 24B) (154).

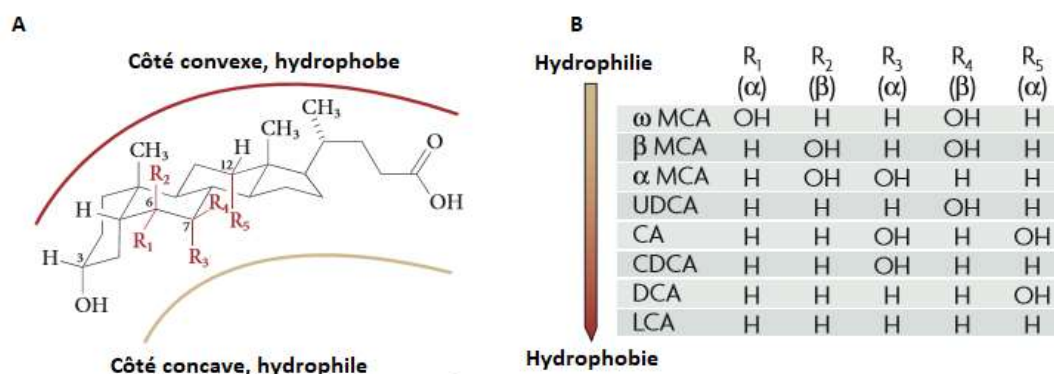


Figure 24 : A : Structure tridimensionnelle des AB ; B : Hydrophobicité des AB (155)

Le pool des AB varie en fonction des espèces. Chez l'humain, il est composé d'AB particulièrement hydrophobes, alors que chez le rongeur, les AB hydrophiles (famille des MCA) sont majoritaires. Chez le porc, les espèces majeures sont le HCA et le HDCA, alors qu'il s'agit d'espèces mineures chez l'humain (155).

2.2 Cycle entéro-hépatique

Le cycle entéro-hépatique sera présenté de manière globale dans ce paragraphe et les détails des différentes étapes de la synthèse et de la transformation des AB seront décrits dans les paragraphes suivants.

Après leur excrétion par les hépatocytes, les AB primaires conjugués sont stockés et concentrés dans la vésicule biliaire. Après un repas, ils sont libérés dans l'intestin grêle où ils contribuent à la solubilisation et à l'assimilation par l'organisme des nutriments liposolubles. Dans la partie distale de l'intestin, par action des bactéries, les AB primaires conjugués subissent une déconjugaison puis différentes transformations conduisant aux AB secondaires. A ce niveau, la majorité des AB (95%) sont réabsorbés par transport actif ou passif et retournent vers le foie par la veine porte. Ils sont ensuite re-conjugués et déversés une nouvelle fois dans la bile. Ce processus est appelé le cycle entéro-hépatique. Il est illustré en Figure 25. Les 5% d'AB restants dans l'intestin sont éliminés dans les selles (155).

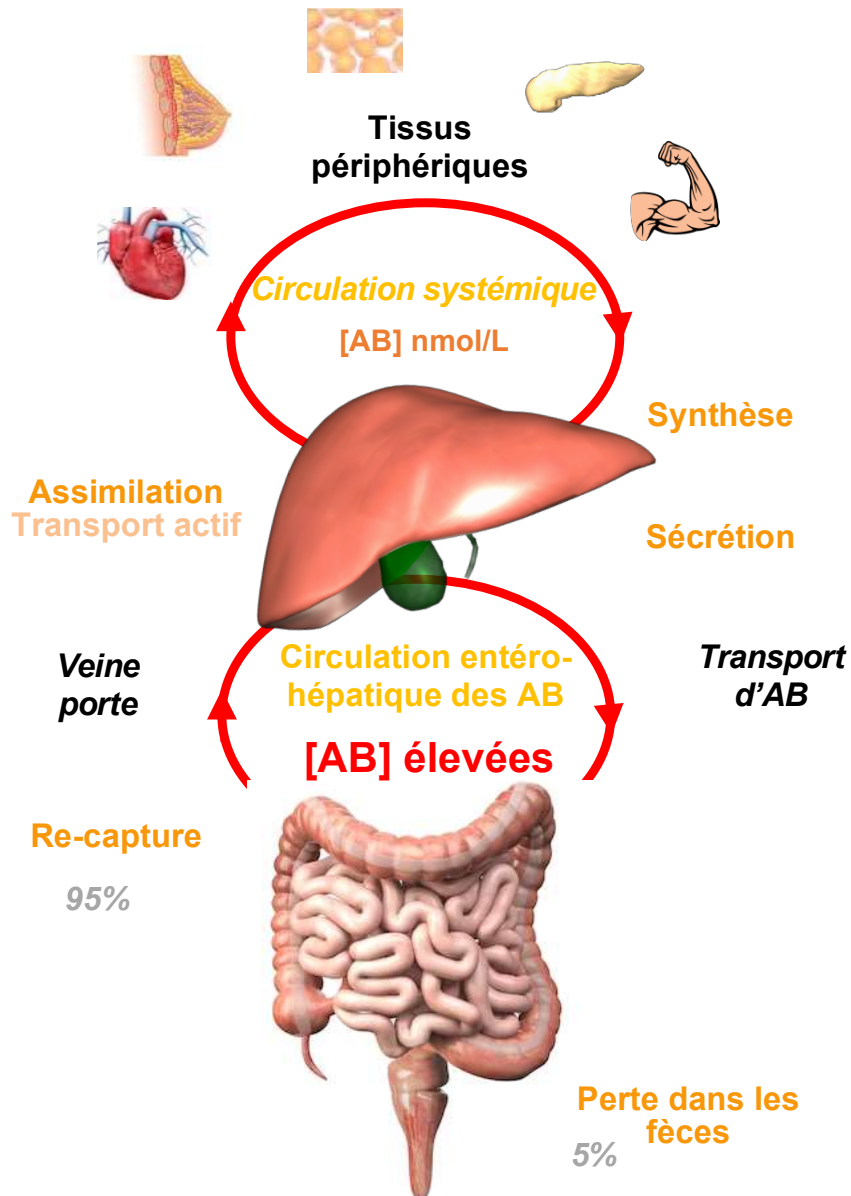


Figure 25 : Cycle entéro-hépatique

Lors du retour des AB au foie par la veine porte, une partie des AB échappe à la recapture hépatique et passe dans la circulation sanguine systémique. Les AB peuvent ainsi atteindre les organes périphériques comme le pancréas, les reins, les tissus adipeux, les muscles ou encore la glande mammaire.

Les AB subissent 4 à 12 cycles entéro-hépatiques par jour.

2.3 Synthèse hépatique des AB

Les AB sont synthétisés dans le foie et sont les constituants majeurs de la bile (156). Leur synthèse est la voie de catabolisme du cholestérol et de son excrétion de l'organisme (157,158). Il s'agit d'une suite de réactions enzymatiques réalisées par les hépatocytes (159).

Les deux voies de biosynthèse des AB sont la voie classique, qui produit 90 à 95 % des AB, et la voie alternative qui mènent aux AB primaires (CA, CDCA, HCA) (160) (Figure 26). La voie classique met en jeu principalement une enzyme située au niveau de compartiments cellulaires tels que le cytosol, les microsomes, les mitochondries et les peroxysomes : la CYP7A1 (*CYtochrome P450 family 7 subfamily A member 1*). Elle convertit le cholestérol en 7 α -hydroxy-cholesterol, à son tour transformé en 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) par la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) (161). L'enzyme 12- α -hydroxylase (CYP8B1, *CYtochrome P450 family 8 subfamily B member 1*) mène à la synthèse du CA (162).

La voie alternative permet de convertir les dérivés d'oxystérol, tels que le 27-hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol, à partir du cholestérol par la CYP27A1 (*CYtochrome P450 family 27 subfamily A member 1*) (161) (Figure 26). Le 27-hydroxycholestérol et le 25 hydroxycholestérol sont ensuite de nouveau hydroxylés par la CYP7B1 (*CYtochrome P450 family 7 subfamily B member 1*) (163). La CYP27A1 et la CYP7B1 conduisent à la synthèse du CDCA.

Chez le rongeur, la CYP2C70 (*CYtochrome P450 family 2 subfamily C member 70*) conduit à l'oxydation du CDCA et au raccourcissement progressif de la chaîne latérale du cholestérol pour mener à la synthèse du α et β MCA (161). Les AB MCA sont absents chez l'humain.

Les AB sont conjugués à la glycine (majoritairement chez l'humain) ou à la taurine (majoritairement chez le rongeur) (164). La conjugaison des AB permet de diminuer leur toxicité et de favoriser leur solubilisation dans la bile. Elle est catalysée par les enzymes Bile Acid:CoA Synthase (BACS) et Bile Acid:Amino acid Transferase (BAAT) exprimées dans les hépatocytes (165).

2.4 Sécrétion hépatique des AB

Les AB primaires conjugués sont excrétés *via* les canalicules biliaires par la *Bile-Salt Export Pump* (BSEP), acteur majeur de la sécrétion des AB par les hépatocytes. L'efflux basolatéral d'AB *via* le transporteur *Organic Solute Transporter* (OST- α/β) et les *Multidrug Resistance*

Associated-Proteins MRP3 et MRP4 permettent aux AB d'atteindre la circulation systémique (Figure 27).

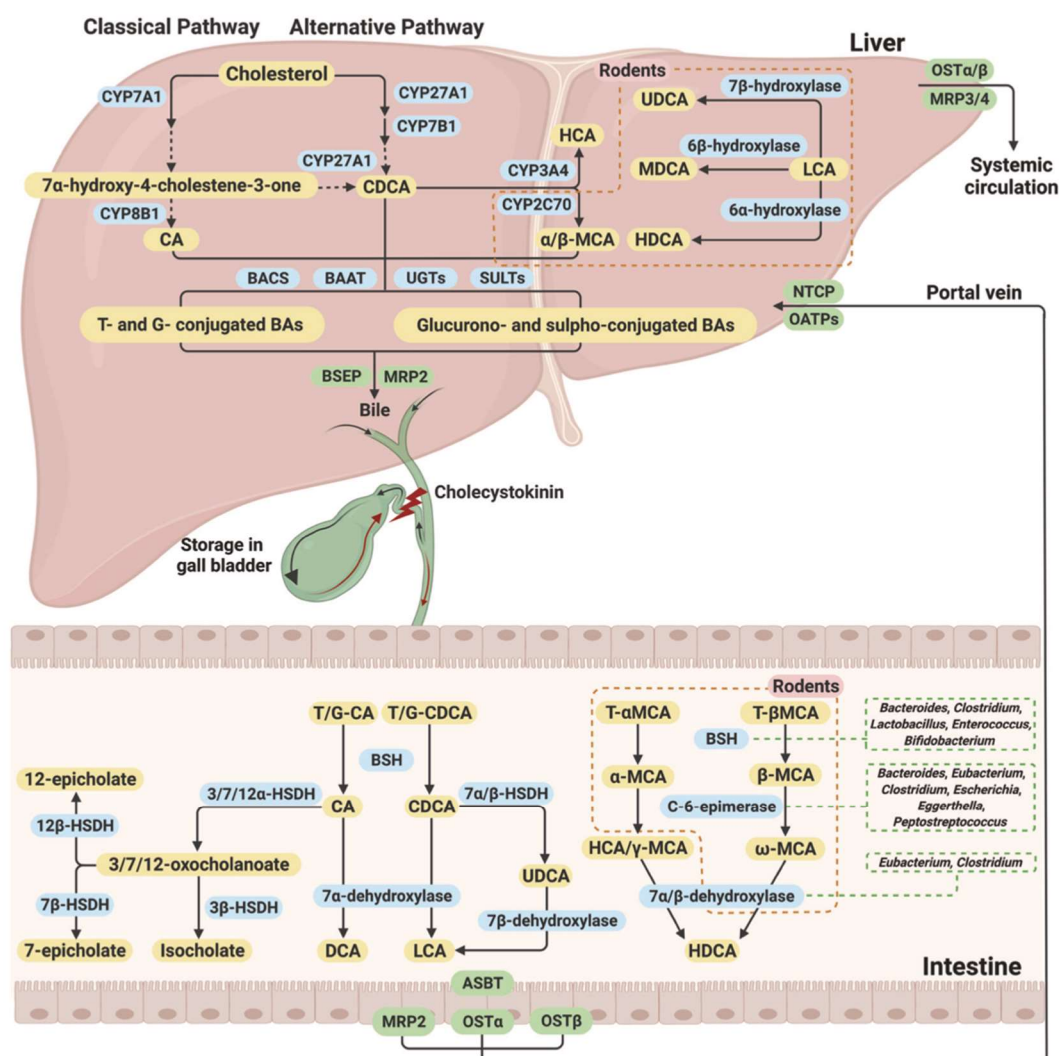


Figure 26 : Voies du métabolisme des AB

Ting-Ying Jiao et al. (2022) *Acta Pharmacologica Sinica*

Alternativement, une partie des AB sécrétée dans les canalicules biliaires est absorbée par les cholangiocytes qui expriment le transporteur *Apical Sodium Dependant Bile-salt Transporter* (ASBT) et OST- α/β pour permettre un retour aux hépatocytes.

S'écoulant le long des canalicules et des voies biliaires, la bile atteint directement le duodénum ou remplit la vésicule biliaire où elle est concentrée et stockée. Lors d'un repas, la contraction de la vésicule biliaire expulse la bile dans la lumière duodénale pour faciliter l'émulsification, la digestion et l'absorption des lipides.

Les AB peuvent également être sulfatés grâce à l'action de sulfotransférases, comme la SULT2A1, ou être conjugués à l'acide glucuronique par l'UGT2B4, UDP glucuronosyltransférase. Ces conjugaisons sont minoritaires mais permettent d'augmenter l'hydrophilie des AB, leur clairance par voie urinaire et leur élimination lors d'une cholestase (164,166).

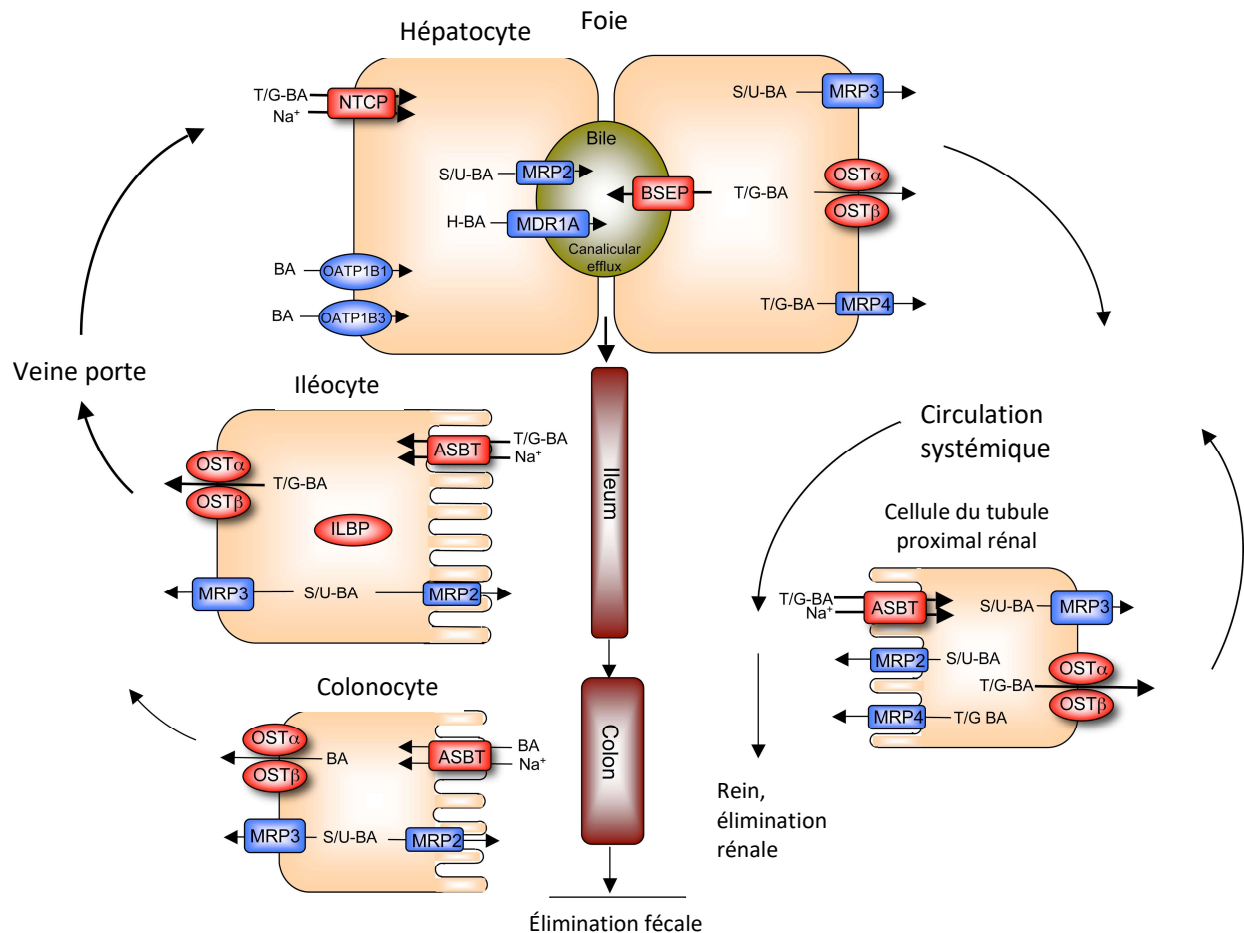


Figure 27 : Les transporteurs des AB dans le cycle entéro-hépatique (Adapté de Dawson et al. 2011) ; BA = bile acids

2.5 Transformation des AB par le microbiote intestinal

Dans la lumière intestinale, les AB interagissent avec un large éventail de micro-organismes et subissent des transformations par des enzymes bactériennes qui mènent aux AB secondaires (167). D'une part, la *Bile Salt Hydrolase* (BSH) catalyse les déconjugaisons par le biais de

différentes espèces de bactéries anaérobies intestinales. D'autre part, la 7- α -déhydroxylase est active sur les AB libres (non conjugués) et, par l'action des enzymes de la flore intestinale, conduit aux AB secondaires (DCA, LCA, UDCA, HDCA) (168,169).

La déconjugaison et la 7- α -déhydroxylation augmentent l'hydrophobicité des AB, permettant leur absorption passive au travers de l'épithélium intestinal (158).

Outre ces transformations, les hydroxystéroïdes déshydrogénases peuvent oxyder et épimériser les AB, augmentant encore la diversité de leurs espèces. Chez l'humain, l'UDCA est formé par épimérisation du CDCA par l'action des bactéries intestinales et n'est pas synthétisé dans le foie comme chez la souris.

De façon marginale, il est à noter que l'acide cholique, produit dans le foie, peut être conjugué à 3 acides aminés : phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) et leucine (Leu) dans l'intestin (151). Il s'agit d'AB minoritaires encore peu étudiés. Cependant, il a notamment été montré que leurs concentrations augmentaient dans un contexte d'inflammation sévère (151). Leur absence dans la circulation sanguine pourrait s'expliquer par le fait qu'ils ne soient pas re-captés de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin (170).

Il a été montré récemment que le LCA est métabolisé dans l'intestin en ses dérivés 3-oxo-LCA et iso-allo-LCA (152,153), impliqués dans la régulation de la différenciation des cellules immunes intestinales. De la même manière, le DCA est métabolisé en iso-DCA, un épimère (171,172).

2.6 Réabsorption intestinale des AB

Environ 95 % des AB présents dans l'intestin sont réabsorbés *via* la circulation portale et 5 % sont éliminés dans les selles. Au niveau intestinal, les AB libres (non-conjugués) diffusent passivement à travers la membrane cellulaire (173). Les AB conjugués sont, quant à eux, absorbés par l'iléon terminal *via* le transporteur *Apical Sodium Dependant Bile-salt Transporter* (ASBT) et excrétés dans la circulation portale par le transporteur *Organic Solute Transporter* (OST- α/β) (174–176) (Figure 27). Dans l'entérocyte, le transport des AB est assuré par *Ileal Bile Acid Binding Protein* (I-BABP) qui protège l'iléocyte des effets toxiques des AB en les excréant.

Les AB sulfatés ou glucuronidés traversent la membrane *via* la *Multidrug Resistance-Associates Protein 2* (MRP2) (174,177).

2.7 Recapture hépatique des AB

Les AB transportés dans le sang portal sont recapturés par l'hépatocyte *via* le *Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP), spécifique des AB conjugués, et *via* les transporteurs *Organic Anion Transporter* (OATP1 et OATP4) (174) (Figure 27). Cette dernière étape complète le cycle entero-hépatique. Une faible proportion des AB échappe à la recapture par le foie et se retrouve dans la circulation sanguine systémique.

Dans les hépatocytes, les AB provenant du tractus intestinal sont mélangés aux AB nouvellement synthétisés et sont conjugués avant d'être sécrétés et de démarrer un nouveau cycle entero-hépatique.

2.8 Rôles physiopathologiques des AB

Rôle dans l'absorption des lipides : Les AB jouent un rôle primordial dans la digestion des lipides grâce à leurs propriétés physico-chimiques. Ils forment des micelles avec les lipides alimentaires, les rendant plus accessibles aux enzymes digestives et permettant ainsi leur absorption par l'entérocyte (154).

Rôle de signalisation cellulaire : Dans le passé, les AB étaient considérés uniquement comme détergents impliqués dans la solubilisation et l'absorption des graisses alimentaires. Cependant, depuis les années 2000, ils ont été reconnus comme des molécules de signalisation cellulaire, activant de nombreuses voies de signalisation et modulant l'expression de gènes clés du métabolisme. En effet, les AB sont des ligands naturels de plusieurs récepteurs : les récepteurs nucléaires « Farnesoid X receptor » (FXR), « Vitamin D Receptor » (VDR), « Constitutive Androstane Receptor » (CAR), « Pregnane X Receptor » (PXR) et le récepteur membranaire au AB couplé aux protéines G, TGR5. CDR, CAR et PXR sont exprimés dans le foie, où ils régulent le métabolisme et le transport des xénobiotiques. FXR et TGR5 sont exprimés dans plusieurs tissus (foie, intestin, pancréas, tissu adipeux, cerveau), où ils régulent le métabolisme des AB, du glucose et des lipides (154). Nous nous intéresserons particulièrement à ces deux derniers récepteurs, jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie métabolique. Le mécanisme d'action des AB *via* les récepteurs FXR et TGR5 est résumé dans la Figure 28.

Les différentes espèces d'AB ont des activités différentes sur FXR et TGR5. Leurs activités sur FXR et TGR5 ont été démontrées par des études de transactivation *in vitro* et dépendent des propriétés lipophiles des AB (178). L'agoniste naturel le plus puissant de FXR est le CDCA ($EC_{50} = 4,5 \mu M$) (179,180) alors que les AB secondaires plus hydrophobes, tels que le LCA

(EC₅₀ = 0,58 µM) et le DCA (EC₅₀ = 1,25 µM), présentent une grande activité sur TGR5 (181). Les formes tauro- et glyco-conjuguées de ces AB ont la même capacité, si ce n'est plus, à activer ces récepteurs que leurs formes libres.

A l'inverse, certains AB ont une action antagoniste. Le TαMCA et TβMCA ont une action antagoniste sur FXR (182–184).

A noter, l'activité des AB dérivés du LCA (isoallo-LCA et 3-oxo-LCA) sur ces récepteurs n'est pas connue et fera l'objet d'une étude dans le cadre de cette thèse. De même en ce qui concerne les AB-AA dont l'activité n'est connue que sur FXR humain : EC₅₀ (PheCA) = 4,5 µM, EC₅₀ (TyrCA) = 0,14 µM et EC₅₀ (LeuCA) = n.d. (151).

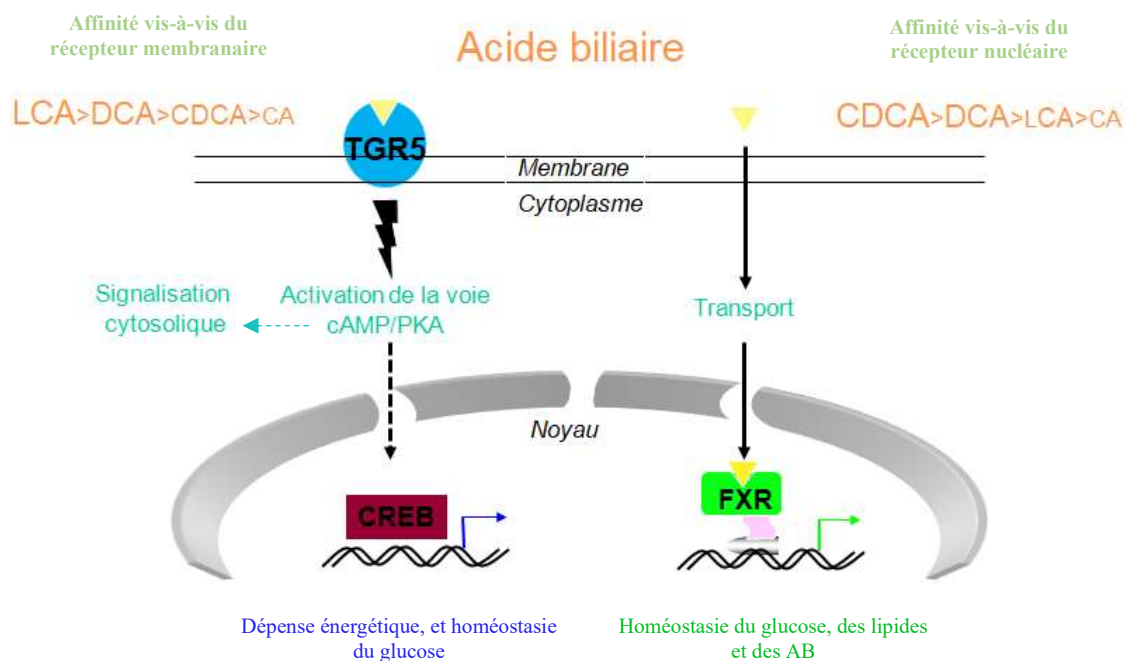


Figure 28 : Rôle de signalisation cellulaire des AB impliquant les récepteurs FXR et TGR5

Pharmacologie du récepteur FXR et mécanisme d'action des AB

Les AB se lient à FXR dans le noyau, le complexe AB-FXR se lie à l'ADN sur des séquences nucléotidiques appelées éléments de réponse (FXRE), présents dans le promoteur des gènes

cibles. La fixation de l'AB sur son récepteur module ainsi la transcription de gènes qui régulent l'homéostasie des lipides, du glucose et des AB eux-mêmes (185).

FXR régule négativement la synthèse des AB. Au niveau hépatique, il réprime directement l'expression de la CYP7A1 (186,187) et de la CYP8B1 (188) et active la conjugaison des AB, notamment la sulfatation et la glucuronidation, augmentant leur hydrophilie et leur excrétion (189–191). Au niveau intestinal, FXR active l'expression du gène codant FGF15/19 (*Fibroblast Growth Factor 15* chez la souris, *19* chez l'humain) qui mène indirectement à l'inhibition de la synthèse des AB (192).

FXR joue un rôle dans l'homéostasie des lipides. Il a été observé une hypercholestérolémie, une hypertriglycémie et une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol chez la souris FXR-KO (193–195). Dans les hépatocytes primaires humains, l'activation de FXR induit l'expression de *Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha* (PPAR α) et de ses gènes cibles, impliqués dans le transport et l'oxydation des acides gras (196).

FXR est également impliqué dans la régulation du métabolisme du glucose. Mais l'expression de FXR est aussi régulée positivement par le glucose et négativement par l'insuline (197). Au niveau intestinal, FXR module l'absorption du glucose et la production de l'incrétine *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1). Les souris FXR-KO soumises à un bolus de glucose présentent une réponse retardée de l'apparition du glucose dans la circulation sanguine (198). De plus, FXR inhibe la synthèse et la sécrétion de GLP-1, notamment par inhibition de la glycolyse (199). FXR régule également le métabolisme du glucose en contrôlant l'expression de l'insuline dans la cellule bêta pancréatique.

L'activité de FXR est régulée par la présence des ligands, le niveau d'expression du récepteur mais aussi par modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation et la O-glucosylation (200,201).

Pharmacologie du récepteur TGR5 et mécanisme d'action des AB

TGR5 est un récepteur membranaire, caractérisé par 7 domaines transmembranaires, couplé à la protéine G, protéine formée des sous-unités α , β/γ . Il est exprimé majoritairement dans le tissu adipeux brun, l'intestin, le cerveau et les macrophages. La liaison du ligand sur son récepteur entraîne la dissociation de la sous-unité α de la protéine G, l'activation de l'adénylate

cyclase qui conduit à l'augmentation de la production d'AMPc à l'origine de l'activation des voies de signalisation liées à la protéine kinase A (PKA). Une fois activée, la PKA induit une cascade de phosphorylations de différentes protéines dont la finalité est d'activer, entre autre, le facteur de transcription CREBP, qui, par fixation sur la séquence nucléotidique CRE, module la transcription de gènes cibles impliqués dans la dépense énergétique et l'homéostasie du glucose (181,202). Cette voie de signalisation, initialisée par l'activation de TGR5, se traduit donc à la fois par des effets cytosoliques et des effets transcriptionnels particulièrement importants pour l'homéostasie cellulaire et tissulaire.

TGR5 est actif au niveau des voies biliaires (203). Chez l'humain, l'augmentation des niveaux d'expression de TGR5 dans la vésicule biliaire est associée au développement de pathologies lithiasiques (204) ; par contre il protège les voies hépto-biliaires des effets détergents des AB en augmentant le pH de la bile et réduit ainsi l'inflammation des voies biliaires (205).

TGR5 est impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique. Il favorise la dépense énergétique *via* l'activation de l'hormone thyroïdienne tri-iodothyronine (T3) par l'enzyme iodothyronine deiodinase 2 (Dio2), qui active les réactions de β -oxydation des acides gras dans le tissu adipeux brun ou du muscle squelettique, favorisant ainsi la conversion des graisses en énergie (206).

TGR5 participe à la régulation de l'homéostasie glucidique. Dans des lignées cellulaires d'entérocytes murins (STC1), l'activation de TGR5 augmente la synthèse de l'hormone GLP-1, incrétine qui favorise la sécrétion de l'insuline par le pancréas et la régulation de la glycémie (207,208). Chez l'humain, les concentrations en AB au niveau intestinal sont positivement corrélées aux concentrations en GLP-1 et à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (209). Ces études montrent que TGR5 est une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du diabète.

TGR5 possède des propriétés anti-inflammatoires. Il est fortement exprimé dans les cellules immunitaires, notamment dans les macrophages et les monocytes CD14⁺ chez l'humain (181). Les propriétés anti-inflammatoires de ce récepteur sont décrites aussi bien au niveau hépatique qu'intestinal. L'activation de TGR5 permet de limiter la production de cytokines dans des macrophages hépatiques isolés à partir de foie de rat (210). Dans un modèle murin de colite,

son activation conduit à la diminution des signes d'inflammation et réduit l'expression des cytokines (211).

2.9 Variations physiologiques des AB

Les concentrations circulantes d'AB sont fortement influencées par la prise des repas. En effet, lors du repas, l'hormone cholécystokinine (CCK) est sécrétée par le duodénum. Au plus la prise alimentaire est riche en lipides, au plus la quantité de CCK sécrétée est importante, induisant une contraction de la vésicule biliaire et une excrétion des AB dans l'intestin et le passage d'une fraction dans la circulation systémique. Chez le rongeur, espèce nocturne, les concentrations en AB circulants sont à leur plus faible niveau au milieu de la phase diurne, pendant leur jeûne physiologique. Elles augmentent rapidement au début et en milieu de la phase nocturne, durant les deux épisodes de prise alimentaire (212). Chez l'humain, espèce diurne, les concentrations en AB circulants sont les plus élevées environ deux heures après un repas (13 heures et 21 heures) (213). Les espèces d'AB conjuguées à la glycine et à la taurine sont responsables de cette élévation. Un troisième pic est provoqué durant les premières heures de la journée, entre 6 heures et 8 heures du matin, indépendant du repas mais dépendant du rythme diurne (214). Cette fois, ce sont les espèces d'AB non-conjuguées qui sont particulièrement présentes.

La synthèse des AB suit un rythme circadien. L'expression de la CYP7A1 est régulée, d'une part, par des récepteurs nucléaires qui agissent comme senseurs nutritionnels et, d'autre part, par des facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines impliquées dans le rythme circadien.

FXR réprime la synthèse de la CYP7A1. PPAR α a une action directe sur la CYP7A1 et indirecte sur *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α), régulateur positif de la transcription de la CYP7A1 (215,216).

L'expression de la CYP7A1 est également régulée par les acteurs de l'horloge, responsables du rythme circadien. L'horloge centrale est située au niveau de l'hypothalamus et elle est dépendante des signaux externes tels que la lumière, l'obscurité ou encore l'alimentation (217). Elle régule notamment la transcription de *Rev-Erba* et *Retinoid-related Orphan Receptor alpha* (ROR α), qui, à leur tour, régulent le rythme circadien de l'expression de la CYP7A1 mais aussi de la CYP8B1 chez la souris (218,219).

La synthèse hépatique des AB est dépendante de l'expression de FGF15/19, hormone intestinale induite par l'activation de FXR intestinale, qui répond également à un rythme circadien. En effet, sa sécrétion est régulée par le taux d'AB présents dans l'intestin. Il existe une relation inverse entre FGF15/19 sérique à jeun et le taux de C4, marqueur de la synthèse hépatique des AB (220). FGF15/19 active le récepteur membranaire FGFR4 (Fibroblast Growth Factor Receptor 4) dans le foie en présence du corécepteur β Klotho, réduisant l'expression génique de la CYP7A1 et de la CYP8B1 dans le foie, inhibant ainsi la synthèse des AB (220–222).

2.10 Variations des AB dans des contextes pathologiques

Étant donné leurs différentes activités sur les récepteurs FXR (CDCA > DCA > LCA > CA) et TGR5 (LCA > DCA > CDCA > CA), une modification de la composition du pool d'AB peut moduler leur activité et impacter l'homéostasie métabolique. Le syndrome métabolique regroupe différents signes cliniques et biologiques, tels que le surpoids/l'obésité, l'IR/le DT2, les dyslipidémies et l'hypertension artérielle. Il s'agit d'un problème de santé publique à travers le monde.

Je présenterai dans cette partie des exemples d'associations entre l'altération du pool des AB et l'état physiopathologique. La Figure 29 illustre les différents contextes pathologiques de variation des AB.

L'insulino-résistance

L'insulino-résistance (IR) est associée à une augmentation des AB totaux chez l'humain (223,224). Concernant le CA, un AB 12- α -hydroxylé, celui-ci est synthétisé par l'action de la CYP8B1, enzyme directement régulée par l'insuline. En effet, à l'état physiologique, l'insuline inhibe la transcription du gène de la CYP8B1. Le ratio des AB 12- α -hydroxylés et des AB non-12- α -hydroxylés reflète donc l'activité de la CYP8B1 et il est un marqueur de la sensibilité hépatique à l'insuline (225). Cette association entre IR et niveaux d'AB 12- α -hydroxylés a été montrée par plusieurs études chez la souris (226,227) et chez l'humain sur des sujets insulino-résistants non-diabétiques (228). Dans un contexte physiopathologique d'IR, les concentrations des espèces d'AB 12- α -hydroxylées, telles que le CA, GCA, TCA, DCA, TDCA et GDCA, augmentent.

Bien que des études aient lié cette perturbation à des altérations de la voie de signalisation de l'insuline, il reste à élucider s'il s'agit d'un marqueur de l'IR ou d'un acteur de sa pathogenèse.

Des études ont montré que les variations du pool des AB sont à l'origine des perturbations métaboliques : en effet, une étude sur un modèle de souris CYP8B1-KO a montré que l'incapacité à synthétiser le CA et ses dérivés entraîne une amélioration de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et de la fonction β -pancréatique (229). De plus, l'absorption des graisses intestinales est réduite en l'absence de CA, ce qui entraîne une augmentation des acides gras libres atteignant les cellules entéro-endocrines L de l'iléon. Cela conduit à une sécrétion élevée de l'incrétine GLP-1, qui augmente la sécrétion d'insuline et améliore la tolérance au glucose (229).

De plus, l'augmentation des espèces d'AB 12- α -hydroxylées dans ce contexte mène à une diminution des ligands les plus puissants de FXR et TGR5, tels que le CDCA et le LCA (230,231). La perturbation de l'activation de ces récepteurs, exprimés dans les cellules β pancréatiques, où ils régulent positivement la synthèse et la sécrétion d'insuline, peut donc avoir des conséquences sur le métabolisme (159).

Diabète de Type 2

Certaines études menées chez l'humain ne constatent aucun changement dans le pool des AB chez des patients atteints de DT2 en comparaison à des patients non-DT2 (232,233) alors que d'autres montrent une association entre DT2 et augmentation des concentrations en AB chez ces patients (234,235). Il a été montré que le DT2 est associé à une modification de la composition de la flore bactérienne intestinale (236). Ces variabilités observées d'une étude à l'autre sont principalement liées aux différences clinico-biologiques des patients, aux facteurs confondants tels que le degré d'IR, l'obésité, le stade NAFLD...

Obésité

Il a été montré que l'indice de masse corporelle (IMC) est positivement corrélé aux concentrations en AB plasmatiques à jeun (237) mais négativement aux concentrations en AB postprandiales (232). Chez des patients obèses, le taux de C4 circulant à jeun est plus élevé que chez des contrôles, ce qui suggère une augmentation de la biosynthèse des AB (214,238). Il est possible que la différence de composition du microbiote intestinal, fortement altérée dans l'obésité, contribue à cette modification des concentrations en AB (239,240).

Cependant, certaines études ne montrent aucune modification du pool des AB entre des patients obèses et sains (241). Les résultats hétérogènes obtenus sont probablement due à la variabilité inter-patients, notamment au niveau d'IR de la population de patients étudiée qui peut s'avérer être un facteur confondant qu'il est primordial de prendre en compte (225).

La chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique est une méthode efficace dans le traitement de l'obésité. Le Roux-en-Y (RYGB), qui consiste en la réduction drastique du volume de l'estomac et au remaniement de l'anatomie de l'intestin, engendre une élévation des concentrations en AB à jeun (242). De plus, les taux de GLP-1 et les concentrations en AB sont positivement corrélés après l'opération (209,243). La modification du microbiote intestinal engendrée par le RYGB ainsi que les altérations de la signalisation de FXR et TGR5 pourraient contribuer aux améliorations métaboliques *via* la modification du pool des AB (159). Il a été montré que cette chirurgie n'a pas seulement des effets bénéfiques sur le poids corporel, mais permet de réduire le DT2 et de faire régresser de la *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD), des co-morbidités fréquentes de l'obésité (244).

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

Les NAFLD constituent un ensemble de pathologies hépatiques qui se développent progressivement, lentement et sur plusieurs années chez l'humain. Son premier stade correspond à une accumulation de lipides dans les hépatocytes, une stéatose hépatique, qui peut évoluer vers une inflammation et un gonflement hépatocellulaires (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*: NASH), une fibrose, une cirrhose et enfin un carcinome hépato-cellulaire. En plus de provoquer une mortalité liée au foie, la NAFLD est également fortement associée à un risque accru de maladie cardiovasculaire et de DT2 (236). Elle est souvent considérée comme une manifestation hépatique du syndrome métabolique.

Il n'existe pas de traitement pharmacologique à l'heure actuelle pour cette maladie mais les voies de signalisation activées par les AB sont des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, des études réalisées chez des patients atteints de NAFLD, notamment au stade NASH, montrent une altération du profil des AB (245–247). Chez des patients atteints de NASH, les concentrations en AB circulants sont augmentées à jeun (245) et les niveaux de FGF19 diminués (248). Chez ces patients, l'expression de la CYP8B1 (enzyme de la voie classique de la synthèse des AB) est réduite alors que l'expression de la CYP7B1 (enzyme de la voie alternative) est augmentée, ce qui explique une modification quantitative mais aussi qualitative du pool des AB (249). Une molécule prometteuse pour le traitement de la NASH est actuellement en étude clinique de phase III. Il s'agit de l'acide obéticholique, un agoniste de FXR (250).

De manière générale, la NAFLD est souvent associée à de nombreuses comorbidités telles que l'obésité, l'IR et le DT2. Il est donc difficile d'attribuer les variations du pool d'AB observées uniquement à la NAFLD, indépendamment de ses comorbidités (225).

Cholestase

La cholestase est une réduction du flux biliaire des hépatocytes au tractus digestif. Elle est notamment caractérisée par une accumulation cytotoxique d'AB dans les hépatocytes et le sang ainsi que par une malabsorption des graisses. Les concentrations en AB circulants peuvent être de 2 à 330 fois plus élevées que les concentrations physiologiques (251). L'élévation des concentrations en AB sont donc des marqueurs précoces de la maladie. Elle occasionne du prurit chez la majorité des patients, induit par l'activation de TGR5 par les AB dans les cellules cutanées (252).

Le profil des AB est modifié quantitativement, par une augmentation du TCA, GCA, TCDCA et GCDCA, mais aussi qualitativement, par une prédominance du CA et des AB tauro-conjugués (251).

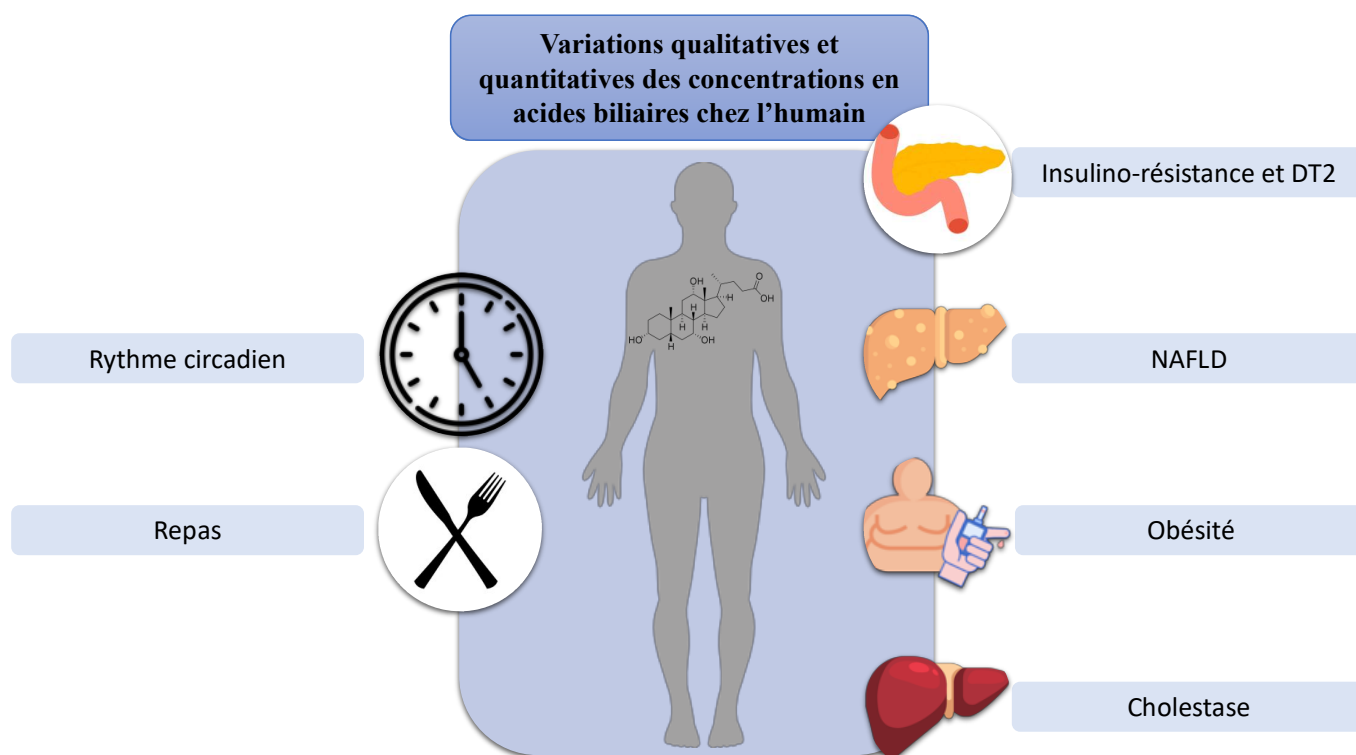


Figure 29 : Contextes physiologiques et physiopathologiques de variation des acides biliaires chez l'humain

Il est difficile d'établir une association claire et indépendante entre chaque composante du syndrome métabolique et la variation du pool des AB à cause, notamment, de nombreux facteurs confondants des études réalisées chez l'humain (253). Il a été montré que ni l'obésité, ni le DT2, ni la NAFLD ne sont associés de manière indépendante à la variation du pool des AB (225). Il existe cependant une concomitance des pathologies, générant ainsi des facteurs confondants, notamment dans les études cliniques.

2.11 Méthodes d'analyse des AB

Toute modulation du profil des AB peut conduire à des modifications des voies de signalisation des récepteurs FXR et/ou TGR5, et donc à une modification de l'homéostasie métabolique. Compte tenu de leur diversité, de leurs rôles variés et leurs implications dans différentes fonctions physiologiques et pathologiques, il est important de pouvoir déterminer les profils d'AB dans différentes matrices biologiques (254). Ainsi, il est possible d'apprécier la variation de ces profils dans différents contextes physio-pathologiques (diabète, obésité, grossesse...) en dosant individuellement chaque espèce d'AB ainsi que le marqueur circulant de leur synthèse, le C4.

Afin de pouvoir doser les AB dans des matrices biologiques, il est indispensable de disposer d'une méthode d'analyse spécifique et sensible. A jeun, il est estimé que la concentration totale en AB plasmatiques est inférieure à 5 μM mais elle peut doubler après un repas (235) voire être multipliée par 10 dans certaines pathologies. Il est donc nécessaire d'être capable de développer une méthode de dosage fiable sur une large plage de concentrations.

Diverses techniques sont utilisées pour quantifier les AB totaux et/ou individuels. Elles sont décrites dans les paragraphes suivants et leurs avantages et inconvénients sont représentés en Figure 31.

2.11.1 Dosage enzymatique

Le dosage enzymatique permet de quantifier les AB totaux dans un fluide biologique tel que le sang et le plasma. Le dosage des AB totaux mesure l'ensemble des AB primaires et secondaires, qu'ils soient libres ou conjugués, sans distinction. Ce dosage est réalisé à l'aide de kits commerciaux dont le principe est présenté en Figure 30. L'enzyme 3- α -hydroxystéroïde déshydrogénase (3- α -HSD) oxyde réversiblement les AB en 3-cétostéroïdes en présence de thio-NAD (thionicotinamide adenine dinucleotide), qui est réduit en thio-NADH₂ (thionicotinamide adenine dinucleotide reduced) (237). L'absorbance du thio-NADH₂ est

mesurée quantitativement à 405 nm par spectrophotométrie et la concentration en AB totaux peut être déterminée indirectement.

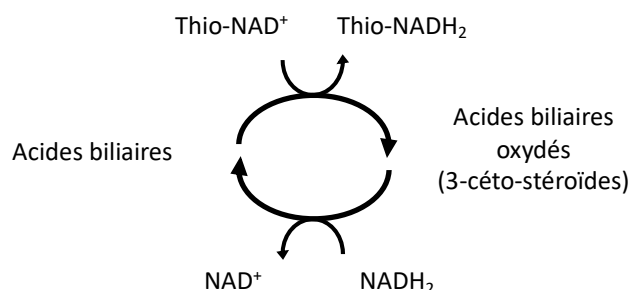


Figure 30 : Principe du dosage enzymatique des acides biliaires

Cette méthode permet un dosage simple, rapide, peu coûteuse et nécessitant peu de préparation d'échantillons. Elle est très utilisée dans les laboratoires hospitaliers. Cependant, elle est limitée en termes de gamme de concentration et sa limite de détection est égale à 0,22 μM (255). De plus, elle ne permet pas de différencier les différentes espèces d'AB.

Afin d'accéder à des concentrations de l'ordre du nM et au profil des espèces d'AB, il est nécessaire d'utiliser d'autres techniques d'analyses.

2.11.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les AB sont des molécules peu volatiles et instables à haute température. Une étape de dérivation est donc requise pour leur analyse en chromatographie en phase gazeuse. La première application de la GC-FID pour l'analyse des espèces d'AB a été décrite en 1960, avec quatre dérivés d'AB méthylés-estérifiés grâce au diazométhane (256). Le développement de diverses techniques de détection, notamment la détection par ionisation de flamme (FID), a permis d'élargir les applications de l'analyse des AB dans la bile, le sérum, l'urine et les fèces (257,258). Cependant, la longue procédure de préparation des échantillons et le manque de spécificité de cette méthode ont limité l'étendue de l'application pour la quantification des AB.

La GC couplée à la détection par MS est une méthode robuste et spécifique qui a été largement utilisée pour la séparation et la quantification des AB (259). Contrairement à la GC couplée à un détecteur FID, la GC-MS est plus sensible et permet une identification spécifique des AB sur la base de leurs rapports masse/charge. Plusieurs méthodes de GC-MS ont été mises au

point pour l'identification des AB dans les échantillons biologiques (260–262). Elles nécessitent de multiples étapes de préparation de l'échantillon afin d'éliminer les interférences des matrices biologiques (SPE, LLE) et une étape de dérivation qui les rend complexes. *Kumar et al.* (262) décrivent une méthode comprenant une hydrolyse, une SPE, une LLE et une dérivation qui permet la détection de sept AB, dont le CA, le LCA, le DCA, le CDCA, l'UDCA, l' α -MCA et le β -MCA, dans l'urine de rat. Il s'agit d'une méthode difficilement applicable pour un grand nombre d'échantillons.

2.11.3 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

La LC couplée à la MS ou la MS/MS est l'outil analytique le plus sensible, le plus spécifique et le plus largement utilisé pour la détection et la quantification des AB dans l'urine (263,264), le plasma/sérum (263,265), la bile (263,266), le contenu intestinal (267,268), le foie (267,269) et les fèces (267,270). La technique la plus utilisée est la chromatographie à polarité de phase inversée, utilisant des phases stationnaires de type C₁₈. Le pH de la phase mobile est un facteur important qui influe sur la séparation chromatographique et l'efficacité de l'ionisation des AB. Les analytes neutres sont plus apolaires que les analytes ionisés et ont une rétention différente sur la chromatographie en phase inverse. Les valeurs de pK_a des AB varient de 1,5 à 6 (les AB conjugués à la taurine : ~1,5, les AB conjugués à la glycine : ~4,5, et les AB libres : ~6). La variation du pH de la phase mobile peut donc modifier l'état d'ionisation des différentes espèces d'AB et influencer la séparation chromatographique globale (271,272). L'ionisation par électrospray (ESI) est classiquement utilisée en mode négatif et l'analyseur de type quadripôle (MS) ou triple quadripôle (MS/MS) permet une identification spécifique de chaque espèce d'AB. En effet, les AB conjugués et non conjugués présentent des profils de fragmentation distincts, notamment avec une perte de glycine (m/z 74) pour les AB glyco-conjugués ou une perte du groupement [SO₃⁻] de la taurine (m/z 80) pour les AB tauro-conjugués (273). Le mode MRM est donc particulièrement adapté à l'analyse et à la quantification de ces AB. Quant aux AB libres, ils ne présentent pas de fragmentation spécifique ni de fragment intense. Une analyse en mode « pseudo-MRM » est plus adaptée : l'ion précurseur est sélectionné en Q1, non fragmenté en q2 et le même ion est sélectionné en Q3.

L'approche MRM a été utilisée par *Ye et al.* (274) pour quantifier 15 AB en utilisant la LC-MS/MS en mode négatif. Les limites de détection et de quantification obtenues sont respectivement de 1 à 6 nM et de 3 à 18 nM pour différentes espèces d'AB (274). Diverses études ont été menées pour quantifier les AB par LC-MS/MS dans différents échantillons

biologiques, y compris des extraits de sérum et de foies humains, de souris et de rats (156,164,254).

Analyser tous les AB en un seul run chromatographique demeure un défi, de par leurs structures chimiques diverses et leur large gamme de concentration dans des matrices biologiques. Ces matrices complexes génèrent beaucoup d'interférents lors de l'analyse par LC-MS/MS. Il est donc indispensable d'optimiser la préparation des échantillons en amont afin d'extraire correctement les AB tout en éliminant un maximum d'interférents. Contrairement à l'analyse par GC, la LC ne nécessite pas d'étape de dérivation, ce qui allège la préparation des échantillons. Les techniques utilisées pour extraire les AB de matrices biologiques sont la précipitation de protéines, la SPE, la LLE ou encore la SLE. Leur mise en place est dépendante du type de matrice étudié : tissu ou fluide biologique. *Humbert et al* (164) ont optimisé différentes techniques pour extraire différentes espèces d'AB du sérum, de l'urine, de la bile mais aussi des fèces (164).

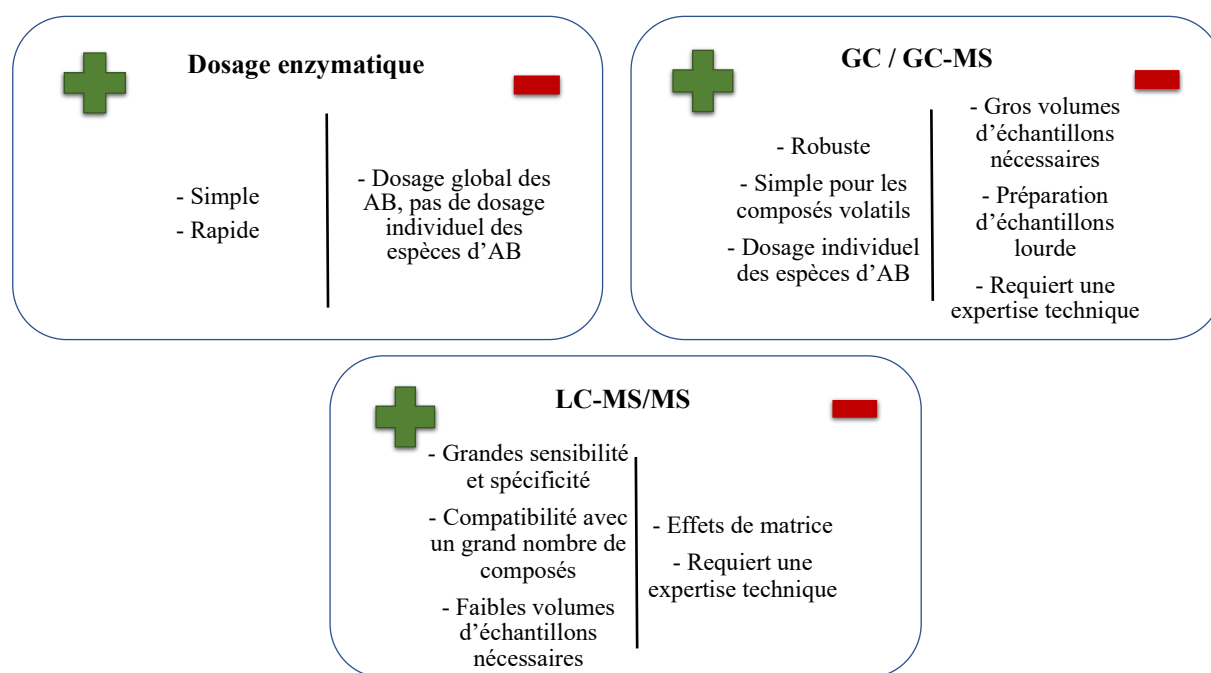


Figure 31 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de dosage des AB

3 Objectifs

Ce travail de thèse s'articule en deux axes principaux :

A) Le DEHP, plastifiant associé au PVC dans les dispositifs médicaux à l'hôpital, est un perturbateur endocrinien et CMR. Les patients hospitalisés en unités de soins intensifs, polyperfusés, sont fortement exposés à ce phtalate qui peut atteindre leur organisme. Il est métabolisé par le foie en ses métabolites primaires et secondaires, tout aussi toxiques. Ces dernières années, des plastifiants alternatifs au DEHP ont été développés, notamment le DEHT qui n'est ni classé perturbateur endocrinien, ni CMR, et qui est également métabolisé *in vivo* en ses métabolites primaires et secondaires (150). Ce plastifiant a été très peu étudié mais peut s'avérer prometteur en tant que substituant au DEHP. Nous avons ainsi choisi de l'inclure dans notre étude.

Les objectifs de ce premier axe de travail ont été les suivants :

1. Développer des méthodes de dosage du DEHP, DEHT et de leurs métabolites primaires et secondaires dans diverses matrices biologiques
2. Appliquer ces méthodes à l'étude du relargage du DEHP et du DEHT à partir de poches de sang

Ces travaux ont conduit à la publication de deux articles qui seront présentés dans ce manuscrit. Le développement du dosage des métabolites du DEHT sera également décrit.

B) Les AB sont synthétisés dans le foie et l'intestin et représentent la voie principale de catabolisme du cholestérol. Le C4 est le marqueur circulant de la synthèse des AB. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans l'absorption des lipides alimentaires mais également dans la signalisation cellulaire des récepteurs FXR et TGR5, impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose, des lipides et de la dépense énergétique. Une modulation du profil des AB peut donc induire une modification de l'homéostasie métabolique.

Les objectifs de ce second axe de travail ont été les suivants :

1. Développer une méthode de dosage du C4 dans le plasma
2. Développer des méthodes de dosage des différentes espèces d'AB dans diverses matrices biologiques (plasma, foie, contenu caecal, urine, lait maternel)
3. Appliquer ces méthodes dans différents contextes de la maladie cardiométabolique

Les développements des méthodes de dosage du C4 et des AB seront décrits ainsi que l'optimisation de leur extraction dans les différentes matrices biologiques. Le développement du dosage des AB dans le lait maternel a conduit à la rédaction d'un article en cours de soumission qui sera présenté dans ce manuscrit. Ces méthodes ont été appliquées dans diverses

études dans le contexte de la maladie cardiométabolique et ont mené à la publication de quatre articles dans lesquels j'ai été impliquée, qui seront intégrés dans ce manuscrit.

Le métabolisme humain peut être modifié par les perturbateurs endocriniens, notamment l'homéostasie du cholestérol. Il a été montré que cet équilibre peut être notamment impacté par l'action des métabolites du DEHP *via* PPAR α (117) et *via* une diminution de l'expression de la CYP7A1 (116), pouvant potentiellement mener à une modification du pool des AB. Le DEHT et ses métabolites, qui n'ont pas été étudiés dans ce contexte, pourraient être agonistes de PPAR α , tout comme le DEHP et ses métabolites. Cette hypothèse ainsi que les objectifs de ce travail sont illustrés en figure 32.

Afin d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse, l'activité des plastifiants, le DEHP et le DEHT, et de leurs métabolites primaires et secondaires ont été mesurées sur le récepteur PPAR α par des essais cellulaires *in vitro* de transfection transitoire et les résultats obtenus seront présentés dans ce manuscrit. Des essais préliminaires de dosage des plastifiants et des AB dans du lysat cellulaire issu de cellules HepG2 seront également décrits.

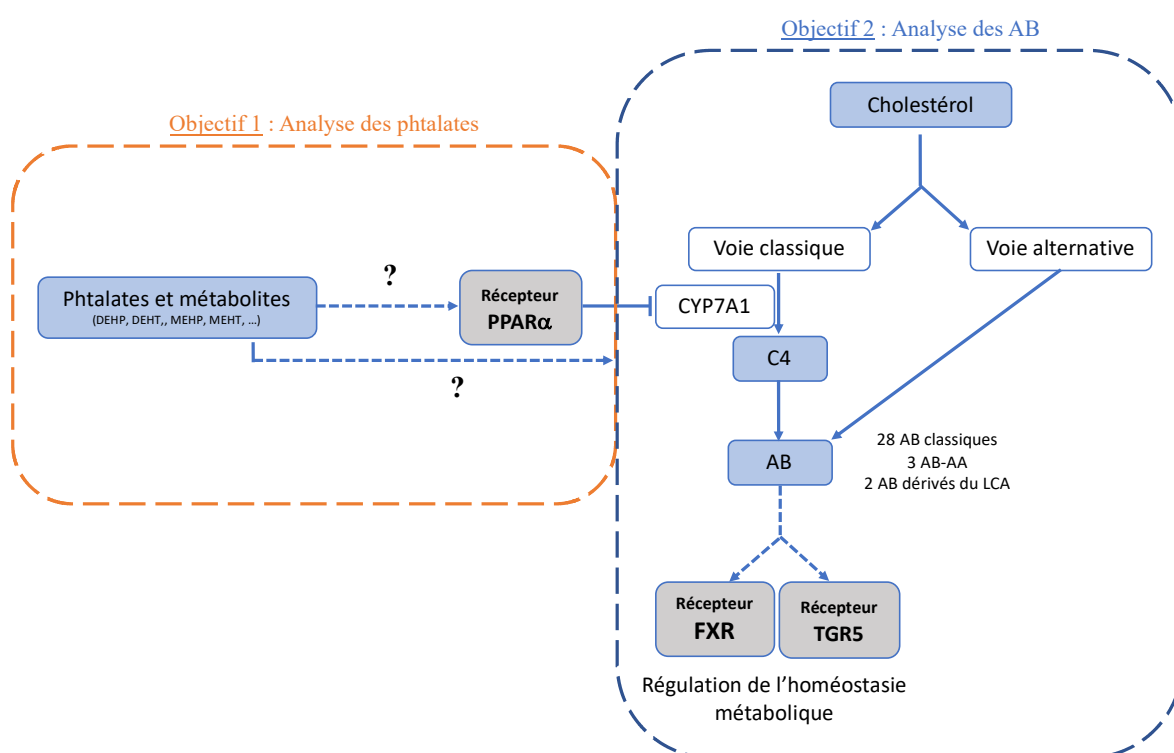


Figure 32 : Objectifs de ce travail de thèse

Matériels et Méthodes

4 Expérimentations en chimie analytique

4.1 Conditions d'analyse du DEHP, MEHP, DINCH et MINCH par LC-MS/MS

La séparation du DEHP, de son métabolite primaire le MEHP, du DINCH et de son métabolite primaire le MINCH a été effectuée à l'aide d'une HPLC UFLC-XR (Shimadzu) et a été réalisée sur une phase stationnaire ACE 3 C₁₈ (100 x 2.1 mm, 3 µm) (AIT) et d'une précolonne C₁₈. Une colonne dite de piégeage de type C₁₈ (100 x 2.1 mm, 5µm) (Interchim) a été connectée entre la chambre de mélange des solvants et l'injecteur. La phase mobile a consisté en (A) : eau + 0,1 % acide formique et (B) : acétonitrile + 0,1 % acide formique. Le débit a été fixé à 500 µL/min et le four contenant la colonne à 30 °C. La séparation s'est effectuée en mode gradient comme suit : 40 % de B sont délivrés pendant 1 min puis atteignent linéairement 95 % de B en 3 min. Un plateau de 6 min à 95 % de B est ensuite maintenu avant le ré-équilibrage de la phase stationnaire à 40 % de B pendant 4 min. Le volume d'injection est de 5 µL.

L'HPLC est couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle QTRAP 5500 (Sciex). Il est équipé d'une source ESI et l'ionisation des analytes est effectuée en mode positif. Les paramètres de masse de chaque analyte ont été optimisés par introduction directe d'une solution dans l'acétonitrile à 1 µM de chacun des standards, injectée à un débit de 7 µL/min en mode d'ionisation positif et en détection « balayage » afin d'obtenir un spectre complet de l'ion analysé. L'ion pseudo-moléculaire a été sélectionné pour la suite de l'optimisation, en mode « Product Ion Scan ». Il a été fragmenté dans la cellule de collision (q2) et les ions fragments produits ont été analysés en mode « balayage » dans le Q3. L'ion fragment produit le plus intense, l'ion quantifiant, et le plus spécifique, l'ion qualifiant, ont été sélectionnés pour la suite du développement de chacun des métabolites. Afin de maximiser l'intensité de ces transitions, l'énergie de collision (EC), le « declustering potential » (DP), le « cell exit potential » (CXP) et le « entrance potential » (EP) ont été optimisés. Le travail a été réalisé en mode MRM.

La tension en source a été fixée à 5500 V. La température d'ionisation à 550 °C. Les pressions des gaz auxiliaire (air), de nébulisation (air) et rideau (azote) ont été respectivement optimisées à 50, 50 et 35 psi. L'azote a été utilisé comme gaz de collision et les énergies de collision ont été optimisées selon les analytes. Le temps d'acquisition pour chaque transition a été réglé à 50 ms. Le logiciel utilisé pour piloter le spectromètre de masse et l'HPLC ainsi que pour traiter les données est Analyst 1.7.2.

4.2 Conditions d'analyse du DEHT par LC-UV

La séparation du DEHT a été effectuée à l'aide d'une HPLC Alliance (Waters) et a été réalisée sur une phase stationnaire Kinetex C₁₈ (100 x 4.6 mm, 2,6 µm) (Phénomenex), équipée d'une précolonne. La phase mobile a consisté en (A) : eau + 0,1 % acide formique et (B) : acétonitrile + 0,1 % acide formique. Le débit a été fixé à 1000 µL/min et le four contenant la colonne à 35°C. La séparation s'est effectuée en mode gradient comme suit : 40 % de B à 100 % de B en 6 min, puis stabilisation de 5 min à 100 % de B, puis diminution de 100 % à 40 % en 1 min, et équilibration à 40 % pendant 5 min. La durée totale de l'analyse est de 17 min. Le volume d'injection est de 20 µL.

L'HPLC est couplée à un détecteur à barrettes de photodiodes 996 (Waters). La détection d'effectue à une longueur d'onde de 240 nm. Le logiciel utilisé pour piloter l'instrument ainsi que pour traiter les données est Empower (version 3).

4.3 Conditions d'analyse des métabolites primaires et secondaires du DEHT par LC-MS/MS

La séparation des métabolites du DEHT (MEHT, 5-oxo-MEHT, 5-cx-MEHT, 5-OH-MEHT) a été effectuée à l'aide d'une HPLC UFLC-XR (Shimadzu) et a été réalisée sur une phase stationnaire Kinetex biphenyl (100 x 2.1mm, 2,6 µm) (Phénomenex), équipée d'une précolonne. La phase mobile a consisté en (A) : eau + 0,1 % acide formique et (B) : acétonitrile + 0,1 % acide formique. Le débit a été fixé à 400 µL/min et le four contenant la colonne à 30°C. La séparation s'est effectuée en mode gradient comme suit : de 25 % de B à 44 % de B en 6 min, puis augmentation de B à 95 % en 1 min, stabilisation de 1 min à 95 %, puis diminution de 95 % à 25 % en 1 min, et équilibration à 25 % pendant 1 min. La durée totale de l'analyse est de 10 min. Le volume d'injection est de 5 µL.

L'HPLC est couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle QTRAP 5500 (Sciex). Il est équipé d'une source ESI et l'ionisation des analytes est effectuée en mode négatif. Les paramètres de masse de chaque analyte ont été optimisés comme décrit dans le paragraphe 4.1. Le travail a été réalisé en mode MRM. La tension en source a été fixée à -4500 V. La température d'ionisation à 650 °C. Les pressions des gaz auxiliaire (air), de nébulisation (air) et rideau (azote) ont été respectivement optimisées à 55, 55 et 25 psi. L'azote a été utilisé comme gaz de collision et les énergies de collision ont été optimisées selon les analytes. Le temps d'acquisition pour chaque transition a été réglé à 50 ms. Le logiciel utilisé pour piloter l'instrument ainsi que pour traiter les données est Analyst 1.7.2.

4.4 Procédures d'extraction des plastifiants et de leurs métabolites de matrices biologiques

4.4.1 Extraction du DEHP, MEHP, DINCH et MINCH de produits sanguins labiles

La méthode d'extraction du DEHP, MEHP, DINCH et MINCH a été optimisée à partir de 4 matrices : le concentré de globules rouges (CGR), le plasma, le sang total et le concentré plaquettaire.

A 500 µL d'échantillon préalablement dilué au centième ont été ajoutés 15 µL de l'étalon interne à 100 nM (concentration finale). Successivement, 500 µL d'acide phosphorique à 7,5 M, 100 µL d'éthanol et 500 µL de solution de chlorure de sodium à 0,9 % ont été ajoutés à l'échantillon. Après passage aux ultrasons durant 15 minutes, l'échantillon a subi une extraction liquide-liquide à l'aide de 1,5 mL d'un mélange heptane/acétate d'éthyle 1/2 (v/v), répétée 2 fois. L'échantillon a été agité durant 30 secondes entre chaque extraction à l'aide d'un vortex. Les phases organiques sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote à température ambiante durant 30 minutes. Le résidu a été reconstitué par 500 µL d'acétonitrile. 5 µL ont été injectés en LC-MS/MS.

4.4.2 Extraction du DEHT et du MEHT de produits sanguins labiles

La méthode d'extraction du DEHT et du MEHT a été optimisée à partir de 4 matrices : le CGR, le plasma, le sang total et le concentré plaquettaire.

A 250 µL d'échantillon (préalablement dilué au cinquième pour le sang total, le plasma et le CGR, dilué au dixième pour le concentré plaquettaire) ont été ajoutés 10 µL de l'étalon interne à 15 µM (concentration finale). Successivement, 250 µL d'acide phosphorique à 15,6 M, 50 µL d'éthanol et 250 µL de solution de chlorure de sodium à 0,9 % ont été ajoutés à l'échantillon. Après passage aux ultrasons durant 15 minutes, l'échantillon a subi une extraction liquide-liquide à l'aide de 750 µL d'un mélange heptane/acétate d'éthyle 2/1 (v/v), répétée 2 fois. L'échantillon a été agité durant 30 secondes entre chaque extraction à l'aide d'un vortex. Les phases organiques sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote à température ambiante durant 30 minutes. Le résidu a été reconstitué par 250 µL d'acétonitrile. 20 µL ont été injectés en LC-UV.

4.4.3 Extraction des métabolites du DEHT de lysat cellulaire (HepG2)

10 millions de cellules (lignée HepG2) ont été cultivées soit avec le DEHT (50 μ M) soit avec le MEHT (50 μ M) pendant 48 h (protocole décrit dans le paragraphe 5.2, p. 96). Le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été rincées 2 fois par 5 mL de PBS froid. 1 mL de mélange d'extraction méthanol/eau (80/20 ; v/v) a été ajouté sur les cellules. Après une période de 10 minutes à -80°C, les cellules ont été grattées, placées dans un tube, vortexées et soumises à un bain à ultrasons durant 10 min. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et évaporé sous flux d'azote. Le résidu sec a été repris par 50 μ L d'un mélange méthanol/eau 50/50 contenant l'EI MEHP-d19 à 250 nM avant l'injection en LC-MS/MS.

4.5 Conditions d'analyse du C4, marqueur de la synthèse des AB, par LC-MS/MS

L'élution du C4 a été effectuée à l'aide d'une HPLC UFLC-XR (Shimadzu) et a été réalisée sur une phase stationnaire Kinetex Coreshell C₁₈ (100 x 2.1 mm, 5 μ m) (Phénomenex), équipée d'une précolonne C₁₈. La phase mobile a consisté en (A) : eau + 0,1 % acide formique et (B) : acétonitrile. Le débit a été fixé à 500 μ L/min et la température du four contenant la colonne fixée à 30 °C. L'élution s'est effectuée en mode gradient comme suit : 75 % de B sont délivrés pendant 2 min puis atteignent linéairement 95 % de B en 5 min. Un plateau de 2 min à 95 % de B est ensuite maintenu avant le ré-équilibrage de la phase stationnaire à 75 % de B pendant 2 min. La durée totale de l'analyse est de 12 min. Le volume d'injection est de 2 μ L.

L'HPLC est couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle QTRAP 5500 (Sciex). Il est équipé d'une source ESI et l'ionisation des AB est effectuée en mode positif. Les paramètres de masse de chaque analyte ont été optimisés comme décrit dans le paragraphe 4.1. Le travail a été réalisé en mode MRM. La tension en source a été fixée à 5500V et la température d'ionisation à 650°C. Les pressions des gaz auxiliaire (air), de nébulisation (air) et rideau (azote) ont été respectivement optimisées à 50, 50 et 25 psi. Le DP et l'EP ont été respectivement fixés à -100V et -10V. L'azote a été utilisé comme gaz de collision et l'énergie de collision a été optimisée à 31eV. Le temps d'acquisition pour chaque transition a été réglé à 100 ms. Le logiciel utilisé pour piloter l'instrument ainsi que pour traiter les données est Analyst 1.7.2.

4.6 Conditions d'analyse des AB par LC-MS/MS

La séparation des AB a été effectuée à l'aide d'une HPLC UFLC-XR (Shimadzu) et a été réalisée sur une phase stationnaire Luna C₁₈ (250 x 3.0 mm, 5 μ m) (Phénomenex), équipée

d'une précolonne C₁₈. La phase mobile a consisté en (A) : tampon 20 mM d'acétate d'ammonium ajusté à pH 8 et (B) : ACN/MeOH (v:v 70:30). Le débit a été fixé à 500 µL/min et la température du four contenant la colonne fixée à 30°C. La séparation s'est effectuée en mode gradient comme suit : 35 % de B sont délivrés pendant 5 min puis atteignent linéairement 90 % de B en 30 min. Un plateau de 2 min à 90 % de B est ensuite maintenu avant le ré-équilibrage de la phase stationnaire à 35 % de B pendant 4 min. La durée totale de l'analyse est de 41 min et l'élution des AB s'effectue entre 6 et 28 minutes. Le volume d'injection est de 5 µL.

L'HPLC est couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle QTRAP 5500 (Sciex). Il est équipé d'une source ESI et l'ionisation des AB est effectuée en mode négatif. Les paramètres de masse de chaque analyte ont été optimisés comme décrit dans le paragraphe 4.1. Le travail a été réalisé en mode MRM. La tension en source a été fixée à -4500V et la température d'ionisation à 550°C. Les pressions des gaz auxiliaire (air), de nébulisation (air) et rideau (azote) ont été respectivement optimisées à 50, 50 et 25 psi. Le DP et l'EP ont été respectivement fixés à -100V et -10V. Les valeurs du CXP varient de -10 à -40V. L'azote a été utilisé comme gaz de collision et les énergies de collision varient entre -40 et -130 eV selon les AB. Le temps d'acquisition pour chaque transition a été réglé à 75 ms. Le logiciel utilisé pour piloter l'instrument ainsi que pour traiter les données est Analyst 1.7.2.

Cette méthode permet la séparation de 31 espèces d'acides biliaires ainsi que de 7 étalons internes deutérés (CA-d₄, CDCA-d₄, GCA-d₄, GCDCA-d₄, TCA-d₄, TyrCA-d₄, LeuCA-d₄).

4.7 Conditions d'analyse d'AB dérivés du LCA par LC-MS/MS

La séparation du 3-oxo-LCA et du isoallo-LCA a été effectuée à l'aide d'une HPLC UFLC-XR (Shimadzu) et a été réalisée sur une phase stationnaire Kinetex Coreshell F5 (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) (Phénomenex), surmontée d'une précolonne F5. La phase mobile a consisté en (A) : eau + 0.1% acide formique et (B) : ACN/MeOH (v:v 70:30) + 0.1% acide formique. Le débit a été fixé à 300 µL/min et la température du four contenant la colonne fixée à 30°C. La séparation s'est effectuée en mode gradient comme suit : 40 % de B sont délivrés pendant 2 min puis atteignent linéairement 90 % de B en 4 min. Un plateau de 2 min à 90 % de B est ensuite maintenu avant le ré-équilibrage de la phase stationnaire à 40 % de B pendant 1 min. La durée totale de l'analyse est de 10 min. Le volume d'injection est de 5 µL.

L'HPLC est couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle QTRAP 5500 (Sciex). Il est équipé d'une source ESI et l'ionisation des AB dérivés du LCA est effectuée en mode négatif.

Les paramètres de masse de chaque analyte ont été optimisés comme décrit dans le paragraphe 4.1. Le travail a été réalisé en mode MRM. La tension en source a été fixée à -4500V et la température d'ionisation à 600°C. Les pressions des gaz auxiliaire (air), de nébulisation (air) et rideau (azote) ont été respectivement optimisées à 45, 45 et 20 psi. Le DP et l'EP ont été respectivement fixés à -100V et -10V. La valeur du CXP a été optimisée à -35V. L'azote a été utilisé comme gaz de collision et les énergies de collision varient entre -23 et -50 eV selon les AB. Le temps d'acquisition pour chaque transition a été réglé à 100 ms. Le logiciel utilisé pour piloter l'instrument ainsi que pour traiter les données est Analyst 1.7.2.

Cette méthode permet la séparation des 2 espèces d'AB dérivés du LCA ainsi que des étalons internes deutérés choisis (CA-d4 et CDCA-d4).

4.8 Procédures d'extraction du C4 de matrices biologiques

4.8.1 Extraction du C4 du plasma

A 100 µL de plasma ont été ajoutés 500 µL d'eau, 50 µL d'EI, 100 µL de méthanol et 60 µL d'acide chlorhydrique (HCl) 1 M. L'échantillon a été agité et déposé sur cartouche SPE (BondElut C18 200 mg 1 mL). La cartouche a été conditionnée au préalable avec 2 mL de méthanol et 2 mL d'eau. Après dépôt de l'échantillon, la cartouche a été lavée avec 2 mL d'eau et le C4 a été élué grâce à 3 mL de méthanol. Après évaporation à sec sous flux d'azote à 30°C, le résidu a été repris par 80 µL de méthanol et 10 µL d'acétate d'ammonium 10 mM, pH 6,5 avant injection en LC-MS/MS.

4.8.2 Extraction du C4 de lysat cellulaire (HepG2)

10 millions de cellules (lignée HepG2) ont été cultivées. Le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été rincées 2 fois par 5 mL de PBS froid. 1 mL de milieu d'extraction (méthanol/eau (80/20 ; v/v) a été ajouté sur les cellules. Après une période de 10 minutes à -80°C, les cellules ont été grattées, placées dans un tube, vortexées et soumises à un bain à ultrasons durant 10 min. Le surnageant a été récupéré après centrifugation et évaporé à sec sous flux d'azote. Le résidu a été repris par 50 µL d'un mélange méthanol/eau 50/50 contenant le CA-d7 avant l'injection en LC-MS/MS.

4.9 Procédures d'extraction des AB de matrices biologiques

4.9.1 Extraction des AB du plasma

A 50 μL de plasma ont été ajoutés 25 μL d'EI à 0,5 μM et 250 μL de méthanol à -20°C afin de précipiter les protéines plasmatiques. Après agitation, l'échantillon a été placé 20 min à -20°C pour parfaire la précipitation. Après centrifugation, le surnageant a été prélevé et évaporé à sec sous flux d'azote à 50°C . Le résidu a été repris par 50 μL d'un mélange eau/méthanol 50/50 avant injection de 5 μL en LC-MS/MS.

4.9.2 Extraction des AB de lysat cellulaire (HepG2)

10 millions de cellules (lignée HepG2) ont été cultivées. Le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été rincées 2 fois par 5 mL de PBS froid. 1 mL de milieu d'extraction (méthanol/eau (80/20 ; v/v) a été ajouté sur les cellules. Après une période de 10 minutes à -80°C , les cellules ont été grattées, placées dans un tube, vortexées et soumises à un bain à ultrasons durant 10 min. Le surnageant a été récupéré après centrifugation et évaporé à sec sous flux d'azote. Le résidu a été repris par 50 μL d'un mélange méthanol/eau 50/50 contenant les 7 EI deutérés avant injection de 5 μL en LC-MS/MS.

4.9.3 Extraction des AB du foie

Protocole 1 : Adapté de *Sayin et al.* (183)

A 5 mg de foie lyophilisé ont été ajoutés 50 μL d'EI et 500 μL de NaOH 0.1M. Après agitation, les échantillons ont été incubés 20 minutes au bain-marie préalablement chauffé à 80°C . Après refroidissement, 1500 μL d'eau ont été ajoutés aux échantillons qui ont de nouveau été agités avant centrifugation à 14000 *rpm* pendant 25 minutes. Le surnageant a été prélevé et 2 mL d'heptane ont été ajoutés. Après agitation et centrifugation à 4000 *rpm* pendant 10 minutes, l'heptane a été éliminé et la procédure a été répétée 2 fois. Le sous-nageant a été déposé sur cartouche SPE (Oasis HLB 60 mg 1 mL). La cartouche a été conditionnée au préalable avec 1 mL de méthanol et 3 mL d'eau. Après dépôt de l'échantillon, la cartouche a été lavée avec 2 x 1 mL d'eau. Les AB ont été élués grâce à 1 mL d'un mélange acétonitrile/méthanol/eau (4/4/2, v/v/v). Après évaporation à sec sous flux d'azote à 45°C , le résidu a été repris par 100 μL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v) avant injection de 5 μL en LC-MS/MS.

Protocole 2 : Adapté de *Humbert et al.* (164)

A 5 mg de foie lyophilisé ont été ajoutés 250 µL de NaOH 0.1M. Après agitation, les échantillons ont été incubés 1h au bain-marie préalablement chauffé à 60°C. Les échantillons ont été agités toutes les 20 minutes. Après 1 h, 500 µL d'eau et 50 µL d'EI ont été ajoutés aux échantillons qui ont de nouveau été agités avant centrifugation à 14000 *rpm* pendant 25 minutes. Le surnageant a été prélevé et déposé sur cartouche SPE (Chromabond HLB 30 mg 1 mL). La cartouche a été conditionnée au préalable avec 2 mL de méthanol et 2 mL d'eau. Après dépôt de l'échantillon, la cartouche a été lavée avec 2 mL d'eau, 2 mL d'heptane puis 2 mL d'eau. Les AB ont été élués grâce à 2 mL de méthanol. Après évaporation à sec sous flux d'azote à 45°C, le résidu a été repris par 100 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v /v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

Protocole 3 : Adapté de *Alnouti et al.* (263)

A 5 mg de foie lyophilisé ont été ajoutés 300 µL d'un mélange méthanol/eau 50/50. Après agitation, 50 µL d'EI et 2 mL d'acétonitrile glacé contenant 5 % d'ammoniaque ont été ajoutés aux échantillons qui ont de nouveau été agités au vortex. Ils ont été placés sous agitation continue durant 1 h à 4 °C. Après centrifugation à 4000 *rpm* pendant 10 minutes, le surnageant a été prélevé et transféré dans un tube propre. 1 mL d'acétonitrile glacé contenant 5 % d'ammoniaque a de nouveau été ajouté au sous-nageant et les échantillons ont été agités en continu durant 1 h supplémentaire. Après centrifugation, le surnageant a été prélevé et ajouté au premier. Après évaporation à sec sous flux d'azote à 45°C, le résidu sec a été repris par 100 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v /v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

4.9.4 Extraction des AB du contenu caecal

A 25 mg de contenu caecal lyophilisés ont été ajoutés 1000 µL de NaOH 0,1 M. Après agitation, les échantillons ont été incubés 1 h au bain-marie préalablement chauffé à 60°C. Les échantillons ont été agités toutes les 20 minutes. Après 1 h, 1500 µL d'eau et 50 µL d'EI ont été ajoutés aux échantillons qui ont de nouveau été agités avant centrifugation à 14000 *rpm* pendant 25 minutes. Le surnageant a été prélevé et déposé sur cartouche SPE (Chromabond HLB 30 mg 1 mL). La cartouche a été conditionnée au préalable avec 2 mL de méthanol et 2 mL d'eau. Après dépôt de l'échantillon, la cartouche a été lavée avec 2 mL d'eau, 2 mL d'heptane puis 2 mL d'eau. Les AB ont été élués grâce à 2 mL de méthanol. Après évaporation

à sec sous flux d'azote à 45°C, le résidu a été repris par 100 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

4.9.5 Extraction d'AB dérivés du LCA, l'isoallo-LCA et le 3-oxo-LCA, du contenu caecal

Protocole 1 : A 25 mg de contenu caecal lyophilisés ont été ajoutés 1000 µL de NaOH 0,1 M. Après agitation, les échantillons ont été incubés 1 h au bain-marie préalablement chauffé à 60°C. Les échantillons ont été agités toutes les 20 minutes. Après 1 h, 1500 µL d'eau et 50 µL d'EI ont été ajoutés aux échantillons qui ont de nouveau été agités avant centrifugation à 14000 *rpm* pendant 25 minutes. Le surnageant a été prélevé et déposé sur cartouche SPE (OASIS HLB 30 mg 1 mL). La cartouche a été conditionnée au préalable avec 2 mL de méthanol et 2 mL d'eau. Après dépôt de l'échantillon, la cartouche a été lavée avec 2 mL d'eau, 2 mL d'heptane puis 2 mL d'eau. Les AB ont été élués grâce à 2 mL de méthanol. Après évaporation à sec sous flux d'azote à 45°C, le résidu a été repris par 100 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

Protocole 2 : A 25 mg de contenu caecal lyophilisés ont été ajoutés 1000 µL de NaOH 0,1 M. Après agitation, les échantillons ont été incubés 1 h au bain-marie préalablement chauffé à 60°C. Les échantillons ont été agités toutes les 20 minutes. Après 1 h, 1500 µL d'eau et 50 µL d'EI ont été ajoutés aux échantillons qui ont de nouveau été agités avant centrifugation à 14000 *rpm* pendant 25 minutes. Le surnageant a été prélevé et déposé sur cartouche SPE (SOLA WAX 30 mg 1 mL). La cartouche a été conditionnée au préalable avec 2 mL de méthanol et 2 mL d'eau + 0,1 % d'acide formique. Après dépôt de l'échantillon, la cartouche a été lavée avec 2 mL d'eau + 0,1 % d'acide formique puis les AB ont été élués grâce à 2 mL de méthanol + 5 % d'ammoniaque. Après évaporation à sec sous flux d'azote à 45°C, le résidu a été repris par 100 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

Protocole 3 : A 25 mg de contenu caecal lyophilisés ont été ajoutés 1000 µL de NaOH 0,1 M. Après agitation, les échantillons ont été incubés 1 h au bain-marie préalablement chauffé à 60°C. Les échantillons ont été agités toutes les 20 minutes. Après 1 h, 1500 µL d'eau et 50 µL d'EI ont été ajoutés aux échantillons qui ont de nouveau été agités avant centrifugation à 14000 *rpm* pendant 25 minutes. Le surnageant a été prélevé et déposé sur cartouche Hybrid-SPE puis les AB ont été récupérés grâce à l'application d'une pression négative. Après évaporation à sec

sous flux d'azote à 45°C, le résidu a été repris par 100 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v /v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

4.9.6 Extraction des AB de la bile et du liquide intestinal

A 150 µL de bile ou de contenu intestinal ont été ajoutés 25 µL d'EI à 0,5 µM et 750 µL de méthanol froid. Après agitation, l'échantillon a été placé 20 min à -20°C. Après centrifugation, le surnageant a été prélevé et évaporé à sec sous flux d'azote à 50°C. Le résidu a été repris par 50 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

4.9.7 Extraction des AB des urines

Protocole 1 : adapté de *Humbert et al.* (164)

A 150 µL d'urine ont été ajoutés 75 µL d'EI à 0,5 µM ainsi que 1500 µL de méthanol à -20 °C. Après agitation, les échantillons ont été placés à -20 °C pendant 20 minutes. Ils ont ensuite été centrifugés à 4000 *rpm* durant 15 minutes. Les surnageants ont été évaporés à sec sous flux d'azote à 45°C et le résidu a été repris par 150 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v /v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

Protocole 2 : adapté de *Han et al.* (275)

A 150 µL d'urine ont été ajoutés 75 µL d'EI à 0.5 µM ainsi que 1500 µL de méthanol à -20 °C. Après agitation et centrifugation à 4000 *rpm* durant 15 minutes, le surnageant a été déposé sur une cartouche Hybrid-SPE. Une pression négative a été appliquée et l'échantillon purifié a été évaporé à sec sous flux d'azote à 45°C. Le résidu a été repris par 150 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v /v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

Protocole 3 : adapté de *Alnouti et al.* (263)

A 150 µL d'urine ont été ajoutés 75 µL d'EI à 0.5 µM ainsi que 1500 µL de méthanol à -20 °C. Après agitation et centrifugation à 4000 *rpm* durant 15 minutes, le surnageant a été déposé sur une cartouche SPE OASIS HLB (30 mg, 1 mL). La cartouche a été conditionnée au préalable avec 1 mL de méthanol et 2 x 1 mL d'eau. Après dépôt de l'échantillon, la cartouche a été lavée avec 2 x 1 mL d'eau. Les AB ont été élués grâce à 2 x 1 mL de méthanol. Après évaporation à sec sous flux d'azote à 45°C, le résidu a été repris par 150 µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v /v) avant injection de 5 µL en LC-MS/MS.

4.9.8 Extraction des AB du lait maternel

A 200 μL de lait maternel ont été ajoutés 50 μL d'EI à 0,5 μM . Après agitation, 1 mL d'un mélange acétonitrile/méthanol 50/50 (v/v) additionné de 0,1% d'acide acétique froid a été ajouté à l'échantillon. Après une nouvelle agitation, l'échantillon a été centrifugé à 10000 *rpm* durant 10 minutes. Le surnageant a été prélevé et 2 mL d'heptane additionné de 0,1% d'acide acétique ont été ajoutés. Après agitation et centrifugation, la phase inférieure a été transférée dans un tube et évaporée à sec sous flux d'azote à 45°C. Le résidu a été repris par 100 μL d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v) avant injection de 5 μL en LC-MS/MS.

5 Expérimentations en pharmacologie cellulaire et moléculaire

5.1 Culture cellulaire

Les cellules hépatocytaires humaines (HepG2) ont été cultivées dans le milieu *Dulbecco's Minimum Essential Media* (DMEM) *High Glucose* contenant 10 % de SVF dialysé et 1 % d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Elles ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de 100 mm à une densité de $2,5 \times 10^6$ cellules/boîte dans du DMEM contenant de 10 % de SVF dialysé et ont été incubées à 37 °C durant 24 h.

Les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK) 293 (ATCC^R CRL-1573) ont été cultivées dans le milieu *Eagle's Minimum Essential Media* (MEM) contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF) et 1 % d'antibiotique (gentamicine). Elles ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de 150 mm à une densité de 7×10^6 cellules/boîte dans du MEM contenant de 10 % de SVF et incubées à 37 °C pendant 72 h avant la transfection. Après 72 h, le nombre de cellules en suspension a été compté sur cellule de Malassez. La densité cellulaire est d'environ 330 000 cellules par mL de milieu.

Les cellules rénales de singe (COS-7) (ATCC^R CCL70) ont été cultivées dans le milieu *Dulbecco's Minimum Essential Media* (DMEM) contenant 10 % de SVF et 1 % d'antibiotique (gentamicine). Elles ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de 150 mm à une densité de 7×10^6 cellules/boîte dans du DMEM contenant de 10 % de SVF et incubées à 37 °C pendant 24 h avant la transfection. Après 24 h, le nombre de cellules en suspension a été compté sur cellule de Malassez. La densité cellulaire est d'environ 340 000 cellules par mL de milieu.

5.2 Incubation des cellules HepG2 avec les plastifiants et leurs métabolites primaires

Les cellules HepG2, à une densité de $2,5 \times 10^6$ cellules/boîte de 100 mm dans du DMEM contenant de 10 % de SVF dialysé, ont été incubées à 37 °C pendant 48 h avec nos composés d'intérêt (DEHP, MEHP, DEHT, MEHT) à 50 μ M dans 10 mL de milieu (soit 500 nmol). Après lavage au PBS et action de la trypsine, les cellules ont été comptées sur cellule de Malassez et réparties par culot de 10 millions de cellules avant lyse et reprise par 50 μ L d'un mélange eau/méthanol 50/50 avant analyse en LC-MS/MS.

5.3 Transfection transitoire des cellules HEK293 et activation de TGR5

Les cellules HEK293 ont été transitoirement co-transfectées avec le plasmide d'expression pCMV tag4b-TGR5h et le plasmide rapporteur pCRE TALuciférase à l'aide du réactif JET PEI (Polyplus transfection). Le plasmide d'expression pCMV- β -galactosidase a été co-transfecté comme contrôle de l'efficacité de la transfection. Les cellules transfectées durant 12 h ont ensuite étéensemencées dans des plaques à 96 puits (environ 10 000 cellules par puits) et incubées pendant 18 h avec les composés d'intérêt (isoallo-LCA, 3-oxo-LCA, iso-DCA, Phe-CA, Leu-CA, Tyr-CA) à des concentrations croissantes (de 0,1 μ M à 100 μ M) déposées en triplicat. L'acide lithocholique (LCA) (EC_{50} TGR5 = 0,53 μ M) à 10 μ M a été utilisé comme composé de référence positif. L'activation de TGR5 humain par nos composés d'intérêt induit l'adénylate cyclase, qui synthétise l'AMPc intracellulaire à partir d'ATP. Cette augmentation d'AMPc active la protéine chimérique produite par le vecteur rapporteur CRE-Luciférase et conduit à l'augmentation de l'activité de la luciférase, qui est détectée après ajout de son substrat, la luciférine. Les cellules ont été lysées grâce à 100 μ L par puits d'un mélange composé de diglycine à 25 mM, de Triton 1x, de $MgSO_4$ à 15 mM, d'EGTA à 4 mM et d'eau et placées au congélateur à - 80 °C durant 1 h. Une solution de dosage de l'activité de la luciférase composée de diglycine à 25 mM, de $MgSO_4$ à 15 mM, d'ATP à 5 mM, de D-luciférine à 62,5 μ M et d'eau, a été ajoutée à 40 μ L de lysat et la luminescence à 405 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques Mithras (Berthold). Une solution permettant le dosage de la β -galactosidase composée de 80 % de tampon Z (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 à pH 7,4 à 100 mM, KCl à 10 mM, $MgSO_4$ à 1 mM, eau), de 19 % d'ONPG (2-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside) à 13 mM et de 1 % de β -mercaptoethanol à 50 mM, a été ajoutée à 20 μ L de lysat et l'activité de la β -galactosidase a été mesurée grâce au même appareillage, à une longueur d'onde de 405 nm. Le protocole est schématisé en figure 33.

L'activité de la luciférase a ensuite été normalisée par rapport à l'activité de la β -galactosidase. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la valeur du LCA 10 μ M et la concentration (EC_{50}) a été calculée à l'aide du logiciel GraphPadPrism 9.5.1 pour chacun des composés étudiés.

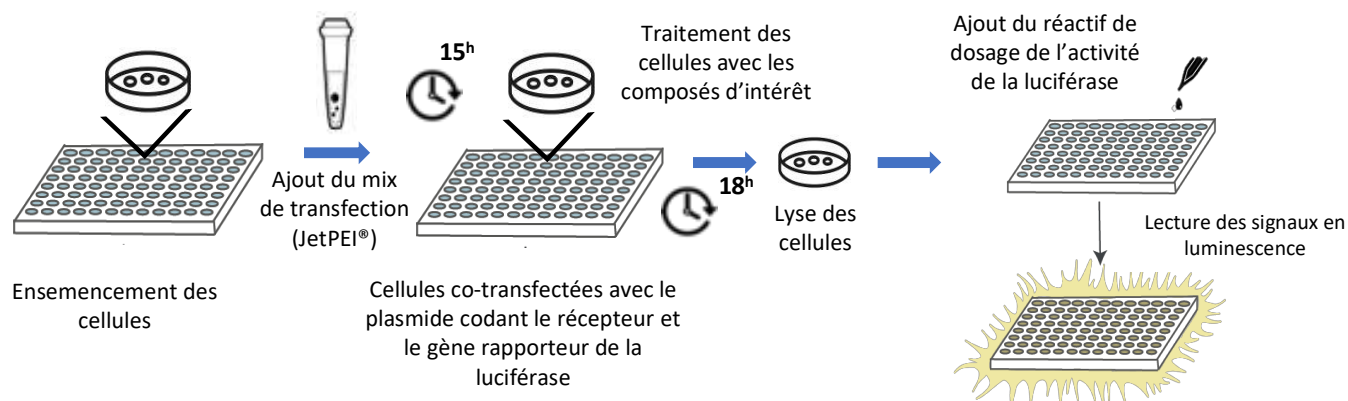


Figure 33 : Protocole de mesure d'activation d'un récepteur par transfection transitoire

5.4 Transfection transitoire des cellules Cos-7 et activation de FXR

Les cellules Cos-7 ont été transitoirement co-transfectées avec le vecteur d'expression pGal4-hFXR et le plasmide rapporteur pG5-TK-pGL3 à l'aide du réactif JET PEI (Polyplus transfection). Le plasmide d'expression pCMV- β -galactosidase a été co-transfecté comme contrôle de l'efficacité de la transfection. Les cellules transfectées durant 12 h ont ensuite été ensemencées dans des plaques à 96 puits (environ 10 000 cellules par puits) et incubées pendant 18 h avec les composés d'intérêt (isoallo-LCA, 3-oxo-LCA, iso-DCA, Phe-CA, Leu-CA, Tyr-CA, DEHP, MEHP, DEHT, MEHT, 5-oxo-MEHT, 5-OH-MEHT et 5-cx-MEHT) à des concentrations croissantes (de 0,1 μ M à 1 mM) déposées en triplicat. Le GW4064 (EC_{50} FXR = 65 nM) à 10 μ M a été utilisé comme composé de référence positif. L'activation de FXR par nos composés d'intérêt stimule le gène rapporteur et la production de luciférase. Les cellules ont été lysées grâce à 100 μ L par puits d'un mélange composé de diglycine à 25 mM, de Triton 1x, de $MgSO_4$ à 15 mM, d'EGTA à 4 mM et d'eau et placées au congélateur à - 80 °C durant 1 h. Une solution de dosage de l'activité de la luciférase composée de diglycine à 25 mM, de $MgSO_4$ à 15 mM, d'ATP à 5 mM, de D-luciférine à 62,5 μ M et d'eau, a été ajoutée à 40 μ L de lysat et la luminescence à 405 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques Mithras

(Berthold). Une solution permettant le dosage de la β -galactosidase composée de 80 % de tampon Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ à pH 7,4 à 100 mM, KCl à 10 mM, MgSO_4 à 1 mM, eau), de 19 % d'ONPG (2-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside) à 13 mM et de 1 % de β -mercaptoethanol à 50 mM, a été ajoutée à 20 μL de lysat et l'activité de la β -galactosidase a été mesurée grâce au même appareillage, à une longueur d'onde de 405 nm.

L'activité de la luciférase a ensuite été normalisée par rapport à l'activité de la β -galactosidase. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la valeur du GW4064 10 μM et la concentration (EC_{50}) a été calculée à l'aide du logiciel GraphPadPrism 9.5.1 pour chacun des composés étudiés.

5.5 Transfection transitoire des cellules HEK293 et activation de $\text{PPAR}\alpha$

Les cellules HEK293 ont été transitoirement co-transfectées avec le vecteur d'expression pGal4-h $\text{PPAR}\alpha$ et le plasmide rapporteur pG5-TK-pGL3 à l'aide du réactif JET PEI (Polyplus transfection). Le plasmide d'expression pCMV- β -galactosidase a été co-transfecté comme contrôle de l'efficacité de la transfection. Les cellules transfectées durant 12 h ont ensuite étéensemencées dans des plaques à 96 puits (environ 10 000 cellules par puits) et incubées pendant 18 h avec les composés d'intérêt (DEHP, MEHP, DEHT, MEHT, 5-oxo-MEHT, 5-OH-MEHT, 5-cx-MEHT) à des concentrations croissantes (de 0,1 μM à 1 mM) déposées en triplicat. Le Wy 14643 (EC_{50} h $\text{PPAR}\alpha$ = 5 μM) à 10 μM a été utilisé comme composé de référence positif. L'activation de $\text{PPAR}\alpha$ par nos composés d'intérêt stimule le gène rapporteur et la production de luciférase. Les cellules ont été lysées grâce à 100 μL par puits d'un mélange composé de diglycine à 25 mM, de Triton 1x, de MgSO_4 à 15 mM, d'EGTA à 4 mM et d'eau et placées au congélateur à - 80 °C durant 1 h. Une solution de dosage de l'activité de la luciférase composée de diglycine à 25 mM, de MgSO_4 à 15 mM, d'ATP à 5 mM, de D-luciférine à 62,5 μM et d'eau, a été ajoutée à 40 μL de lysat et la luminescence à 405 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques Mithras (Berthold). Une solution permettant le dosage de la β -galactosidase composée de 80 % de tampon Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ à pH 7,4 à 100 mM, KCl à 10 mM, MgSO_4 à 1 mM, eau), de 19 % d'ONPG (2-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside) à 13 mM et de 1 % de β -mercaptoethanol à 50 mM, a été ajoutée à 20 μL de lysat et l'activité de la β -galactosidase a été mesurée grâce au même appareillage, à une longueur d'onde de 405 nm.

L'activité de la luciférase a ensuite été normalisée par rapport à l'activité de la β -galactosidase. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la valeur du Wy 14643 10 μM et la

concentration (EC_{50}) a été calculée à l'aide du logiciel GraphPadPrism 9.5.1 pour chacun des composés étudiés.

Résultats

6 Développements analytiques pour la quantification des plastifiants et de leurs métabolites

Afin de répondre à nos hypothèses de travail, il est nécessaire de pouvoir quantifier les plastifiants que nous avons choisi d'étudier et leurs métabolites dans des matrices biologiques. Cette partie sera consacrée aux développements de méthodes analytiques qui ont été réalisés dans le but de doser spécifiquement nos molécules d'intérêt. Ce travail a notamment fait l'objet de deux publications qui seront présentées ci-après.

6.1 Développement du dosage par LC-MS/MS du DEHP, du DINCH, du MEHP et du MINCH dans les produits sanguins labiles : Publication 1

Le dosage du DEHP, du DINCH, un plastifiant alternatif au DEHP, et de leurs métabolites primaires a été développé en LC-MS/MS. L'analyse du DEHP s'est avérée délicate en raison de son omniprésence dans l'environnement de travail. Malgré les précautions prises pour éviter la contamination des solvants et de la verrerie, la contamination en DEHP provenant des tubulures de l'HPLC était constante. Afin de remédier à cette contamination de nos analyses, une colonne chromatographique de piégeage a été mise en place entre la chambre de mélange des solvants et l'injecteur du système LC. Cette configuration a permis de distinguer le DEHP présent dans l'échantillon du DEHP apporté par la contamination environnementale. La méthode de dosage a été validée selon les critères de l'*European Medicines Agency* (EMA) et une méthode de préparation des échantillons biologiques utilisant l'extraction liquide-liquide a été développée avec succès. Elle a été appliquée à l'évaluation de la migration du DEHP et du DINCH à partir de poches de sang en PVC-DEHP et PVC-DINCH et les concentrations de leurs métabolites primaires ont été déterminées dans quatre produits sanguins labiles contenus dans les poches : le sang total, le concentré de globules rouges, le plasma et le concentré plaquettaire. Le DINCH est retrouvé en quantités 8 fois moins importantes que le DEHP dans les produits sanguins labiles contenus dans les poches, présentant un relargage moins important que le DEHP.

Simultaneous determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate and their monoester metabolites in four labile blood products by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2020), 181:113063

Amandine Descat^{a,b}, Marie Lecoœur^{a,*}, Mostafa Kouach^{a,b}, Laurence Goossens^a, Aurélie Thelliez^a, Pascal Odou^{a,c}, Bertrand Decaudin^{a,c,1}, Jean-François Goossens^{a,b,1}

^a Univ Lille, ULR 7365 - GRITA - Groupe de Recherche sur les Formes Injectables et Technologies Associées, F-59000, Lille, France

^b Univ Lille, Plateau de spectrométrie de masse - ULR 7365 - GRITA - Groupe de Recherche sur les Formes Injectables et Technologies Associées, F-59000, Lille, France

^c Department of Pharmacy, University Hospital, F-59000, Lille, France

* Corresponding author

¹ Co-last authors

Abstract

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a common plasticizer that is largely used for PVC blood bags. The migration of DEHP from medical devices into labile blood products (LBP) is a well-known situation. While DEHP has beneficial effects on the storage of red blood cells, it can have toxicological impact due to its potential reprotoxic effects (classified group 1B). Since July 1st, 2015, the French law prohibits the use of tubing made in DEHP-plasticized PVC in paediatric, neonatal and maternity wards. This provision, which could extend in several years more widely to medical devices used for drugs infusion, dialysis, feeding and blood bags, has led manufacturers to replace DEHP to alternative plasticizers such as diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH). In this paper, a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC MS/MS) method has been developed and validated for the determination of DEHP, DINCH and their corresponding monoester metabolites (MEHP and MINCH) in four labile blood products (LBP): whole blood (WB), red cells concentrate (RCC), plasma and platelet concentrate (PC). Due to strong contamination of blank LBP by DEHP because of its ubiquitous presence in working environment and despite the attention paid to avoid contamination of solvents and glassware, a trap chromatographic column was implemented between the solvent mixing chamber and the injector of the LC system. This set-up permitted to discriminate DEHP present in the sample to DEHP brought by the environmental contamination. In the optimized conditions, all compounds were separated in less than 10 min. The analytes were extracted from

LBP samples using a liquid-liquid extraction. After optimization, recoveries were ranged from 47 to 96 %, depending on the analytes and the nature of LBP. Except for DEHP which exhibited RSD values of intermediate precision higher than 20 % at a concentration of 25 nM, all the precision results (repeatability and intermediate precision) were lower than 16 % and trueness values ranged from -16.2–19.8%. Using the validated method, the leachability of DEHP and DINCH from corresponding PVC-blood bags was investigated and the concentrations of their corresponding metabolites, MEHP and MINCH, were determined in whole blood, red cells concentrate, plasma and platelet concentrate.

Keywords: Diethylhexyl phthalate (DEHP), Diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) Labile blood product (LBP), Liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), Metabolites, Trap column.

6.1.1 Introduction

Phthalic acid esters usually called phthalates are widely used in industrial applications (vinyl flooring, ink, glue, cosmetics, textile...). In polymer industry, phthalates act as plasticizers to improve flexibility and workability of polyvinylchloride (PVC). Among applications, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) was very useful for producing medical devices such as blood bags and tubings used for blood collection, labile blood product (LBP) processing and transfusion. As phthalates are not chemically bonded in the PVC, they can be released from the medical device during contact with the corresponding LBP along the storage life, then penetrate into the human fluid during transfusion. DEHP is considered as a class-1B carcinogen, mutagen or toxic for reproduction chemical compound due to its reproductive toxicity in animal studies (1). Hence, since 2010, European authorities (European Directive 2007/47/CE) have challenged the use of DEHP in medical devices destined to the administration or removal of drugs, biological liquids or other substances into or from the human body. As a result, since July 1st, 2015, the French law prohibits the use of tubing made in DEHP-plasticized PVC in paediatric, neonatal and maternity wards. In several years, this provision which could be extended more widely to medical devices used for dialysis and blood bags, has led manufacturers to replace DEHP by alternative plasticizers. Among the different possibilities classically used for the plasticization of PVC medical devices (2), the compatible options for the LBP storage seems to be very limited (3,4) that raises many questions from transfusion centers (5). Indeed, the leachability of butyryl trihexyl citrate (BTHC) from PVC blood bag into the LBP affects both the quality of platelet concentrate (PC) (6) and that of red cells concentrate (RCC) (7,8). Regarding di(2-

ethylhexyl)terephthalate (DEHT), it could be considered as a potential DEHP alternative although hemolysis values were higher than DEHP (9). According to the Scenihir report (1), DINCH is considered as non-genotoxic and non-carcinogen. It is neither a reproductive toxicant nor an endocrine disruptor in rodents (1). Thyroid hyperplasia, signs of renal toxicity (1) and cytotoxicity on L929 cells are only observed at relatively high dose levels (10). However, metabolites have been found to be more cytotoxic (10). Hence, diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) seems to be a good candidate because it possesses similar plasticization properties to that of DEHP and a lower cytotoxic effect (11-13). In order to verify this hypothesis, the leachability of DINCH into the four LBP, namely whole blood (WB), plasma, red cells concentrate and platelet concentrate (PC) has to be evaluated and compared with DEHP.

HPLC-MS and GC-MS are both techniques usually developed to quantify plasticizers and their corresponding monoester metabolites (MEHP and MINCH) at trace levels in labile blood products (Table 1). However, analysis of DINCH is challenging because the complex isomer formulation with different degrees of branching leads to GC chromatographic profile with a high number of unresolved peaks (14-16) or a broad and distorted peak obtained by LC (17) that may cause approximative results during quantitative analysis. In addition, limits of quantitation (LOQ) obtained by GC are rather high even if MS system is hyphenated (15, 17, 18). Although LC-UV seems to be suitable to evaluate the leachability of DEHP in plasma, RCC and PC (19, 20), sensitivity of UV detection is too poor to determine the concentration of its metabolite.

Regarding the other methods described in the literature for the quantitation of DEHP, MEHP, DINCH and MINCH, none of them provide a universal protocol of extraction whatever the nature of the LBP. Off-line SPE has been successfully applied to extract DINCH and MINCH from plasma, PC and RCC (12, 19). However, this extraction method seems to be hardly transferable for DEHP because contamination may occur with the use of plastic SPE cartridge. LLE is an interesting alternative to on-line SPE (21) since no specific equipment is required and recoveries obtained for DEHP and MEHP extracted from WB are higher than 90% (22).

It is also important to underline that the development of a LC-MS/MS method for the quantitation of DEHP at trace level is a real analytical challenge and the limitation of contamination problem concerns every steps of the method implementation. Indeed, since DEHP is a ubiquitous semi-volatile plasticizer, there are numerous sources of sample contamination during sample preparation and analysis: disposable plastic consumable, organic

solvents (23), gas supply (24), HPLC system (25) and the laboratory air since DEHP vapors can contaminate the surface of all materials at disposal (26).

The aim of this work was to develop and validate a unique LC-MS/MS method preceded by a liquid-liquid extraction for the simultaneous quantitation of DEHP, MEHP, DINCH and MINCH in WB and its LBP *ie* plasma, PC and RCC. Finally, this method was applied to evaluate the migration of DEHP and DINCH from their corresponding plasticized-PVC blood containers into the four LBP and to determine the concentration of their respective metabolites, MEHP and MINCH.

Table 1: LC and GC methods for the determination of DEHP, MEHP, DINCH and MINCH in labile blood products

Analyte	Blood Product	Sample preparation	Analytical technique	Reference
DEHP	Plasma, RCC, PC	LLE with acetonitrile/hexane	LC-UV	[18]
	WB, RCC, PC, Plasma	LLE MeOH/ACN/hexane Recovery not specified	GC-MS (IE-Q)	[16]
	RCC	not specified	LC-MS (ESI-Q)	[11]
	plasma	LLE with NaOH/ ACN/ hexane	LC-UV	[19]
	WB, RCC, plasma, PC	On-line SPE (Bioptric AV-2 column) 91 < Recoveries < 106 %	LC-MS (ESI-Q)	[20]
	WB	LLE with EtOH/ NaCl/ H ₃ PO ₄ / n-hexane/ Ethyl acetate 89 < Recoveries < 93,5 %	LC-MS/MS (ESI-QQQ)	[21]
MEHP	Plasma, RCC, PC	LLE with ACN/acidified hexane	LC-UV	[18]
	WB, RCC, plasma, PC	On-line SPE (Bioptric AV-2 column) 91 < Recoveries < 106 %	LC-MS (ESI-Q)	[20]
	RCC	not specified	LC-MS (ESI-Q)	[11]
	WB	LLE with EtOH/ NaCl/ H ₃ PO ₄ / n-hexane/ Ethyl acetate 89 < Recoveries < 93,5 %	LC-MS/MS (ESI-QQQ)	[21]
DINCH	Plasma, PC, RCC	Protein precipitation with MeOH then SPE (stationary phase not specified) Recovery not specified	LC-MS/MS (ESI-QQQ)	[18]
	RCC	Protein precipitation with MeOH then SPE (stationary phase not specified) Recovery not specified	LC-MS/MS (ESI-QQQ)	[11]
	RCC	LLE with NaCl and n-hexane	GC-MS/MS (CI-QQQ)	[17]
MINCH	RCC	Protein precipitation with MeOH then SPE (stationary phase not specified) Recovery not specified	LC-MS/MS (ESI-QQQ)	[11]
	Plasma, PC, RCC	Protein precipitation with MeOH then SPE (stationary phase not specified) Recovery not specified	LC-MS/MS (ESI-QQQ)	[18]

CI: chemical ionization; LLE: liquid-liquid extraction; PC: platelet concentrate; RCC: red cells concentrate; SPE: solid phase extraction; WB: whole blood

6.1.2 Materials and methods

A. Chemicals

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), bis-(2-ethylhexyl) phthalate-3,4,5,6-d₄ (DEHP-d₄) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Di- isononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) and 1,2-cyclohexane monocarboxylic acid monoisononyl ester (MINCH) were obtained from BASF (Meaux, France). Di-isononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate-d₆ (DINCH-d₆) was acquired from

Alsachim (Illkirch-Graffenstaden, France). All structures are presented in figure 1. Except for ethanol of HPLC grade, all organic solvents were of HPLC-MS grade. Ethanol, heptane and ethyl acetate were purchased from Merck (Guyancourt, France), acetonitrile and dioxane from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Phosphoric acid was obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and sodium chloride solution (0.9 % w/v) from CDM Lavoisier (La Chaussée Saint Victor, France).

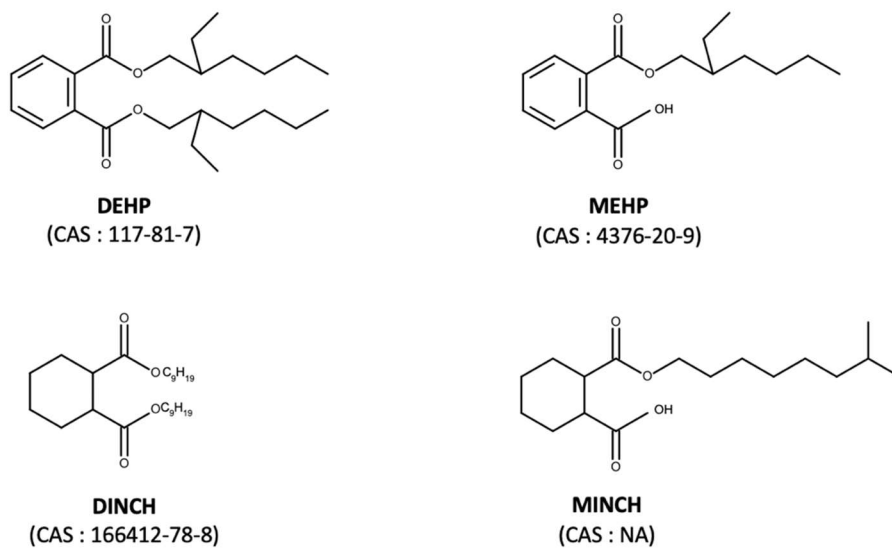


Figure 1: Chemical structures of the four analytes investigated.

DEHP: di(2-ethylhexyl) phthalate, DINCH: diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate, MEHP: mono-(2-ethylhexyl) phthalate, MINCH: 1,2-cyclohexane monocarboxylic acid monoisononyl ester

MINCH-d19 analog, used as deuterated internal standard, was synthesized by esterification of the 1,2-cyclohexanedicarboxylic anhydride (Acros Organics, Illkirch, France) by the n-nonyl-d19 alcohol (98 % isotopic purity, CDN Isotopes Inc, Pointe-Claire, QC, Canada) according to the following protocol (Figure 2): n-nonyl-d19 alcohol (1.1 eq) in dioxane was added to a stirring solution of 1,2-cyclohexanedicarboxylic anhydride (1.0 eq) in dioxane. The flask was sealed and heated at 100°C for 72 h. Solvents were evaporated, dried under high vacuum, and the residue was analyzed by HRMS (Orbitrap mass spectrometer Exactive, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), at a resolution of 100 000, equipped with a heated electrospray ionization source, operating in positive ionization mode, to confirm the identity and to determine the

purity. The presence of a sodium adduct with an experimental m/z 340.32192 (-4.46 ppm) confirmed the formation of the deuterated MINCH-d19 analog.

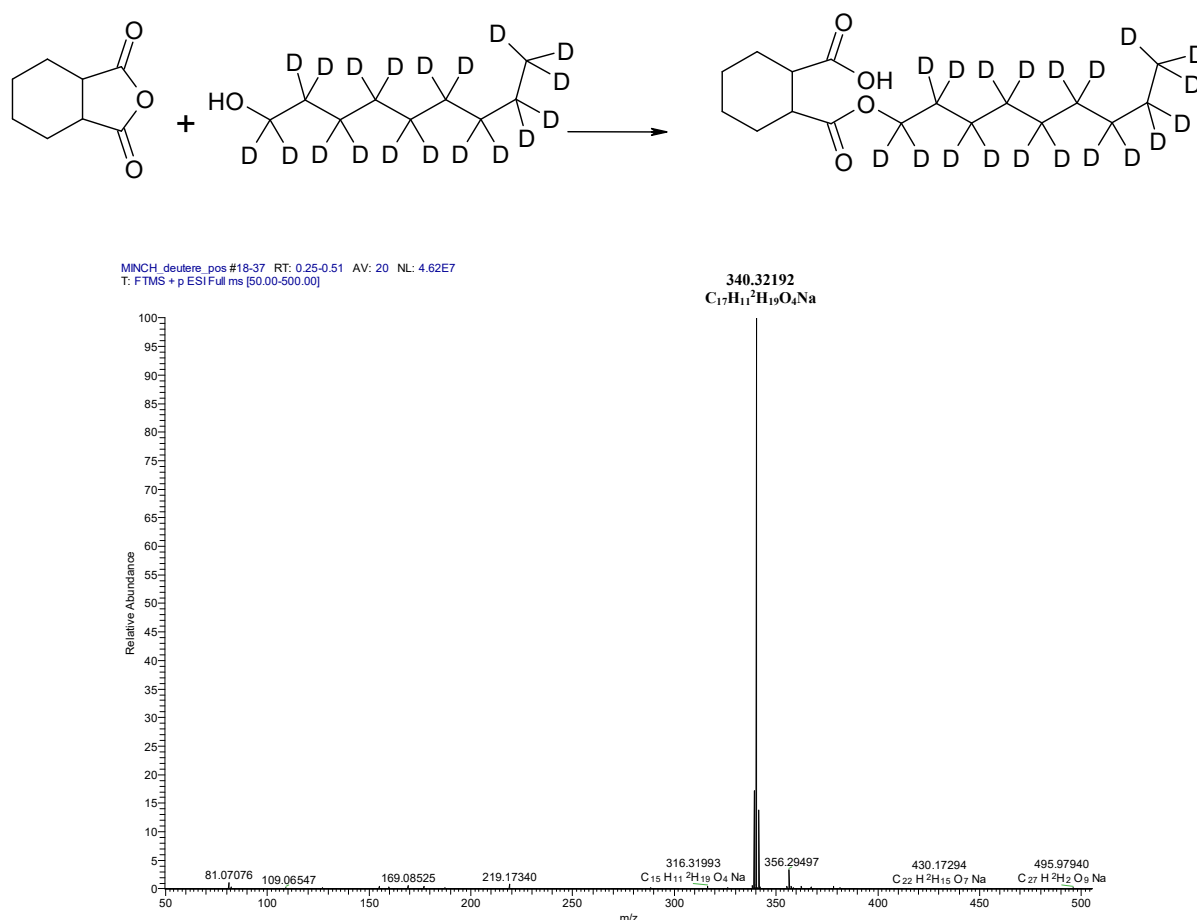


Figure 2: Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid mono d₁₉ nonylester synthesis and its corresponding HRMS spectrum obtained in positive ionization mode.

B. Collect of whole blood and preparation of labile blood products

Whole blood, donated by consenting volunteer research donors, was collected by the French Blood Agency (EFS, Lille, France) using a PVC-made blood collection system plasticized either by DEHP (LQT system) or by DINCH (prototype system) both from Macopharma (Tourcoing, France). These medical devices were composed of four bags enable the separation of each LBP (plasma, buffy coat and red cells concentrate) by a top and bottom process followed by the filtration of red cells concentrate by a filter (LCRD2 type, Macopharma). Furthermore, the 500 mL whole blood collection bag was filled with 70 mL of citrate phosphate

dextrose (CPD) solution whereas de-leucoreduced RCC were stored in saline-adenine- glucose-mannitol (SAGM, 110 mL) solution.

After collection, WB was cooled and stored at 20–24°C overnight. The WB bag was centrifuged at 5000 g for 15 min at 22°C then the application of frontal pressure (from 50 to 600 mbar) enables the collection of RCC and plasma in their corresponding storage bag. The buffy coats from five donors were pooled then diluted in a platelet additive storage solution (SSP+, Macopharma) to obtain platelet concentrate. All LBP were stored at +4°C and LC–MS/MS analysis was performed within seven days after sampling.

C. LC-MS/MS method

LC–MS/MS analyses were performed using UFLC-XR system (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a QTRAP[®] 5500 MS/MS hybrid system triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (Sciex, Foster City, CA, USA), equipped with a Turbo VTM ion source operating in positive ion mode. The Sciex Analyst software package (version 1.5.2) was used for the LC–MS/MS system control, data acquisition and processing.

Separations were carried out on a reversed-phase ACE 3 C18 (100 × 2.1 mm i.d., 3 µm) column (AIT, Houilles, France). A C18 trap column (100 × 2,1 mm i.d., 5 µm, Interchim, Montluçon, France) was connected between the solvent mixing chamber and the injector of the HPLC apparatus then set in the column oven. A gradient separation mode was used to separate the analytes, using H₂O (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1 % formic acid. The elution gradient performed at 500 µL.min^{−1} was the following: (1) 60/40(v/v) mixture of solvents A and B for the first 1 min; (2) increase to 95 % of B in a linear gradient from 1 to 4 min; (3) 5/95 (v/v) mixture of solvents A and B from 4 to 10 min. Then, the column was equilibrated in the initial conditions for 4 min. The column was thermostated at 30°C and the injection volume was 5 µL.

Air was used as the nebulizer and heater gas, while nitrogen was used as curtain and collision gas. In the optimal conditions, the ion source nebulizer (GS1), heater (GS2) and curtain gas pressure were 50, 50, and 35 psi, respectively. The ion-spray needle voltage and the declustering potential (DP) were set at 5500 V and 90 V, respectively. A heater gas temperature of 550°C was selected. The mass spectrometer was used in the multiple reaction monitoring mode (MRM). The precursor > product ion transitions with the highest intensity and/or specificity

were selected to give the maximum sensitivity and selectivity for each analyte. The identification of each analyte was based on the quantifier/qualifier transitions ratio. Retention time as well as MRM parameters (m/z of precursor ion, collision energy, m/z of product ion, quantifier/qualifier ion transition ratio) for each analyte are summarized in Table 2. Additionally, the CXP potential of the collision cell was set at 15 V, for all analytes.

Table 2: Retention times and MRM parameters of the analytes and their corresponding internal standards

Analyte	Retention time (min)	Ion precursor (m/z)	Quantifier ion (m/z)	Collision energy (eV)	Qualifier ion (m/z)	Collision energy (eV)	Quantifier/qualifier ion transition ratio
DEHP	5.8	391	149	32	167	17	2.5
MEHP	2.7	279	167	11	149	24	0.6
DEHP-d4	5.8	395	153	32	-	-	-
DINCH	6.4	425	281	13	127	17	1.3
DINCH-d6	6.4	431	287	13	-	-	-
MINCH	3.6	299	155	15	109	28	1.2
MINCH-d19	3.6	318	155	15	-	-	-

The dwell time of each MRM transition was 50 ms.

D. Sample preparation

Preparation and storage of all solutions are performed only with glass material to prevent the extraction of plasticizers from plastic consumables. The glassware is decontaminated before use by successive rinses with THF, MeOH and water. Some plastic consumables such as tips for micropipettes (Tipone[®], Starlab, France), conic plastic tubes (Eppendorf, Le Pecq, France) and plastic caps for haemolysis glass tubes (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) were also used but they were systematically checked before analysis to be plasticizer-free.

a. Stock solutions, calibration and validation standards

Stock solutions of each plasticizer (17 mM) were prepared in ACN and sonicated in an ultrasonic bath for 10 min to ensure a complete dissolution. Stock solutions of each internal standard were also prepared in ACN at a concentration of 10 mM. These solutions were stored for 30 days at 4°C. All solutions were diluted in ACN by a 1000-fold factor to obtain the individual working solution of each analyte. These solutions were used to prepare two distinct series of calibration and validation standards. The first series was prepared from corresponding LBP collected in PVC-bag plasticized with DEHP after a 100-fold factor dilution in water and

contained DINCH and MINCH and their internal standards, *i.e* DINCH-d6 and MINCH-d19, respectively. The second series was prepared from corresponding LBP collected in PVC-bag plasticized with DINCH after a 100-fold factor dilution in water and contained DEHP, MEHP and DEHP-d4 as internal standard. Calibration was carried out using five calibration standards (CS) prepared by spiking the corresponding diluted LBP with working solutions of each analyte. The concentration range was 25–300 nM. Three validation standards (VS) were also prepared in which concentrations of analytes were 25, 120 and 300 nM. For each series, calibration and validation solutions contained 100 nM of corresponding internal standard. Each CS and VS were processed as described in the following section before LC–MS/MS analysis.

b. Liquid-Liquid extraction

An aliquot of 500 μ L diluted LBP (100-fold) was transferred into a glass tube then spiked with 15 μ L of internal standard (final concentration 100 nM). Subsequently, 100 μ L of ethanol, 500 μ L of 0.9% sodium chloride solution and 500 μ L of 7.5 M phosphoric acid solution were added. After sonication for 15 min, the sample was then extracted thrice with 1.5 mL of n-heptane/ethyl acetate – 1/2 (v/v) mixture. After each addition of extraction solvent, the sample was vortexed for 30 s. Subsequently, the supernatants were transferred into a clean glass vial and then the pooled extracts were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The residue was dissolved in 500 μ L of ACN and 5 μ L of the solution were injected into the LC–MS/MS apparatus.

E. Validation of the method

First, stability was ensured for every step in the analytical method, meaning that the conditions applied to the stability tests, such as sample matrix, anticoagulant, container materials, storage and analytical conditions were similar to those used for the actual study samples. Stability of the analyte in the studied matrix was evaluated using low and high calibration standards (CS) (blank matrix spiked with analyte at a concentration of a maximum of 3 times the LLOQ and close to the upper limit of quantitation, ULOQ) which are analyzed immediately after preparation and after the applied storage conditions that are to be evaluated. The CS samples were analyzed against a calibration curve, obtained from freshly spiked calibration standards, and the obtained concentrations are compared to the nominal concentrations. The mean concentration at each level should be within ± 15 % of the nominal concentration.

The matrix effect (ME) was evaluated by comparing the slope of the calibration curve set from standard solutions with that of matrix matched standard solutions. The matrix effect was calculated using the following formula:

$$\text{ME (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Where A is the slope of the calibration curve for standard solutions and B, the slope of the calibration curve for matrix matched standard solutions.

Validation of the method was performed for each LBP (WB, plasma, PC, RCC) and was carried out on three consecutive days. Each day, five CS and three validation standards (VS; each prepared in triplicate), a blank LBP sample obtained by a 100-fold dilution of the corresponding LBP and the same sample spiked with internal standards were prepared and analyzed. Selectivity, response function, linearity, trueness and precision (repeatability and intermediate precision) were evaluated. Trueness and precision, expressed as bias (%) and relative standard deviation (%RSD), respectively, were assessed by back-calculating the concentration of each validation standards. Acceptance criteria were set in accordance with the requirements of European Medicines Agency (27) namely %RSD and relative bias under 15 % for the VS samples (except 20 % for the lower limit of quantitation, LLOQ). The carry-over was assessed by injecting a blank sample after a calibration standard at the upper limit of quantification *i.e.* 300 nM for the analyte and 100 nM for the corresponding internal standard. The absence of carry-over was demonstrated if peak area in this blank sample was lower than 20 % of the lower limit of quantification and 5 % for the internal standard (27).

In addition, stability of stock solutions and working solutions for each analyte and internal standard was assessed by comparison of freshly prepared solutions to solutions stored ever at room temperature for 24 h (period and conditions during LPB processing) or at +4°C for seven days (storage conditions before analysis). The stability of analytes was determined in each LBP (WB, plasma, PC, RCC) from two validation standards (medium (VS2) and the highest (VS3); n = 3, per concentration).

6.1.3 Results and discussion

A. Method development

a. Optimization of elution gradient

In a first step, mobile phase composition was deeply investigated by LC–MS/MS, using a C18 stationary phase, not only to stack the chromatographic peak of DINCH but to optimize the MS detection. A mobile phase composed of ACN/water (0.1 % HCOOH) mixture and eluted under a gradient step of 2.75 % ACN/min was adequate for the separation of DEHP, MEHP and MINCH but not satisfying for DINCH because it was eluted under a broad peak with a poor sensitivity. Finally, all compounds were totally resolved in 7 min under gradient elution by selecting a mobile phase with strong elution strength (95 % ACN at the end of the gradient) and a high slope for the gradient step (an increase in 18 % ACN/min).

b. Setting-up a trap column

The second and main challenge relative to the analysis of plasticizers at trace level concerned the limitation of contamination problem especially for DEHP. Although attention was paid to avoid potential contamination: 1) use of plasticizer-free material, 2) use of new bottle of high purity solvent (of LC–MS grade), 3) bi-distilled solvent, a strong contamination with DEHP was observed during the analysis of a blank sample (ACN or H₂O). This contamination was detected only under elution gradient mode when the content of acetonitrile in the mobile phase reached 90 %. After deep investigation, we concluded that DEHP contamination came from the LC system and was favored by using a mobile phase with a high content of ACN. In order to discriminate DEHP contamination and DEHP present in the sample, a trap column was implemented on the system (Figure 3) as proposed by Vavrous et al. (25). This column, possessing the same chemistry as the separative one, was connected between the solvent mixing chamber and the injector of the LC apparatus then set in the column oven.

The interest of this set-up is shown in Figure 4. The 391 > 149 MRM transition recorded during the analysis of a blank sample reveals the presence of DEHP in a large quantity (Figure 4A). The chromatograms of a spiked sample containing DEHP and MEHP both at 100 nM are presented in Figure 4B. Two peaks were observed by following the specific MRM transition of DEHP: the first one eluted at 5.8 min corresponds to DEHP added in the sample whereas the second one (t_R =7.8 min) matches for the contamination signal. The retention of DEHP brought by the contamination was delayed for 2.6 min in comparison of the retention of DEHP from the

sample because it is successively retained by the trap and the separative columns. As expected, no contamination by MEHP was noticed. The small peak at 4.8 min on the chromatogram corresponds to a baseline disturbance related to gradient elution mode. Note the in-source fragmentation of DEHP depicted by the presence of a chromatographic peak at the retention time of DEHP but recorded with the 279 > 167 MRM transition.

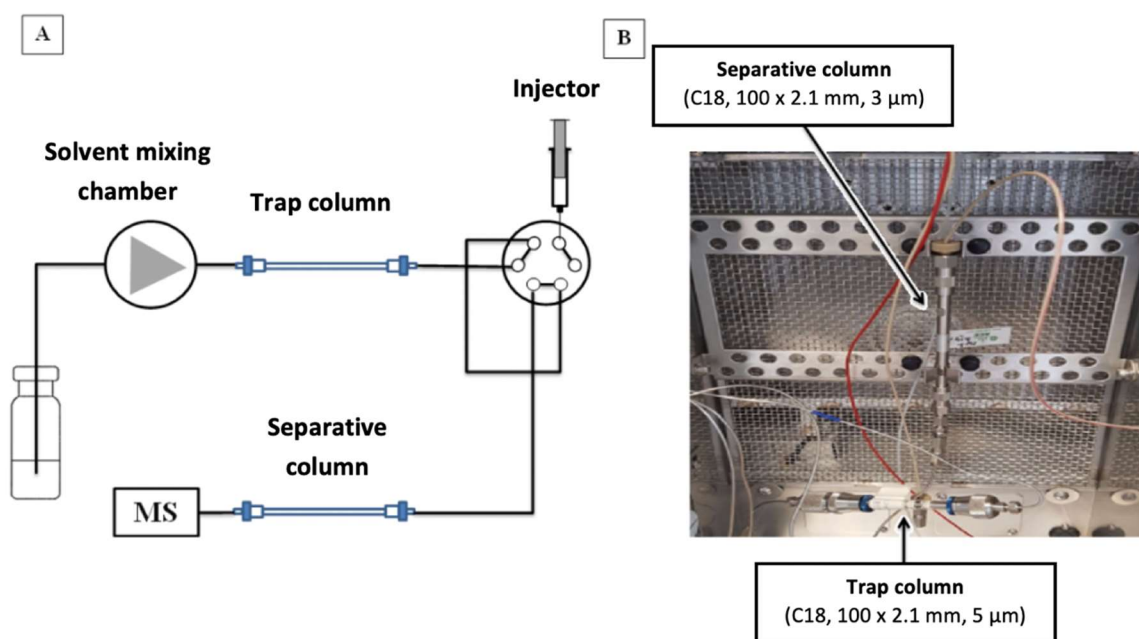


Figure 3: Schematic diagram (A) and picture (B) of the trap-column implemented on the HPLC system

The trap column was plumbed between the solvent mixing chamber and the injector of the HPLC apparatus, in the column oven.

c. Liquid-liquid extraction (LLE)

The aim of this step was to develop a single LLE method for the extraction of four analytes from each LBP. From an ideal point of view, similar extraction yield has to be obtained for all the analytes whatever the biological matrix with a minimal time-consuming. LLE was optimized based on the Eckert's work (22) while reducing the volume of extraction solvents and substituting CMR solvents by other with less toxicity.

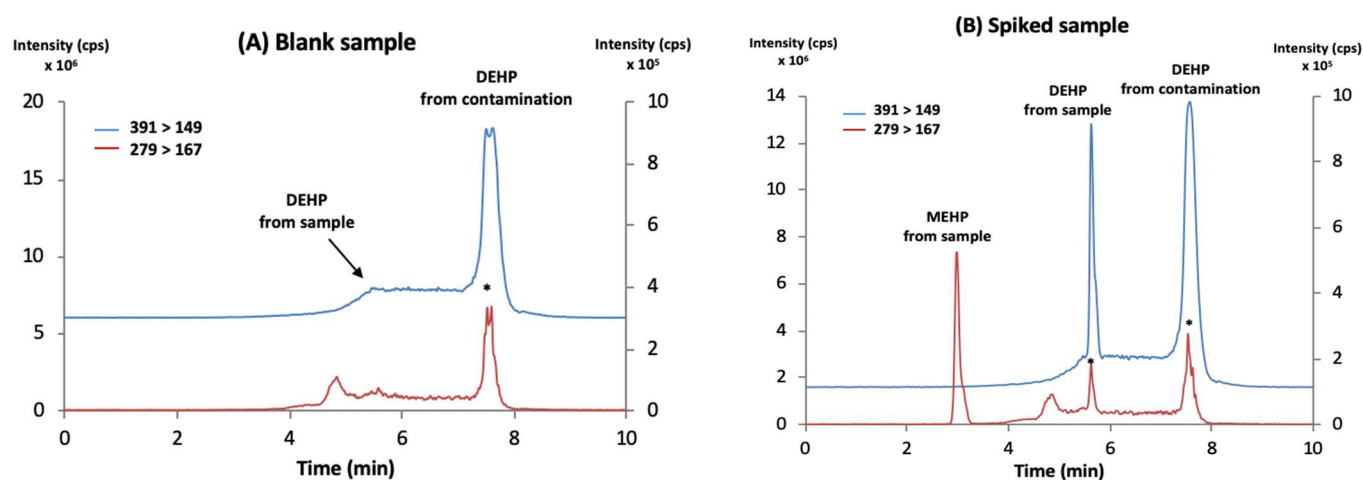


Figure 4: Chromatograms of (A) a blank sample and (B) a spiked sample with DEHP and MEHP using the trap column set-up.

(A) ACN; (B) Spiked ACN solution with 100 nM DEHP and 100 nM MEHP. *In source DEHP fragmentation.

Blank troubleshooting

The establishment of a trap column, as described above, is a successful set-up avoiding DEHP contamination came from the LC system. However, first experiments relative to the development of LLE method revealed other sources of DEHP contamination those concentration determined by LC–MS/MS analysis saturated the MS detector. The first source of contamination came from solvents. Bi-distilled solvents were not necessary as long new bottles of solvents were opened just before LLE experiments. Likewise, new bottle of ACN (HPLC-MS grade) was required to prepare stock solutions and to dissolve residue before LC-MS/MS analysis. In a general manner, all solvents stored in glassware bottles can be used within two weeks after opening.

Sample shaking also contributed to the second source of DEHP contamination. In a first attempt, the sample was shaken using a rotate agitator for 20 min and then centrifugated at 1400 x g for 5 min, after each addition of extraction solvent. Unfortunately, DEHP contamination from plastic cap set on the glass tube was suspected. Finally, we concluded that contact time between glass tube and extraction solvent had a strong impact on contamination because it contributes to the capture of environmental DEHP. Hence, sample shaking had to be fastest as

possible: vortex agitation for 30 s after the addition of extraction solvent was ideal to extract the analytes from LBP while avoiding contamination.

Finally, gas supply useful for the evaporation of pooled extracts was tested: nitrogen produced from a generator did not bring any contamination contrary to air generated by a compressor.

Influence of the spiked volume of LBP

In order to develop LLE method or to establish calibration curve of analytes in each LBP, corresponding biological samples has to be spiked either with stock solutions of each analyte or with internal standard both pre-pared in ACN. An aliquot of 100-fold diluted RCC (500 μ L) was spiked with different volumes of DINCH stock solutions (from 15 to 150 μ L) in order to mimic the preparation of a calibration curve. Then, the sample was treated according to the protocol described in the 2.1.2.E.b experimental section. Consecutively to the introduction of a volume range of stock solution from 20 to 150 μ L, decanting problem between aqueous and organics phases occurred. Same phenomenon was observed with WB, plasma and PC. We can suppose that the total miscibility of ACN with the aqueous phase and its partial one with the organic layer may alter the decanting step. As a conclusion, the maximum volume of spiked solution did not exceed 15 μ L for fast and effective decantation of the two layers.

Influence of the extraction solvent composition

Five different extraction media were tested: pure heptane, pure ethyl acetate and three heptane/ethyl acetate mixtures those compositions were 2/1; 1/1 and 1/2 (v/v) to extract an aliquot (500 μ L) of each corresponding 100-fold diluted LBP (WB; RCC, plasma and PC). As an example, Figure 5 presents the recovery rates of each analyte extracted from plasma and RCC. We can notice that recovery rates depend not only on the analyte but on the composition of the extraction medium and the nature of the LBP. Whatever the analyte, higher recovery rates were obtained for biological matrixes free from red blood cells *ie* plasma and PC (data not shown). Likewise, better extraction yields were obtained by using heptane/ethyl acetate mixtures instead of pure solvents. These results could be explained by decanting problem between the aqueous and the organic phases when pure solvent are involved leading to a loss of analytes in the aqueous phase. Centrifugation did not permit to resolve this complicated situation.

Figure 6 depicts the LLE recoveries of DEHP, MEHP, DINCH and MINCH obtained using heptane/ethyl acetate 1/2 (v/v) as extraction mixture and for each LBP. Extraction yields (mean value of 80%) were quite similar whatever the analytes extracted from plasma and PC. Regarding RCC and WB, recoveries were ranged from 60 to 92 %, for MEHP, DINCH and MINCH whereas DEHP was extracted with a lower yield (52 %). Even if recoveries were lesser than those obtained by Eckert et al. (22), time required for sample preparation was reduced of 60 min and the volume of extraction solvent was halved. Chromatograms of each spiked labile blood product samples with the four analytes and their respective internal standards after LLE extraction are presented in Figure 7.

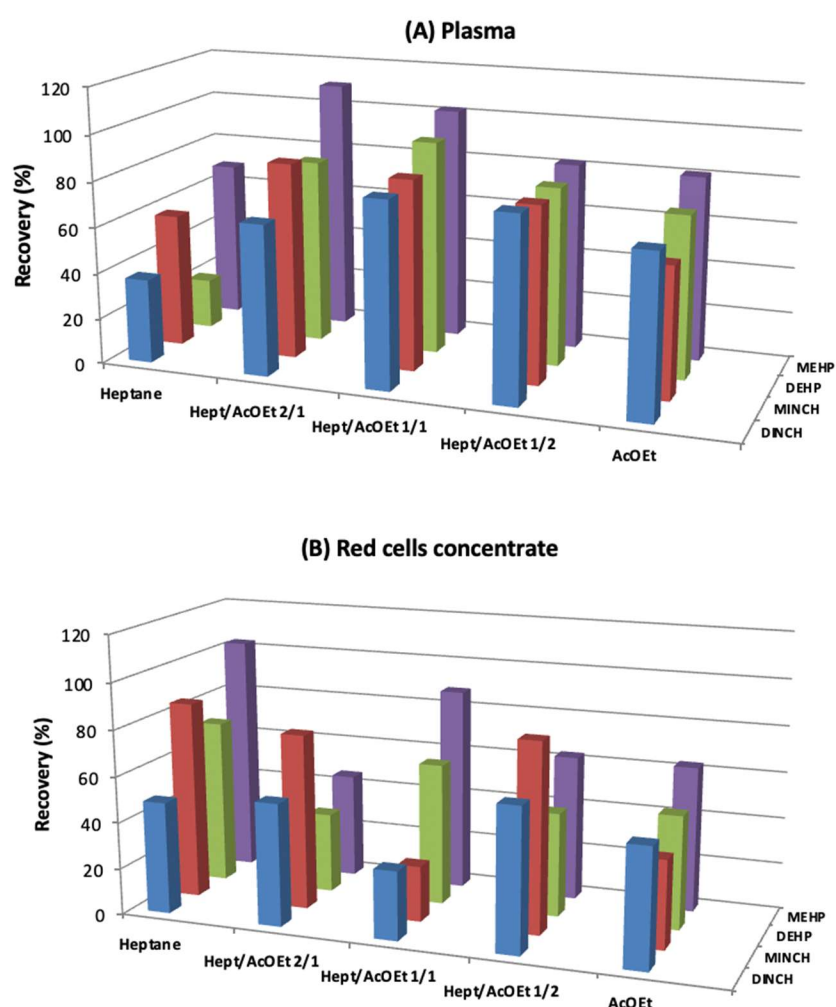


Figure 5: Influence of the solvent composition on the extraction recovery of plasticizers (DEHP, DINCH) and their corresponding monoester metabolites (MEHP, MINCH), calculated in (A) plasma and (B) red cells concentrate.

Mean recoveries were calculated from three independent determinations (RSD < 10%).

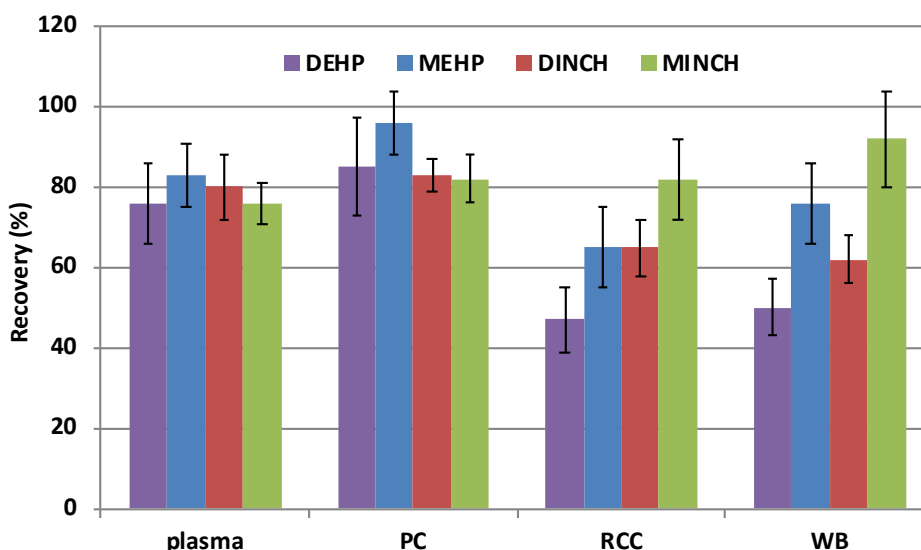


Figure 6: Liquid liquid extraction recovery of plasticizers (DEHP, DINCH) and their corresponding monoester metabolites (MEHP, MINCH) calculated in each labile blood product using heptane/ethyl acetate mixture.

Extraction solvent: Heptane/ethyl acetate 1/2 (v/v); PC: platelet concentrate; RCC: red cells concentrate; WB: whole blood. Mean recoveries were calculated from three independent determinations.

B. Method validation

Firstly, stability has been carried out to ensure that the storage of LBP at room temperature for a day (conditions and duration for LBP processing) and at +4°C for seven days (storage before analysis) do not affect the concentration of the analytes. Stock solutions were stable as assessed by a deviation from the initial concentration with $\pm 15\%$ for all analytes, whatever the duration and the temperature of storage investigated.

Selectivity of the method with respect to DEHP, MEHP, DINCH and MINCH was assessed by comparing chromatograms obtained for 100-fold diluted blank LBP and same sample spiked with the analytes and their respective internal standards. Except for DEHP for which a peak was observed in the blank sample ($< 10\%$ of the nominal concentration of the LLOQ), the absence of interfering signal from the matrix at the expected retention time of each analyte revealed the selectivity of the method.

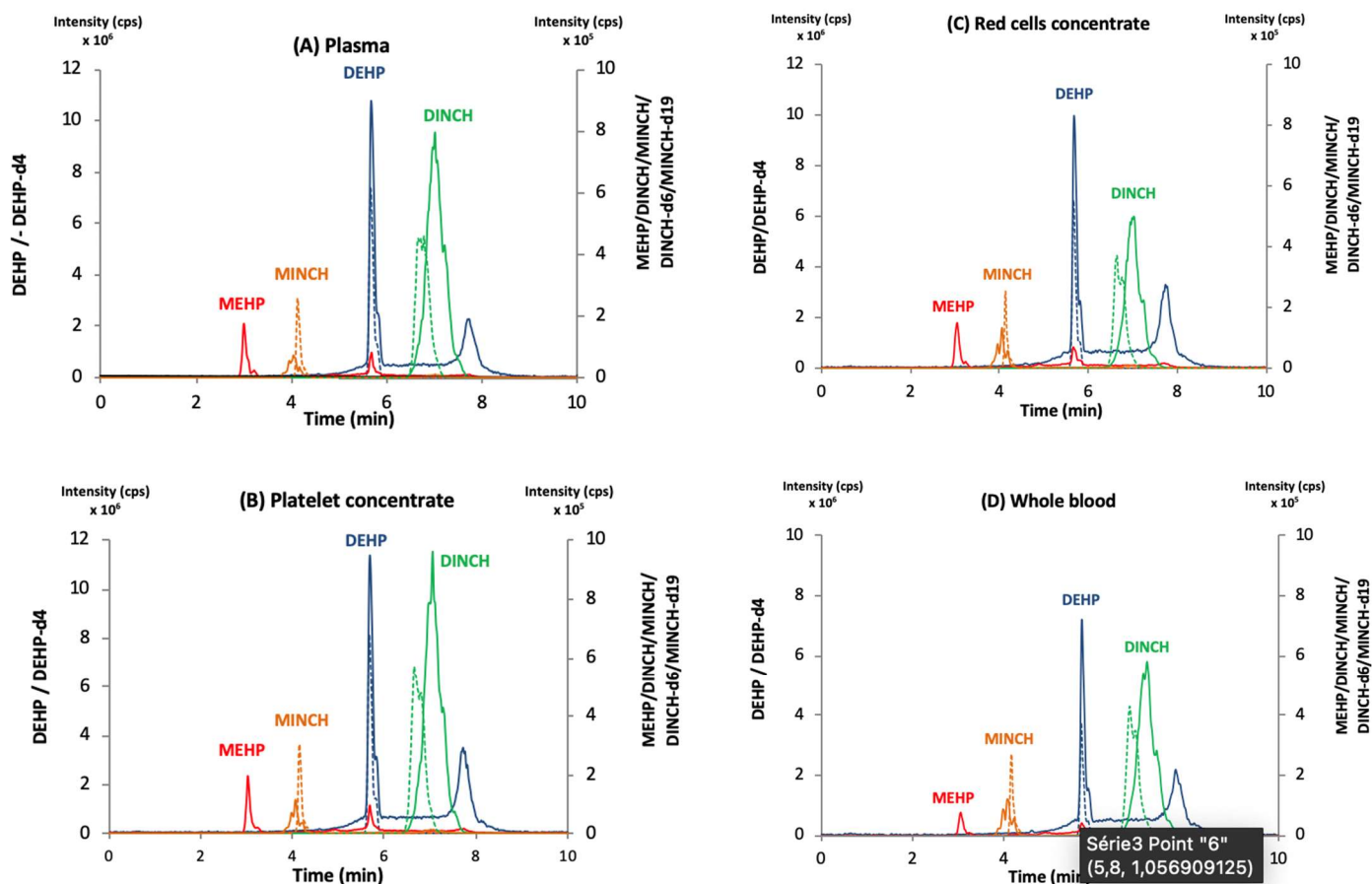


Figure 7: Chromatograms of spiked labile blood product samples with the four analytes and their corresponding internal standards.

(A) Plasma, (B) Platelet concentrate, (C) Red cells concentrate, (D) Whole blood.

Plain lines: DEHP 200 nM (blue); MEHP 200 nM (red); DINCH 200 nM (green); MINCH 200 nM (orange); dotted lines: DEHP-d4 100 nM (blue); DINCH-d6 100 nM (green); MINCH-d19 100 nM (orange). All labile blood products were diluted by a factor 100 before the liquid liquid extraction. All the MRM transitions are recorded during the elution time.

Calibration curves, expressing the peak area ratio (analyte/IS) versus concentration ratio (analyte/IS), were established from five calibration standards in the corresponding 100-fold diluted blank LBP (WB, RCC, plasma, PC). Such dilution factor was selected in order to minimize the matrix effect and avoid the potential saturation of MS signals during the migration study. They were used to assess the response functions using least square weighted (1/X) linear

regression for MEHP, DINCH and MINCH and weighted (1/X) quadratic regression for DEHP. Obtained results are summarized in Table 3. Whatever the analyte, matrix effect was still acceptable: slight ion suppression occurred for DINCH, MINCH and MEHP with ME ranged from -10.2 to -5.3 % whereas an ion enhancement of 8.7% arose for DEHP.

Table 3: Responses function and linearity of the LC-MS/MS method for the analysis of each analyte determined in the four labile blood products.

LBP	Analyte	Response function f(x)	Linearity		
			Slope	y-Intercept	R ²
Plasma	DEHP	$-0.1021x^2 + 0.964x + 0.201$	1.008	-0.5155	0.986
	MEHP	$0.0116x - 0.0003$	1.014	-1.341	0.961
	DINCH	$0.990x - 0.0022$	0.963	8.812	0.989
	MINCH	$0.325x + 0.001$	1.000	0.072	0.965
PC	DEHP	$-0.0932x^2 + 0.9203x + 0.169$	1.008	0.708	0.992
	MEHP	$0.010x - 0.0004$	1.013	-3.195	0.964
	DINCH	$1.056x + 0.084$	0.982	1.003	0.997
	MINCH	$0.379x + 0.007$	0.992	0.944	0.980
RCC	DEHP	$-0.0461x^2 + 0.815x + 0.274$	1.017	-3.735	0.985
	MEHP	$0.011x - 0.0010$	1.123	6.932	0.968
	DINCH	$0.991x - 0.0021$	0.963	8.786	0.989
	MINCH	$0.540x - 0.004$	0.998	-0.175	0.989
WB	DEHP	$0.0127x^2 + 0.991x + 0.300$	0.982	0.927	0.943
	MEHP	$0.0110x - 0.0006$	1.000	0.017	0.981
	DINCH	$1.004x + 0.0170$	0.997	0.388	0.997
	MINCH	$0.409x + 0.029$	0.990	1.243	0.991

LBP: labile blood product; PC: platelet concentrate; RCC: red cells concentrate; WB: whole blood

The validity of the model was attested by evaluation of the linearity of the method: whatever the analyte, the introduced concentrations and the back-calculated ones can be expressed by linear models ($R^2 > 0.943$) with slopes close to the unit and y-intercept that can be considered to be equal to zero (Student test, with $\alpha = 5\%$). Trueness and precision results are presented in Table 4. Whatever the analyte and the LBP, all back calculated concentrations of the calibration standards were within $\pm 15\%$ of the nominal value, except for the LLOQ for which they were within $\pm 20\%$. These results are in accordance with the EMA criteria.

Table 4: Validation criteria (trueness, precision) of each analyte determined in the four labile blood products.

LBP	Analyte	Concentration (nM)	Trueness (bias, %)	Precision	
				Repeatability (RSD, %)	Intermediate precision (RSD, %)
Plasma	DEHP	25	-16.2	10.4	27.8
		120	-11.2	4.5	5.1
		300	-9.0	2.9	2.9
	MEHP	25	0.5	3.9	3.9
		120	-4.9	6.7	9.5
		300	0.9	2.7	2.7
	DINCH	25	-1.7	1.0	1.0
		120	-1.9	3.8	8.2
		300	2.9	2.6	7.6
	MINCH	25	3.5	9.8	10.7
		120	-7.0	0.7	0.7
		300	-1.1	0.9	0.9
PC	DEHP	25	-5.6	19.7	22.2
		120	1.0	6.6	8.0
		300	-3.1	5.7	6.2
	MEHP	25	17.8	7.7	7.7
		120	1.2	6.6	9.6
		300	-2.1	5.5	10.3
	DINCH	25	-2.1	1.2	1.2
		120	-2.2	0.5	0.5
		300	-0.3	4.0	4.4
	MINCH	25	8.3	9.6	9.7
		120	2.1	6.6	7.9
		300	3.6	8.4	9.9
RCC	DEHP	25	-4.2	16.8	28.6
		120	-5.2	8.1	9.9
		300	-9.0	8.3	9.6
	MEHP	25	2.1	9.6	17.9
		120	-4.5	2.8	2.8
		300	4.6	13.7	14.1

WB	DINCH	25	10.6	1.0	1.0
		120	5.8	3.8	8.2
		300	-0.5	2.4	7.6
	MINCH	25	3.9	6.4	8.3
		120	0.3	9.4	9.6
		300	-6.5	7.1	8.0
	DEHP	25	-3.9	2.2	2.2
		120	3.2	14.1	15.0
		300	-14.6	9.3	10.6
	MEHP	25	19.8	4.2	4.2
		120	-4.0	1.2	1.2
		300	3.6	1.7	1.7
	DINCH	25	4.1	4.2	5.8
		120	1.0	0.4	0.4
		300	3.8	0.7	0.7
	MINCH	25	7.0	3.7	3.7
		120	-4.4	4.6	7.7
		300	3.5	0.8	0.8

LBP: labile blood product; PC: platelet concentrate; RCC: red cells concentrate; WB: whole blood

For MEHP, DINCH and MINCH, repeatability ranged from 1.0 – 9.8% for the LLOQ and from 0.4 – 13.7% for the other validation standards. Regarding intermediate precision, RSD values were less than 17.9 % which is in accordance with EMA criteria. For DEHP, both repeatability and intermediate precision were in the acceptance limits ($RSD < 15\%$) except for the validation standards exhibiting the lowest concentration in plasma, PC and RCC ($22.2 < RSD_{\text{intermediate precision}} < 28.6\%$). It is important to underline that DEHP was quantified in a limited concentrations range that requires a suitable dilution of the unknown LBP samples before their LC–MS/MS analysis.

No carry-over was noted since peak areas corresponding to MRM transition of each analyte and of internal standards determined during the injection of a blank sample after the analysis of a calibration standard (300 nM) were lower than 20 % of the lower limit of quantification and 5 % for the internal standard, respectively.

C. Application of the LC–MS/MS method to the quantitation of DEHP, MEHP, DINCH and MINCH in LBP

The optimized method was applied to evaluate the leachability of DEHP or DINCH from PVC-blood bags and to determine the concentration of their corresponding metabolite MEHP and MINCH in the four LBP. Blank sample was performed every five analyses in order to verify that no carryover occurred. For example, Figure 8 depicts the mean concentration of DEHP, MEHP, DINCH and MINCH determined in each LBP after one day of storage in their corresponding PVC-bag. As shown, the leachability of plasticizers depends on the nature of the biological matrix. Indeed, plasticizer concentrations were higher in plasma and WB (mean values of 48 and 7 μM for DEHP and DINCH, respectively) than RCC and PC (mean value of 17 and 2 μM for DEHP and DINCH, respectively). Several assumptions have been proposed in order to explain these results: 1) the dilution of RCC and PC in storage solution in favor of a lower concentration of the analytes in these biological matrixes, 2) the difference in contact area between plasticized-PVC and LBP during the LBP processing, 3) the specific lipophilicity of each LBP. The presence of corresponding plasticizers' metabolites in each LBP is not clearly elucidated especially for MINCH. Some complementary experiments are required in order to investigate the possible degradation of plasticizer in monoester metabolite during the sterilization step of the blood bag (27-30).

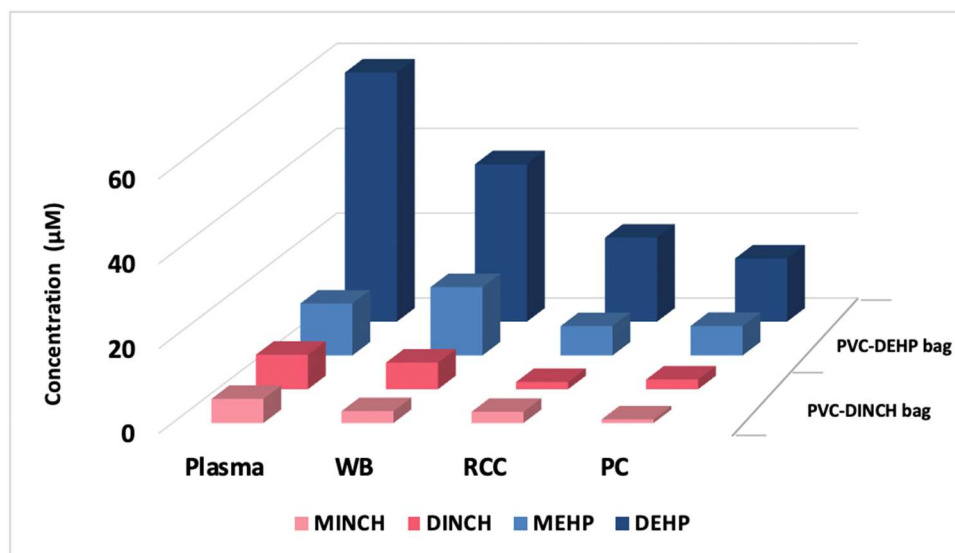


Figure 8: Concentrations of DEHP, MEHP, DINCH and MINCH determined after one day of storage in the four labile blood products.

LBP: labile blood product; PC: platelet concentrate; RCC: red cells concentrate; WB: whole blood.

All labile blood products were stored at 4°C. Mean concentrations were calculated from three independent determinations (RSD < 10%).

6.1.4 Conclusion

A novel LC–MS/MS method was developed and validated for the determination of DEHP, DINCH and their corresponding monoester metabolites (MEHP and MINCH) in four labile blood products (plasma, platelet concentrate, red cells concentrate and whole blood). The implementation of a trap column on the LC system enabled to discriminate DEHP present in the sample from DEHP brought by the environmental contamination. A general LLE method was used to extract all compounds from the four LBP. Except for DEHP extracted from whole blood or red cells concentrate, recoveries were higher than 60 %. The proposed method showed good performances with respect to selectivity, linearity, trueness and precision with a short run time (10 min) and makes this method suitable both to evaluate the leachability of DEHP and DINCH from PVC-based blood bags and to determine the concentration of MEHP and MINCH in these biological samples.

References

- (1) A. Ahlbom, J. Bridges, W. De Jong, J. Hajslová, P. Hartemann, T. Jung, M.-O. Mattsson, J.-M. Pagès, K. Rydzynski, D. Stahl, M. Thomsen, D. Williams, Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (SCENIHR) Preliminary report on the safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk, June 2007, Brussels. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_047.pdf. 2007 (accessed 12 July 2019).
- (2) L. Bernard, B. Décaudin, M. Lecoœur, D. Richard, D. Bourdeaux, R. Cuff, V. Sautou, Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: a review, *Talanta* 129 (2014) 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.069>.
- (3) R.J. Almizraq, J.P. Acker, Closing in on DEHP-free red blood cell concentrate containers, *Transfusion*, 58 (2018) 1089-1092. <https://doi.org/10.1111/trf.14622>.
- (4) C.V. Prowse, D. de Corte, P.F. van der Meer, Commercially available blood storage containers, *Vox Sang.* 106 (2014) 1-13. <https://doi.org/10.1111/vox.12084>.
- (5) P. F. van der Meer, D. V. Devine, Alternatives in blood operations when choosing non-DEHP bags, *Vox Sang.* 112 (2017) 183–184. <https://doi.org/10.1111/vox.12479>.
- (6) S. Bashir, A. Meli, R. Cardigan, In vitro quality of apheresis platelets divided into paediatric-sized units and stored in PVC bags plasticized with TOTM, BTHC or DINCH, *Transfus. medicine* 28 (2018) 380-385. <https://doi.org/10.1111/tme.12528>.
- (7) K. Serrano, E. Levin, D. Chen, A. Hansen, T.R. Turner, J. Kurach, A. Reidel, W.F. Boecker, J.P. Acker, D.V. Devine, An investigation of red blood cell concentrate quality during storage in paediatric-sized polyvinylchloride bags plasticized with alternatives to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), *Vox Sang.* 110 (2016) 227-235. <https://doi.org/10.1111/vox.12355>.
- (8) B. Bicalho, K. Serrano, A. Dos Santos Pereira, D.V. Devine, J.P. Acker, Blood bag plasticizers influence red blood cell vesiculation rate without altering the lipid composition of the vesicles, *Transfus Med Hemother.* 43 (2016) 19-26. <https://doi.org/10.1159/000441639>.
- (9) S. Graminske, K. Puca, A. Schmidt, S. Brooks, A. Boerner, S. Heldke, M. de Arruda Indig, M. Brucks, D. Kossor, In vitro evaluation of di(2-ethylhexyl)terephthalate-plasticized polyvinyl chloride blood bags for red blood cell storage in AS-1 and PAGGSM additive solutions, *Transfusion*, 58 (2018) 1100-1107. <https://doi.org/10.1111/trf.14583>.

- (10) T. Eljezi, P. Pinta, D. Richard, J. Pinguet, J.-M. Chezal, M.-C. Chagnon, V. Sautou, G. Grimandi, E. Moreau, In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line, *Chemosphere* 173 (2017) 452-459.
- (11) J. Simmchen, R. Ventura, J. Segura, Progress in the removal of di-[2-ethylhexyl]-phthalate as plasticizer in blood bags, *Transfus. Med. Rev.* 26 (2012) 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2011.06.001>.
- (12) L.J. Dumont, S. Baker, D.F. Dumont, L. Herschel, S. Waters, K. Calcagni, C. Sandford, K. Radwanski, K. Min, R. M. David, R. Otter, Exploratory *in vitro* study of red blood cell storage containers formulated with an alternative plasticizer, *Transfusion* 52 (2012) 1439-1445. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03506.x>.
- (13) Y. Morishita, Y. Nomura, C. Fukui, T. Kawakami, T. Ikeda, T. Mukai, T. Yuba, K.I. Inamura, K.H. Yamaoka, K.I. Miyazaki, H. Okazaki, Y. Haishima, Pilot study on novel blood containers with alternative plasticizers for red cell concentrate storage, *PLoS One*. 12 (2017) 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185737>.
- (14) D. Bourdeaux, M. Yessaad, P. Chennell, V. Larbre, T. Eljezi, L. Bernard, V. Sautou, Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118 (2016) 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.034>.
- (15) R. Nagorka, A. Conrad, C. Scheller, B. Süßenbach, H.-J. Moriske, Diisononyl 1,2-cyclohexanedicarboxylic acid (DINCH) and di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT) in indoor dust samples: concentration and analytical problems, *Int. J. Hygiene and Environ. Health* 214 (2011) 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.08.005>.
- (16) P. Gimeno, S. Thomas, C. Bousquet, A-F. Maggio, C. Civade, C. Brenier, P.-A. Bonnet, Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS, *J. Chromatogr. B* 949-950 (2014) 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.037>.
- (17) S. Loff, F. Kabs, K. Witt, J. Sartoris, B. Mandl, K.H. Niessen, K.L. Waag, Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers, *J. Pediatric Surgery* 35 (2000) 1775-1781. <https://doi.org/10.1053/jpsu.2000.19249>.
- (18) Y. Morishita, Y. Nomura, C. Fukui, A. Fujisawa, K. Watanabe, H. Fujimaki, H. Kumada, K. Inoue, T. Morikawa, M. Takahashi, T. Kawakami, H. Sakoda, T. Mukai, T. Yuba, K.I. Inamura, A. Tanoue, K.I. Miyazaki, U.I. Chung, K. Ogawa, M. Yoshida, Y. Haishima, Alternative plasticizer, 4-cyclohexene-1,2-dicarboxylic acid dinonyl ester, for blood containers

with protective effects on red blood cells and improved cold resistance, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106 (2018) 1052-1063. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33916>.

(19) J.W. Lagerberg, E. Gouwerok, R. Vlaar, M. Go, D. de Korte, In vitro evaluation of the quality of blood products collected and stored in systems completely free of di(2-ethylhexyl)phthalate-plasticized materials, *Transfusion* 55 (2015) 522-531. <https://doi.org/10.1111/trf.12870>.

(20) N. Kambia, T. Dine, R. Azar, B. Gressier, M. Luyckx, C. Brunet, Comparative study of the leachability of di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing, *Int. J. Pharm.* 229 (2001) 139-146.

(21) K. Inoue, M. Kawaguchi, R. Yamanaka, T. Higuchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl)phthalate from blood bags, *Clinica Chimica Acta* 358 (2005) 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.02.019>.

(22) E. Eckert, J. Müller, T. Göen, Simultaneous determination of polyvinylchloride plasticizers di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate and its degradation products in blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1410 (2015) 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.083>.

(23) Y. Guo, K. Kannan, Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2539-2554. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5999-2>.

(24) A. Frankhauser-Noti, K. Grob, Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and trick, *Ana. Chim. Acta* 582 (2007) 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.012>.

(25) A. Vavrouš, J. Pavloušková, V. ŠevččK. Vrbik, R. Čabala, Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1456 (2016) 196-204. <https://doi.org/>

(26) M. Marega, K. Grob, S. Moret, L. Conte, Phthalate analysis by gas chromatography-mass spectrometry: blank problems related to syringe needle, *J. Chromatogr. A* 1273 (2013) 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.014>.

(27) Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, (2011) United Kingdom, London.

https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf, 2011 (accessed 12 july 2019).

(28) R. Ito, F. Seshimo, N. Miura, M. Kawaguchi, K. Saito, H. Nakazawa, Effect of sterilization process on the formation of mono(2-ethylhexyl)phthalate from di(2-ethylhexyl)phthalate, *J Pharm Biomed Anal.* 41 (2006) 455-460. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.021>.

(29) R. Ito, N. Miura, M. Ushiro, M. Kawaguchi, H. Nakamura, H. Iguchi, J. Ogino, M. Oishi, N. Wakui, Y. Iwasaki, K. Saito, H. Nakazawa, Effect of gamma-ray irradiation on degradation of di(2-ethylhexyl)phthalate in polyvinyl chloride sheet, *Int J Pharm.* 376 (2009) 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.019>.

(30) Y. Haishima, K. Isama, C. Hasegawa, T. Yuba, A. Matsuoka, A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *J Biomed Mater Res A.* 101 (2013) 2630-2643. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34558>.

6.2 Développement du dosage par LC-UV du DEHT et du MEHT dans les produits sanguins labiles : Publication 2

Nous avons choisi de développer le dosage du DEHT et de son métabolite primaire par LC-UV et non par LC-MS/MS.

Nos optimisations en spectrométrie de masse sur le QTRAP5500 équipé d'une source d'ionisation par électrospray ont révélé la présence majoritaire du dimère du DEHT $[2M+H]^+$, au détriment du signal du monomère du DEHT $[M+H]^+$. De plus, l'ionisation du monomère comme du dimère s'est montrée très instable, ne permettant pas d'obtenir des analyses reproductibles.

La méthode développée en LC-UV est bien plus performante pour le dosage du DEHT et de son métabolite, permettant d'obtenir des LOQ sept fois inférieures à celles obtenues en spectrométrie de masse. Ceci peut s'expliquer par la formation du dimère directement en solution, menant à un coefficient d'absorption molaire (ϵ) en UV supérieur à celui du monomère, améliorant ainsi son signal.

Ces observations sont en accord avec la littérature qui fait état d'une seule publication présentant le dosage du DEHT par LC-MS dans du sang total contenu dans une poche (10), avec cependant une LOQ supérieure à 2000 nM, bien trop élevée pour la recherche de faibles concentrations.

La publication 2 présente la comparaison des deux techniques d'analyse et la validation de la méthode de dosage par LC-UV à 240 nm. Une méthode de préparation des échantillons biologiques utilisant l'extraction liquide-liquide a été développée avec succès. Cette dernière a été appliquée pour évaluer la migration du DEHT à partir de poches de sang en PVC-DEHT stockées durant 49 jours et pour déterminer la concentration de son métabolite correspondant, le MEHT, dans quatre produits sanguins labiles contenus dans les poches : le sang total, le concentré de globules rouges, le plasma et le concentré plaquettaire. Le DEHT est retrouvé à des concentrations de l'ordre de 20 μ M dans le concentré de globules rouges après 49 jours de stockage dans une poche PVC-DEHT. Ces résultats démontrent un relargage du DEHT non négligeable. Dans les mêmes conditions, le MEHT est dosé à environ 10 μ M par LC-MS/MS.

High-performance liquid chromatography–ultraviolet detection method to evaluate the migration of di(2-ethylhexyl) terephthalate and its metabolite from polyvinyl chloride bag in four labile blood products

Separation Science plus (2022), 1–10

Aurélie Thelliez^{1,2}, Amandine Descat¹, Pauline Bouchot¹, Mostafa Kouach¹, Jean-François Goossens¹, Bertrand Decaudin¹⁺, Marie Lecoeur^{1+*}

¹Univ Lille, CHU Lille, ULR 7365 - GRITA - Groupe de Recherche sur les Formes Injectables et Technologies Associées, F-59000 Lille, France

²Macopharma, 200 Chaussée Fernand Forest, 59200 Tourcoing, France

⁺ Joint last authors

^{*} Corresponding author

Abstract

A liquid chromatography with UV detection method has been developed and validated for the quantitation of di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT), a blood bag plasticizer, and its monoester metabolite, mono(2-ethylhexyl)terephthalate (MEHT), in the four labile blood products (LBP): whole blood, red cells concentrate, plasma and platelet concentrate. Quantitation thresholds were compared with those obtained using the more conventional tandem mass spectrometry detection and revealed that UV performed better than mass spectrometry for the quantitation of di(2-ethylhexyl)terephthalate.

Liquid-liquid extraction was selected for sample preparation. Recoveries ranged from 101 to 106 and from 80 to 83%, for di(2-ethylhexyl)terephthalate and mono(2-ethylhexyl)terephthalate, respectively, depending on the labile blood product. Repeatability and intermediate precision expressed as relative standard deviation were lower than 20% at the lower limit of quantitation and ranged from 1.9 to 11.2% for the other concentration levels. Regarding the trueness, bias ranged from -13.6 to 11.8%. The method was validated considering a total error measurement of $\pm 20\%$. Lower limits of quantitation ranged from 500 to 680 nM for di(2-ethylhexyl)terephthalate and were equal to 500 nM for mono(2-ethylhexyl)terephthalate. Migration of di(2-ethylhexyl)terephthalate from polyvinyl chloride blood bags was investigated and mono(2-ethylhexyl)terephthalate concentrations were determined in each labile blood product.

Keywords: blood bag; Di(2-ethylhexyl)terephthalate; labile blood product, leachability; liquid-chromatography – ultra-violet detection

6.2.1 Introduction

Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is a very useful phthalate that acts as a plasticizer to improve flexibility and workability of polyvinyl chloride (PVC)-based medical devices such as tubing and bag used for blood collection, labile blood product (LBP) processing and transfusion. As DEHP is not chemically bonded to PVC, it can migrate into LBPs during storage (1). Since DEHP is classified as being toxic for reproduction (category 1B) and is an endocrine disruptor (2), European regulation (European Directive 2007/47/CE) recommends the substitution of DEHP with alternative plasticizers in medical devices used for transfusion.

Di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT) is structurally similar to DEHP, possesses the same molecular weight (390.6 g/mol) and hydrophobicity ($\log P = 7.4$), and has equivalent plasticization properties to DEHP (3). Although no PVC bags plasticized with DEHT are available on the market for the storage of LBPs (4), this additive seems to be interesting because it has a lower level of migration than DEHP (5). Moreover, DEHT has shown no reprotoxic effects, low developmental toxicity, no genotoxicity (6,7), and no endocrine-disrupting effect (8). Likewise, the monoester metabolite (mono(2-ethylhexyl)terephthalate, MEHT) exhibits lower cytotoxicity than the corresponding DEHP monoester metabolite (mono(2-ethylhexyl)phthalate, MEHP) (9). Regarding red blood cells (RBC) storage, it could be considered as a potential alternative although hemolysis was higher than DEHP (10). In order to complete these data, the leachability of DEHT into the four LBPs, namely whole blood (WB), plasma, RBC and platelet concentrate (PC) has to be evaluated then compared with DEHP (11). LC-MS using a single or a triple quadrupole is the technique of choice to quantify DEHP and MEHP in plasma, RBC, WB and PC (11-14). On the contrary, literature relative to the analysis of DEHT at trace levels is very poor (Table 1).

Table 1: Chromatographic methods for the determination of di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT) and mono(2-ethylhexyl)terephthalate (MEHT)

Analyte	Matrix	Analytical technique	Sample preparation technique	LOQ (nM)	Reference
DEHT	Indoor dust	GC-EI-MS	Solvent extraction		(15)
	Medical devices / Infused solutions	GC-EI-MS	Solvent extraction	641	(16)
	PVC medical devices	GC-EI-MS	Polymer dissolution	36	(17)
	PVC medical devices	SFC-ELSD	Solvent extraction	11 000	(18)
	PVC medical devices	SFC-UV (240 nm)	Solvent extraction	14 000	(18)
	PVC medical devices	HPLC-ELSD	Solvent extraction	15 000	(18)
	PVC medical devices	HPLC-UV (240 nm)	Solvent extraction	51	(18)
	PVC medical devices	HPLC-UV (221 nm)	Polymer dissolution	513	(19)
	RBC	HPLC-MS	LLE with ethyl ether	2307	(10)
MEHT	Urines	HPLC-ESI-MS/MS	Offline SPE	10	(20)
	Urines	HPLC-ESI-MS/MS	Online SPE	0.05	(21)
	RBC	HPLC-MS	LLE with ethyl ether	1790	(10)
	Urines and serum	HPLC-ESI-MS/MS	Offline SPE	0.7	(22)
	Hepatic microsomes	HPLC-ESI-MS/MS	Online SPE	n.d.	(23)
	Hair	HPLC-ESI-MS/MS	Offline SPE	1.55	(24)

Abbreviations: EI, electron ionization; ELSD, evaporative light scattering detection; ESI, electrospray ionization; GC, gas chromatography; HPLC, highperformance liquid chromatography; LC, liquid chromatography; LLE, liquid-liquid extraction; LOQ, limit of quantitation; PC, platelet concentrate; PVC, polyvinyl chloride; RBC, red blood cells; SFC, supercritical fluid chromatography; SPE, solid-phase extraction; WB, whole blood; n.d., not determined.

Several papers deal with the quantitation of DEHT in indoor dust (15) or in PVC medical devices (16-19) using GC-MS, supercritical fluid chromatography (SFC) or LC coupled with UV or evaporative light scattering detection. Whatever the detection implemented, LOQs obtained by SFC were too high and did not permit the evaluation of the migration of DEHT in LBPs. On the contrary, GC-MS and LC-UV allowed to obtain the best quantitation thresholds and with the same order of magnitude (from 30 to 50 nM). To our knowledge, only one research article demonstrated the applicability of LC-MS for the quantitation of DEHT in the transfusion field but with high quantitation thresholds of 2307 nM (10).

Regarding the physico-chemical properties of MEHT (presence of an ionization function), LC-MS/MS was a universal technic to quantitate it, at trace levels, in biological samples with LOQ

ranged from 0.05 to 10 nM (10, 20-24) depending on the nature of the biofluid and the sample preparation technique implemented (Table 1).

The aim of this work was to develop an LC/UV method and to compare its performances with the LC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of DEHT and MEHT in the four LBPs, that is, WB, plasma, PC and RBC. Then, the LC/UV method was selected, validated and finally applied to evaluate the leachability of DEHT from plasticized-PVC blood containers into the four LBPs and, to determine the concentration of MEHT.

6.2.2 Materials and methods

A. Chemicals

DEHT, MEHT, DEHP, MEHP, dicyclohexyl phthalate (DCHP), were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Except for ethanol of HPLC grade, all organic solvents were of HPLC-MS grade. Ethanol, heptane and ethyl acetate were purchased from Merck (Guyancourt, France), acetonitrile from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Phosphoric acid (85%) was obtained from VWR (Fontenay-sous- Bois, France), formic acid (99%) from VWR international (Val-de-Reuil, France) and sodium chloride solution (0.9% w/v) from CDM Lavoisier (La Chaussée Saint Victor, France).

B. Collection of WB and preparation of LBPs

WB, donated by consenting volunteer research donors, was collected by the French Blood Establishment (Lille, France) using a PVC-made blood collection system plasticized by DEHP. Furthermore, the 500 mL WB collection bag was filled with 70 mL of citrate phosphate dextrose (CPD) solution. After collection, WB was cooled and stored at 20-24°C overnight.

For method development, the WB collection bag, received by EFS, was connected to a PVC-DEHP medical device for the preparation of LBPs (LQT system, Macopharma). This medical device was composed of four bags that enable the separation of each LBP (plasma, buffy coat and RBC) by a top and bottom process followed by the filtration of red cells concentrate. The WB collection bag and the storage bag for leukoreduced RBC of the LQT medical device were filled with 63 mL of anticoagulant solution (CPD) and 100 mL of a saline-adenine-glucose-mannitol storage solution, respectively. It should be noted that the anticoagulant solution (CPD) was removed from the LQT medical device prior to the transfer of the WB due to its initial presence in the EFS collection bag. After WB transfer in the LQT system medical device, the

bag was centrifuged at 5000 g for 15 min at 22°C then the application of frontal pressure (from 50 to 600 mbar) enables the collection of RBC and plasma in their corresponding storage bag. The buffy coat was placed in a propylene tube and diluted with platelet storage solution to obtain a platelet mini-concentrate. A ratio of 0.6 was applied between the platelet storage solution and the buffy coat in order to comply with standard practices for the preparation of PCs. The storage solution was composed of 69.3 mM NaCl, 10.8 mM citrate, 32.5 mM acetate, 28.2 mM phosphate, 5 mM potassium and 1.5 mM magnesium. All LBPs were sampled in polypropylene tubes at D1 after blood collection, stored at -80°C before LC-UV analysis.

To determine the extent of DEHT migration, WB collected in a PVC-DEHP bag was transferred into a PVC-DEHT prototype (LQT system, Macopharma) and was processed as described previously. RBC was stored at +4°C for 49 days and plasma was kept at 4°C for 24 h and then frozen at -80°C until D30. Samplings of plasma and RBC were performed considering their respective storage: plasma (D1, D2, D30) and RBC (D1, D14, D21, D28, D35, D42, D49). WB and PC were sampled one day after their collection and processing (D1). The samples were collected in polypropylene tubes, frozen at -80°C, immediately, and then assayed for DEHT and MEHT using liquid-liquid extraction (LLE) and LC-UV.

C. LC-UV instrumentation and analysis conditions

Chromatographic analyses were performed using an Alliance system (Waters, Milfors, MA USA) equipped with a gradient quaternary pump, an on-line degasser apparatus, an autosampler and a 996- photodiode array detector. Data were collected and processed on a computer running with Empower software (version 3) from Waters. Separations were carried out on a reversed-phase Kinetex C18 (100 × 4,6 mm internal diameter [i.d.], 2,6 µm) column (Phenomenex, Le Pecq, France) preceded with a guard column (same stationary phase). A gradient separation mode was used to separate the analytes, using acetonitrile (A) and water (B) both supplemented by 0.1 % of formic acid. The elution gradient performed at 1 mL/min was the following: (1) 0 – 6 min, linear increase from 40% to 100% of solvent A; (2) 6 – 11 min, 100% of solvent A; (3) 11 – 12 min, linear decrease to 40 % of solvent A; (4) 12 – 17 min, 40% of solvent A. The column was thermostated at 35 °C and the injection volume was 20 µL. Detection was performed at 240 nm except for DEHP and MEHP that were detected at 225 nm.

D. LC-MS/MS method

LC-MS/MS analyses were performed using UFLC-XR system (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a QTRAP® 5500 MS/MS hybrid system triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (Sciex, Foster City, CA, USA), equipped with a Turbo VTM ion source operating in positive and negative ion modes. The Sciex Analyst software package (version 1.5.2) was used for the LC-MS/MS system control, data acquisition, and processing.

Limits of quantitation of DEHT and MEHT were determined in the same conditions as described in our previous work (11), except the following. Separations were carried out on a reversed-phase Kinetex C18 (100 × 4,6 mm i.d., 2,6 µm) column (Phenomenex, Le Pecq, France). A gradient separation mode was used to separate the analytes, using H₂O (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid. The elution gradient was: (1) 30/70 (v/v) mixture of solvents A and B for the first 1 min; (2) increase to 100% of B in a linear gradient from 1 to 3 min; (3) 0/100 (v/v) mixture of solvents A and B from 3 to 6 min. The mass spectrometer was used in the multiple reaction monitoring mode (MRM). MRM parameters were m/z 391 > m/z 279 and m/z 277 > m/z 233 for DEHT and MEHT, with a collision energy of 22 and -26 eV, respectively. Signals were recorded under negative ionization mode from 0 to 4 min (elution of MEHT) and under positive ionization mode from 4.1 to 10 min (elution of DEHT), with an ionspray needle voltage of 5500 V and -4500 V, respectively.

E. Sample preparation

Preparation and storage of all solutions were performed only with glass material to prevent the extraction of plasticizers from plastic consumables. Some plastic consumables such as tips for micropipettes (Tipone®, Starlab, France), conic plastic tubes (Eppendorf, Le Pecq, France) and plastic caps for haemolysis glass tubes (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) were also used but they were systematically checked before analysis to be plasticizer-free.

A. Stock solutions, calibration, and validation standards

Stock solutions of each plasticizer and of each internal standard (IS) were prepared in ACN at 3 mM and sonicated for 10 min to ensure complete dissolution. These solutions were stored for 30 days at 4°C. All solutions were diluted in ACN to obtain the individual working solution of each analyte for LC-UV and LC-MS/MS analyses, respectively. Stock solutions were used to prepare a series of calibration and validation standards (VS) required for the LC-UV method

validation. The first series, containing DEHT, MEHT and IS, that is, DCHP was prepared from corresponding LBP collected in PVC-DEHP bag after a 5-fold factor dilution (for WB, RBC, Plasma) or a 10-fold factor dilution (for PC) in water. Calibration was carried out using nine calibration standards (CS) prepared by spiking the corresponding diluted LBP with working solutions of each analyte. The concentration range was 500 - 3000 nM. Five VS were also prepared at 500, 700, 900, 2000, and 3000 nM and each solution was supplemented with 15 μ M of DCHP. Each CS and VS were processed as described in the following section before LC-UV analysis.

B. Liquid-Liquid extraction

After optimization, an aliquot of 250 μ L diluted LBP (5-fold for WB; RBC and plasma or 10-fold for PC) was transferred into a glass tube then spiked with 10 μ L of IS (final concentration 15 μ M). Subsequently, 50 μ L of ethanol, 250 μ L of 0.9 % sodium chloride solution, and 250 μ L of 15.6 M phosphoric acid solution were added. After sonication for 15 min, the analytes were extracted thrice from the LPB with 750 μ L of an *n*-heptane/ethyl acetate - 2/1 (v/v) mixture. After each addition of extraction solvent, the sample was vortexed for 30 s. Subsequently, the supernatants were transferred into a clean glass vial and then the pooled extracts were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The residue was dissolved in 250 μ L of ACN and 20 μ L of the solution was injected into the LC-UV apparatus.

F. Validation of the method

First, stability was ensured for every step of the analytical method, meaning that the conditions applied to the stability tests, such as sample matrix, anticoagulant, container materials, storage and analytical conditions were similar to those used for the actual study samples. Stability of stock solutions and working solutions for each analyte and IS was assessed by comparison of freshly prepared solutions to solutions stored ever at room temperature for 24 h (period and conditions during LPB processing) or at +4°C for seven days (storage conditions before analysis). The stability of analytes was determined in each LBP (WB, plasma, PC, RBC) from two VS (medium (VS2) and the highest (VS3); n=3, per concentration). The VS samples were analyzed against a calibration curve, obtained from freshly spiked VS, and the obtained concentrations are compared to the nominal concentrations. The mean concentration at each level should be within $\pm 15\%$ of the nominal concentration.

Validation of the method was performed for WB and each LBP (plasma, PC, RBC) and was carried out on three consecutive days. Each day, nine CS and five VS (each prepared in triplicate), a blank LBP sample obtained by a 5-fold or 10-fold dilution of the corresponding LBP, and the same sample spiked with the IS were prepared and analyzed. Selectivity, response function, linearity, trueness and precision (repeatability and intermediate precision) were evaluated. Trueness and precision, expressed as bias (%) and relative standard deviation (%RSD), respectively, were assessed by back-calculating the concentration of each VS. Acceptance criteria were set in accordance with the requirements of European Medicines Agency (EMA) (25) if %RSD and relative bias were under 15% for the VS samples (except 20% for the lower LOQ, LLOQ). Finally, the accuracy profile (26) was assessed considering the $\pm 20\%$ acceptance limits admitted for quantitation of drugs in biological fluids ($\beta = 80\%$). The carry-over was assessed by injecting a blank sample after a calibration standard at the upper limit of quantification i.e. 3000 nM for the analyte and 15 μM for the corresponding IS. The absence of carry-over was demonstrated if the peak area in this blank sample was lower than 20% of the LLOQ and 5% for the IS (25).

6.2.3 Results and discussion

A. LC-UV method development

a. Development and performance comparison with MS detection

A LC-UV method was developed for the quantitation of DEHT and MEHT in the four LBPs. DCHP which is a seldom-used phthalate in industrial applications was used as an IS. Attention was paid to resolve analytes of interest and DEHP because of its ubiquitous presence in environmental matrices which could be some sources of sample contamination in blood donor. The chromatogram of a standard mixture containing 3000 nM of DEHT, DEHP, MEHT, MEHP, and 15 μM of DCHP, obtained after optimization, is presented in Figure 1.

All compounds are totally resolved within 10 min. At 240 nm, we can notice that the chromatographic profiles of DEHP and DEHT are different, with a 4-fold factor sensitivity for DEHT than DEHP, although all compounds were analyzed at the same concentration. As shown on UV spectra (inserts in Figure 1), DEHT exhibits a maximum of absorbance at 240 nm ($\epsilon_{\text{DEHT in ACN}} = 23\,985 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) whereas 225 nm ($\epsilon_{\text{DEHP in ACN}} = 16\,570 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) and 275 nm were considered as the wavelengths of maximum absorbance for DEHP (usually observed

for the phthalates moiety). These bathochromic and hyperchromic effects can have been explained by the formation of the DEHT dimer. The same observation was made by comparing the chromatographic profiles of their corresponding metabolites, namely MEHP and MEHT. As a result, DEHT and MEHT exhibited an LOQ by a 14-fold factor than DEHP and MEHP, using UV detection (Table 2).

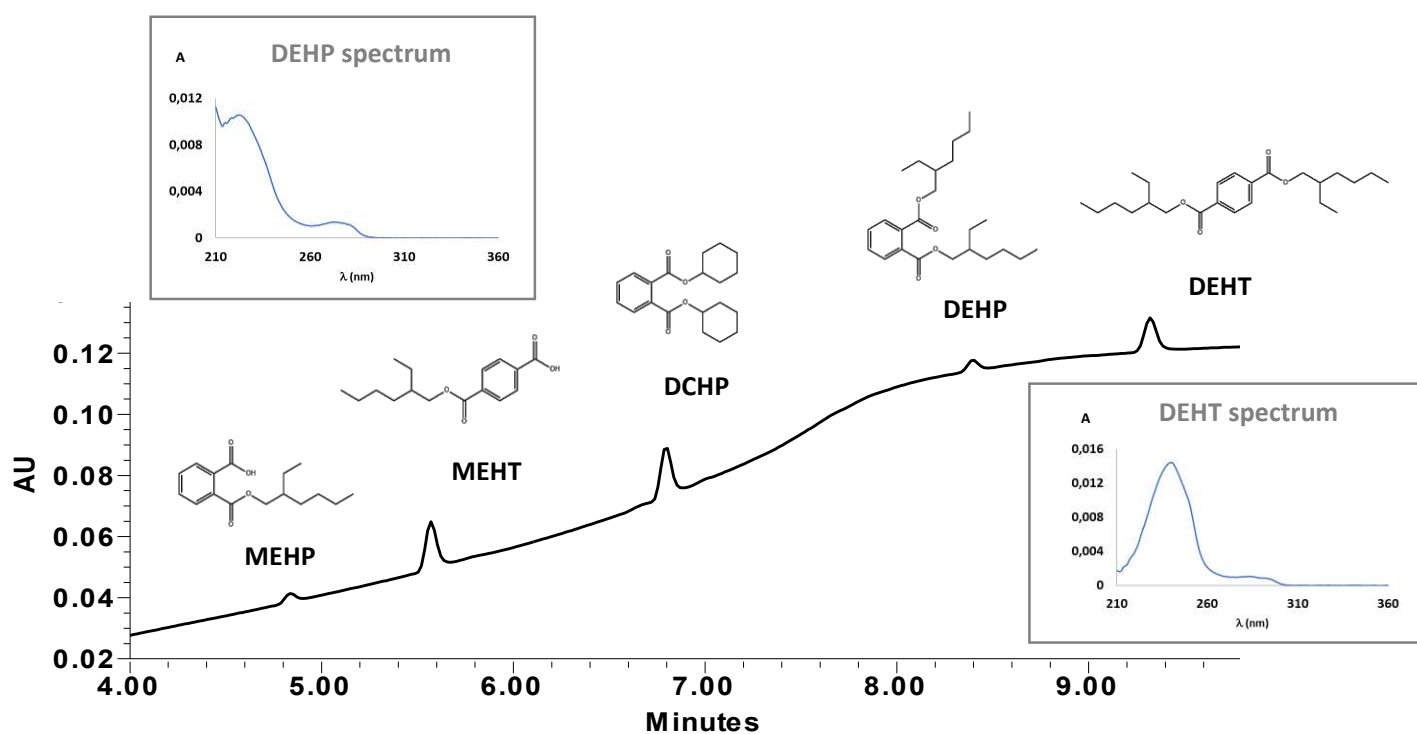


Figure 1: LC-UV chromatograms of a standard mixture containing 3000 nM of di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), mono(2-ethylhexyl)terephthalate (MEHT), mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), and 15 μ M of the internal standard (DCHP). Detection at 240 nm. Other operating conditions of high-performance liquid chromatography (HPLC)-UV are given in Section 2.3. The inserts correspond to UV spectra of DEHP and DEHT, respectively

Table 2: Limits of quantitation of analytes investigated obtained by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and liquid chromatography-ultraviolet detection (LC-UV)

Compound	Limit of quantitation (nM)	
	LC-UV	LC-MS/MS
DEHP	1500	8
DEHT	110	714
MEHP	1500	5
MEHT	110	0.6

Limits of quantitation were determined from a standard solution whose concentration corresponds to a signal-to-noise ratio of 10. They were determined at 240 nm for DEHT and MEHT and at 275 nm for DEHP and MEHP using UV detection. Abbreviations: DEHP, di(2-ethylhexyl)phthalate; DEHT, di(2ethylhexyl)terephthalate; MEHP, mono(2-ethylhexyl)phthalate; MEHT, mono(2-ethylhexyl)terephthalate.

The formation of the DEHT dimer was confirmed by recording its full scan mass spectrum in the infusion mode (10 $\mu\text{L}/\text{min}$), after optimization of the collision energy. Regarding its ionization in the electrospray ionization (ESI) source, the intensity of the pseudo-molecular ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ with m/z 391.4 is weak. Neither sodium nor potassium adducts with DEHT are observed. In the ESI source, DEHT is principally ionized under the dimeric forms: $[\text{2M}+\text{H}]^+$ and $[\text{2M}+\text{Na}]^+$, with m/z values of 781.1 and 803.6, respectively. Considering DEHP, the pseudo-molecular ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ of m/z 391.2 is the majority ion produced. Adduct ions with sodium (m/z 413.3) or potassium (m/z 429.3) are also formed but with a lesser intensity. The presence of dimeric forms under sodium and potassium adducts with m/z values of 803.6 and 819.6, respectively, is also noticed.

Therefore, the LOQs for DEHP and DEHT were strongly different: 8 versus 714 nM, respectively. LOQ values of the four compounds obtained by LC-MS/MS were consistent with the literature (20, 21, 27). However, regarding DEHT, best LOQ were obtained by LC-UV (110 nM) compared to LC-MS/MS (714 nM) and, were 7-fold lower than those determined by *Moldoveanu and Yerabolu* (27). This difference of results could be explained by the detection wavelength of 342 nm selected by *Moldoveanu and Yerabolu* compared to 240 nm, in our study. Hence, although DEHP and DEHT are compounds with very similar chemical structures

(position isomer on the benzenic ring), they possess both various optical properties and different ESI ionization abilities in favor of DEHT quantitation using LC-UV.

b. Liquid-liquid extraction (LLE)

LLE was optimized considering our previous experience (11) while simplifying the protocol and reducing the volume of extraction solvents in order to make a high throughput LLE for the quantitation of DEHT and MEHT during migration study from PVC blood bags. Contrary to our previous results obtained with DEHP for which extraction yields varied from one PSL to another (11), recovery rates were quite similar for all LBP regarding the analyte, using a heptane/ethyl acetate 2/1 (v/v) mixture as extraction solvent. Indeed, extraction yields were 105% (RSD = 10%) and 80% (RSD = 9%) for DEHT and MEHT, respectively (Figure 2).

B. Validation of the LC-UV method

Firstly, stability was carried out to ensure that the storage of LBP at room temperature for a day (conditions and duration for LBP processing) and at +4°C for 7 days (storage before analysis) do not affect the concentration of the analytes. Stock solutions were stable as assessed by a deviation from the initial concentration with $\pm 15\%$ for all analytes, whatever the duration and the temperature of storage investigated.

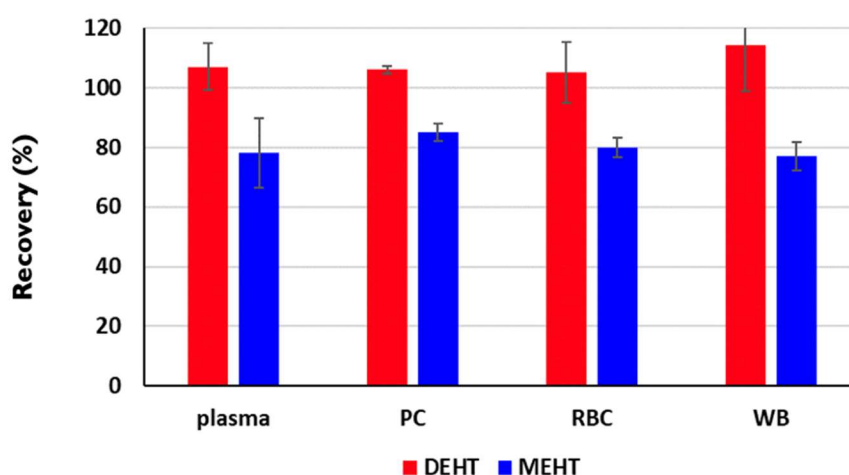


Figure 2: Mean liquid-liquid extraction recovery for di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT) and mono(2-ethylhexyl)terephthalate (MEHT) in each labile blood product. Extraction solvent: Heptane/ethyl acetate - 2/1 (v/v); PC, platelet concentrate; RBC, red blood cells concentrate; WB, whole blood. Mean recoveries were calculated from three independent determinations (RSD < 10%)

The specificity of the method with respect to DEHT and MEHT was assessed by comparing chromatograms obtained for 5- or 10-fold diluted blank LBP (CAL00), the same sample spiked with IS (CAL0) or with IS and the analytes. The absence of interfering signal from the matrix at the expected retention time of each analyte revealed the selectivity of the method.

Calibration curves, expressing the peak area ratio (analyte/IS) versus analyte concentration, were established from nine CS in the corresponding 5-fold (WB, RBC, plasma) or 10-fold (PC) diluted blank LBP. They were used to assess the response functions using least square linear or weighted (1/X) linear regression depending on the analyte and the matrix. All results are summarized in Table 3. No carry-over was noted since peak areas of each analyte and of IS determined during the injection of a blank sample after the analysis of a calibration standard (3000 nM) were lower than 20% of the LLOQ and, than 5% for the IS, respectively.

The validity of the model was attested by evaluation of the linearity of the method: whatever the analyte, the introduced concentrations and the back-calculated ones can be expressed by linear models ($R^2 > 0.97$) with slopes close to the unit and y-intercept that can be considered to be equal to zero (Student test, with $\alpha = 5\%$). Trueness and precision results are presented in Table 3. Whatever the analyte and the LBP, all back calculated concentrations of the CS were within $\pm 15\%$ of the nominal value, except for the LLOQ for which they were within $\pm 20\%$. These results are in accordance with the EMA criteria.

Table 3: Response function and linearity of the LC-UV method for the determination of di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT) and mono(2-ethylhexyl)terephthalate (MEHT) in the four labile blood products

LBP	Analyte	Response function		Linearity		
		Model	Equation	Slope	y-Intercept	R ²
Plasma	DEHT	linear	$2.191 \cdot 10^{-4} + 2.502 \cdot 10^{-2}$	1.025	-41.29	0.98
	MEHT	linear	$3.199 \cdot 10^{-4} - 1.86 \cdot 10^{-2}$	1.036	-9.647	0.993
PC	DEHT	linear	$2.115 \cdot 10^{-4} x - 3,138 \cdot 10^{-3}$	1.009	35.1	0.995
	MEHT	linear	$3,374 \cdot 10^{-4} x - 3,999 \cdot 10^{-2}$	1.007	23.6	0.996
RBC	DEHT	1/x weighted linear	$9.786 \cdot 10^{-4} x - 9.190 \cdot 10^{-2}$	0.967	40.16	0.97
	MEHT	1/x weighted linear	$1.084 \cdot 10^{-3} x - 2.151 \cdot 10^{-1}$	0.996	10.9	0.98
WB	DEHT	1/x weighted linear	$1.890 \cdot 10^{-4} x + 2.149 \cdot 10^{-2}$	1.007	-13.11	0.992
	MEHT	1/x weighted linear	$3.007 \cdot 10^{-4} - 1.790 \cdot 10^{-2}$	1.051	-20.75	0.992

Abbreviations: LBP, labile blood product; PC, platelet concentrate; RBC, red cells concentrate; WB, whole blood.

Whatever the LBP, repeatability ranged from 2.5 to 16.5% for the LLOQ and from 1.9 to 11.2% for the other VS. Regarding intermediate precision, RSD values were lesser than 17.7 and 11.2%, for the LLOQ and the other VS, respectively, which is in accordance with the EMA criteria. Considering the trueness, results of bias were acceptable with values ranging from -13.6 to 11.7%.

These trueness and precision results were used to calculate the upper and lower confidence limits for each validation standard, required to establish the accuracy profiles (Figure 3). Whatever the concentration level, the tolerance interval ($\beta = 80\%$) is included in the acceptance limits set at $\pm 20\%$ for MEHT, whatever the LBP, and for DEHT in WB and RBC. Therefore, the LLOQ is equal to 500 nM in these conditions. It is worth noting that for the quantitation DEHT in plasma and PC, bias and RSD results were too high to guarantee that the total error will be lesser than 20%. Hence, the accuracy profiles exhibit a tolerance interval excluded from the acceptance limits for the lowest concentration. For the quantitation of DEHT in plasma and PC, the LLOQ can be calculated by taking the intersection point between the acceptability limit and the corresponding tolerance interval; they are equal to 680 and 600 nM, respectively.

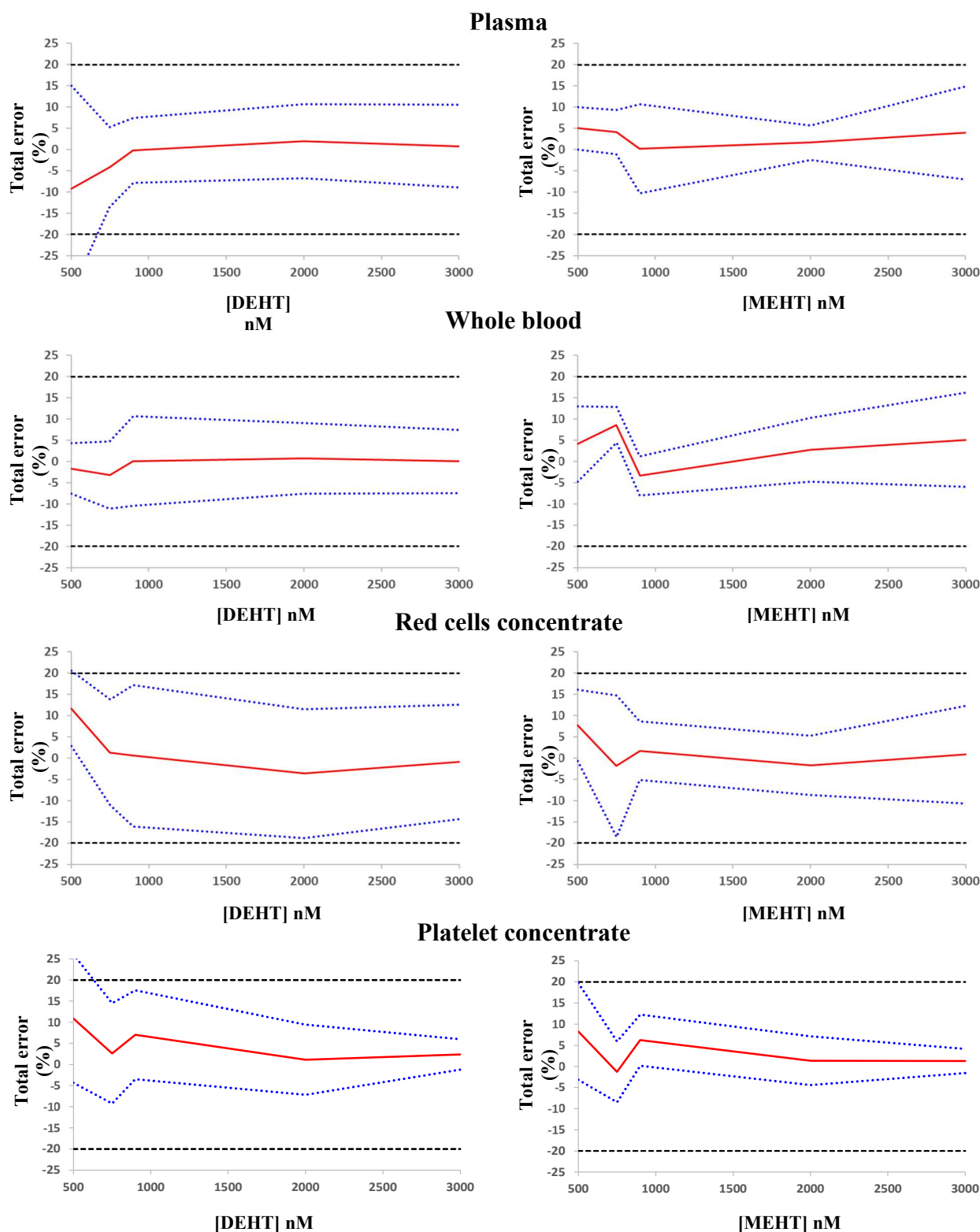


Figure 3: Accuracy profiles of the liquid chromatography-ultraviolet detection (LC-UV) method for the quantitation of di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT) and mono(2-ethylhexyl)terephthalate (MEHT) in each labile blood product. The dashed lines represent the acceptance limits at 20%, the red plain line corresponds to the bias and the tolerance interval of the bias for a risk of 5% was materialized by the dotted blue line

C. Application of the LC-UV method for the quantitation of DEHT and MEHT in LBPs

The optimized LC-UV method was applied to evaluate the migration of DEHT from PVC-blood bags and to determine the concentration of its corresponding metabolite MEHT, in the four LBPs. On D1 after processing, DEHT and MEHT concentrations were estimated to be lower than 750 nM in CP and WB. From D1 to D30, DEHT and MEHT concentrations in plasma ranged from 490 to 2880 nM and from 450 to 760 nM, respectively. Figure 4 depicts the mean concentrations of DEHT and MEHT in RBC during storage.

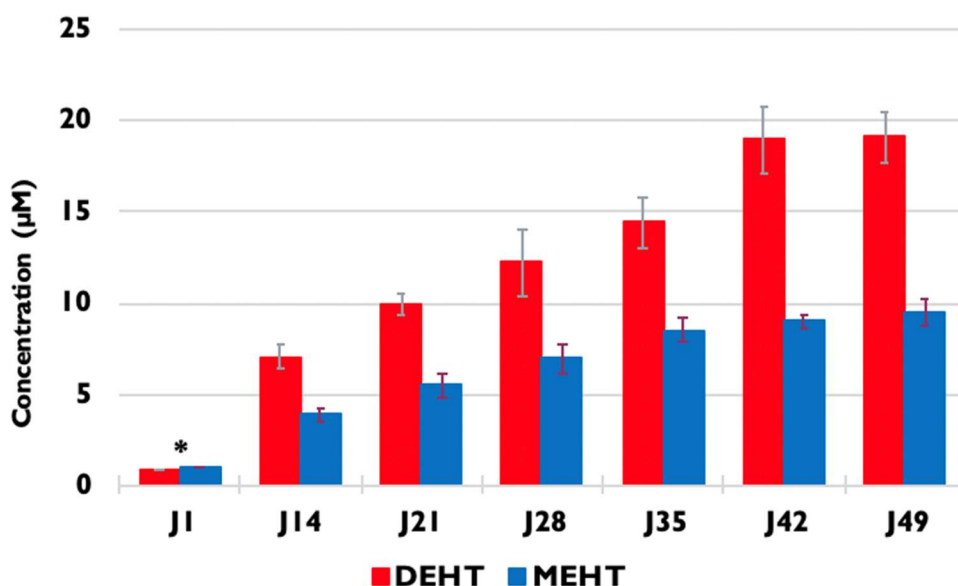


Figure 4: Di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT) and mono(2-ethylhexyl)terephthalate (MEHT) concentrations in red cells concentrate along the storage period. *At J1, DEHT and MEHT concentrations result from an estimation since they are lower than the lower limits of quantitation (LLOQs). For the other days, mean concentrations were calculated from three independent determinations (RSD < 10%)

We can observe an increase in the DEHT and MEHT concentrations, until reaching a plateau of 19000 ± 1000 and 9000 ± 1000 nM, respectively. Whatever the LBP, the quantitation of DEHT and MEHT, on D1, was possible by changing the analytical protocol i.e. dissolving the residue after LLE in 125 µL instead of 250 µL. Hence, the validated LC-UV method was suitable to evaluate the migration of these two analytes from the bag to the four LBPs. These

results are very promising as they are substantially lower than those obtained for DEHP and MEHP in RBC, that is, 51000 and 7000 μM , respectively (13).

6.2.4 Conclusion

A novel LC-UV method was developed and validated for the determination of DEHT and MEHT in the four LBPs (plasma, PC, red cells concentrate and WB). This method was more performant than LC- MS/MS for the quantitation of DEHT as it permits to reach lower quantitation thresholds. An LLE method was used to extract all compounds from the four LBP with average recoveries of 105 and 80%, for DEHT and MEHT, respectively. The proposed method was fully validated with a total error within the $\pm 20\%$ acceptance limits and makes this method suitable both to evaluate the leachability of DEHT from PVC- based blood bags and to determine the concentration of MEHT in these LPBs.

References

- (1) Rael L.T., Bar-Or R., Ambruso D.R., Mains C.W., Slone D.S., Craun M.L., Bar-Or D., Phthalate esters used as plasticizers in packed red blood cell storage bags may lead to progressive toxin exposure and the release of pro-inflammatory cytokines. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009, 2, 166–71.
- (2) Ahlbom A., Bridges J., De Jong W., Hajslová J., Hartemann P., Jung T., Mattsson M.O., Pagès J.M., Rydzynski K., Stahl D., Thomsen M., Williams D., Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (SCENIHR) Preliminary report on the safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk, June 2007, Brussels.
https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_047.pdf. 2007 [accessed july 12, 2021].
- (3) Bernard L., Décaudin B., Lecoœur M., Richard D., Bourdeaux D., Cuff R., Sautou V., Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: a review, *Talanta* 2014, 129, 39-54.
- (4) Prowse C.V., de Corte D., van der Meer P.F., Commercially available blood storage containers, *Vox Sang.* 2014, 106, 1-13.
- (5) Bernard L., Cuff R., Breyse C., Décaudin B., Sautou V., Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions, *Int. J. Pharm.* 2015, 1, 341-7.

- (6) CPSC Staff Statement on University of Cincinnati Report, Toxicity Review for Di-2 Ethylhexyl Terephthalate (DEHT), <https://www.cpsc.gov/s3fs-public/Toxicity%20Review%20of%20DEHT.pdf?FObpuBBqgypVtw7gIEGMFXHN5H7vbeEz>. [accessed october 12, 2021]
- (7) Faber W.D., Deyo J.A., Stump D.G., Navarro L., Ruble K., Knapp J., Developmental toxicity and uterotrophic studies with di-2-ethylhexyl terephthalate. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2007, *80*, 396–405.
- (8) Furr J., Lambright C., Wilson V.S., Foster M.P., Gray L.E., A short-term in vivo screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation, *Toxicol. Sci.* 2014, *140*, 403–24.
- (9) Eljezi T., Pinta P., Richard D., Pinguet J., Chezal J.M., Chagnon M.C., Sautou V., Grimandi G., Moreau E., In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line, *Chemosphere* 2017, *173*, 452-9.
- (10) Graminske S., Puca K., Schmidt A., Brooks S., Boerner A., Heldke S., de Arruda Indig M., Brucks M., Kossor D., *In vitro* evaluation of di(2-ethylhexyl)terephthalate-plasticized polyvinyl chloride blood bags for red blood cell storage in AS-1 and PAGGSM additive solutions, *Transfusion*, 2018, *58*, 1100-7.
- (11) Descat A., Lecoeur M., Kouach M., Goossens L., Thelliez A., Odou P., Décaudin B. Goossens J.F., Simultaneous determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate and their monoester metabolites in four labile blood products by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020, *181*, 113063.
- (12) Dumont L.J., Baker S., Dumont D.F., Herschel L., Waters S., Calcagni K., Calcagni K., Sandford C., Radwanski K., Min K., David R. M., Otter R., Exploratory *in vitro* study of red blood cell storage containers formulated with an alternative plasticizer, *Transfusion* 2012, *52*, 1439-1445.
- (13) 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, *Clin. Chim. Acta* 2005, *358*, 159-66.
- (14) Eckert E., Müller J., Göen T., Simultaneous determination of polyvinylchloride plasticizers di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate and its degradation products in blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2015, *1410*, 173-180.

- (15) Christia C., Tang B., Yin S.S., Luo X.J., Mai B.X., Poma G., Covaci A., Simultaneous determination of legacy and emerging organophosphorus flame retardants and plasticizers in indoor dust using liquid and gas chromatography-tandem mass spectrometry: method development, validation, and application, *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, *411*, 7015-7025.
- (16) Bourdeaux D., Yessaad M., Chennell P., Larbre V., Eljezi T., Bernard L., Sautou V., Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC–MS, *J. Pharm. Biom. Anal.* 2016, *118*, 206-213.
- (17) Gimeno P., Thomas S., Bousquet C., Maggio A.F., Civade C., Brenier C., Bonnet P.A., Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC–MS, *J. Chromatogr. B* 2014, *949–950*, 99-108.
- (18) Lecoeur M., Décaudin B., Guillotin Y., Sautou V., Vaccher C., Comparison of high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography using evaporative light scattering detection for the determination of plasticizers in medical devices, *J. Chromatogr. A* 2015, *1417*, 104-115.
- (19) Radaniel T., Genay S., Simon N., Feutry F., Quagliozzi F., Barthélémy C., Lecoeur M., Sautou V., Décaudin B., Odou P., Quantification of five plasticizers used in PVC tubing through high performance liquid chromatographic-UV detection, *J. Chromatogr. B* 2014, *965*, 158-63.
- (20) Nayebare S.R., Karthikraj R., Kannan K., Analysis of terephthalate metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), *J. Chromatogr. B* 2018, *1092*, 473-479.
- (21) Pinguet J., Kerckhovea N., Eljezi T., Lambert C., Moreau E., Bernard L., Boeuf B., Décaudin B., Genay S., Masse M., Storme L., Sautou V., Richard D., New SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous determination in urine of 22 metabolites of DEHP and alternative plasticizers from PVC medical devices, *Talanta* 2019, *198*, 377-389.
- (22) Been F., Malarvannan G., Bastiaensen M., Yin S., van Nuijs A.L.N., Covaci A., Development and validation of a bioanalytical assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for measuring biomarkers of exposure of alternative plasticizers in human urine and serum, *Talanta* 2020, *198*, 230-236.
- (23) Silva M.J., Samandar E., Calafat A.M., Ye X., Identification of di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHTP) metabolites using human liver microsomes for biomonitoring applications. *Toxico. in Vitro* 2015, *29*, 716 - 721.
- (24) Yin S., Been F., Liu W., Covaci A., Hair as an alternative matrix to monitor human exposure to plasticizers – Development of a liquid chromatography - tandem mass spectrometry method. *J. Chromatogr. B* 2019, *1104*, 94 – 101.

- (25) Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, (2011) United Kingdom, London. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf, 2011 (accessed July 12, 2021).
- (26) Hubert Ph., Nguyen-Hu J.J., Boulanger E., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L., Rozet E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal–Part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 45, 82-96.
- (27) Moldoveanu S.C., Yerabolu R., Critical evaluation of several techniques for the analysis of phthalates and terephthalates: Application to liquids used in electronic cigarettes, *J. Chromatogr. A* 2018, 1540, 77-86.

6.3 Développement du dosage des métabolites secondaires du DEHT par LC-MS/MS dans un lysat cellulaire

Le dosage du DEHT a été développé en LC-UV, comme vu dans le paragraphe précédent, du fait de sa limite de quantification élevée en spectrométrie de masse. Cependant, les métabolites du DEHT, tout comme les métabolites du DEHP, s'ionisent très facilement en ESI en mode négatif. Une méthode de quantification des métabolites secondaires du DEHT a été développée par LC-MS/MS afin d'obtenir des limites de quantification basses, permettant leur dosage dans des matrices biologiques.

Le MEHT, le métabolite primaire du DEHT, est un standard disponible dans le commerce, ce qui n'est pas le cas de tous les métabolites du DEHT. Ses métabolites secondaires tels que le 5-oxo-MEHT, le 5-OH-MEHT et le 5-cx-MEHT sont difficilement accessibles. Ils ont donc été synthétisés en interne, au sein de notre équipe de recherche par le Dr Laurence Goossens. Le contrôle de leur pureté a été réalisée par HRMS à l'aide d'un Orbitrap Exactive (ThermoScientific). Un exemple de spectre obtenu pour le 5-OH-MEHT en ESI en mode négatif est présenté en Figure 34. Le spectre obtenu ne présente pas d'impureté significative et il permet de confirmer l'identification du 5-OH-MEHT par sa masse exacte avec une exactitude de 2,58 ppm, sa formule brute et son degré d'insaturation égal à 6,5 en mode d'ionisation négatif.

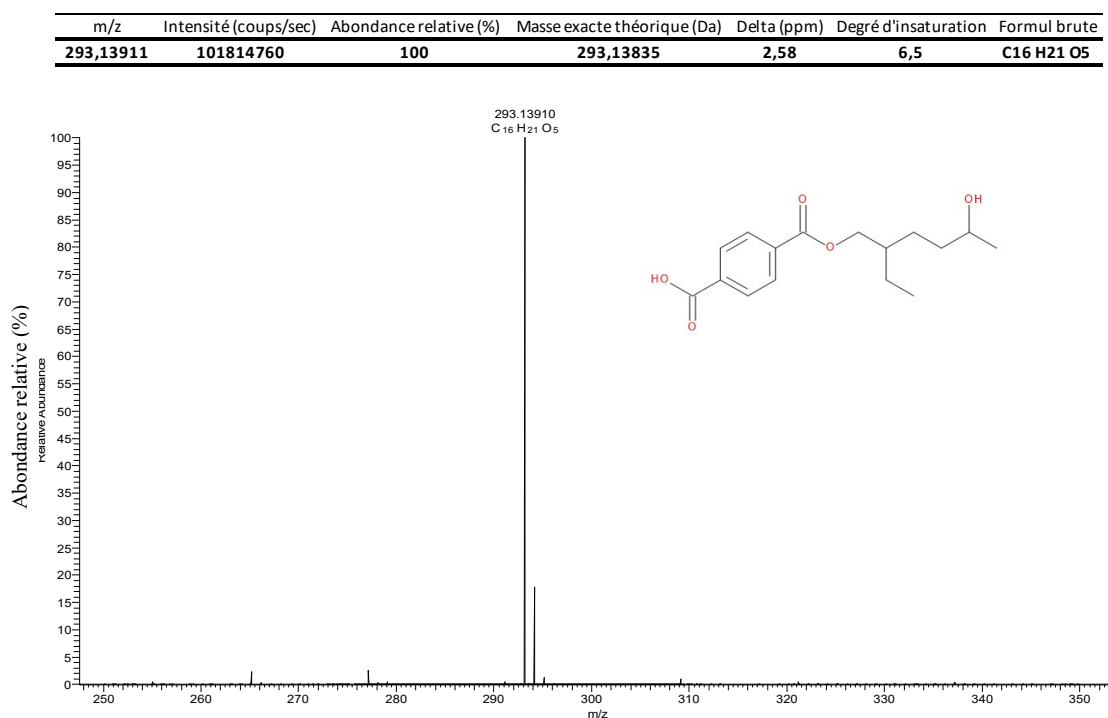


Figure 34 : Spectre HRMS et analyse élémentaire du 5-OH-MEHT en mode d'ionisation négatif

Les paramètres de détection des métabolites secondaires du DEHT ont été optimisés comme décrit dans le paragraphe 4.3. et leurs transitions MRM ont été déterminées et sont présentées dans le Tableau 5.

Un analogue du MEHP-d19 a été choisi comme étalon interne (EI) pour l'ensemble des métabolites. L'optimisation de sa détection en spectrométrie de masse a été réalisée et les paramètres optimisés tels que l'énergie de collision sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Temps de rétention et paramètres de spectrométrie de masse pour l'analyse des métabolites du DEHT

Analyte	t _R (min)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z) qualifiant	Q3 (m/z) quantifiant	EC (eV)	DP (V)	CXP (V)	EP (V)
5-OH-MEHT	4,57	293	77	121	-23	-120	-11	-10
5-cx-MEHT	4,92	307	121	165	-21	-120	-14	-10
5-oxo-MEHT	5,55	291	77	121	-24	-120	-10	-10
MEHP-d19	7,72	310		158	-11	-100	-15	-10
MEHT	7,84	277	121	233	-22	-110	-15	-10

Les paramètres de la source d'ionisation ont été optimisés afin de produire un maximum d'ions d'intérêts. Les conditions optimales du système HPLC en absence de colonne chromatographique utilisent : une phase mobile composée d'eau + 0,1 % d'acide formique / acétonitrile + 0,1 % d'acide formique (50/50, v/v) et un débit de 0,4 mL/min. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Paramètres optimisés de la source ESI pour l'analyse des métabolites du DEHT

Paramètres de la source d'ionisation (ESI -)	
Tension (V)	-4500
Température (°C)	650
Gaz 1 air (psi)	55
Gaz 2 air (psi)	55
Gaz rideau azote (psi)	25

La séparation chromatographique a ensuite été réalisée sur une phase stationnaire de type biphenyl qui permet d'obtenir une rétention optimale des composés aromatiques. Un gradient d'élution de 10 minutes a été mis en place afin d'obtenir une séparation efficace de tous les métabolites. Les temps de rétention de chaque métabolite sont présentés dans le Tableau 5. Les conditions chromatographiques et le profil chromatographique sont présentés en Figure 35.

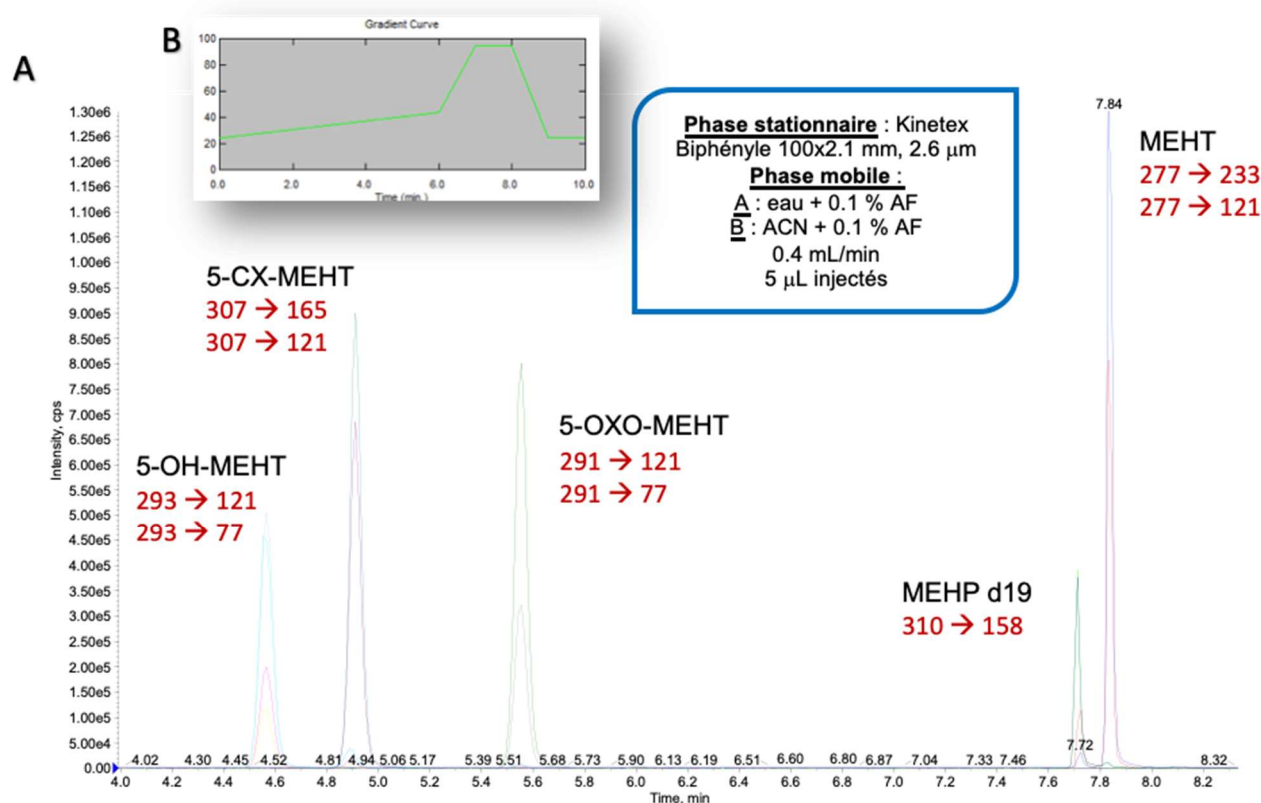


Figure 35 : A : Chromatogramme des métabolites du DEHT, transitions MRM quantifiantes et qualifiantes (en rouge) et conditions chromatographiques. B : Gradient d'élution.

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de la méthode ont été déterminées par dilutions successives jusqu'à atteindre des concentrations correspondant à :

- Signal/Bruit (S/B) = 10 pour la LOQ
- S/B = 3 pour la LOD

Les LOD et LOQ de chacun des métabolites sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : LOD et LOQ des métabolites du DEHT

Métabolite	LOD (nM)	LOQ (nM)
5-OH-MEHT	0,1	0,3
5-cx-MEHT	0,1	0,2
5-oxo-MEHT	0,04	0,1
MEHT	0,6	2

Les gammes de calibration ont été construites dans l'acétonitrile, de 5 à 400 nM, avec une concentration constante d'EI à 250 nM. Un exemple du tracé de la fonction de réponse du 5-OH-MEHT est présenté en Figure 36.

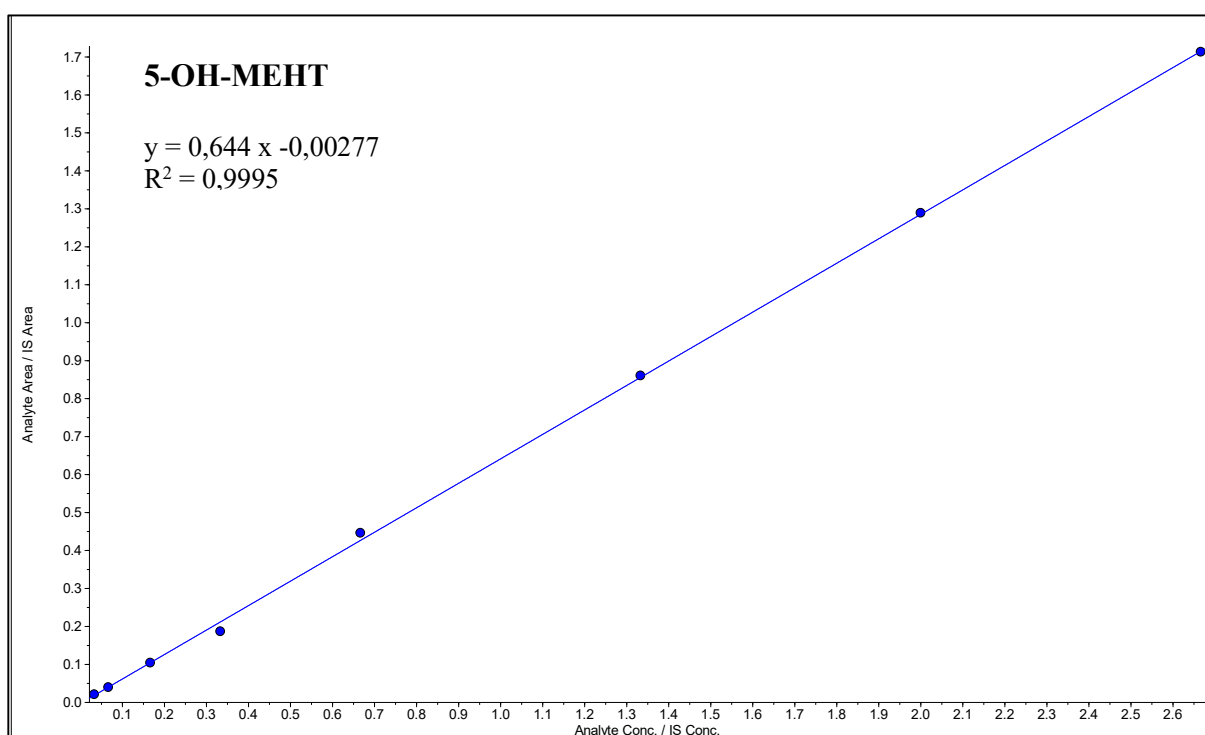


Figure 36 : Courbe de calibration du 5-OH-MEHT de 5 à 400 nM

La fonction de réponse obtenue est linéaire sur toute la gamme de concentration. Il en est de même pour les autres métabolites.

Dans une perspective de mise en place de protocoles *in vitro* permettant l'étude de l'impact du DEHT et de ses métabolites sur des cellules HepG2, il a été indispensable de développer une méthode permettant leur quantification dans du lysat cellulaire issu de cette lignée. La méthode

d'incubation des cellules HepG2 avec les plastifiants est présentée dans le paragraphe 5.2 et la méthode de préparation des échantillons de lysats cellulaires est présentée dans le paragraphe 4.4.3.

Pour commencer, 2,5 millions de cellules HepG2 ont été incubées durant 48 h avec 0,1 % de DMSO, utilisé comme blanc dans notre protocole. Un culot cellulaire de 10 millions de cellules a été préparé et les cellules ont été lysées comme décrit dans le paragraphe 4.4.3. Le MEHP-d19 a été ajouté à l'échantillon avant analyse en LC-MS/MS. Le chromatogramme en Figure 37 illustre ce blanc, confirmant la présence de l'EI et l'absence des analytes d'intérêt.

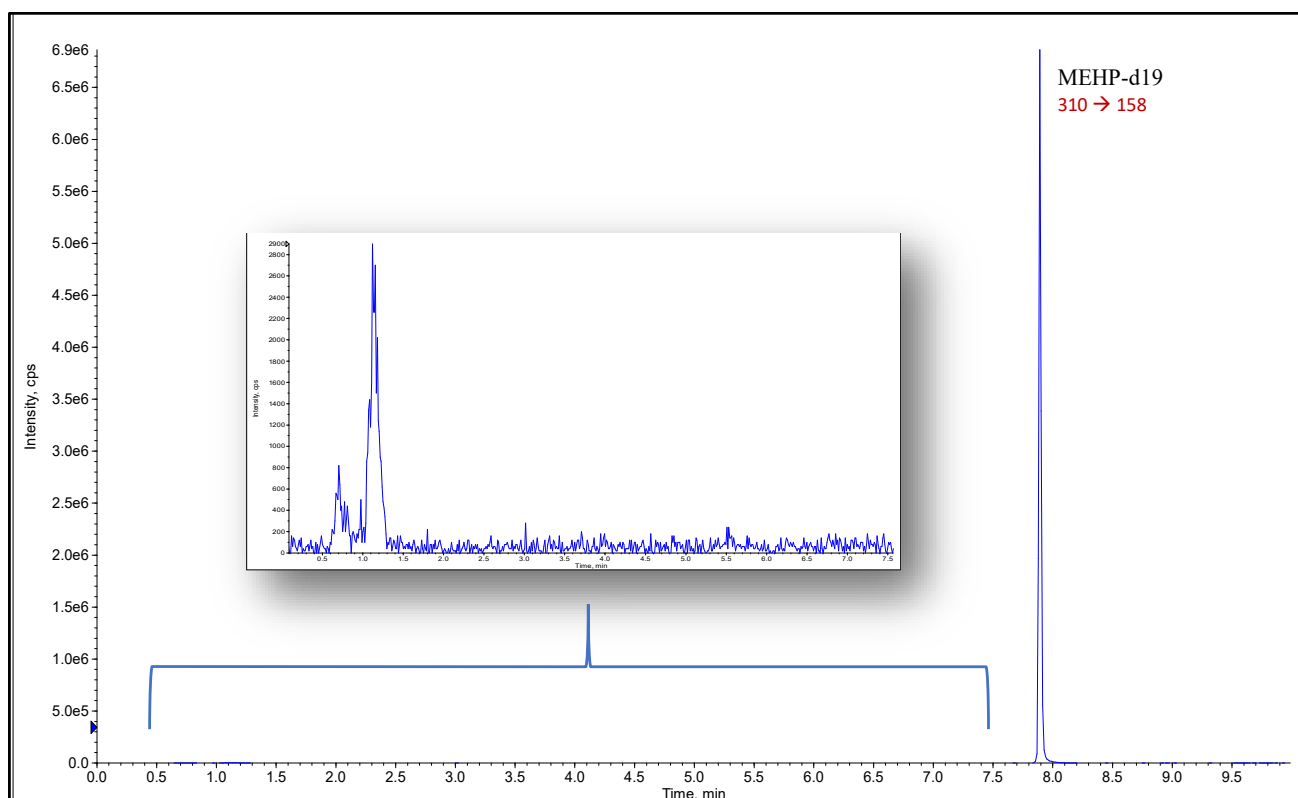


Figure 37 : Chromatogramme représentant l'analyse des métabolites du DEHT dans un échantillon de lysat cellulaire issu de cellules HepG2 incubées avec du DMSO

Le chromatogramme présenté en Figure 38 illustre l'analyse d'un échantillon issu de 2,5 millions de cellules HepG2 incubées durant 48 h avec du DEHT à 50 μ M (0,1 % DMSO) dans 10 mL de DMEM + 10 % SVF dialysé (soit 500 nmol), réalisée en duplicat. Un culot cellulaire de 10 millions de cellules a été préparé et les cellules ont été lysées comme décrit dans le paragraphe 4.4.3. Le MEHP-d19 a été ajouté à l'échantillon avant analyse en LC-MS/MS.

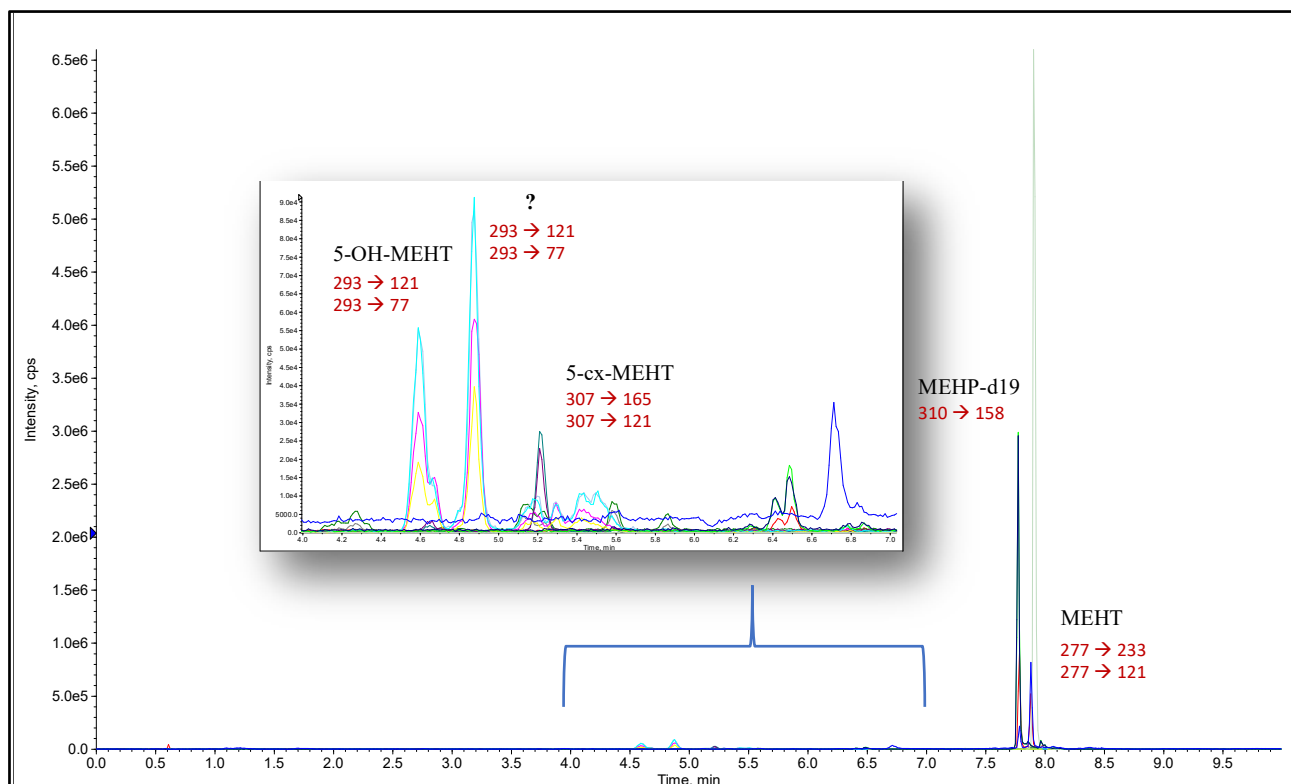


Figure 38 : Chromatogramme représentant l'analyse des métabolites du DEHT dans un échantillon de lysat cellulaire issu de cellules HepG2 incubées avec du DEHT à 50 μ M (500 nmol) durant 48 h

A l'aide des gammes étalons mises en place précédemment, les métabolites du DEHT ont pu être quantifiés dans les lysats cellulaires. Il est possible de visualiser la formation des métabolites primaires et secondaires du DEHT au sein des cellules HepG2 durant l'incubation tels que le MEHT, dosé à 13,5 nM (soit 0,68 pmol), le 5-OH-MEHT, dosé à 6 nM (soit 0,3 pmol) alors que le 5-cx-MEHT est non quantifiable. La concentration retrouvée en MEHT est très faible en comparaison de celle introduite. Cette analyse suggère que le DEHT est faiblement métabolisé au sein des hépatocytes. Un signal à $t_R = 4,85$ min est observé à la même transition MRM que celle du 5-OH-MEHT non encore décrit dans la littérature. Nous pouvons supposer qu'il s'agit d'un isomère de position du 5-OH-MEHT. Des isomères du 5-OH-MEHT, tels que le 6-OH-MEHT, sont actuellement en cours de synthèse au sein de notre laboratoire afin de confirmer l'identification du signal de cet analyte.

Pour rappel, le DEHT n'est pas analysé par cette méthode développée en LC-MS/MS à cause, notamment, de son ionisation aléatoire. La méthode LC-UV développée pour le dosage du DEHT n'a pas encore été appliquée à ces lysats cellulaires.

Le même protocole a été réalisé pour une incubation des cellules HepG2 durant 48 h avec du MEHT à 50 μM (0,1 % DMSO) dans 10 mL de DMEM + 10 % SVF dialysé (soit 500 nmol), réalisée en duplicat. Le chromatogramme obtenu est présenté en Figure 39.

Nous observons également la formation des métabolites secondaires tels que le 5-OH-MEHT, dosé à 8 nM (0,4 pmol) et le 5-cx-MEHT, dosé à 5 nM (0,25 pmol). Le MEHT demeure détectable et il est quantifié à 425 nM (21,2 pmol). La concentration retrouvée en MEHT est bien inférieure à celle introduite (50 μM , 500 nmol), mais 30 fois plus élevée que celle retrouvée lors de l'incubation avec le DEHT. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Il existe peu de transporteurs actifs du MEHT, ce qui ne lui permet pas de traverser la membrane cellulaire
- Son transport actif est limité et la concentration de MEHT à 50 μM introduite est trop élevée
- Il est donc possible que le MEHT soit en parti éliminé lors du rinçage des cellules.

Le 5-oxo-MEHT n'est pas détectable dans cet échantillon. Cependant, un signal à $t_R = 4,85$ min est observable, correspondant à la même transition MRM que celle du 5-OH-MEHT.

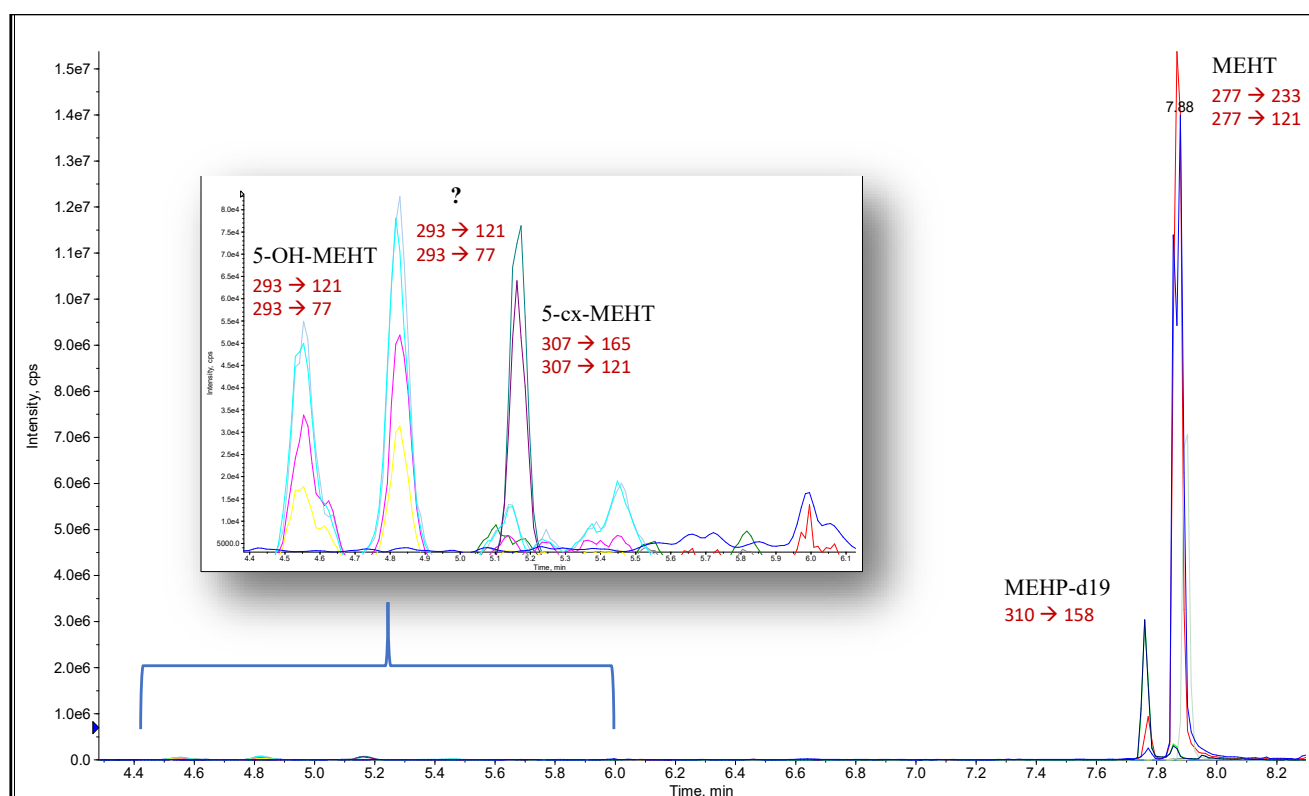


Figure 39 : Chromatogramme représentant l'analyse des métabolites du DEHT dans un échantillon de lysat cellulaire issu de cellules HepG2 incubées avec du MEHT à 50 μM (500 nmol) durant 48 h

6.4 Mesure de l'activité du DEHP, du DEHT et de leurs métabolites sur le récepteur PPAR α

Il est connu que le métabolisme humain, notamment l'homéostasie du cholestérol, peut être modifié par des perturbateurs endocriniens, tels que des plastifiants. En effet, des données de la littérature ont montré que l'homéostasie du cholestérol pouvait être perturbée par l'exposition au DEHP *via* son activité sur h-PPAR α (PPAR α humain) et une diminution de l'expression du gène codant la CYP7A1 (116,117). Cette modulation de l'expression de la CYP7A1 pourrait moduler le profil des AB produits par le foie et présents dans la circulation sanguine.

Peu d'études ont été menées dans le but de mesurer l'activité des plastifiants sur h-PPAR α en déterminant l'EC₅₀ de ces composés. *Maloney et al.* montre par des essais de transfection transitoire de cellules COS-1, que le métabolite primaire du DEHP, le MEHP, est un ligand de h-PPAR α , avec une activité définie par son EC₅₀ d'environ 10 μ M (118). Quelques années plus tard, *Hurst et al.* détermine dans les mêmes conditions une EC₅₀ égale à 3,2 μ M pour le même composé (119). Plus récemment, *Laurenzana et al.* n'observe qu'une faible activité du MEHP à 100 μ M sur h-PPAR α (276). Même si ces trois études n'ont pas démontré la même activité du MEHP sur le récepteur h-PPAR α , elles s'accordent sur le fait que le DEHP n'a pas d'activité sur h-PPAR α . Aucun essai *in vitro* similaire n'a été réalisé pour évaluer l'activité du DEHT et de ses métabolites sur le récepteur h-PPAR α .

Des essais de transfection transitoire de cellules HEK293 ont été réalisés comme décrits dans le paragraphe 5.4. afin d'évaluer l'activité des composés suivants sur h-PPAR α : DEHP, DEHT, MEHP, MEHT, 5-OH-MEHT, 5-oxo-MEHT et 5-cx-MEHP. Les résultats obtenus pour le DEHP, le DEHT, le MEHP et le MEHT sont présentés dans la Figure 40 sous forme de courbes dose-réponse, représentant la réponse obtenue en luminescence afin de quantifier l'activité de la luciférase rapportée à celle de la β galactosidase (%) en fonction de la concentration introduite du composé à tester (log M). Les concentrations efficaces médianes (EC₅₀) ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPadPrism 9.5.1 pour chacun des composés étudiés.

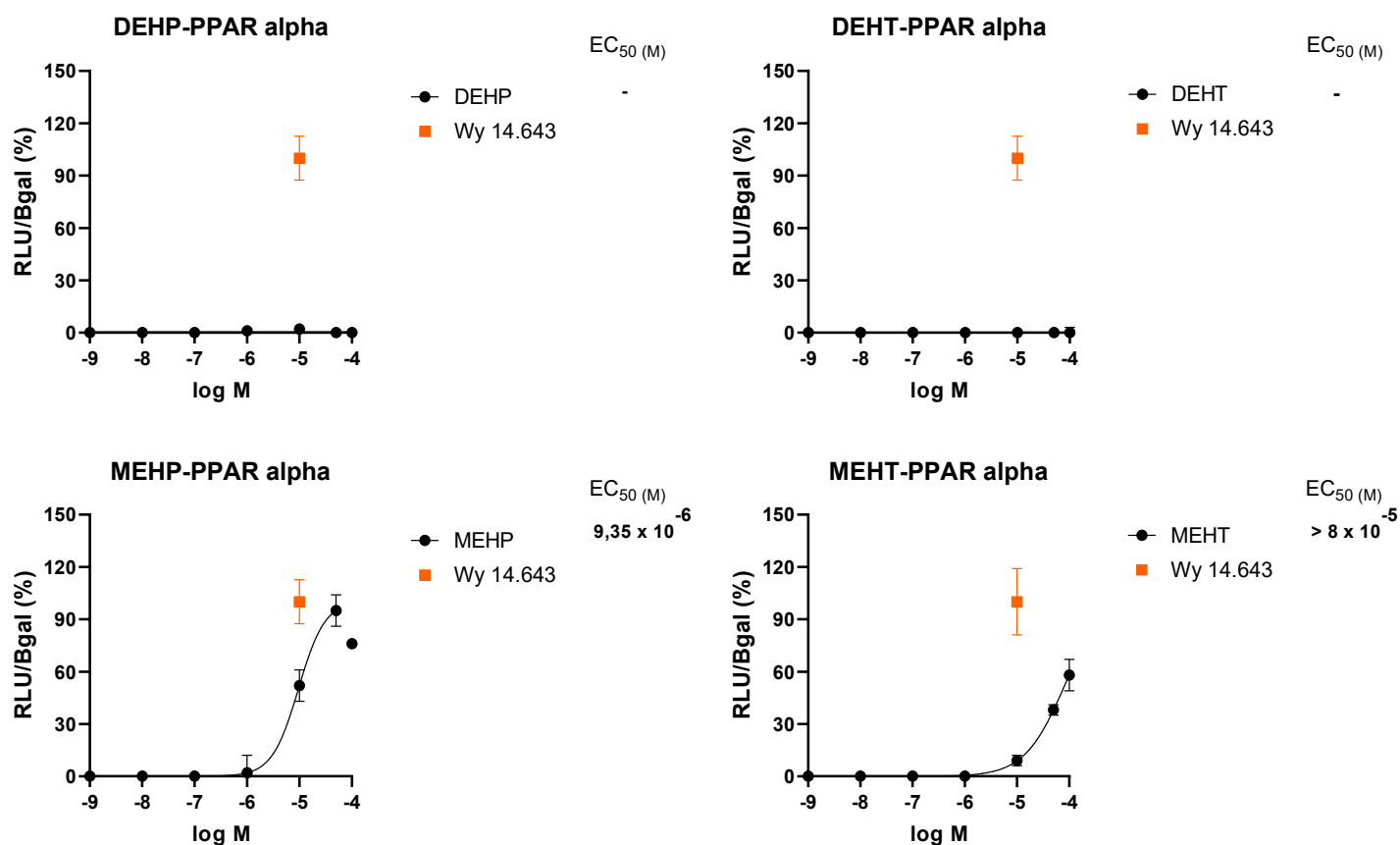


Figure 40 : Courbes dose-réponse et EC_{50} du DEHP, DEHT, MEHP et MEHT sur le récepteur PPAR α humain. Wy14643 à 10 μ M comme référence. $n = 3$.

Le composé Wy 14643, agoniste de h-PPAR α , a été testé à 10 μ M et a été utilisé comme référence. Sa réponse a été définie comme représentant RLU/ β gal = 100 %. Les réponses des composés d'intérêt ont été mesurées de manière relative par rapport à cette référence. Les plastifiants et leurs métabolites ont été évalués à des concentrations de 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 50 et 100 μ M. Chaque concentration a été réalisée en triplicat.

Les métabolites secondaires du DEHT, le 5-OH-MEHT, le 5-oxo-MEHT et le 5-cx-MEHT n'ont montré aucune activité sur le récepteur h-PPAR α et leurs courbes dose-réponse ne sont pas présentées.

Comme attendu, le DEHP n'a pas d'activité sur le récepteur h-PPAR α , même à une concentration élevée de 100 μ M. Il en est de même pour le DEHT, qui ne présente aucune activité sur h-PPAR α . Ce résultat n'avait jamais été démontré auparavant.

Le MEHP présente une activité sur h-PPAR α et a été déterminée par son EC₅₀ = 9,35 μ M. Ce résultat est comparable à celui obtenu par Maloney et al. (118). A 100 μ M de MEHP, une diminution du % RLU/ β gal est observée qui est corrélée à une mortalité cellulaire non négligeable.

Le MEHT présente également une activité sur h-PPAR α à une concentration plus élevée et son EC₅₀ est estimée supérieure à 80 μ M. Il présente donc une plus faible activité sur h-PPAR α que le MEHP.

7 Développements analytiques pour la quantification des acides biliaires

L'étude du métabolisme des AB nécessite le dosage d'un grand nombre d'espèces d'AB mais aussi du marqueur circulant de leur synthèse, le C4.

La mise au point des méthodes de dosage permettra de quantifier ces composés dans diverses matrices telles que le plasma, le foie ou encore le lysat cellulaire.

Le développement de ces méthodes de quantification sera présenté dans cette partie.

7.1 Développement du dosage par LC-MS/MS du C4

Les paramètres de détection du C4 en spectrométrie de masse ont été optimisés comme décrit dans le paragraphe 4.5. et leurs transitions MRM ont été déterminées et sont présentées dans le Tableau 8.

L'analogue du C4 deutéré sept fois, le C4-d7, a été choisi comme EI. Son optimisation en spectrométrie de masse a été réalisée de la même manière et les paramètres optimisés pour sa transition MRM 408 → 177 sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Temps de rétention et paramètres de spectrométrie de masse pour l'analyse du C4

Analyte	t _R (min)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z) quantifiant	EC (eV)	DP (V)	CXP (V)	EP (V)
C4	6,56	401	177	31	100	15	10
C4-d7	6,52	408	177	31	100	15	10

Les paramètres de la source d'ionisation ont été optimisés afin de produire un maximum d'ions d'intérêts. Les conditions optimales du système HPLC en absence de colonne chromatographique utilisent : une phase mobile composée d'eau + 0,1 % d'acide formique / acétonitrile (50/50, v/v) et un débit de 0,5 mL/min. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Paramètres optimisés de la source ESI pour l'analyse du C4

Paramètres de la source d'ionisation (ESI +)	
Tension (V)	5500
Température (°C)	650
Gaz 1 air (psi)	50
Gaz 2 air (psi)	50
Gaz rideau azote (psi)	20

La séparation chromatographique a été réalisée sur une phase stationnaire classique en polarité de phase inversée, la C₁₈. Un gradient d'élution de 12 min a été mis en place afin d'obtenir l'élution du C4 et de son étalon interne à un temps de rétention de 6,5 min, anticipant ainsi de possibles interférences éluées en début et en fin d'analyse telles que des résidus de matrices biologiques n'ayant pas été suffisamment purifiés. Les conditions chromatographiques de l'analyse, le gradient ainsi que la séparation chromatographique sont présentés en Figure 41.

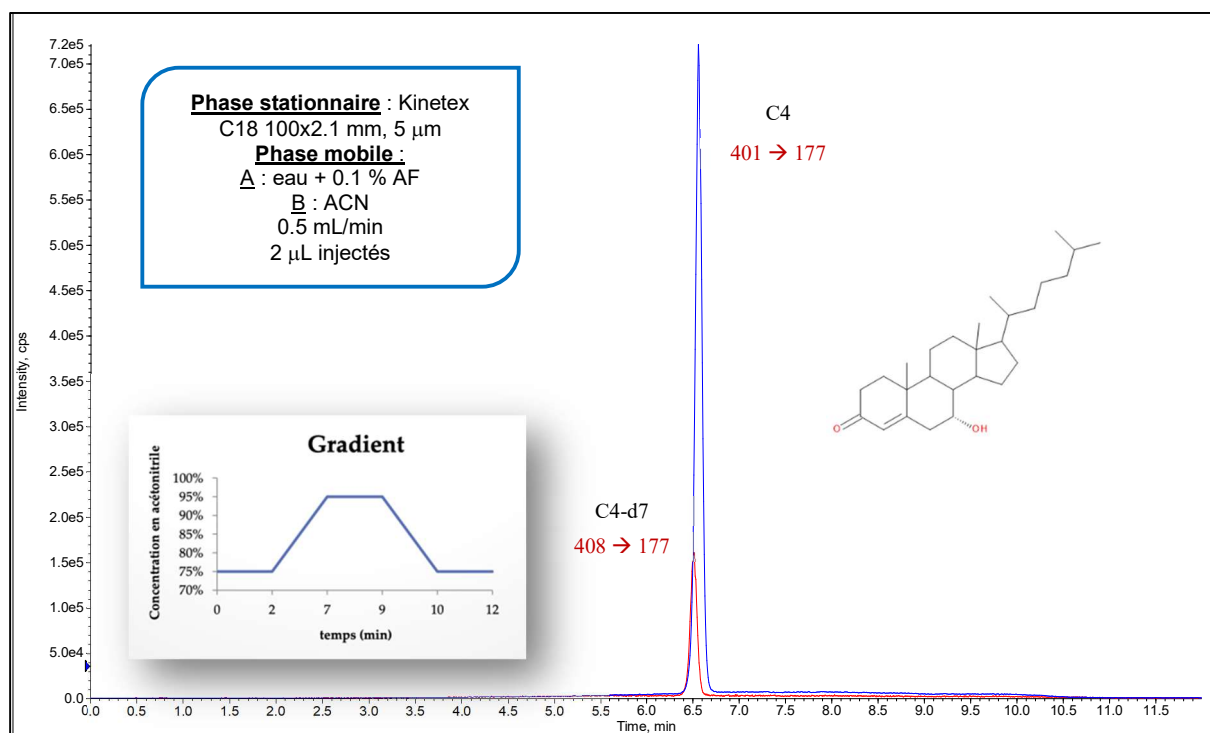


Figure 41 : Chromatogramme du C4 et du C4-d7, transitions MRM quantifiantes (en rouge), conditions chromatographiques et gradient d'élution.

La gamme de calibration a été construite dans le méthanol, de 1 à 200 nM, avec une concentration constante d’EI à 30 nM. Son tracé est présenté en Figure 42.

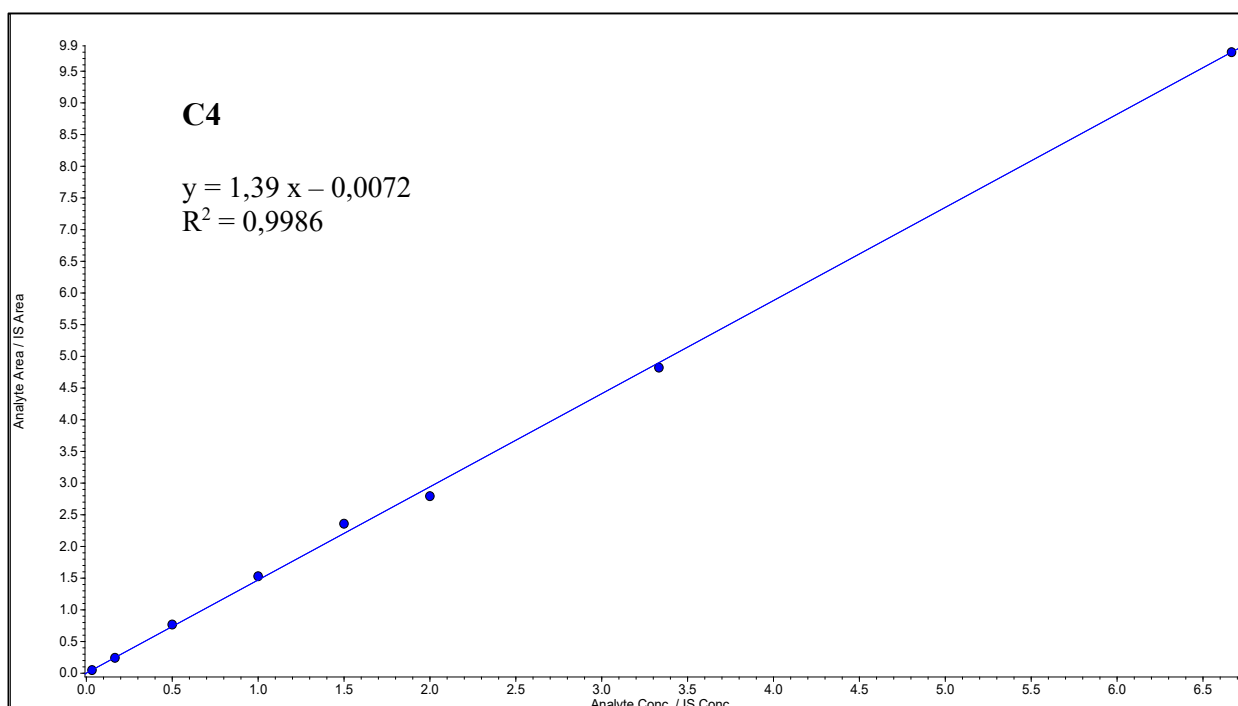


Figure 42 : Courbe de calibration du C4 de 1 à 200 nM

La fonction de réponse obtenue est linéaire sur toute la gamme de concentration, de 1 à 200 nM. Son coefficient de détermination R^2 est supérieur à 0,998.

7.2 Développement du dosage par LC-MS/MS des AB

7.2.1 Optimisation de la méthode LC-MS/MS pour la quantification des AB

De la même manière que pour le développement de la méthode de quantification du C4, les paramètres de détection des AB en spectrométrie de masse ont été optimisés comme décrit dans le paragraphe 4.6. et leurs transitions MRM ont été déterminées et sont présentées dans le Tableau 10.

31 AB ont été étudiés, ainsi que 7 EI deutérés (CA-d4, CDCA-d4, GCA-d4, GCDCA-d4, TCA-d4, TyrCA-d4, LeuCA-d4). Parmi ces AB, 10 AB libres et leurs formes glyco- et/ou tauro-conjuguées sont majoritairement présents chez l’humain et/ou le cochon et/ou le rongeur. 4 formes minoritaires décrites récemment dans la littérature ont été intégrés à cette méthode : l’iso-DCA, Phe-CA, Leu-CA, Tyr-CA (151). La fragmentation de ces différentes espèces d’AB a été étudiée afin de déterminer leurs transitions MRM.

Le spectre de fragmentation des AB conjugués à la taurine présente un fragment intense à m/z 80, qui correspond à la perte du groupement SO_3^- de la taurine, alors que celui des AB conjugués à la glycine présente un fragment intense à m/z 74, correspondant à la perte du résidu glycine. Les AB conjugués aux acides aminés comme la phénylalanine, la tyrosine et la leucine, se fragmentent en générant respectivement les ions m/z 164, m/z 180 et m/z 130.

Les AB libres ne se fragmentent pas ou peu et ne présentent pas de fragment intense qui puisse être exploité pour la quantification en mode MRM. Ces AB non-conjugués ont été suivis en mode « pseudo MRM » : l'ion précurseur sélectionné en Q1 est le même que celui sélectionné en Q3.

Les transitions MRM des 31 AB étudiés, ainsi que leurs paramètres instrumentaux sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Temps de rétention, paramètres de spectrométrie de masse, limites de détection (LOD) et limites de quantification (LOQ) des AB

Analyte	t_R (min)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z) quantifiant	EC (eV)	DP (V)	CXP (V)	EP (V)	LOD (nM)	LOQ (nM)
ω MCA	6,99	407	407	-40	-100	-17	-10	1,7	5,3
α MCA	7,41	407	407	-40	-100	-17	-10	1,7	5,3
β MCA	7,95	407	407	-40	-100	-17	-10	1,7	5,3
T ω MCA	8,80	514	80	-130	-100	-10	-10	1,3	4,1
T α MCA	9,25	514	80	-130	-100	-10	-10	1,0	3,3
T β MCA	9,62	514	80	-130	-100	-10	-10	1,3	4,1
HCA	11,26	407	407	-40	-100	-10	-10	3,3	10,2
GHCA	11,32	464	74	-80	-100	-10	-10	0,3	1,2
THCA	12,36	514	80	-130	-100	-10	-10	0,4	1,1
GUDCA	12,52	448	74	-40	-100	-10	-10	0,1	0,3
UDCA	12,91	391	391	-40	-100	-39	-10	1,7	5,3
GHDCa	12,92	448	74	-40	-100	-10	-10	0,2	1,1
HDCA	13,41	391	391	-40	-100	-15	-10	1,7	5,3
TUDCA	13,49	428	80	-130	-100	-13	-10	0,1	0,4
THDCa	13,93	498	80	-130	-100	-10	-10	0,4	1,1
CA	14,08	407	407	-40	-100	-17	-10	0,8	2,5
CA-d4	14,11	411	411	-40	-100	-45	-10		

GCA	14,28	464	74	-80	-100	-10	-10	0,1	0,5
GCA-d4	14,31	468	74	-80	-100	-10	-10		
isoDCA	14,48	391	391	-30	-100	-35	-10		
TCA	14,93	514	80	-130	-100	-10	-10	0,3	1,3
TCA-d4	14,95	518	80	-130	-100	-12	-10		
Tyr-CA	15,41	570	180	-50	-100	-10	-10	0,1	0,4
Tyr-CA-d4	14,43	574	180	-50	-100	-10	-10		
GCDCA	17,91	448	74	-80	-100	-10	-10	0,1	0,4
GCDCA-d4	17,94	452	74	-80	-100	-10	-10		
TCDCa	18,97	498	80	-130	-100	-10	-10	0,2	0,5
Leu-CA	19,01	520	130	-30	-100	-10	-10	0,1	0,4
Leu-CA-d4	19,04	524	130	-50	-100	-10	-10		
GDCA	19,09	448	74	-40	-100	-10	-10	0,2	0,5
CDCA	19,47	391	391	-40	-100	-45	-10	1,7	5,3
CDCA-d4	19,50	395	395	-40	-100	-10	-10		
TDCA	19,91	498	80	-130	-100	-10	-10	0,2	0,5
Phe-CA	20,38	554	147	-55	-100	-15	-10	0,1	0,4
DCA	20,56	391	391	-40	-100	-15	-10	0,8	2,5
GLCA	23,02	432	74	-80	-100	-10	-10	0,2	0,5
TLCA	23,95	482	80	-130	-100	-10	-10	0,2	0,5
LCA	27,63	375	375	-40	-100	-39	-10	1,7	5,3

Les paramètres de la source d'ionisation ont été optimisés afin de produire un maximum d'ions d'intérêts. Les conditions optimales du système HPLC en absence de colonne chromatographique utilisent : une phase mobile composée d'eau contenant 20 mM d'acétate d'ammonium ajustée à pH 8 / acétonitrile (50/50, v/v) et un débit de 0,5 mL/min. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Paramètres optimisés de la source ESI pour l'analyse des AB

Paramètres de la source d'ionisation (ESI -)	
Tension (V)	-4500
Température (°C)	550
Gaz 1 air (psi)	50
Gaz 2 air (psi)	50
Gaz rideau azote (psi)	25

La séparation chromatographique a été réalisée sur une phase stationnaire de type C₁₈. Un gradient d'élution de 41 min a été mis en place afin d'obtenir la séparation des AB possédant les mêmes m/z.

La composition de la phase mobile a fait l'objet de plusieurs ajustements. En effet, afin d'optimiser l'ionisation de tous les AB, il a été essentiel d'utiliser un tampon à pH alcalin. Des concentrations en acétate d'ammonium à 10, 15 et 20 mM ont été testées et la concentration la plus élevée s'est avérée être optimale pour l'ionisation et la séparation des AB, permettant notamment d'améliorer le nombre de plateaux théoriques et la symétrie des signaux obtenus. La phase organique était uniquement composée d'acétonitrile lors des premiers essais. Cependant, cela ne permettait pas la séparation des différentes espèces d'AB $\alpha/\beta/\omega$ MCA et T $\alpha/\beta/\omega$ MCA ni UDCA/HDCA et leurs conjugués. L'ajout de méthanol à l'acétonitrile a permis d'obtenir leur séparation avec une résolution supérieure à 1,5. Le meilleur compromis entre séparation et temps d'élution a été obtenu grâce à un mélange acétonitrile/méthanol 70/30 (v/v). Le gradient d'élution a été construit de sorte à permettre l'élution et la séparation de tous les AB, malgré leur diversité de polarité, sur une durée de 28 minutes et un temps de run de 41 minutes. En effet, la stabilisation de la phase stationnaire avant et après l'élution des analytes d'intérêt est indispensable afin d'éliminer les impuretés résiduelles provenant des échantillons biologiques et de maintenir des temps de rétention reproductibles entre chaque injection. Les temps de rétention de chaque AB sont présentés dans le Tableau 10.

Les conditions chromatographiques de l'analyse, le gradient ainsi que la séparation chromatographique sont présentés en Figure 43.

Les LOD et LOQ de la méthode ont été déterminées pour chaque AB par dilutions successives. Elles sont présentées dans le Tableau 10 et s'étendent de 0,1 à 10,2 nM.

Les gammes de calibration ont été construites dans le méthanol, de 1,5 à 2000 nM, avec une concentration constante d'EI à 250 nM. Un exemple du tracé de la fonction de réponse du GDCA est présenté en Figure 44.

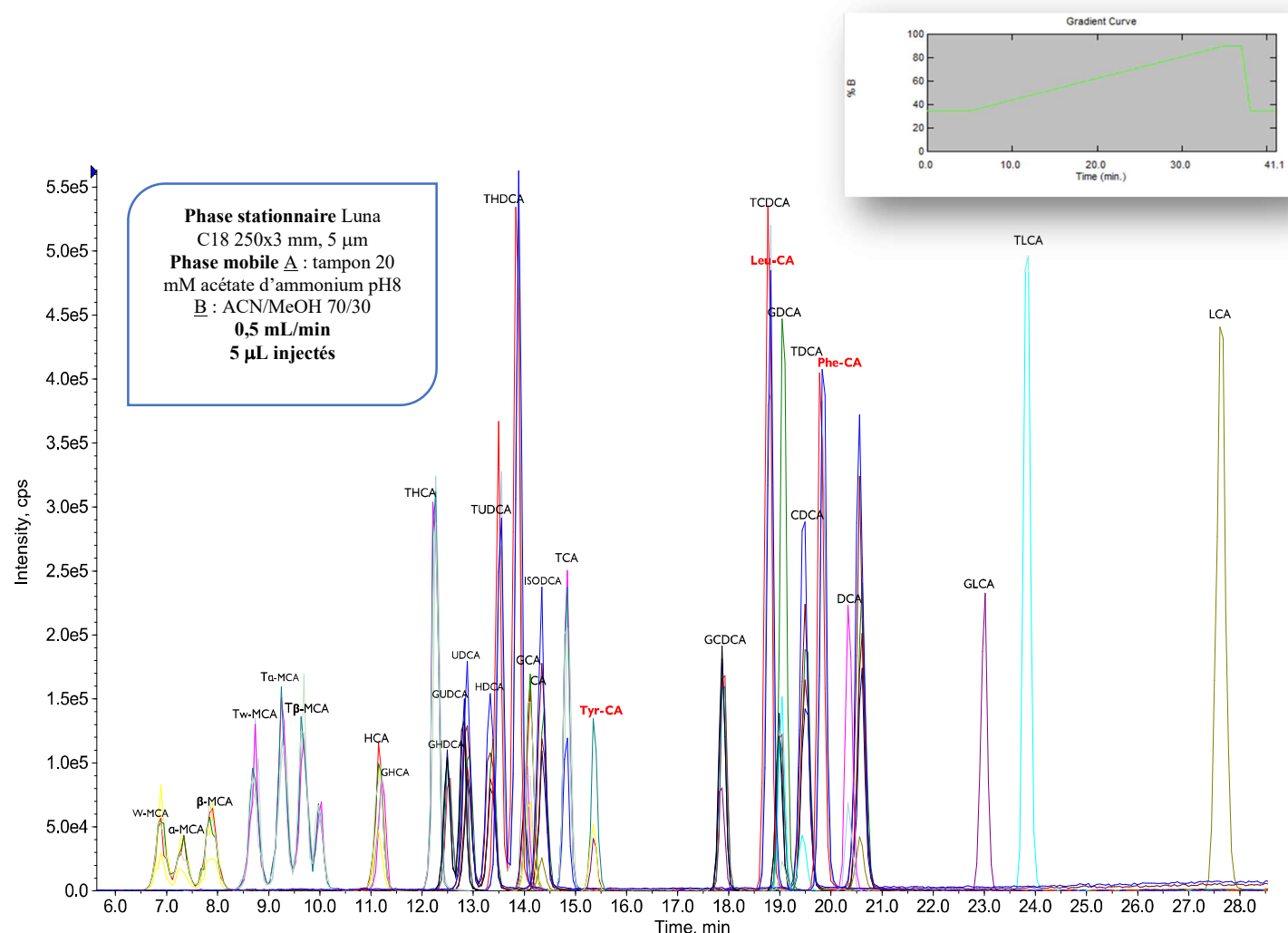


Figure 43 : Chromatogramme des AB, conditions chromatographiques et gradient d'élution

Les fonctions de réponse obtenues sont linéaires sur toute la gamme de concentration pour chacun des AB.

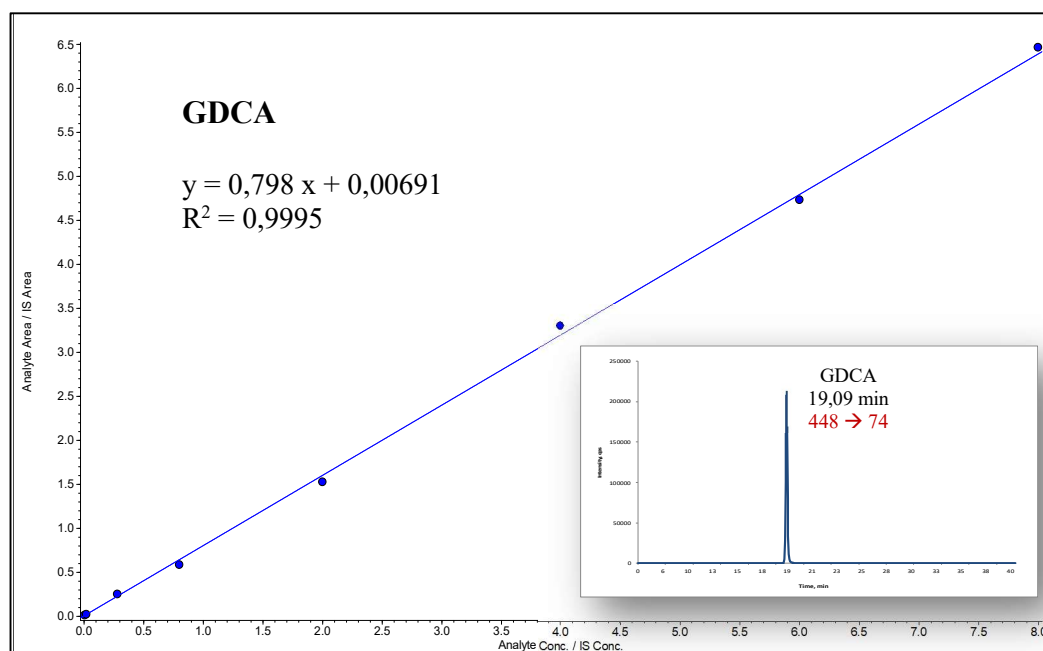


Figure 44 : Courbe de calibration de 1,5 à 2000 nM et chromatogramme du GDCA

7.2.2 Cas particulier d'AB dérivés du LCA

L'isoallo-LCA et le 3-oxo-LCA ont des propriétés physico-chimiques très proches du LCA (Figure 45). L'isoallo-LCA est un isomère du LCA, possédant la même masse molaire. Le 3-oxo-LCA a une structure chimique très proche de celle du LCA et ils ne se distinguent que par 2 unités de masse molaire. Il s'agit de 3 molécules hydrophobes que l'on peut classer par ordre de lipophilie croissante : isoallo-LCA \equiv LCA < 3-oxo-LCA.

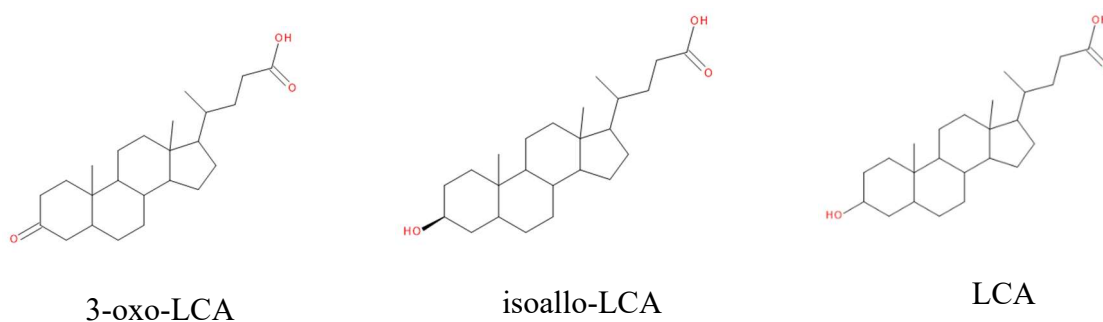


Figure 45 : Structures chimiques du 3-oxo-LCA, isoallo-LCA et LCA

Leur optimisation en spectrométrie de masse sur le QTRAP5500 a été réalisée de manière similaire à celle des autres AB. Comme tous les AB libres, l'isoallo-LCA et le 3-oxo-LCA ne se fragmentent pas dans la cellule de collision. Leur suivi est donc réalisé par leur transition pseudo-MRM présentées dans le Tableau 12. Les paramètres de masse et d'ionisation de ces 2 AB et du LCA sont présentés dans le paragraphe 4.7.

Tableau 12 : Paramètres de spectrométrie de masse (transitions MRM et énergie de collision EC) du LCA et de ses dérivés

Analyte	Ion précurseur Q1 (m/z)	Ion fragment Q3 (m/z)	EC (eV)
isoallo-LCA	375,5	375,5	-23
LCA	375,4	375,4	-24
3-oxo-LCA	373,4	373,4	-27

En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques très proches, les conditions chromatographiques décrites dans le paragraphe précédent n'ont pas permis une séparation satisfaisante et une identification exacte de ces AB dans des échantillons complexes. Nous avons donc choisi de développer une méthode de dosage par LC-MS/MS indépendante, détaillée dans le paragraphe 4.7. Leur séparation en chromatographie liquide a demandé une optimisation plus poussée. En effet, il a fallu notamment s'assurer que ces 2 AB d'intérêt ne sont pas co-élus avec le LCA. Deux phases stationnaires ont été évaluées : la KINETEX POLAR C18 100 x 2,1 mm, 2,6 µm et la KINETEX F5 100 x 2,1 mm, 2,6 µm (Figure 46). La phase POLAR C₁₈ est adaptée à la séparation des AB libres (277) et la phase F5 (278) est indiquée pour permettre la séparation d'isomères.

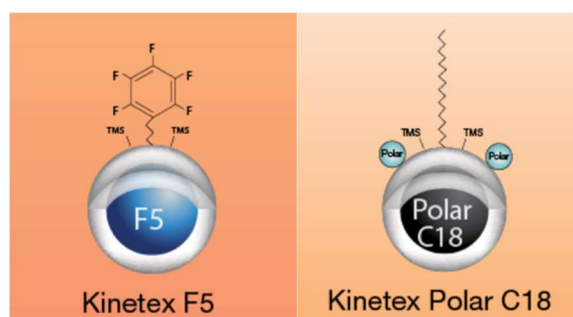


Figure 46 : Greffage des phases stationnaires F5 et POLAR C₁₈

Différentes conditions de phases mobiles et de gradients ont été étudiées sur ces deux phases stationnaires. Afin de déterminer les meilleures conditions d'élution, deux paramètres ont été retenus comme critères de sélection : la résolution entre l'isoallo-LCA et le LCA et les rapports signal/bruit (S/N). Une résolution supérieure à 1,5 et un retour à la ligne de base entre l'isoallo-LCA et le LCA a permis un dosage optimal de chacun de ces AB. Un S/N le plus élevé possible a été obtenu avec un nombre de plateaux théoriques des signaux satisfaisant permettant de doser de faibles quantités d'AB. Les résultats des injections d'un mélange de ces 3 AB à une concentration de 125 nM dans différentes conditions chromatographiques sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Comparaison des performances de deux phases stationnaires (F5 et POLAR C₁₈) pour la séparation de l'isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA

Résolution	POLAR C ₁₈							
	1	2	3	4	5	6	7	8
isoallo-LCA / LCA	1,64	1,57	1,91	2	2,08	2,25	2,2	2,5
S/N								
isoallo-LCA	349	419	233	164	133	206	308	375
3-oxo-LCA	476	623	334	271	166	385	872	389
LCA	283	219	238	144	123	218	282	302

Résolution	F5							
	1	2	3	4	5	6	7	8
isoallo-LCA / LCA	1,06	1,11	1,88	2,21	2,9	2,09	2,58	1,62
S/N								
isoallo-LCA	396	77	66	335	696	409	301	198
3-oxo-LCA	540	187	149	733	918	688	527	184
LCA	296	97	78	456	656	379	288	176

Légende : La couleur verte correspond aux conditions les plus favorables pour le paramètre étudié de l'AB d'intérêt. La couleur rouge correspond aux conditions les plus défavorables pour le paramètre étudié de l'AB d'intérêt. S/N : signal/bruit.

Composition des phases mobiles utilisées en mode gradient d'élution :

1 : Eau + 0,1 % acide formique / Méthanol + 0,1 % acide formique

2 : Eau + 0,1 % acide formique / Méthanol/Acétonitrile 90/10 + 0,1 % acide formique

3 : Eau + 0,1 % acide formique / Méthanol/Acétonitrile 70/30 + 0,1 % acide formique

4 : Eau + 0,1 % acide formique / Méthanol/Acétonitrile 50/50 + 0,1 % acide formique

5 : Eau + 0,1 % acide formique / Méthanol/Acétonitrile 30/70 + 0,1 % acide formique

6 : Eau + 0,1 % acide formique / Méthanol/Acétonitrile 10/90 + 0,1 % acide formique

7 : Eau + 0,1 % acide formique / Acétonitrile + 0,1 % acide formique

8 : Eau + 20 mM acétate d'ammonium pH 8 / Méthanol/Acétonitrile 30/70

Huit compositions de phase mobile (décrites ci-dessus) ont été testées sur les phases stationnaires POLAR C₁₈ et F5 dans le but de séparer les isoformes isoallo-LCA et LCA et d'obtenir des S/N optimaux pour les 3 composés, isoallo-LCA, LCA et 3-oxo-LCA. Le gradient utilisé est présenté en Figure 47.

POLAR C₁₈

- La **résolution** entre l'isoallo-LCA et le LCA est globalement correcte ($> 1,5$) pour chaque condition testée.
 - 1) La comparaison entre la phase mobile contenant uniquement du méthanol [1] et celle contenant uniquement de l'acétonitrile [7] à pH acide montre que l'acétonitrile permet d'obtenir une meilleure résolution. Cela s'explique par le fait qu'il s'agisse d'un solvant aprotique, favorisant ainsi la séparation des composés apolaires.
 - 2) L'utilisation d'un mélange méthanol/acétonitrile (10/90) [6] à pH acide mène à des résultats similaires à ceux obtenus avec de l'acétonitrile pur [7]. Cependant, l'augmentation de la proportion de méthanol en mélange avec l'acétonitrile diminue la résolution obtenue entre l'isoallo-LCA et le LCA. Cela confirme la précédente observation.
 - 3) La comparaison des mélanges méthanol/acétonitrile (30/70) à pH acide [5] et à pH basique [8] montre que l'utilisation d'une phase mobile à pH alcalin améliore la résolution des 2 composés. En effet, à pH alcalin, ces AB se trouvent sous la forme ionisée RCOO⁻ et peuvent ainsi interagir de manière plus importante avec les groupements polaires de la phase stationnaire POLAR C₁₈. Les temps de rétention sont sensiblement identiques quel que soit le pH.
- Les S/N obtenus pour chacun des composés sont très dépendants de la phase mobile utilisée
 - 1) La comparaison entre la phase mobile contenant uniquement du méthanol [1] et celle contenant uniquement de l'acétonitrile [7] à pH acide mène à des S/N similaires pour l'isoallo-LCA et le LCA. L'utilisation d'acétonitrile pur [7] est favorable au S/N du 3-oxo-LCA.
 - 2) Lors de l'utilisation d'un mélange méthanol/acétonitrile [2, 3, 4, 5, 6] à pH acide, plus la proportion de méthanol est augmentée, plus le S/N diminue. Le S/N du 3-oxo-LCA est élevé si les proportions du mélange sont (10/90) et (90/10) [6,2].
 - 3) La comparaison des mélanges méthanol/acétonitrile (30/70) à pH acide [5] et à pH basique [8] montre que l'utilisation d'une phase mobile à pH alcalin améliore le S/N des 3 composés, tout comme leur résolution. Les temps de rétention demeurent inchangés quel que soit le pH.

La séparation chromatographique de l'isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA obtenue grâce à la phase stationnaire POLAR C₁₈ est présentée en Figure 47.

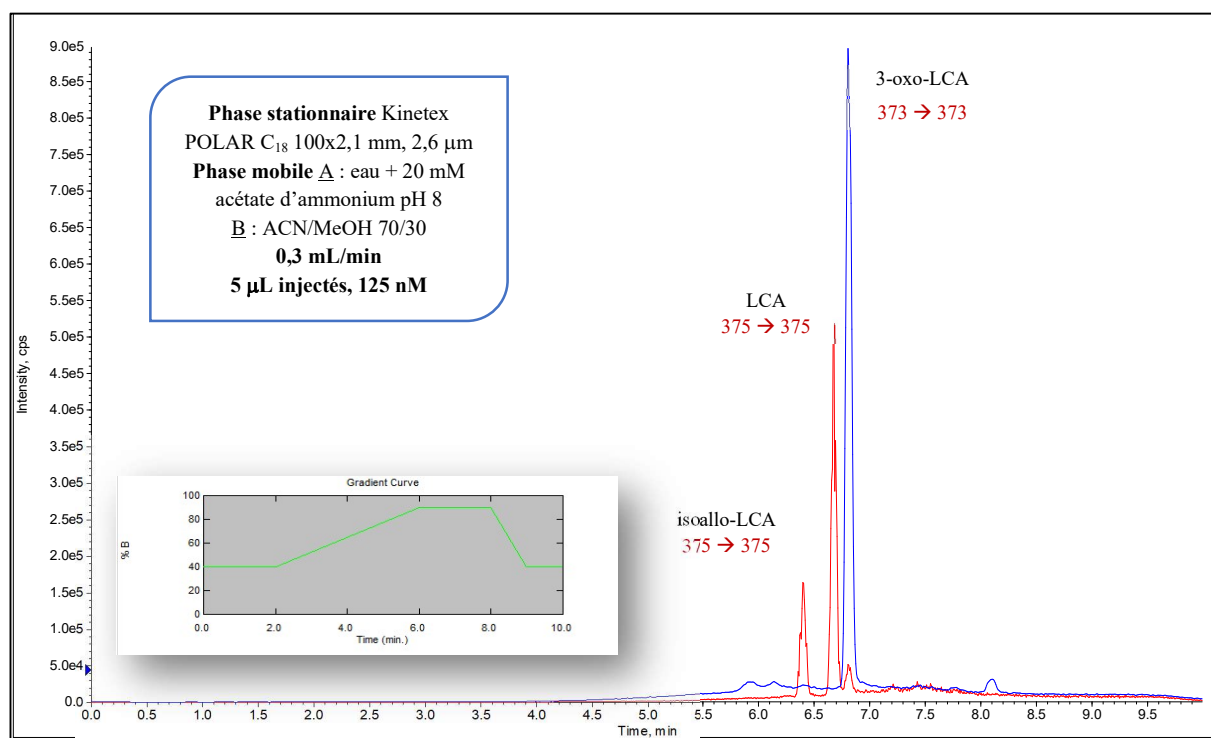


Figure 47 : Chromatogramme de l'isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA obtenue sur la phase stationnaire POLAR C₁₈

F5

- La **résolution** entre l'isoallo-LCA et le LCA est fortement influencée par la composition de la phase mobile.

1) La comparaison entre la phase mobile contenant uniquement du méthanol [1] et celle contenant uniquement de l'acétonitrile [7] à pH acide montre que l'acétonitrile, solvant aprotique, permet d'obtenir une meilleure résolution.

2) L'utilisation d'un mélange méthanol/acétonitrile (10/90) [6] à pH acide mène à une résolution moins bonne (2,09) que celle obtenue avec de l'acétonitrile pur (2,58) [7]. L'augmentation de la proportion de méthanol en mélange avec l'acétonitrile semble déléter mais les proportions méthanol/acétonitrile (30/70) [5] permettent d'obtenir une résolution de 2,9.

3) La comparaison des mélanges méthanol/acétonitrile (30/70) à pH acide [5] et à pH basique [8] montre que l'utilisation d'une phase mobile à pH acide améliore la résolution des 2 composés. En effet, à pH acide, ces AB se trouvent sous leur forme moléculaire et peuvent

ainsi interagir de manière plus importante avec les groupements apolaires de la phase stationnaire F5. Les temps de rétention sont sensiblement identiques quel que soit le pH.

- Les S/N obtenus pour chacun des composés sont très dépendants de la phase mobile utilisée
 - 1) La comparaison entre la phase mobile contenant uniquement du méthanol [1] et celle contenant uniquement de l'acétonitrile [7] à pH acide mène à des S/N similaires.
 - 2) Lors de l'utilisation d'un mélange méthanol/acétonitrile [2, 3, 4, 5, 6] à pH acide, plus la proportion de méthanol est augmentée, plus le S/N diminue. Les proportions de mélange optimales sont le méthanol/acétonitrile (30/70) [5].
 - 3) La comparaison des mélanges méthanol/acétonitrile (30/70) à pH acide [5] et à pH basique [8] montre que l'utilisation d'une phase mobile à pH acide améliore le S/N des 3 composés, tout comme leur résolution.

La séparation chromatographique du isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA est présentée en Figure 48.

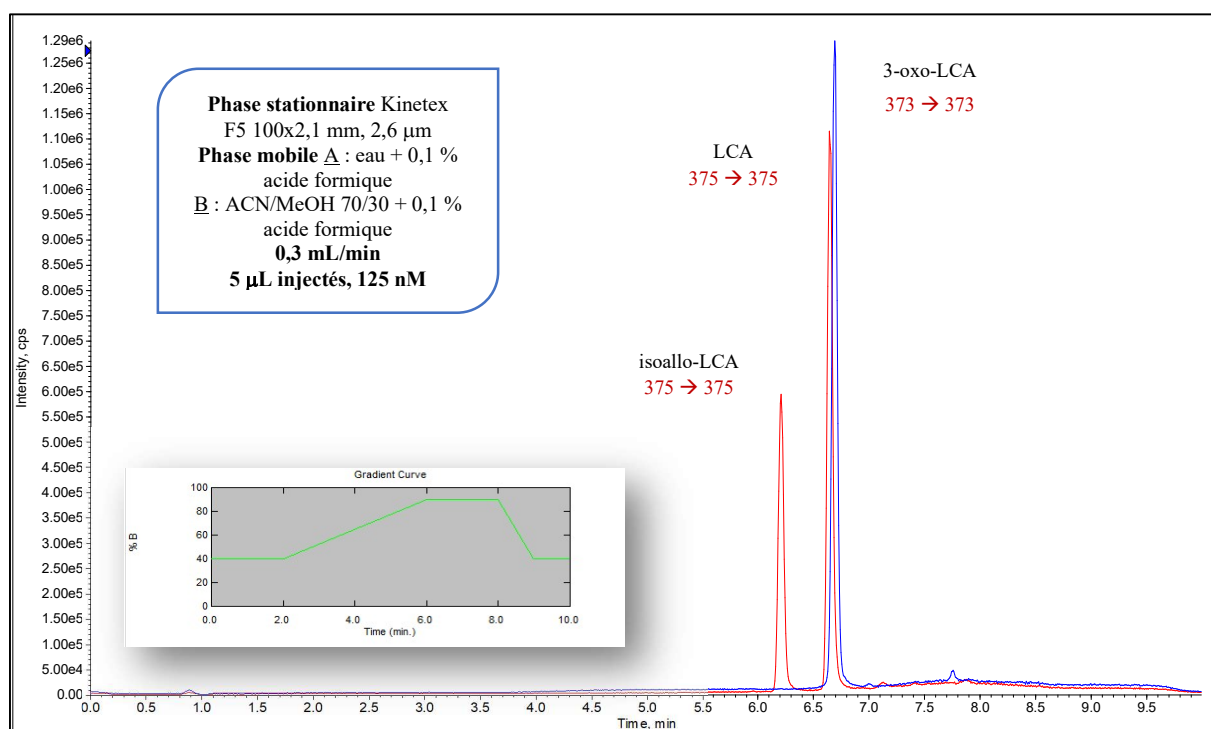


Figure 48 : Chromatogramme de l'isoallo-LCA, du LCA et du 3-oxo-LCA obtenue sur la phase stationnaire F5

Le meilleur compromis a été obtenu grâce à la phase mobile (A) eau + 0,1 % acide formique et (B) méthanol/acétonitrile 30/70 + 0,1 % acide formique en utilisant la phase stationnaire F5. Cette configuration permet d'obtenir une résolution de la séparation de l'isoallo-LCA et du LCA : $R = 2,9$ et des $S/N > 650$ pour une concentration injectée de 125 nM de chaque AB. Le temps de rétention de l'isoallo-LCA est $t_R = 6,23$ min et celui du 3-oxo-LCA est $t_R = 6,71$ min. Le CA-d4 a été choisi comme étalon interne en raison de ses propriétés physico-chimiques proches de celles des analytes d'intérêt et son temps de rétention dans ces conditions chromatographiques est de 4,91 min.

Une étude chimométrique aurait possiblement permis d'affiner les paramètres déterminés.

Les LOD et LOQ de chaque AB ont été déterminées dans le méthanol par dilutions successives. Pour l'isoallo-LCA, la LOD = 1,5 nM et la LOQ = 3 nM. Pour le 3-oxo-LCA, la LOD = 0,5 nM et la LOQ = 1 nM.

Les courbes de calibration s'étendent de 5 à 500 nM, utilisant le CA-d4 comme étalon interne en raison de ses propriétés physico-chimiques proches de celles des analytes d'intérêt et sont présentées en Figure 49.

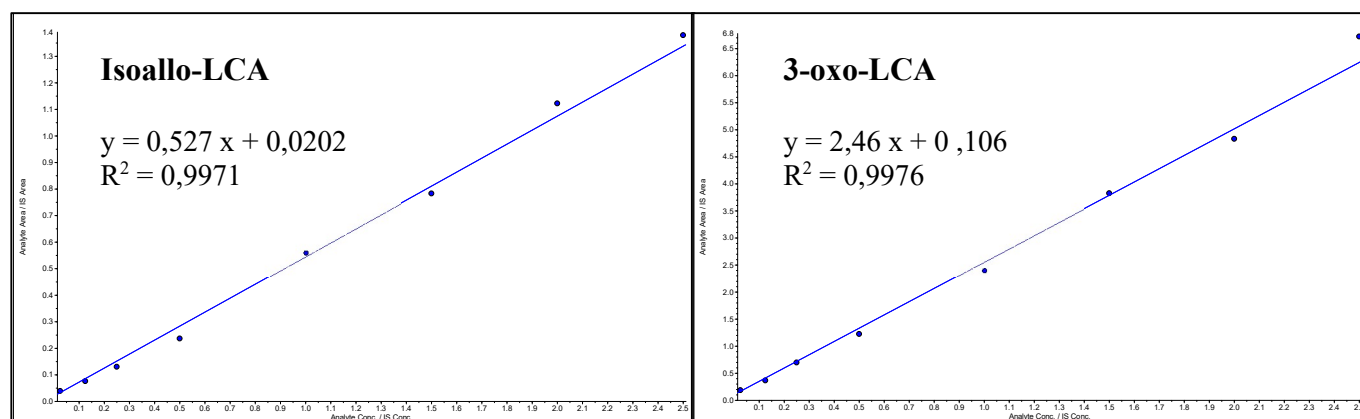


Figure 49 : Courbes de calibration de l'isoallo-LCA et du 3-oxo-LCA de 5 à 500 nM

La linéarité a été obtenue pour chacune des fonctions de réponse tracées sur une gamme de concentrations qui s'étend de 5 à 500 nM. Les coefficients de détermination R^2 sont supérieurs à 0,997.

7.3 Mesure de l'activité des AB conjugués aux acides aminés et des dérivés du LCA sur les récepteurs h-FXR et h-TGR5

L'activité des AB libres, conjugués à la glycine ou à la taurine sur les récepteurs FXR et TGR5 est déjà connue et rapportée dans la littérature (158). Cependant, l'activité des AB dérivés du LCA et des AB-AA sur ces récepteurs n'a été que partiellement montrée (151,170). Afin de l'étudier, des tests *in vitro* de transfection transitoire ont été mis en place en collaboration avec Nathalie Hennuyer de l'U1011.

7.3.1 Mesure de l'activité des AB conjugués aux acides aminés et des dérivés du LCA sur le récepteur h-FXR

Le CA conjugué à la phénylalanine, à la tyrosine et à la leucine sont trois AB décrits récemment dans la littérature (151,170) et les AB dérivés du LCA tels que le 3-oxo-LCA et l'isoalloLCA ont été peu étudiés (152,153). *Quinn et al.* a déterminé l'activité de Phe-CA ($EC_{50} = 4,5 \mu M$) et de Tyr-CA ($EC_{50} = 0,14 \mu M$) pour le récepteur nucléaire h-FXR (151). Il a également démontré que Leu-CA n'a pas d'activité sur FXR (151,170).

Afin de vérifier les données de la littérature et de caractériser ces cinq AB, des essais de transfection transitoire de cellules COS-7 ont été réalisés comme décrits dans le paragraphe 5.3. afin d'évaluer l'activité de ces AB sur le récepteur h-FXR. Les résultats obtenus pour le Phe-CA, Tyr-CA, Leu-CA, isoallo-LCA et 3-oxo-LCA sont présentés dans la Figure 50 sous forme de courbes dose-réponse, représentant la réponse obtenue en luminescence afin de quantifier l'activité de la luciférase rapportée à celle de la β galactosidase (%) en fonction de la concentration introduite du composé à tester (log M). Les concentrations efficaces médianes (EC_{50}) ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPadPrism 9.5.1 pour chacun des composés étudiés.

Le composé GW 4064, agoniste de FXR, a été testé à $1 \mu M$ et a été utilisé comme référence. Sa réponse a été définie comme représentant $RLU/\beta gal = 100 \%$. Les réponses des composés d'intérêt ont été mesurées de manière relative par rapport à cette référence. Les AB ont été évalués à des concentrations de 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 8 ; 10 ; 40 ; 70 et $100 \mu M$. Chaque concentration a été réalisée en triplicat.

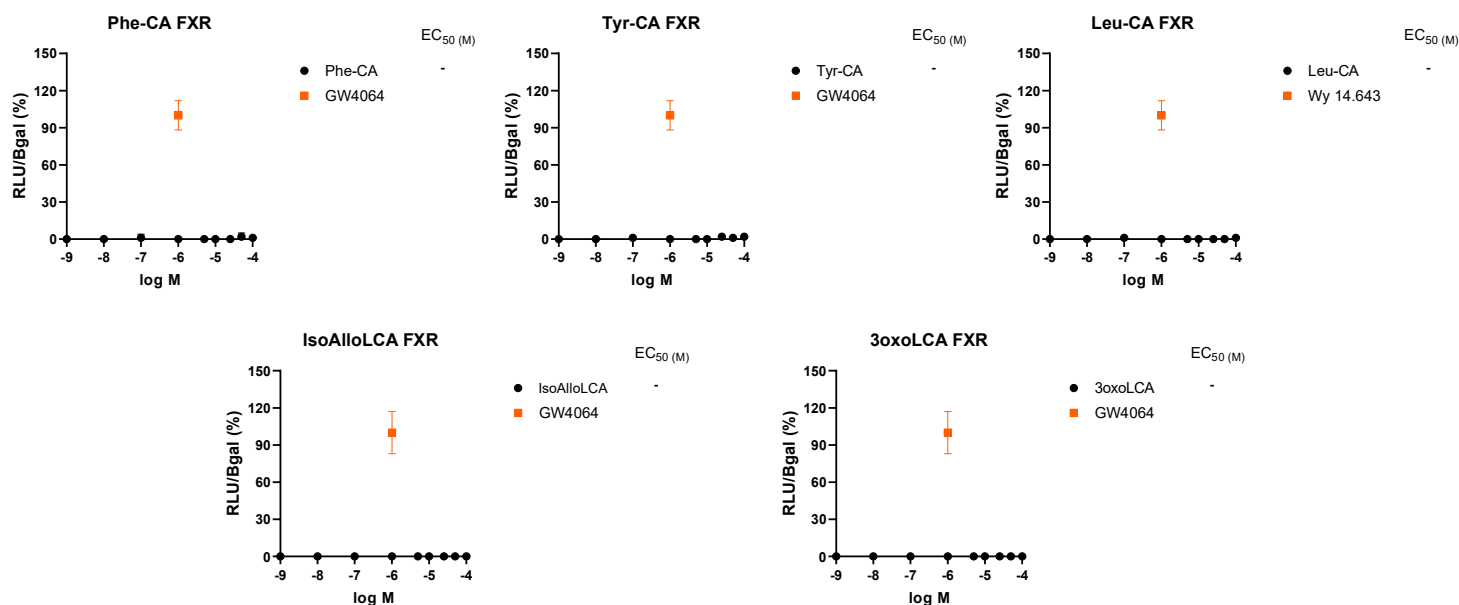


Figure 50 : Courbes dose-réponse et EC_{50} du Phe-CA, Tyr-CA, Leu-CA, isoallo-LCA, 3-oxo-LCA sur le récepteur FXR humain. GW4064 à 1 μ M comme référence. $n = 3$.

Aucun des AB testés ne montre d'activité sur le récepteur h-FXR. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats publiés pour le Phe-CA et Tyr-CA. Comme attendu, le Leu-CA ne présente pas d'activité pour FXR.

Pour la première fois les AB dérivés du LCA, isoallo-LCA et 3-oxo-LCA, sont caractérisés comme inactifs sur FXR aux concentrations testées.

7.3.2 Mesure de l'activité des AB conjugués aux acides aminés et des dérivés du LCA sur le récepteur h-TGR5

Il n'existe pas d'étude dans la littérature qui caractérise le Phe-CA, Tyr-CA, Leu-CA, isoallo-LCA et 3-oxo-LCA sur le récepteur membranaire TGR5.

Pour ces cinq AB, des essais de transfection transitoire de cellules HEK293 ont été réalisés comme décrits dans le paragraphe 5.2. afin d'évaluer l'activité de ces AB sur le récepteur h-TGR5. Les résultats obtenus pour le Phe-CA, Tyr-CA, Leu-CA, isoallo-LCA et 3-oxo-LCA sont présentés dans la Figure 51 sous forme de courbes dose-réponse, représentant la réponse obtenue en luminescence afin de quantifier l'activité de la luciférase rapportée à celle de la β galactosidase (%) en fonction de la concentration introduite du composé à tester (log M). Les concentrations efficaces médianes (EC_{50}) ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPadPrism 9.5.1 pour chacun des composés étudiés.

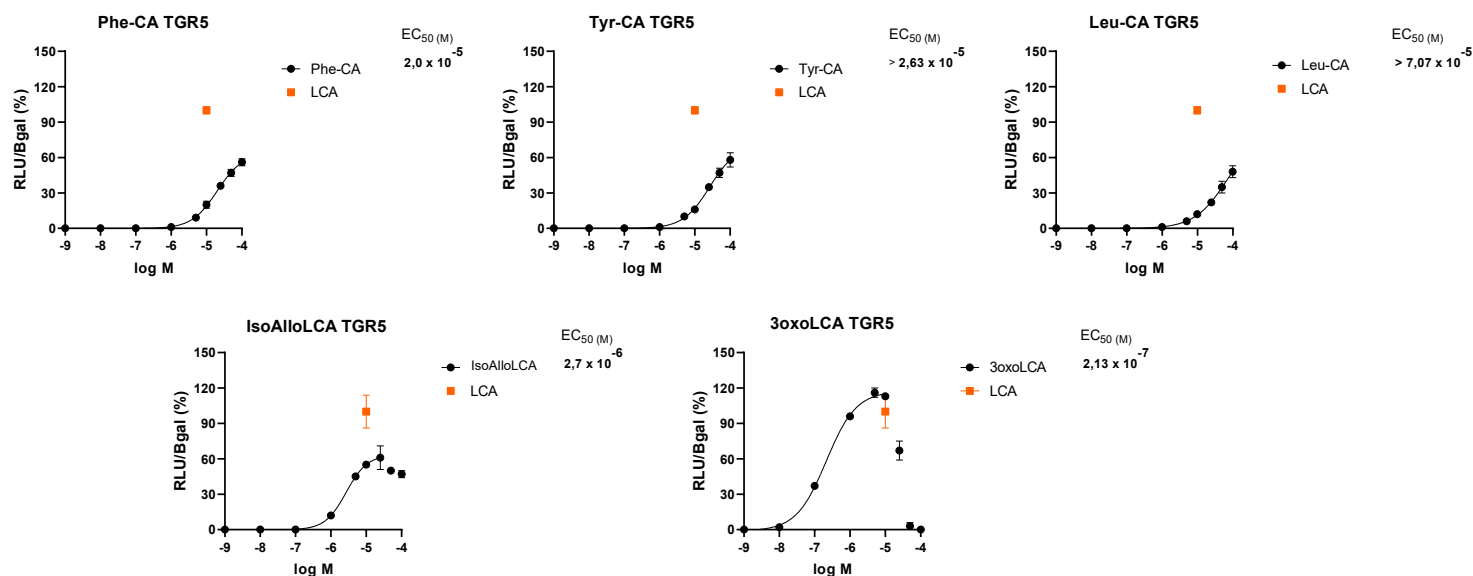


Figure 51 : Courbes dose-réponse et EC₅₀ du Phe-CA, Tyr-CA, Leu-CA, isoallo-LCA, 3-oxo-LCA sur le récepteur TGR5 humain. LCA à 10 μM comme référence. n = 3.

L'AB LCA, agoniste de TGR5 (EC₅₀ = 0,8 μM), a été testé à 10 μM et a été utilisé comme référence. Sa réponse a été définie comme représentant RLU/βgal = 100 %. Les réponses des composés d'intérêt ont été mesurées de manière relative par rapport à cette référence. Les AB ont été évalués à des concentrations de 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 8 ; 10 ; 40 ; 70 et 100 μM. Chaque concentration a été réalisée en triplicat.

De manière intéressante, les CA-AA et les dérivés du LCA montrent une activité vis-à-vis de TGR5. Pour la première fois ces AB sont caractérisés comme agonistes de TGR5. Le Phe-CA, le Tyr-CA et le Leu-CA ont une activité sur h-TGR5 et sont caractérisés par leur EC₅₀ (Phe-CA) = 20 μM, EC₅₀ (Tyr-CA) > 26 μM, EC₅₀ (Leu-CA) > 70 μM, le Phe-CA ayant une plus grande activité sur h-TGR5 que le Leu-CA. Les activités déterminées pour Phe-CA et Tyr-CA sur h-TGR5 sont du même ordre de grandeur que celles du GCA (EC₅₀ = 16 μM) et du TCA (EC₅₀ = 19 μM) pour ce même récepteur. Le isoallo-LCA est également actif sur h-TGR5 et son activité pour ce récepteur a été déterminée par un EC₅₀ = 2,7 μM. Par rapport aux quatre autres AB, le 3-oxo-LCA est l'AB présentant la meilleure activité sur ce récepteur, avec une EC₅₀ = 0,21 μM.

7.4 Applications dans les matrices biologiques étudiées

En collaboration avec l'U1011, dans le cadre de ma thèse mais également de par mon statut d'ingénieure d'études titulaire au laboratoire, j'ai été amenée à développer les dosages du C4

et des AB dans diverses matrices biologiques. Les AB et leurs voies métaboliques ont pu ainsi être étudiés dans le contexte de la maladie cardiométabolique. Plusieurs de ces études seront présentées dans le paragraphe 8.

Afin de permettre le dosage du C4 et des AB dans ces matrices biologiques, des techniques d'extraction ont été optimisées. Les développements de préparation à partir d'échantillons de plasma, de lysat cellulaire, de foie, de contenu caecal, d'urine et de lait maternel seront présentés dans les paragraphes suivants.

7.4.1 Développement du dosage du C4 dans le plasma

Dans le cadre d'un dosage plasmatique du C4, son extraction a été adaptée du protocole décrit par Steiner *et al.* (279). Le protocole détaillé est décrit dans le paragraphe 4.8.1. Le rendement d'extraction obtenu grâce à cette méthode a été évalué par le biais de l'étalon interne, ajouté avant et après la procédure de préparation des échantillons plasmatiques. Le rendement d'extraction du C4 est de l'ordre de 88 %. La Figure 52 présente un chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de plasma. La concentration du C4 a été déterminée à 44 nM dans cet échantillon plasmatique.

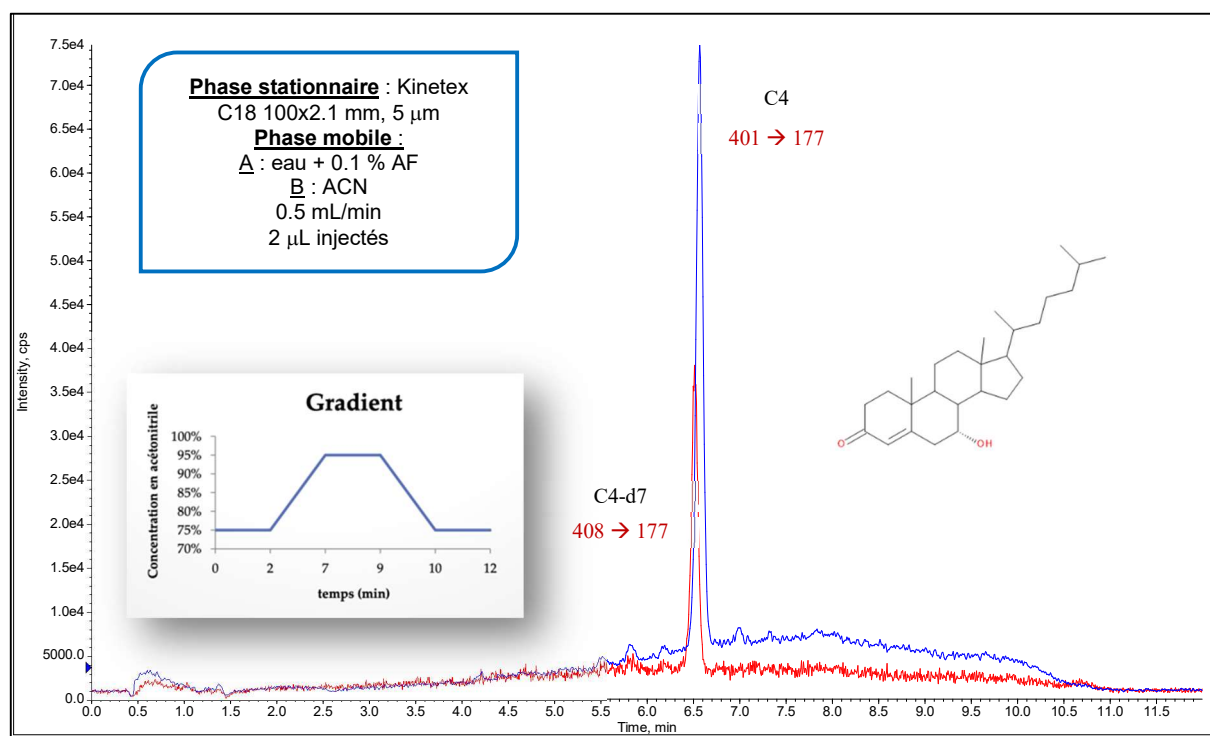


Figure 52 : Chromatogramme obtenu après extraction du C4 à partir de plasma

7.4.2 Développement du dosage du C4 dans du lysat cellulaire

Afin de pouvoir doser le C4 dans des protocoles *in vitro*, une méthode permettant sa quantification dans du lysat cellulaire issu de cellules HepG2 a été développée. La procédure analytique est présentée dans le paragraphe 4.8.2. La Figure 53 présente un chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de lysat cellulaire. La concentration du C4 a été déterminée à 31 nM dans cet échantillon préparé à partir de 10 millions de cellules HepG2.

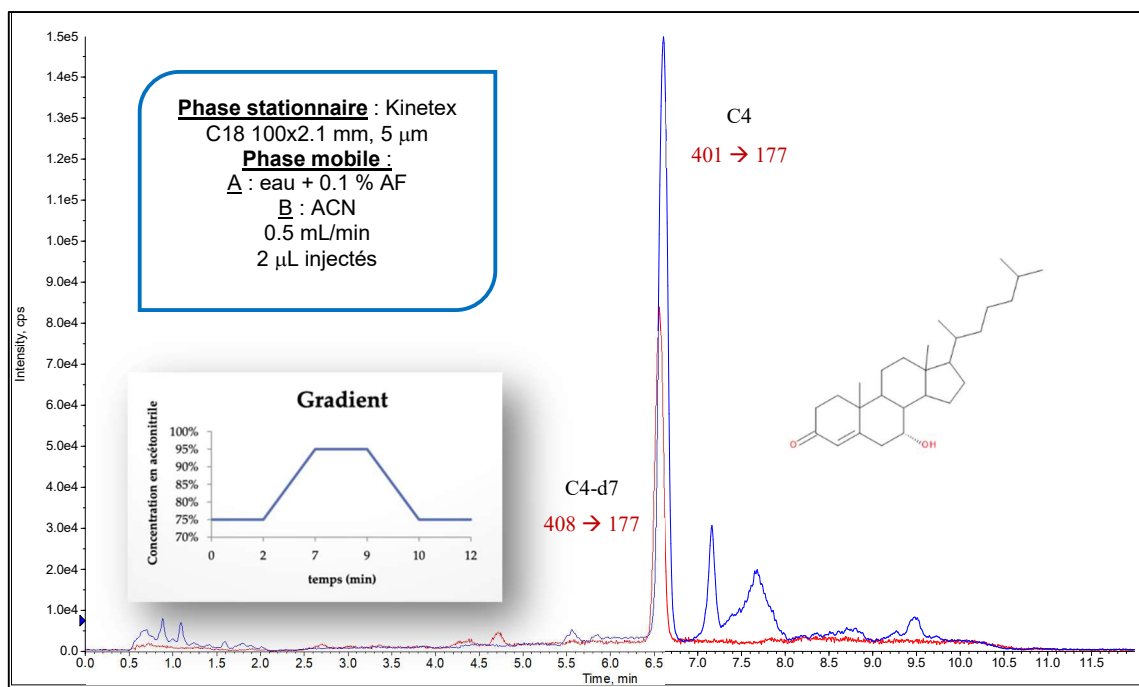


Figure 53 : Chromatogramme obtenu après extraction du C4 à partir de lysat cellulaire issu de cellules HepG2

7.4.3 Développement du dosage des AB dans le plasma

Les critères de validation de la méthode analytique ont été étudiés en termes de spécificité, de fidélité et de justesse dans le cadre du développement du dosage des AB dans du plasma. La répétabilité de la méthode a été évaluée grâce à trois niveaux de standards de validation et est comprise entre 5 et 11 %. La fidélité intermédiaire a été étudiée sur trois jours consécutifs et a permis d'obtenir des CV < 12 % pour chacun des AB. La justesse a été évaluée par un biais relatif de +/- 14 % sur l'ensemble des AB. La méthode de dosage des AB a donc été validée pour une quantification de 1,5 à 2000 nM dans du plasma.

L'extraction des AB du plasma a été adaptée du protocole de *García et al.* (156). Le protocole est détaillé dans le paragraphe 4.9.1. Les rendements d'extraction obtenus grâce à cette méthode ont été évalués par le biais des étalons internes, ajoutés avant et après la procédure de préparation des échantillons plasmatiques. Les rendements sont supérieurs à 91 % pour chacun des EI, représentant la variété des AB étudiés. La Figure 54 présente un chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de plasma de souris. Les concentrations en AB ont été déterminées entre 20 et 1800 nM, selon les espèces d'AB, dans cet échantillon plasmatique. Les 31 espèces d'AB, exceptées les CA-AA, HDCA, THDCA et GHDCA, ont été détectées et quantifiées dans cet échantillon plasmatique.

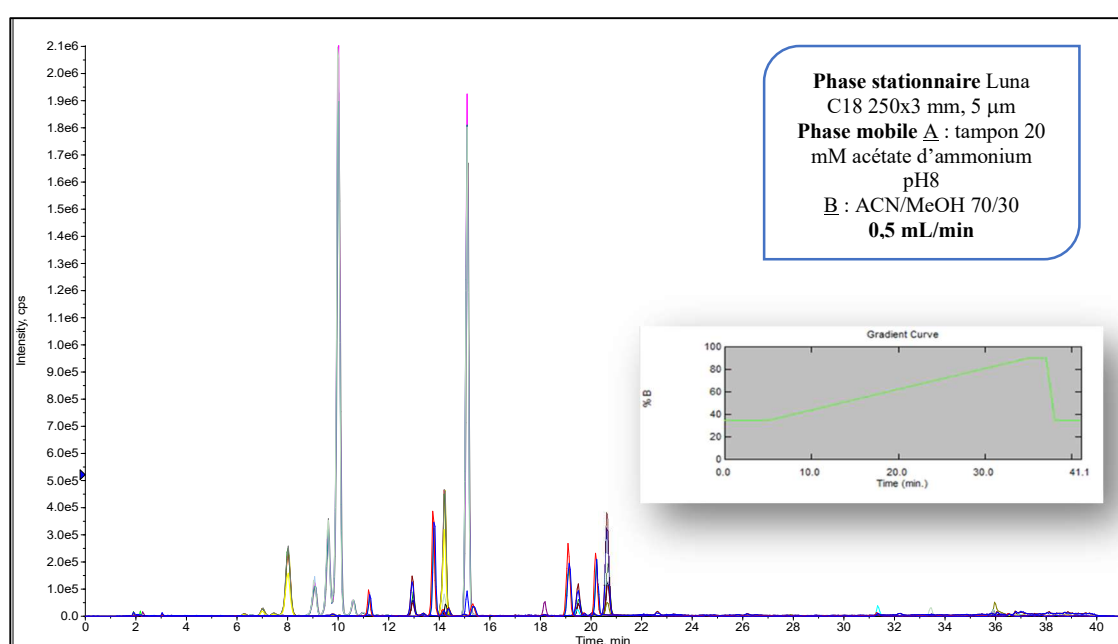


Figure 54 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de plasma

7.4.4 Développement du dosage des AB dans du lysat cellulaire

Afin de pouvoir doser les AB dans nos protocoles *in vitro*, il a été indispensable de développer une méthode permettant leur quantification dans du lysat cellulaire issu de cellules HepG2. Elle est la même que celle décrite pour l'extraction du C4 de la même matrice et est présentée dans le paragraphe 4.9.2. La Figure 55 présente un chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de lysat cellulaire. Les concentrations en AB ont été déterminées entre 6,25 nM (GCA) et 112 nM (TCDCA) dans cet échantillon.

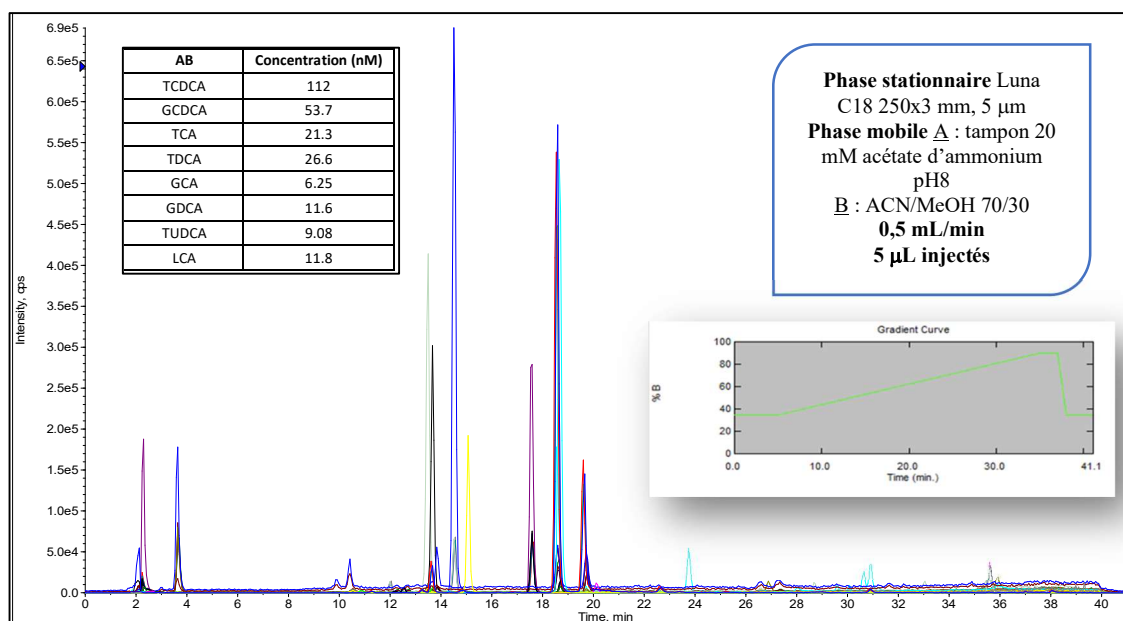


Figure 55 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de lysat cellulaire issu de cellules HepG2. Concentrations en AB présentées dans le tableau

7.4.5 Développement du dosage des AB dans le foie

Les AB sont présents en grande quantité dans le foie (de l'ordre du μ M) et leur extraction a été décrite dans cette matrice par plusieurs équipes. Afin d'extraire au mieux les AB du foie, nous avons adapté et comparé 3 protocoles différents décrits dans le paragraphe 4.9.3.

Le protocole 1 combine une technique d'extraction liquide-liquide (LLE) à une technique d'extraction en phase solide (SPE), le protocole 2 utilise une technique SPE et le protocole 3 s'apparente à une simple précipitation de protéines.

Ces protocoles ont été réalisés en triplicat. Les rendements d'extraction des AB ont été calculés à partir des aires des 7 EI ajoutés avant ou après extraction. Les effets de matrice engendrés par chacun des protocoles ont été évalués en comparant les aires des 7 EI après extraction dans la matrice foie ou dans la matrice eau (considéré échantillon sans matrice). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 56 et Figure 57.

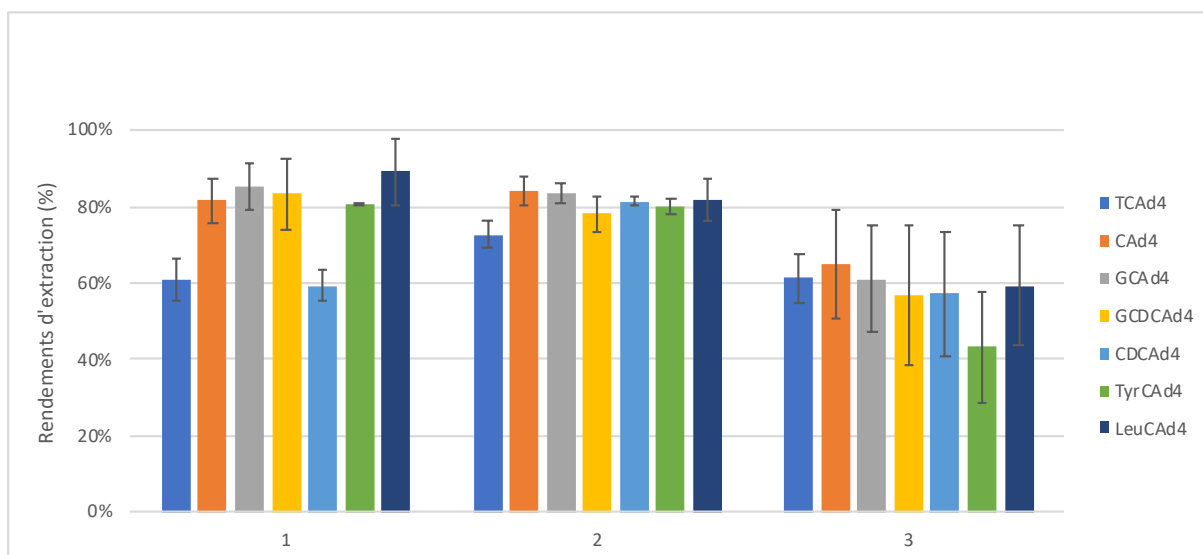


Figure 56 : Rendements d'extraction des 7 AB-deutérés à partir de foie selon les 3 protocoles testés

Les rendements d'extraction obtenus grâce au protocole 1 sont supérieurs à 59 % pour les 7 EI mais varient de 59 à 89 % selon la nature de l'EI. Les CV représentant la reproductibilité de la procédure d'extraction sont compris entre 0 et 9 %.

Les rendements d'extraction obtenus grâce au protocole 2 sont compris entre 73 et 84 % et les CV entre 1 et 5 %. L'extraction est homogène en fonction de la nature de l'EI.

Les rendements d'extraction obtenus grâce au protocole 3 sont compris entre 43 et 65 % et les CV entre 7 et 18 %.

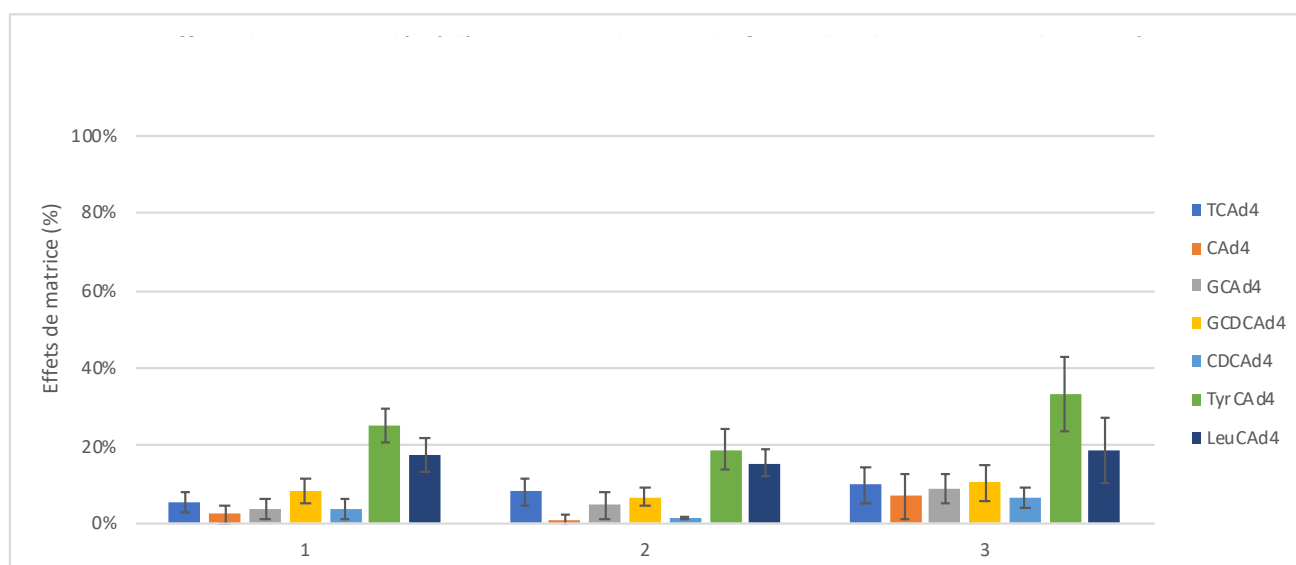


Figure 57 : Effets de matrice des 7 AB-deutérés à partir de foie selon les 3 protocoles testés

Les effets de matrice obtenus grâce aux protocoles 1 et 2 sont compris entre 1 et 25 %. Ils sont particulièrement élevés pour les AB-AA deutérés.

Les effets de matrice obtenus grâce au protocole 3 sont compris entre 6 et 33 %. De la même manière, ils sont élevés pour les AB-AA deutérés.

Pour les 3 protocoles, il s'agit d'effets de matrice positifs particulièrement élevés pour les AB-AA deutérés, les interférents provenant de la matrice résiduelle après préparation d'échantillons, améliorant le signal des AB durant l'ionisation.

En prenant en compte à la fois les rendements d'extraction et les effets de matrice, le protocole 2, adapté de *Humbert et al.* (164) est le plus adapté à l'extraction des AB du foie. Les rendements supérieurs à 73 % et les effets de matrice inférieurs à 25 % en font un protocole reproductible ($CV < 5\%$) et adapté. La Figure 58 présente un chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de foie de souris. Les concentrations variables en AB ont été déterminées entre 1 nM (GCDCA) et 18 800 nM (T β MCA) dans cet échantillon de foie. Certaines espèces d'AB sont très concentrées et leurs concentrations dépassent notre gamme de linéarité. Afin de doser précisément ces AB, des dilutions des échantillons sont effectuées avant l'injection en LC-MS/MS. Les 31 espèces d'AB, exceptées les CA-AA, GLCA, GHCA, HDCA et GHCA, ont été détectées et quantifiées dans cet échantillon de foie.

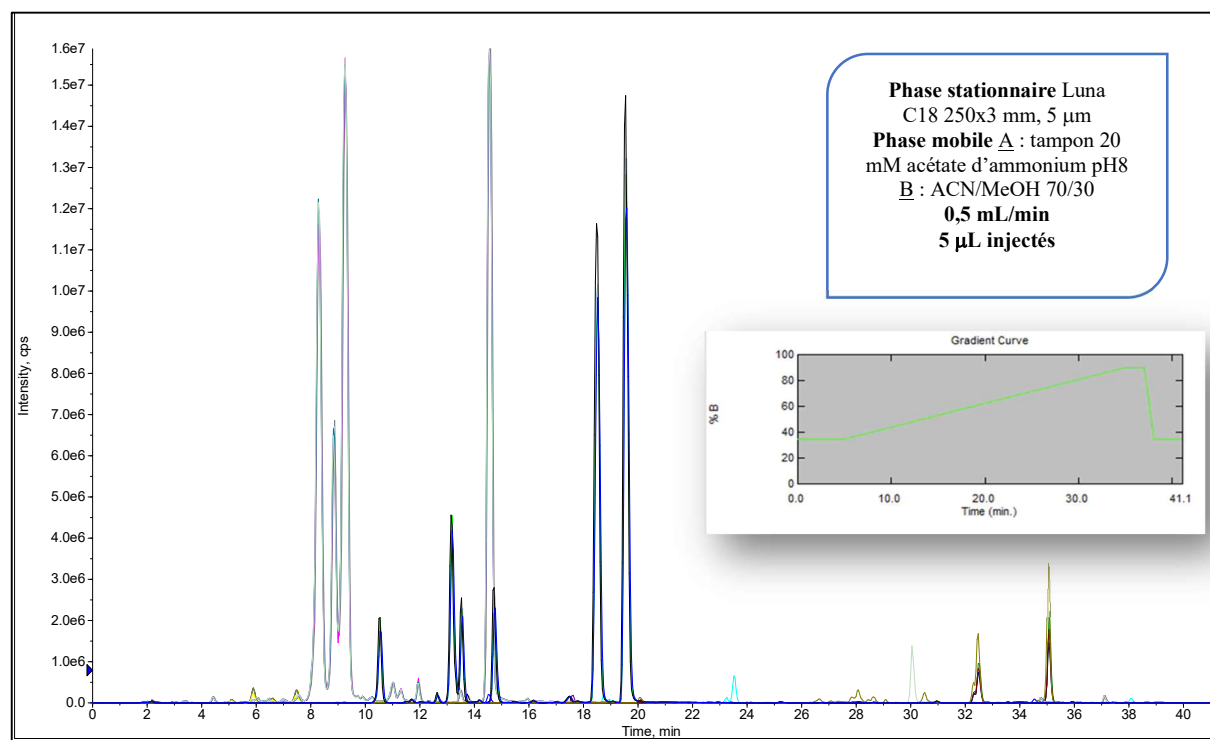


Figure 58 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de foie de souris

7.4.6 Développement du dosage des AB dans le contenu caecal

Les AB étant présents et, pour certains, synthétisés dans l'intestin, le contenu caecal est porteur d'informations dans le cadre de modifications ou de perturbations de la fonction de l'intestin. C'est pourquoi nous avons développé le dosage des AB dans le contenu caecal.

La procédure de préparation des échantillons a été adaptée de protocoles d'extraction des AB décrits dans la littérature (280–282). Il s'agit d'une extraction par SPE, qui est décrite dans le paragraphe 4.9.4. L'extraction des AB du contenu caecal a été largement décrite dans la littérature, c'est pourquoi nous n'avons évalué qu'un seul protocole.

Le protocole, réalisé en triplicat, a été évalué en termes de rendements d'extraction et d'effets de matrice. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 59 et Figure 60.

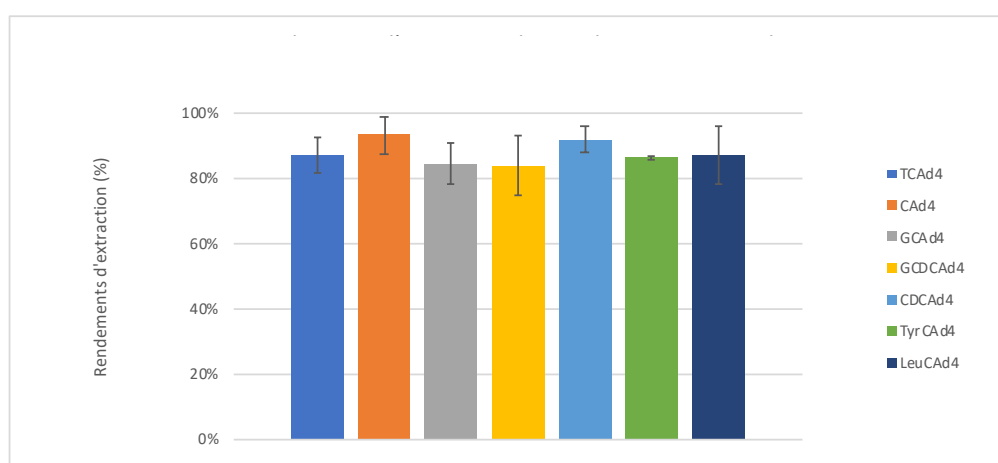


Figure 59 : Rendements d'extraction des 7 AB-deutérés à partir de contenu caecal selon le protocole testé

Les rendements d'extraction obtenus grâce à ce protocole sont compris entre 84 et 93 %. L'extraction est homogène en fonction de la nature de l'EI et les CV sont inférieurs à 9 %.

Les effets de matrice positifs sont compris entre 18 et 34 %.

Malgré des effets de matrice non négligeables, la procédure d'extraction des AB du contenu caecal s'avère très efficace et reproductible. La Figure 61 présente un chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de contenu caecal de souris. Les concentrations en AB ont été déterminées entre 2 nM (GCDCA) et 56 900 nM (ω MCA) dans cet échantillon de contenu caecal.

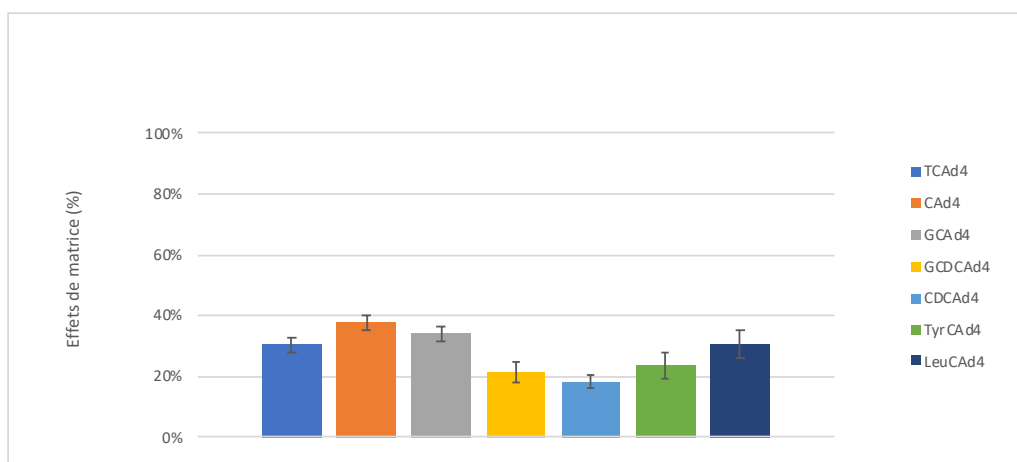


Figure 60 : Effets de matrice des 7 AB-deutérés à partir de contenu caecal selon le protocole testé

De la même manière que pour les échantillons de foie, les échantillons de contenus caeaux présentant des concentrations en AB au-delà de la gamme de linéarité ont été dilués avant injection en LC-MS/MS. Les 31 espèces d'AB ont été détectées et quantifiées dans cet échantillon de contenu caecal.

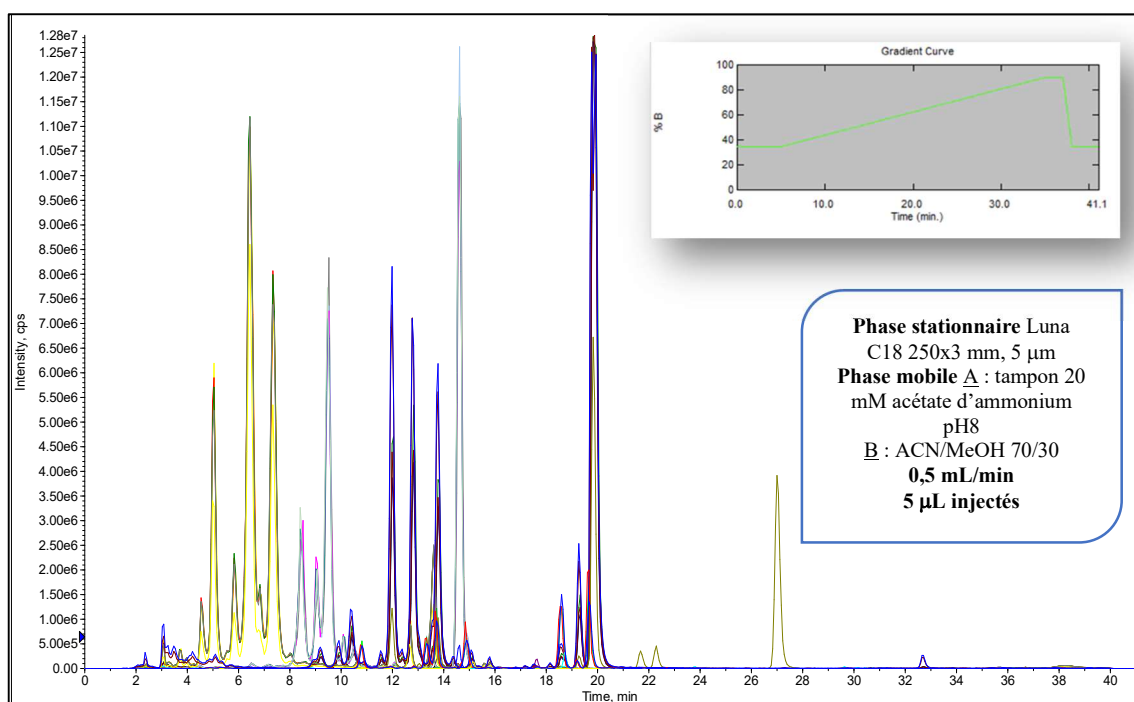


Figure 61 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir de contenu caecal de souris

7.4.7 Développement du dosage d'AB dérivés du LCA dans le contenu caecal

Les dérivés du LCA, isoallo-LCA et 3-oxo-LCA, étant synthétisés dans l'intestin (152,153), nous avons choisi de développer leur dosage dans le contenu caecal, matrice qui sera privilégiée lors des prochaines études. En effet, ils ont déjà été détectés dans le cecum chez la souris et dans les fèces chez l'humain (152,153).

Les extractions ont été réalisées sur phase solide (SPE). Différentes phases stationnaires ont été testées, intégrant des conditions chromatographiques spécifiques pour chaque phase stationnaire (voir paragraphe 4.9.5).

Le protocole 1, utilisant une cartouche SPE OASIS HLB 30 mg, constituée d'un sorbant polymérique en phase inverse, le protocole 2, utilisant une cartouche SPE SOLA WAX 30 mg, constituée d'un sorbant polymérique en mode mixte (phase inverse/échange anionique faible), et le protocole 3, utilisant une cartouche Hybrid-SPE, ont été comparés.

Ces essais ont été réalisés en triplicat et sont détaillés dans le paragraphe 4.9.5.

Un exemple de chromatogramme obtenu grâce au protocole 2 pour l'analyse des 2 AB dérivés du LCA après préparation des échantillons de contenus caeaux est présenté en Figure 62.

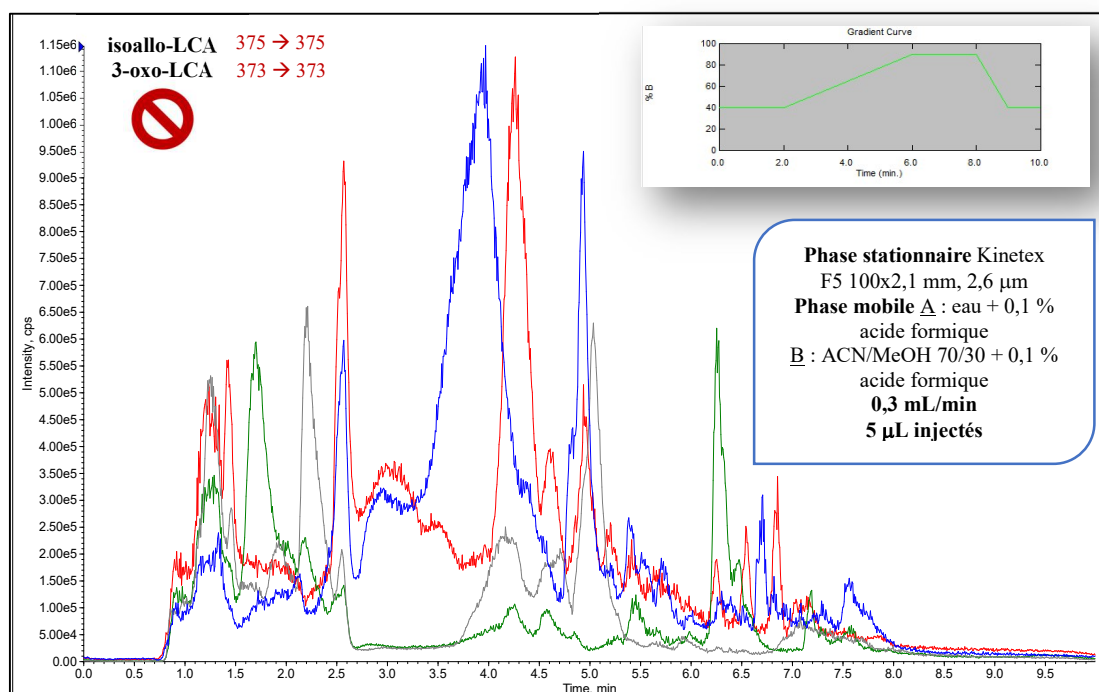


Figure 62 : Chromatogramme obtenu après essais d'extraction de l'isoallo-LCA et du 3-oxo-LCA à partir de contenu caecal de souris. Les transitions MRM deux AB dérivés du LCA sont indiquées en rouge.

Malgré ces nombreux essais, la présence d'un bruit de fond très élevé (1×10^6 coups/sec) pour chacune des transitions pseudo-MRM a demeuré constant, ne permettant pas la visualisation des signaux des 2 AB d'intérêt dans la matrice. Le temps de rétention de l'isoallo-LCA est $t_R = 6,23$ min et celui du 3-oxo-LCA est $t_R = 6,71$ min : ils ne sont pas visibles sur ce chromatogramme.

Les mêmes essais ont été réalisés à partir d'échantillons de contenus caecaux contenant un ajout dosé à 125 nM du isoallo-LCA et du 3-oxo-LCA. Comme montré en Figure 63, les procédures d'extraction envisagées ne permettent pas d'obtenir des signaux quantifiables pour ces 2 AB, en particulier à cause d'un bruit de fond toujours très élevé ($> 10^5$). Cependant, l'ajout dosé de 3-oxo-LCA (125 nM) conduit à un signal ($t_R = 6,71$ min) non détectable. Les quantités attendues dans des échantillons de contenus caecaux étant inférieures à 125 nM, ces méthodes de préparation d'échantillons ne permettent pas d'obtenir une extraction satisfaisante de ces 2 AB de la matrice.

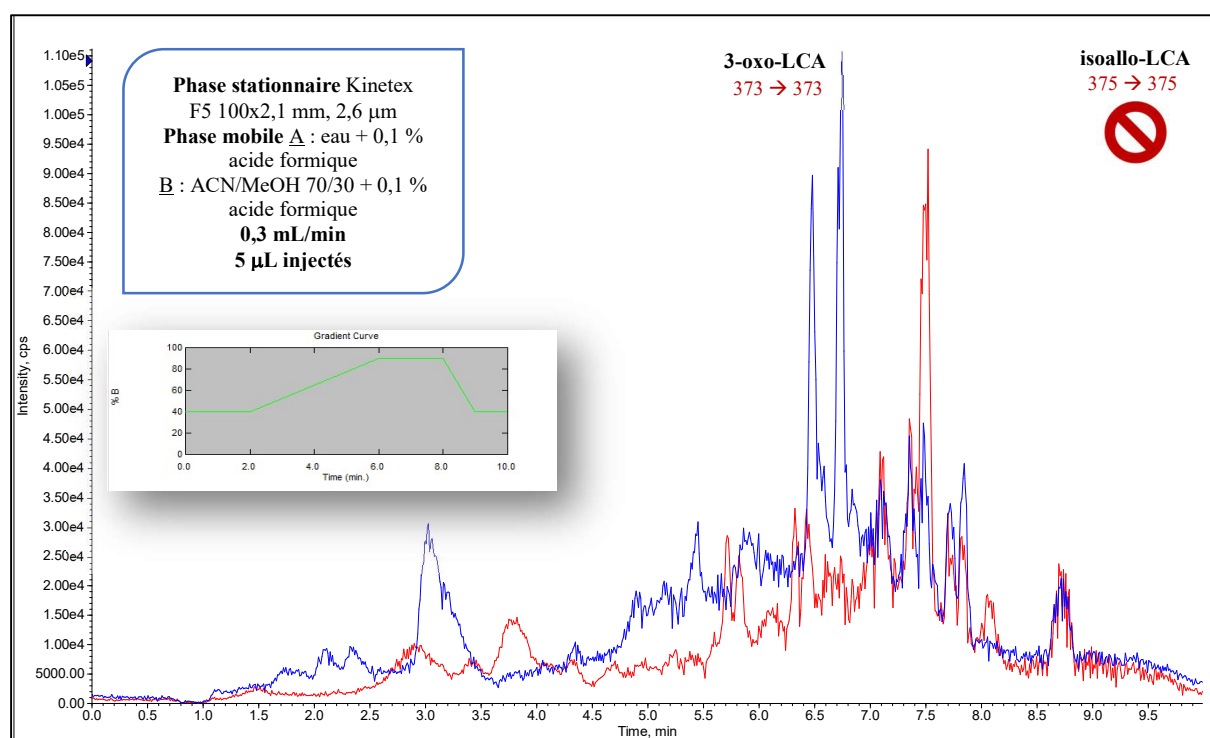


Figure 63 : Chromatogramme obtenu après essais d'extraction avec ajout dosé de 125 nM de l'isoallo-LCA et du 3-oxo-LCA à partir de contenu caecal de souris. Les transitions MRM deux AB dérivés du LCA sont indiquées en rouge.

Plusieurs pistes ont été envisagées et sont encore à l'essai actuellement :

- L'ajout d'une étape de dérivation des AB d'intérêt lors de la préparation des échantillons, afin de réussir à fragmenter ces ions précurseurs grâce au triple quadripôle et ainsi réduire le bruit de fond de l'analyse.
- La réduction du bruit de fond grâce à une fragmentation des ions précurseurs réalisée avec un autre type de cellule de collision que la CID, qui ne permet pas leur fragmentation, telle que la HCD d'un spectromètre de masse de type Q-Orbitrap.
- L'utilisation d'une cellule de mobilité ionique qui permettrait de séparer les ions provenant du bruit de fond de ceux d'intérêt. Des essais sont en cours sur un spectromètre de masse TIMS-TOF, équipé d'une cellule de mobilité ionique.

7.4.8 Développement du dosage des AB dans les urines

Les AB présents dans les urines sont le reflet de leur voie d'excrétion.

Afin d'extraire au mieux les AB de cette matrice, nous avons comparé 3 protocoles différents décrits dans le paragraphe 4.9.7 mettant en œuvre 3 techniques d'extraction distinctes : la précipitation de protéines (protocole 1), la déplétion de phospholipides (protocole 2) et l'extraction en phase solide (protocole 3).

Les protocoles, réalisés en triplicat, ont été évalués en termes de rendements d'extraction et d'effets de matrice. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 64, Figure 65 et Figure 66.

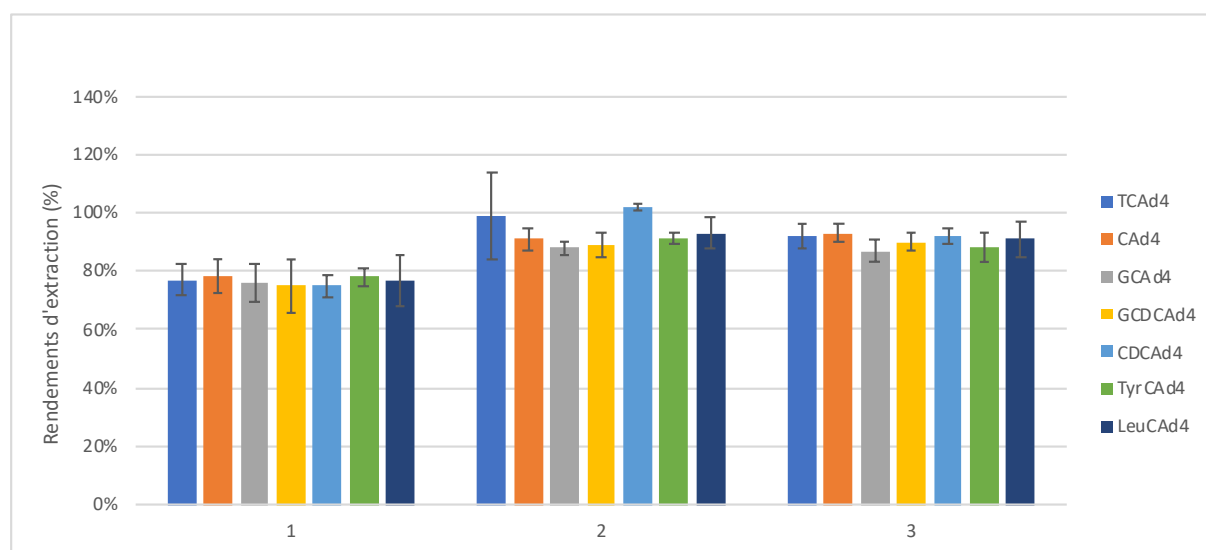


Figure 64 : Rendements d'extraction des 7 AB-deutérés à partir d'urine selon les 3 protocoles testés

Les rendements d'extraction obtenus grâce au protocole 1 sont supérieurs à 75 % pour les 7 EI et l'extraction est très homogène en fonction de la nature de l'EI. Les CV représentant la reproductibilité de la procédure d'extraction sont compris entre 1 et 9 %.

Les rendements d'extraction obtenus grâce au protocole 2 sont compris entre 88 et 119 % et les CV entre 1 et 19 %. L'extraction semble particulièrement peu reproductible pour le TCA-d4 et par extension la famille des AB tauro-conjugués.

Les rendements d'extraction obtenus grâce au protocole 3 sont compris entre 87 et 93 % et les CV entre 3 et 6 %. L'extraction est très homogène en fonction de la nature de l'EI.

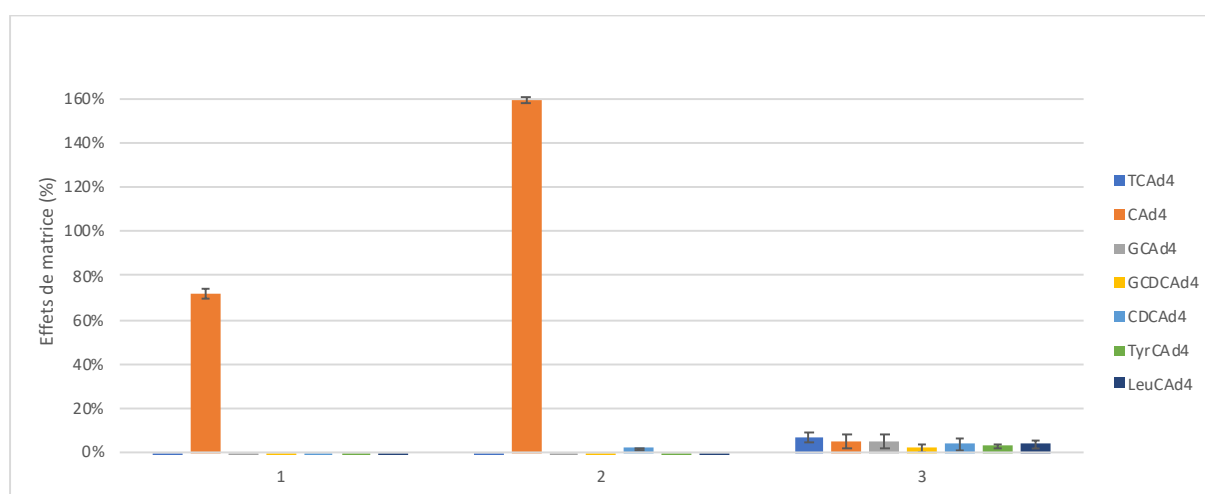


Figure 65 : Effets de matrice des 7 AB-deutérés à partir d'urine selon les 3 protocoles testés

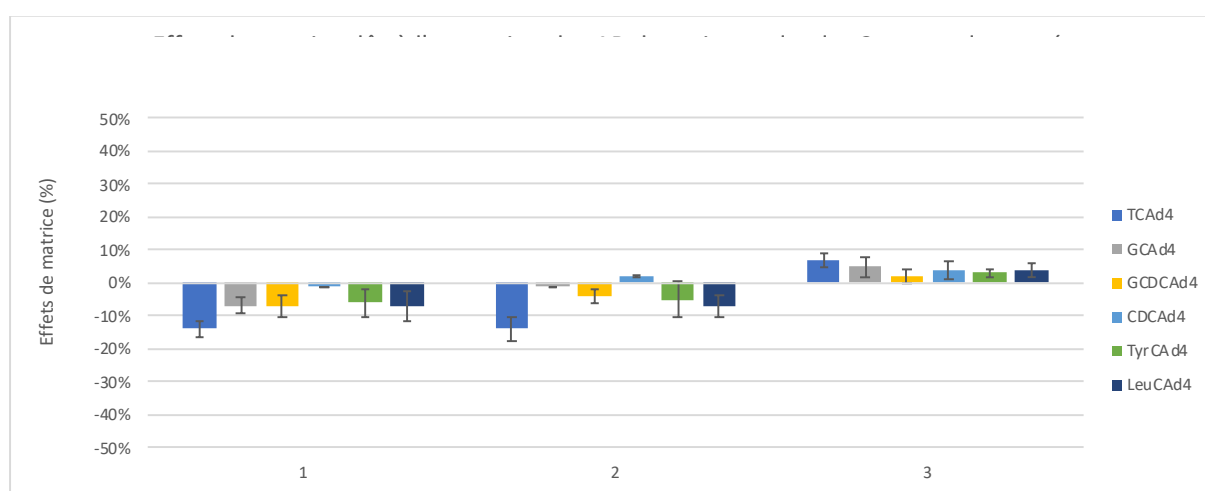


Figure 66 : Effets de matrice de 6 AB-deutérés (sans CA-d4) à partir d'urine selon les 3 protocoles testés

Les effets de matrice obtenus grâce aux protocoles 1 et 2 sont compris entre 2 et - 14 %, excepté le CA-d4. En effet, dans ces deux protocoles, le CA-d4 présente un effet matrice anormal de 72 et 159 %. Après contrôle de l'analyse et reproduction des essais, il semblerait qu'un interférent du même temps de rétention et de la même transition du CA-d4 pollue l'analyse. Afin de mieux visualiser les effets de matrice des EI, la Figure 66 constitue une représentation de ces effets de matrice pour tous les EI exceptés pour le CA-d4.

Les effets de matrice obtenus grâce au protocole 3 sont compris entre 2 et 7 %. De manière intéressant, l'interférent faussant le signal du CA-d4 a pu être éliminé par la technique SPE.

Selon les protocoles utilisés, les effets de matrice sont positifs ou négatifs, les interférents provenant de la matrice résiduelle après préparation d'échantillons améliorant ou réduisant le signal des AB durant l'ionisation.

En prenant en compte à la fois les rendements d'extraction et les effets de matrice, le protocole 3, adapté de *Alnouti et al.* (263) est le plus adapté à l'extraction des AB des urines. Les rendements supérieurs à 87 % et les effets de matrice inférieurs à 7 % en font un protocole reproductible ($CV < 6\%$) et efficace, permettant de réduire fortement les interférents du CA-d4. La Figure 67 présente un chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon d'urine humaine. Les concentrations en AB ont été déterminées entre 1,5 nM (TDCA) et 126 nM (GCA). Seules quelques espèces d'AB ont été détectées et quantifiées dans cet échantillon urinaire (GCA, TDCA, TCA, GCDCA, TCDCA).

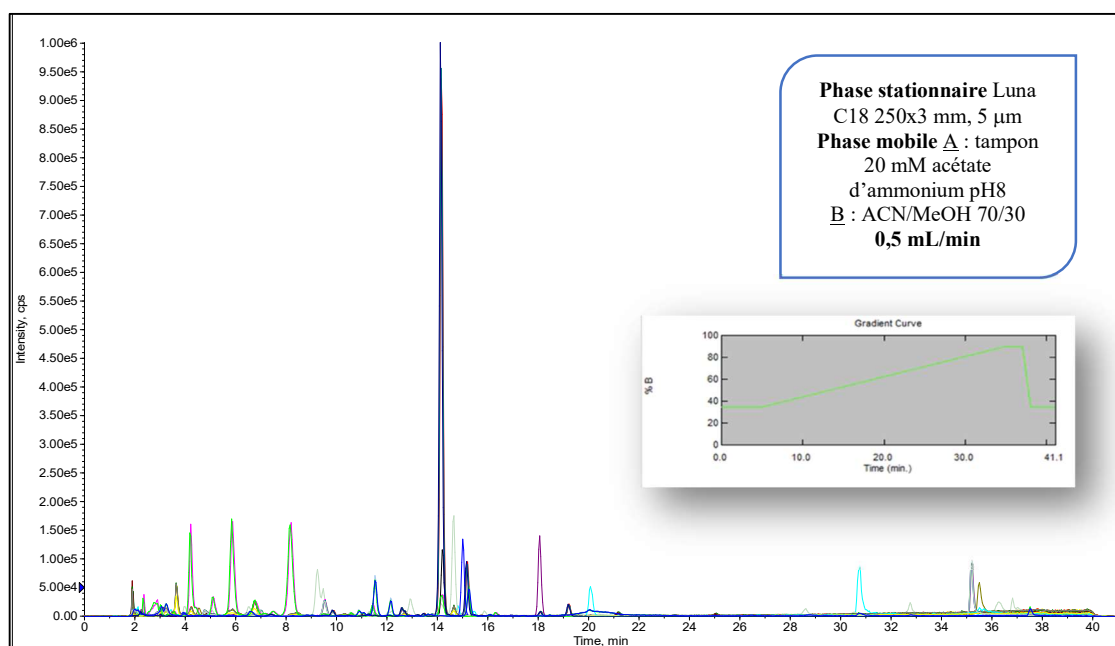


Figure 67 : Chromatogramme obtenu après extraction des AB à partir d'urine

7.4.9 Développement du dosage des AB dans le lait maternel : Publication 3

Seules quelques études ont fait état de la description des AB dans le lait maternel. Il a été démontré que les AB étaient présents dans le lait maternel, en particulier le CA et le CDCA (283,284). Les transporteurs des AB dans la glande mammaire et le rôle physiopathologique des AB sont peu connus chez le nouveau-né, dont le cycle entéro-hépatique est immature à ce stade de la vie (285,286). Chez les rongeurs, la présence de BA dans le lait pourrait influencer le microbiote du nouveau-né (287). Chez l'humain, il a déjà été décrit que la cholestase gestationnelle pouvait être associée à un trouble métabolique programmé chez la progéniture (288). En outre, l'accumulation des AB dans le compartiment fœtal pourrait entraîner des naissances prématurées (288), voire des décès périnataux (289). En raison du rôle potentiellement majeur des AB d'origine maternelle chez le nouveau-né, il est important de pouvoir les quantifier dans le lait maternel. Il existe peu d'études qui décrivent l'analyse des AB du lait maternel et leur extraction est très peu détaillée (283,287,289). Nous nous sommes donc appuyés sur la littérature relative à l'extraction des stéroïdes du lait maternel pour mettre au point une méthode efficace de préparation des échantillons (227,290). Pour cela, nous avons comparé les performances en termes de rendements d'extraction et d'effets de matrice de quatre protocoles d'extraction des AB du lait maternel : la PPT seule ou la PPT suivie d'un protocole SLE, LLE ou SPE. L'extraction LLE utilisant de l'heptane avec de l'acide acétique a permis d'obtenir des rendements d'extraction de 70 % et des effets de matrice négligeables. La méthode de dosage des AB par LC-MS/MS développée décrite dans le paragraphe 7.2.1 a été utilisée et validée dans le lait maternel. Les critères de validation de la méthode analytique ont été étudiés en termes de spécificité, de fidélité et de justesse. La répétabilité de la méthode a été évaluée grâce à trois niveaux de standards de validation et elle est comprise entre 4 et 12 %. La fidélité intermédiaire a été étudiée sur trois jours consécutifs et a permis d'obtenir des CV < 13 % pour chacun des AB. La justesse a été évaluée par un biais relatif de +/- 15 % sur l'ensemble des AB. Cette méthode a été appliquée avec succès à la détermination des AB dans trois types de lait : le lait maternel, le lait de rat et le lait maternisé, afin de comparer leur composition en AB. 15 espèces d'acides biliaires ont été détectées et quantifiées dans les échantillons entre 1,0 et 450 nmol/L. L'étude des acides biliaires dans le lait maternel pourra aider à comprendre l'établissement du cycle entéro-hépatique chez le nouveau-né et pourra être appliquée dans divers contextes physiopathologiques.

Bile acid quantitative-profiling in breast milk samples using LC-MS/MS

En soumission

Amandine Descat¹, Lucie Marousez², Mostafa Kouach¹, Bart Staels², Delphine Eberlé², Anne Tailleux², Jean-François Goossens¹

¹ Univ Lille, CHU Lille, ULR 7365 GRITA – Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées, F-59000 Lille, France

² Univ Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, F-59000 Lille, France

ABSTRACT

Bile acids (BA) are end products of cholesterol and have a large chemical diversity. Their roles in lipid emulsification and absorption as well as in cell signaling are increasingly recognized, making necessary a robust and versatile technique to extract, separate and quantify these numerous molecular species. The optimization of their extraction methods is essential and LC-MS/MS analysis provides the highest sensitivity to detect and identify BA in various biological matrix.

We compared the performance of four BA extraction protocols from breast milk. LLE extraction using heptane with acetic acid resulted in extraction yields of around 70% and negligible matrix effects. A single LC-MS/MS run allowed us to quantify up to 27 bile acid species. Chromatography was performed on a Luna C18 column with a gradient of 20 mM ammonium acetate in water adjusted to pH 8 and acetonitrile/methanol 70/30 (v/v) with a 0.5 mL/min flow rate. Bile acids were monitored in negative mode electrospray ionization and multiple reaction monitoring mass spectrometry. The bile acids linear range was 1.5 – 2000 nmol/L and five deuterated internal standards were used to quantify them. The method showed good performances with respect linearity (LOQ 0.5-10.2 nmol/L and ULOQ 2 µmol/L, $R^2 > 0.99$), trueness (bias < 15%) and precision (RSD < 13%).

This method was successfully applied to the determination of BA in three milk types: breast milk, rat milk and infant milk powder in order to compare their BA pool composition. 15 BA species were detected and quantified in the samples in the range of 1.0-450 nmol/L. The method is now applicable to BA analysis in milk in different physiopathological contexts, both in preclinical and clinical studies. The study of bile acids in breast milk may help to understand

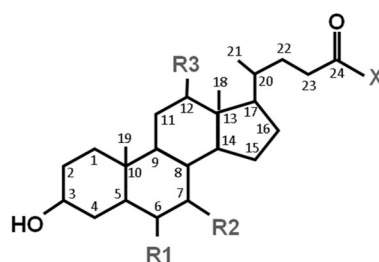
the establishment of the enterohepatic cycle in the newborn, with regard to the variation in the composition of ingested breast milk.

Keywords: Bile acids, breast milk, liquid-liquid extraction, LC-MS/MS

7.4.9.1 Introduction

Bile acids (BA) are steroids with a pentanoic acid side chain and hydroxyl groups in the 3, 7 and 12 position of the cholane cycle. They are end products of cholesterol catabolism and the major constituents of bile (1). BA structures are represented in Figure 1. Two main primary BA, cholic (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) are synthesized in hepatocytes from cholesterol and conjugated with glycine (mainly in humans) or taurine (mainly in rodents). In rodents, CDCA is converted to α MCA and then β MCA. Conjugated primary BA are spilled and stored in the gallbladder, as part of the bile. After a meal, they are released into the small intestine where they contribute to the solubilization and intestinal absorption of fat-soluble nutrients. In the distal part of the intestine, primary conjugated BA undergo deconjugation and chemical transformations (deshydroxylation, epimerization) by the action of intestinal bacteria enzymes, leading to secondary BA (LCA, DCA, UDCA, HDCA, ω MCA). A small part of secondary BA is excreted in the feces whereas the majority are reabsorbed by active or passive transport in the distal part of the intestine and return to the liver *via* the portal vein. They are then re-conjugated and discharged once again into the bile. This process is called the enterohepatic cycle. A small part of BA escapes the hepatic reuptake, reaching the systemic bloodstream and subsequently peripheral organs.

Besides their involvement in intestinal absorption (2), BA are signaling molecules, since they are ligands of at least two receptors: The G-protein-coupled transmembrane receptor TGR5, and the nuclear receptor Farnesoid X receptor (FXR) (3), which are expressed in numerous organs involved in the metabolic homeostasis, such as liver, intestine, adipose tissue or brain (3). Therefore, BA are involved in the regulation of lipid, glucose and energy homeostasis (4). Because of the involvement of BA in these metabolic regulatory processes, an increasing attention has been given to determine the detailed qualitative and quantitative BA profile in various biological samples, especially plasma, liver, urine, feces (5). However, very little is known about measurement of BAs in breast milk.



Free BA					
Bile acid	Abbreviation	R1	R2	R3	X
Cholic acid	CA	H	α -OH	α -OH	OH
Chenodeoxycholic acid	CDCA	H	α -OH	H	OH
Deoxycholic acid	DCA	H	H	α -OH	OH
Lithocholic acid	LCA	H	H	H	OH
Ursodeoxycholic acid	UDCA	H	β -OH	H	OH
α -muricholic acid	α -MCA	β -OH	α -OH	H	OH
β -muricholic acid	β -MCA	β -OH	β -OH	H	OH
ω -muricholic acid	ω -MCA	α -OH	β -OH	H	OH
Hyocholic acid	HCA	α -OH	α -OH	H	OH
Hyodeoxycholic acid	HDCA	α -OH	H	H	OH
Tauro-conjugated BA					
Tauro-cholic acid	TCA	H	α -OH	α -OH	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro-chenodeoxycholic acid	TCDCA	H	α -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro-deoxycholic acid	TDCA	H	H	α -OH	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro-lithocholic acid	TLCA	H	H	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro-ursodeoxycholic acid	TUDCA	H	β -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro- α -muricholic acid	T α -MCA	β -OH	α -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro- β -muricholic acid	T β -MCA	β -OH	β -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro- ω -muricholic acid	T ω -MCA	α -OH	β -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro-hyocholic acid	THCA	α -OH	α -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Tauro-hyodeoxycholic acid	THDCA	α -OH	H	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$
Glyco-conjugated BA					
Glyco-cholic acid	GCA	H	α -OH	α -OH	$\text{NH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$
Glyco-chenodeoxycholic acid	GCDCA	H	α -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$
Glyco-deoxycholic acid	GDCA	H	H	α -OH	$\text{NH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$
Glyco-lithocholic acid	GLCA	H	H	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$
Glyco-ursodeoxycholic acid	GUDCA	H	β -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$
Glyco-hyocholic acid	GHCA	α -OH	α -OH	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$
Glyco-hyodeoxycholic acid	GHDCA	α -OH	H	H	$\text{NH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$

Figure 1: Main bile acid structures in humans and rodents. Each BA is characterized by the chemical substituents R1, R2 and R3 and their position. Substituent X corresponds to the conjugation of bile acids to either glycine or taurine.

Few studies have described BA in breast milk. It has been shown that BA are present in women breast milk, especially CA and CDCA (6,7). Little is known about the transporters of BAs in the mammary gland and the physiological or physiopathological role of BA in the newborn, for whom the enterohepatic cycle is immature at this stage of life (8,9). In rodents, BA in milk could influence the microbiota in the newborn (10). In humans, it has been described that gestational cholestasis may be associated with a programmed metabolic disorder in the offspring (11). In addition, accumulation of BAs in the fetal compartment could lead to preterm births (11) and even perinatal deaths (12). Due to the potentially major role of BA in metabolic homeostasis of the newborn, it is important to be able to quantify them in breast milk.

Due to various BA physicochemical properties, such as hydrophobicity and polarity, and structural differences, their extraction from biological matrices is complex. There is little method for the extraction of BA from breast milk, which is a complex matrix due to the presence of proteins, carbohydrates, phospholipids and fatty acids. The sample preparation methods described in the literature are time consuming. For example, *Forsyth* described a sample preparation combining the use of Amberlite XAD7 resin, liquid-liquid extraction and solid phase extraction (BondElut) to quantify CA and CDCA by radioimmunoassay (7). A few years later, *Brites* described a method combining liquid-liquid extraction, solid phase extraction (C18), hydrolysis, lipophilic anion-exchange chromatography and derivatization (conversion to methyl ester-trimethylsilyl) for the quantification of BA by gas chromatography coupled to flame ionization detector (12). Recently, *Blazquez* described a method to quantify BA by LC-MS/MS, using solid phase extraction but the sample preparation was only poorly described (10).

Therefore, there is a great need for a powerful analytical technique, both in terms of extraction method, separation and detection to quantify BA in breast milk. Gas chromatography-mass spectrometry is a very sensitive and specific technique but requires laborious pre-analysis steps such as derivatization of BA, which makes the procedure particularly complex (13). Liquid chromatography methods coupled with UV detection are currently used for analyte quantification but lack selectivity and have high limits of quantification (14). The coupling of liquid chromatography to tandem mass spectrometry leads to a significant gain in selectivity and a significant decrease in the signal-to-noise ratio (15-17).

Regarding to the extraction procedure, we therefore relied on literature related to the extraction of steroids from breast milk to develop an efficient method of sample preparation (18,19). Four

extraction methods were compared: a milk protein precipitation alone or followed by a solid-phase extraction, a solid-supported liquid-liquid extraction and a liquid-liquid extraction. Milk protein precipitation followed by liquid-liquid extraction was the more efficient to extract BA from breast milk. Then we have developed a method for the determination of 27 BA in the breast milk using LC-MS/MS.

7.4.9.2 Materials and Methods

A. Chemicals and reagents

Methanol, water, and acetonitrile were of LC/MS grade and were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Formic acid > 98% was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ammoniac 25 %, acetic acid, heptane and cyclohexane were purchased from VWR (Radnor, PA, USA). Ammonium acetate, cholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,7 α ,12 α -triol, CA), glycocholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,7 α ,12 α -triol-N-(carboxymethyl)-amide, GCA], taurocholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,7 α ,12 α -triol-N-(2-sulphoethyl)-amide, TCA], chenodeoxycholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,7 α -diol, CDCA), glycochenodeoxycholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,7 α -diol-N-(carboxymethyl)-amide, GCDCA], taurochenodeoxycholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,7 α -diol N-(2-sulphoethyl)-amide, TCDCA), deoxyxholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,12 α -diol, DCA), glycodeoxycholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,12 α -diol-N-(carboxymethyl)-amide, GDCA], taurodeoxyxholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,12 α -diol-N-(2-sulphoethyl)-amide, TDCA], ursodeoxycholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α , 7 β -diol, UDCA), lithocholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α -ol, LCA), and tauroolithocholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α -ol-N-(2-sulphoethyl)-amide, TLCA] were purchased from Sigma-Aldrich Química SA (Madrid, Spain). Tauroursodeoxycholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,7 β -diol-N-(2-sulphoethyl)-amide, TUDCA] was purchased from Calbiochem/Merck (Mollet del Vallès, Spain). α -muricholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,6 β , 7 α -triol, α MCA), tauro- α -muricholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α , 6 β ,7 α -triol-N-(2-sulphoethyl)-amide, T α MCA], β -muricholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,6 β ,7 β -triol, β MCA), tauro- β -muricholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,6 β ,7 β -triol-N-(2-sulphoethyl)-amide, T β MCA], ω -muricholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,6 α ,7 β -triol, ω MCA), tauro- ω -muricholic acid [5 β -cholanolic acid-3 α ,6 α ,7 β -triol-N- (2-sulphoethyl)-amide, T ω MCA], hyocholic acid (5 β -cholanolic acid-3 α ,6 α ,7 α -triol, HCA), glycohyocholic acid [5 β -

cholic acid-3 α ,6 α ,7 α -triol-N-(carboxymethyl)-amide, GHCA], taurohyocholic acid [5 β -cholic acid-3 α ,6 α ,7 α -triol-N-(2-sulphoethyl)-amide, THCA], glyoursodeoxycholic acid [5 β -cholic acid-3 α ,7 β -diol-N-(carboxymethyl)-amide, GUDCA], glycolithocholic acid [5 β -cholic acid-3 α -ol-N-(carboxymethyl)-amide, GLCA], hyodeoxycholic acid (5 β -cholic acid-3 α ,6 α -diol, HDCA), glycohyodeoxycholic acid [5 β -cholic acid-3 α ,6 α -diol-N-(carboxymethyl)-amide, GHDCa], taurohyodeoxycholic acid [5 β -cholic acid-3 α ,6 α -diol-N-(2-sulphoethyl)-amide, THDCa], and deuterated internal standards (IS) cholic acid-2,2,4,4-D4 (CA-d4), chenodeoxycholic acid 2,2,4,4-D4 (CDCA-d4), glycochenodeoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (GCDCA-d4), glycocholic acid-2,2,4,4-D4 (GCA-d4) and taurocholic acid-2,2,4,4-D4 (TCA-d4) were purchased from Steraloid inc (Newport, RI).

B. Stock and working solutions

Stock 1 solutions of each BA (5 mM) were prepared in methanol and stored at -20 °C. All solutions were diluted in methanol by a 100-fold factor and a 10-fold factor to obtain, respectively, stock 2 and stock 3 solutions, used to prepare eight points of calibration standards (CS) for each BA, ranging from 1.5 to 2000 nM.

Stock solutions of each internal standard (IS) (CA-d4, CDCA-d4, GCA-d4, TCA-d4, GCDCA-d4) were also prepared in methanol at a concentration of 5 mM and stored at -20°C. IS stock solutions were diluted in methanol and CS contained 250 nM of the five IS.

C. Sample extraction

Four different methods derived from limited literature were evaluated: milk protein precipitation (PP) alone or followed by solid-phase extraction (SPE), solid-supported liquid-liquid extraction (SLE) or liquid-liquid extraction (LLE). A general outline of the experimental strategy is presented in Figure 2.

a. Milk protein precipitation

100 μ l of milk samples were spiked with 25 μ L of an IS solution (0,5 μ M, CA-d4, CDCA-d4, GCA-d4, GCDCA-d4, TCA-d4). Afterward, 1 ml of cold acetonitrile containing 0.1 % of acetic or formic acid, or an acetonitrile/methanol mixture (50/50, v/v) with 0.1 % of acetic acid were added for protein precipitation. Samples were then vortexed 30 sec before centrifugation at

10,000 *rpm* for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and used for the SPE, SLE or LLE methods.

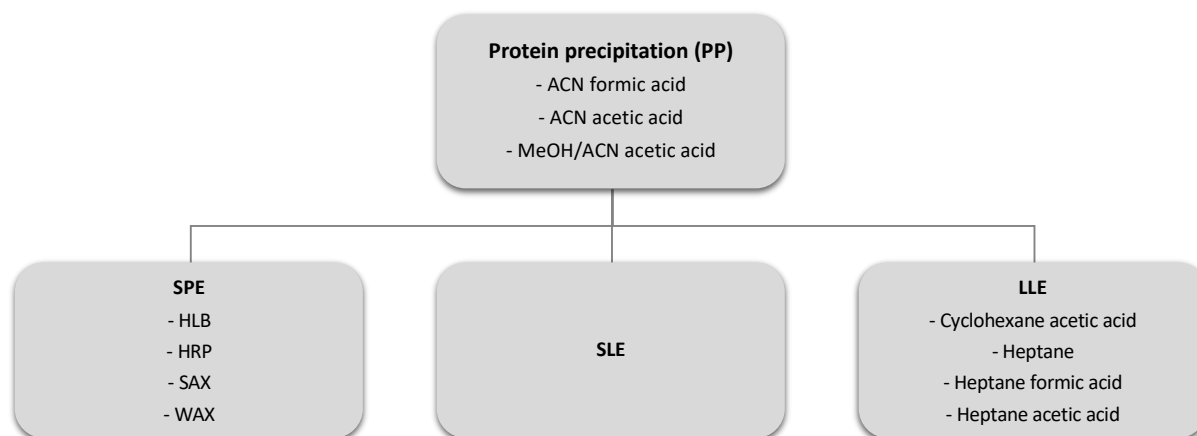


Figure 2: Four methods of extraction compared (global scheme of the extraction procedure): protein precipitation (PP) procedure or PP followed by Solid-Phase Extraction (SPE) or Solid-supported Liquid-liquid Extraction (SLE) or Liquid-Liquid Extraction (LLE).

b. SPE

Supernatants (0.9 mL) of milk protein precipitation were transferred into clean tubes and treated by SPE. HLB, HRP, SAX or WAX SPE columns were tested. Each cartridge was conditioned with 2 mL of methanol and then 2 mL of water before loading supernatants. BA were eluted with methanol for HLB and HRP columns, with methanol containing 5 % formic acid for the SAX column and with methanol containing 5 % ammoniac for the WAX column. Eluates were dried under a nitrogen flow at 45°C. The residue was then reconstituted by addition of 50 µL of methanol:water (50:50, v/v). 5 µL of the sample was analyzed by LC-MS/MS.

c. SLE

Supernatants (0.9 mL) of milk protein precipitation were loaded to SLE column and vacuum (20 mPa) was applied for 5 min. BA were eluted with 2 x 0.6 mL of methanol. Eluates were dried under a nitrogen flow at 45°C. The residue was then reconstituted by addition of 50 µL of methanol:water (50:50, v/v). 5 µL of the sample was analyzed by LC-MS/MS.

d. LLE

Supernatants (0.9 mL) of milk protein precipitation were treated by LLE. Several extraction solvents were tested: cyclohexane, heptane, heptane containing 0.1 % of acetic or formic acid. Lower phases were transferred to clean tubes after centrifugation at 3,000 *rpm* for 10 min at 4°C and dried under a nitrogen flow at 45°C. The residue was then reconstituted by addition of 50 µL of methanol:water (50:50, v/v). 5 µL of the sample were analyzed by LC-MS/MS.

D. LC-MS/MS method

LC-MS/MS analyses were performed using UFLC-XR system (Shimadzu, Japan) coupled to a QTRAP® 5500 MS/MS hybrid system triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (Sciex, USA), equipped with a Turbo VTM ion source operating in negative ion mode. The Sciex Analyst software package (version 1.7.2) was used for the LC-MS/MS system control, data acquisition and processing.

Separations were carried out on a reversed-phase Luna C18 (250 × 2.1 mm i.d., 5 µm) column (Phenomenex, USA). A gradient separation mode was used to separate the analytes, using 20 mmol/L ammonium acetate in water adjusted to pH 8 with ammoniac (A) and acetonitrile/methanol 70/30 (v/v) (B). The elution gradient performed at 500 µL/min was the following: 0-5.0 min, 35 % mobile phase B; 5.0-35.0 min, change to 90 % mobile phase B; 35.0-37.0 min, 90 % mobile phase B; 37.0-38.0 min, change to 35 % mobile phase B; 38.0-41.0 min, 35 % mobile phase B. The column was thermostated at 30 °C and the injection volume was 5 µL.

Air was used as the nebulizer and heater gas, while nitrogen was used as curtain and collision gas. In the optimal conditions, the ion source nebulizer (GS1), heater (GS2) and curtain gas pressure were 50, 50, and 25 psi, respectively. The ion-spray needle voltage, the declustering potential (DP) and the entrance potential (EP) were set at -4500 V, -100 V and -10 V, respectively. The collision exit potential (CXP) values were set between -10 and -40 V. A heater gas temperature of 550 °C was selected. The mass spectrometer was used in the multiple reaction monitoring mode (MRM). The precursor > product ion transitions with the highest intensity were selected to give the maximum sensitivity and selectivity for each analyte.

E. Method validation

Limits of detection and quantification were evaluated. The limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest concentration at which the analyte could be quantified with a coefficient of variation (CV) below 20% and below $\pm 20\%$ deviation from the nominal value. The limit of detection (LOD) was determined as the lowest concentration at which the analyte response was at least three times the blank response.

Extraction recovery was evaluated by comparing IS areas added at the beginning and at the end of the extraction procedure. Extraction recovery was calculated as:

$$\text{Extraction recovery (\%)} = \frac{A \text{ (before extraction)}}{A \text{ (after extraction)}} \times 100$$

where “A (before extraction)” and “A (after extraction)” are the chromatographic peak area of the spiked sample before and after extraction procedure, respectively. The extraction yield was operated by executing three determinations at 250 nM of IS.

Matrix effects were evaluated by comparing IS areas extraction from the matrix (milk) and from water. Matrix effects were calculated as:

$$\text{Matrix effects (\%)} = \left(\frac{A \text{ (matrix)}}{A \text{ (water)}} - 1 \right) \times 100$$

where “A (matrix)” and “A (water)” are the chromatographic peak area of the spiked sample and of the standard solution in water, respectively. The matrix effects experiment was operated by executing three determinations at 250 nM of IS.

The breast milk sample preparation method selected will be the one with the best BAs extraction recoveries and the lowest matrix effects.

Validation of the method was performed on three consecutive days. Each day, eight calibration standards in methanol (CS; each prepared in triplicate) and three validation standards (130, 600, 1300 nM) in breast milk (VS; each prepared in triplicate) were performed. Response function, linearity, trueness and precision (repeatability and intermediate precision) were evaluated. Trueness and precision, expressed as bias (%) and relative standard deviation (%RSD), respectively, were assessed by back-calculating the concentration of each validation standards. Acceptance criteria were set in accordance with the requirements of European Medicines

Agency namely %RSD and relative bias under 15 % for the VS samples (except 20 % for the lower limit of quantitation, LLOQ).

F. Milk samples

Breast milk samples comes from one donor with her consent for research use. Rat milk was collected in female 2 weeks old rat. Infant milk powder (Guigoz® Optipro®) was diluted in H₂O (12.9 g in 90 mL) has recommended by the manufacturer.

7.4.9.3 Results

A. Optimization of breast milk sample preparation

a. Milk protein precipitation

The protein content of breast milk is between 8 and 12 g/L. In order to extract BA from this matrix in the best possible way, it is essential to first remove the proteins. Different precipitation solvents were studied: acetonitrile containing 0.1 % of acetic or formic acid and a mixture of acetonitrile/methanol (50:50, v/v) containing 0.1 % of acetic acid. The extraction recoveries of the bile acids were evaluated. The yields were calculated using the five deuterated IS, representative of the different BA species. The homogeneity of the yields for the five IS was an important criterion to ensure the extraction of all BA species.

The results are shown in Figure 3.a. The mixture of acetonitrile/methanol (50:50, v/v) containing 0.1 % of acetic acid leads to the best homogeneous yields (70 %). The use of other precipitation solvents led to more heterogeneous and variable yields. The yields obtained with simple protein precipitation are satisfactory but the chromatograms showed a high background (data not shown). In order to improve the quantification in breast milk samples and to preserve our analytical material, more specific extraction methods were investigated.

Table 1: Bile acid retention times and MRM parameters

Bile acid	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Quantifier ion (m/z)	Collision energy (eV)
ω MCA	6.52	407	407	-40
α MCA	6.90	407	407	-40
β MCA	7.41	407	407	-40
T ω MCA	8.36	514	80	-130
T α MCA	8.94	514	80	-130
T β MCA	9.34	514	80	-130
HCA	10.74	407	407	-40
GHCA	10.91	464	74	-80
THCA	12.00	514	80	-130
GUDCA	12.21	448	74	-40
UDCA	12.46	391	391	-40
GHDCA	12.53	448	74	-80
HDCA	12.88	391	391	-40
TUDCA	13.25	428	80	-130
THDCA	13.62	498	80	-130
CA	13.75	407	407	-40
CA-d4	13.76	411	411	-40
GCA	13.78	464	74	-80
GCA-d4	13.78	468	74	-80
TCA	14.61	514	80	-130
TCA-d4	14.61	518	80	-130
GCDCA	17.69	448	74	-80
GCDCA-d4	17.70	452	74	-80
TCDC	18.62	498	80	-130
GDCA	18.82	448	74	-80
CDCA	18.95	391	391	-40
CDCA-d4	18.96	395	395	-40
TDCA	19.68	498	80	-130
DCA	20.10	391	391	-40
GLCA	22.86	432	74	-80
TLCA	23.73	482	80	-130
LCA	27.04	375	375	-40

b. SPE

The supernatants obtained after protein precipitation were processed by SPE. Several phases of SPE cartridges were studied: 2 reversed phase polarity cartridges (HLB, HRP) and 2 anion

exchange cartridges (WAX and SAX). The protocols were adapted for each cartridge (see supplementary data). The results are shown in Figure 3.b.

Only WAX cartridges succeeded in extracting BA with extraction recoveries between 25 and 60 %. However, the extraction yields obtained are heterogeneous and variable, depending on BA species.

c. SLE

The supernatants obtained after protein precipitation were loaded to a SLE cartridge. Vacuum was applied and BA were eluted with methanol. In the same way, the yields were calculated for the five IS. The results are shown in Figure 3.c.

Although this method was fast, the extraction recoveries obtained are less than 60 %. This method has therefore not produced satisfactory yields.

d. LLE

The supernatants obtained after protein precipitation were processed by LLE. The influence of the solvent used to remove the most non-polar compounds (such as lipids) was studied. Organic solvents with a high log P, while being immiscible with the protein precipitation solvent were chosen. Therefore, heptane (log P = 4.3) and cyclohexane (log P = 3.4), with or without acid, were chosen. The BA were recovered in the acetonitrile/methanol phase (lower phase). The results are shown in Figure 3.d. LLE using cyclohexane containing acetic acid led to extraction recoveries around 50 %. LLE using heptane containing formic acid or using pure heptane led to extraction recoveries around 65 % on average but with high variability depending on the BA species. LLE using heptane containing acetic acid led to extraction recoveries around 70 % for all bile acid species. This solvent seems to be the most suitable for extracting all BA species by LLE.

e. Comparison of extraction recoveries and matrix effects

In order to choose the most suitable method for the extraction of BA from breast milk, the best conditions of each extraction technique were compared in terms of extraction recoveries but also in terms of matrix effects. The extraction recoveries are shown in Figure 3.e. and matrix effects are shown in Figure 3.f. The PP allowed homogeneous extraction yields for each BA species around 70 %. However, the matrix effects generated were around 40 %. The SPE and

SLE techniques led to heterogeneous extraction yields depending on the BA species, which is prohibitive for our method. LLE allowed, on the one hand, to obtain very homogeneous extraction yields depending on the BA species around 70 % and, on the other hand, to present negligible matrix effects, around 5 %. This technique is therefore the most suitable for extracting BA from breast milk.

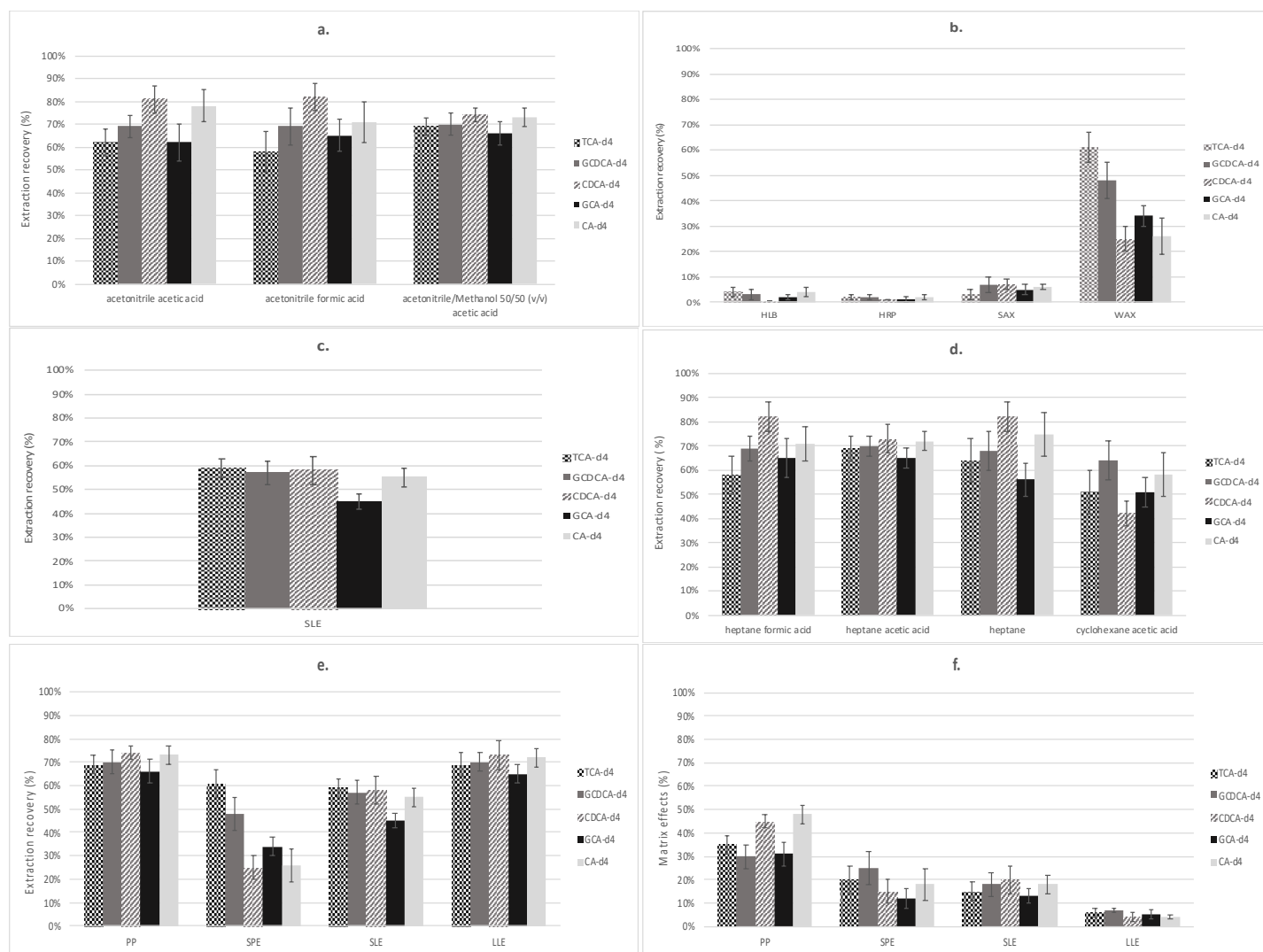


Figure 3: Bile acids extraction recoveries for a. PP procedure, b. SPE procedure, c. SLE procedure, d. LLE procedure, e. Comparison of PP, SPE, SLE and LLE. f. Comparison of breast milk matrix effects for PP, SPE, SLE and LLE procedures. Results are expressed as mean \pm Standard Deviation for 3 independent replicates.

B. LC-MS/MS conditions

LC-MS/MS conditions for quantification of the 27 BA have been previously described (20). In particular, the challenged separation of the different species of UDCA/HDCA, GUDCA/GHDCA and TUDCA/THDCA was obtained using an acetonitrile/methanol (70:30, V/V) mixture as solvent B of the mobile phase. This addition of methanol in the mobile phase is the key to perform their chromatographic separation and to guarantee the specificity of the method.

Retention time as well as MRM parameters (m/z of precursor ion, collision energy, m/z of product ion) for each analyte are presented in Table 1. Chromatographic separation is shown in Figure 4.

Chromatographic separation enables each BA to be identified specifically and selectively, thanks to its retention time and MRM transition. As expected, BA were eluted in ascending order of hydrophobicity (from α MCA to LCA).

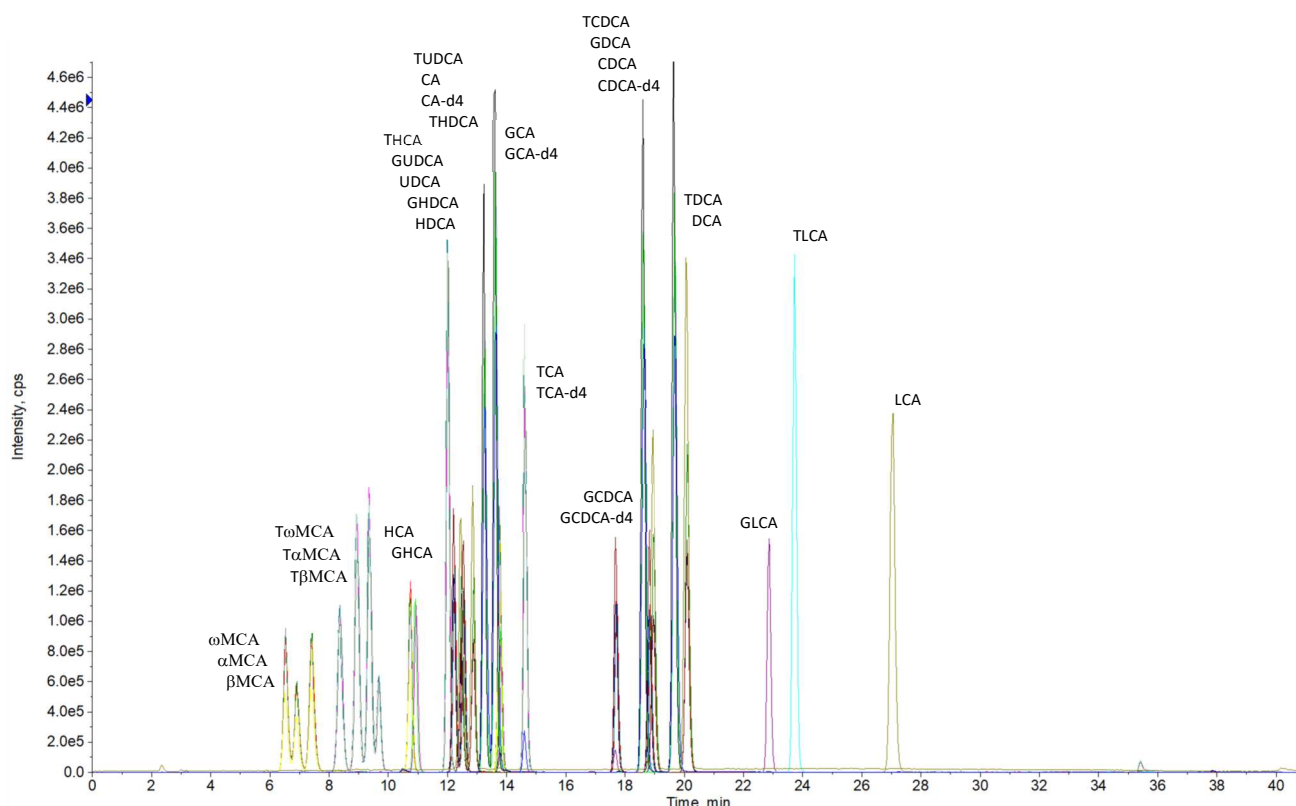


Figure 4: Chromatographic separation of 27 bile acid species and 5 internal standards

C. Method validation

LOD and LOQ were determined for each BA and are reported in Table 2.

Calibration curves, expressing the peak area ratio ($A(\text{analyte})/A(\text{IS})$) versus concentration ratio ($C(\text{analyte})/C(\text{IS})$), were established from eight calibration standards in methanol. Indeed, due to the negligible matrix effects obtained with the LLE technique when preparing the breast milk samples, we chose to perform the calibration curves in methanol. They were used to assess the response functions using least square weighted ($1/X$) linear regression for each BA. The validity of the model was attested by evaluation of the linearity of the method. As shown in Table 2, whatever the analyte, the introduced concentrations and the back-calculated ones can be expressed by a linear model with a value of $R^2 > 0.99$ and with slopes close to one, in accordance with a very good linearity for each BA.

Trueness and precision results are presented in Table 3. Whatever the BA, all back calculated concentrations of the calibration standards were within $\pm 15\%$ of the nominal value. These results are in accordance with the EMA criteria. For all BA, repeatability ranged from 4–12 % for the three levels of validation standards. Regarding intermediate precision, RSD values were less than 13 % which is in accordance with EMA criteria.

The analytical procedure we have developed for the determination of BA in breast milk has been validated according to EMA criteria. Sample preparation, consisting of milk protein precipitation followed by liquid-liquid extraction, enables the further simultaneous determination of 27 BA by LC-MS/MS.

D. Application to milk samples

The validated protocol was then applied to determine BA profile in three types of samples: human breast milk, rat milk and infant milk powder (IMP). BA were extracted by PP and LLE procedure from the samples and analyzed by LC-MS/MS. The whole process was performed in triplicate for each milk type and results are shown in Figure 5.

Table 2: Limits of detection and quantification, responses function and linearity of the LC–MS/MS method for the analysis of each bile acid determined in methanol

Bile acid	LOD (nmol/L)	LOQ (nmol/L)	Response function f(x)	linearity	
				slope	R ²
ωMCA	1.7	5.3	0.70x - 0.0016	1.020	0.9973
αMCA	1.7	5.2	0.488x - 0.00122	1.018	0.9975
βMCA	1.7	5.2	0.768x - 0.00722	1.020	0.9982
TωMCA	1.3	4.1	0.773x + 0.00983	0.982	0.9960
TαMCA	1.0	3.3	1.08x + 0.0014	1.005	0.9923
TβMCA	1.3	4.1	1.07x - 0.000803	1.002	0.9989
HCA	3.3	10.2	0.496x - 0.00137	0.998	0.9998
GHCA	0.3	1.2	1.17x - 0.00373	1.032	0.9984
THCA	0.4	1.1	1.60x - 0.00376	1.018	0.9989
GDCA	0.1	0.3	1.08x + 0.00222	1.003	0.9996
UDCA	1.7	5.5	1.63x - 0.00501	0.997	0.9984
GHDCA	0.2	1.1	1.02x - 0.00208	1.005	0.9992
HDCA	1.7	5.3	2.34x + 0.0116	0.9926	0.9999
TUDCA	0.1	0.4	1.39x + 0.00603	0.982	0.9967
THDCA	0.4	1.1	1.81x + 0.000655	1.009	0.9989
CA	0.8	2.5	0.997x + 0.000155	1.009	0.9995
GCA	0.1	0.5	0.865x + 0.00285	0.944	0.9953
TCA	0.3	1.3	1.26x - 0.000944	1.010	0.9992
GCDCA	0.1	0.4	0.98x + 0.0133	0.998	0.9990
TCDCA	0.2	0.5	1.95x + 0.00254	1.001	0.9999
GDCA	0.2	0.5	0.935x + 0.00165	1.019	0.9972
CDCA	1.7	5.7	2.26x - 0.00386	1.009	0.9998
TDCA	0.2	0.5	1.96x - 0.000458	0.967	0.9959
DCA	0.8	2.5	4.52x - 0.0374	1.009	0.9998
GLCA	0.2	0.5	1.50x - 0.00138	1.021	0.9969
TLCA	0.2	0.5	1.97x + 0.00947	0.967	0.9976
LCA	1.7	5.8	2.00x - 0.0482	1.042	0.9959

Fifteen BA species were detected in rat milk, among which 5 and 7 are also found in breast milk and IMP, respectively. TCDCA, GCDCA, TCA, GCA and GDCA were quantified in all types of milk. DCA, TDCA and CA were quantified in rat milk and IMP. CDCA, UDCA, TαMCA, TβMCA, TωMCA, GHDCA and THDCA were quantified only in rat milk. Interestingly, the CV did not exceed 10 % whatever the BA in the three matrices, in accordance with the high reproducibility of the method. CA was the most abundant BA in the infant milk

powder at a concentration of 101 nM, followed by DCA (33 nM) and GCA (19,5 nM). To our knowledge, this is the first time that the BA composition of infant milk powder has been studied. Considering BA according chemical class (free vs. conjugated) or according to hepatic or intestinal origin (primary vs. secondary) (Table 4), total-, free- and conjugated-BA concentrations are higher in IMP and even more in breast milk compared to humans, as assessed by the different values of ratios free/conjugated BA. Conversely, whereas the primary- and the secondary-BA are higher in IMP and even more in rat milk, compared to humans, the ratio primary/secondary BA only poorly differs among samples.

Rat milk presented high concentrations (> 120 nM) of GHDCA, GCA, TCA, TCDCA, THDCA, CA, T ω MCA and CDCA. This confirms data from *Blazquez et al.* (10). GHDCA was identified for the first time in rat milk at a concentration of 123 nM, which is non-negligible. GCDCA was the most abundant BA in the breast milk with a concentration of 33 nM. DCA, CA and CDCA were not detected in breast milk unlike the work published by *Brites et al.* (12). However, their tauro- and glyco-conjugated forms were quantified here because the present protocol does not include a hydrolysis step, unlike the protocol used by *Brites et al.* (12).

Table 3: Validation criteria (trueness, precision) of each bile acid determined in the breast milk

Bile acid	Concentration (nM)	Trueness (bias, %)	Precision	
			Repeatability (RSD, %)	Intermediate precision (RSD, %)
ω MCA	130	15	6	10
	600	-6	7	9
	1300	-1	5	5
α MCA	130	15	8	12
	600	-8	8	11
	1300	-2	10	10
β MCA	130	15	6	7
	600	-8	10	12
	1300	2	6	5
T ω MCA	130	14	7	8
	600	6	9	11
	1300	-5	8	9
T α MCA	130	13	10	12
	600	-8	8	9
	1300	9	6	8
T β MCA	130	12	7	8
	600	-6	9	10
	1300	7	6	6
HCA	130	14	8	9
	600	4	6	7
	1300	-5	4	8
GHCA	130	11	10	13
	600	-3	9	10
	1300	-2	8	8
THCA	130	-10	9	10
	600	-7	6	7
	1300	6	7	8
GUDCA	130	-8	9	11
	600	-5	10	10
	1300	3	8	9
UDCA	130	15	7	10
	600	-7	9	11
	1300	-2	6	6
GHDCA	130	13	10	11
	600	-9	9	9
	1300	5	8	8
HDCA	130	12	6	8
	600	-5	9	10
	1300	9	8	9
TUDCA	130	9	6	12
	600	-3	8	11
	1300	-2	5	7
THDCA	130	9	9	11
	600	4	7	9
	1300	-5	5	8
CA	130	15	5	9
	600	-9	5	8
	1300	2	6	6
GCA	130	11	8	12
	600	-4	8	10
	1300	-2	4	5
TCA	130	15	6	10
	600	1	7	11
	1300	-1	6	6
GCDCA	130	12	5	8
	600	-5	8	10
	1300	1	5	5
TCDCA	130	9	10	15
	600	-7	10	10
	1300	5	6	7
GDCA	130	10	6	10
	600	-5	8	9
	1300	1	5	5
CDCA	130	15	6	8
	600	-7	6	8
	1300	1	5	4
TDCA	130	15	9	12
	600	-5	9	9
	1300	5	7	7
DCA	130	15	4	8
	600	-6	6	7
	1300	2	4	5
GLCA	130	13	12	13
	600	-6	9	9
	1300	6	7	7
TLCA	130	9	12	13
	600	-7	9	10
	1300	4	7	7
LCA	130	14	10	11
	600	-8	6	8
	1300	7	5	6

Table 4: Total, free, conjugated, primary and secondary BA concentrations and ratios in three milk types: breast milk, rat milk and infant milk powder. Mean +/- SD, nmol/L, n.d.: not detected

nM	Breast milk	Rat milk	Infant milk powder
Total BA	99.1 +/- 1.9	2140.1 +/- 128	181.3 +/- 5.4
Free BA	n.d.	901.8 +/- 42	134.8 +/- 4.1
Conjugated BA	99.1 +/- 2.9	1238.3 +/- 76	46.5 +/- 1.4
Primary BA	74.3 +/- 2.2	1269.8 +/- 75	133.2 +/- 5.3
Secondary BA	24.8 +/- 0.2	543.6 +/- 31	48.1 +/- 1.1
Ratio free/conjugated BA	n.d.	0.7	2.9
Ratio primary/secondary BA	3.0	2.3	2.8

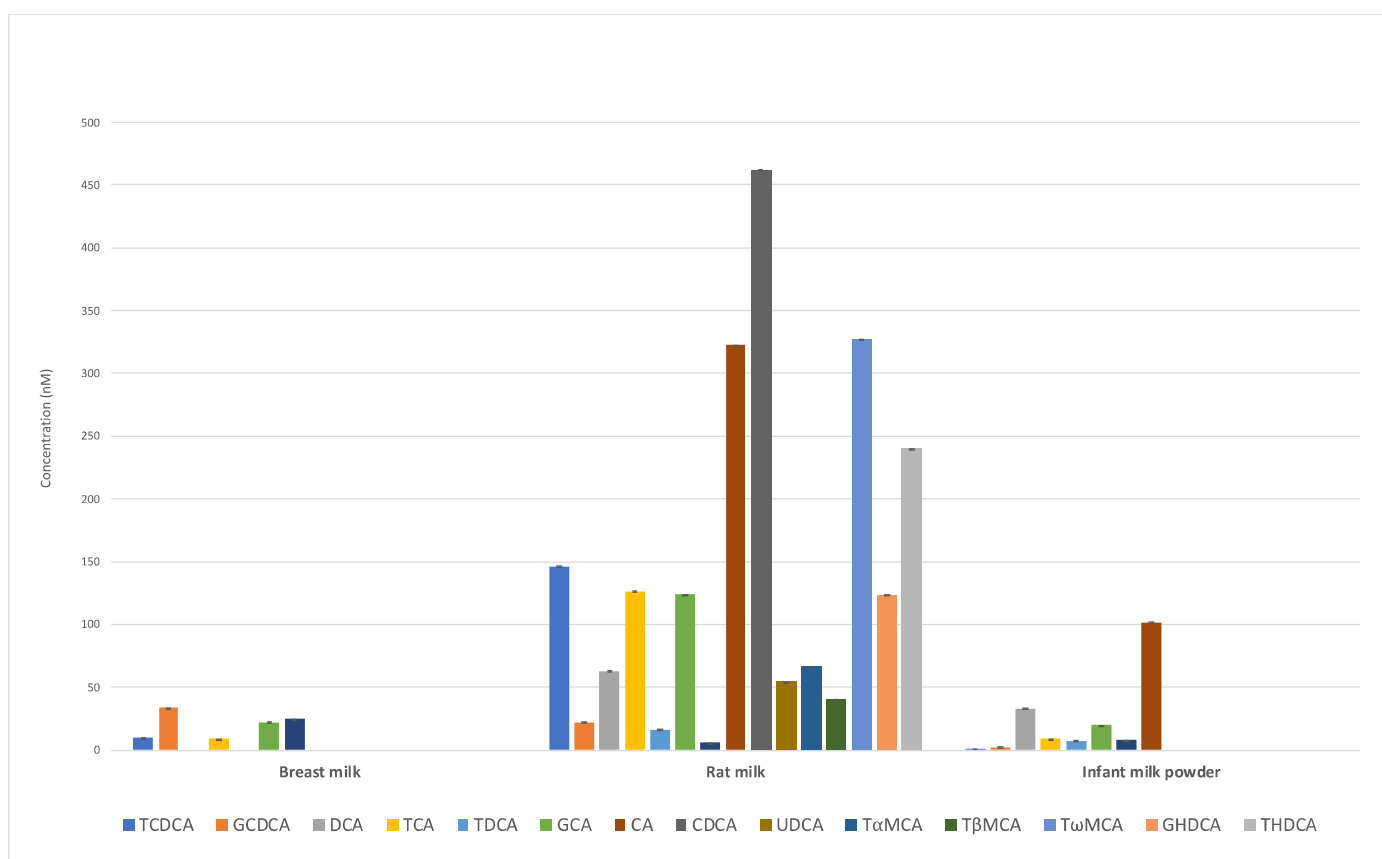


Figure 5: BA concentrations in three milk types: breast milk, rat milk and infant milk powder. Mean +/- SD (n=3).

7.4.9.4 Conclusion

The objective of this study was to develop and validate a new analytical method to quantify 27 BA in breast milk. Four extraction techniques followed by LC-MS/MS were compared in order to select a suitable protocol for the profiling of bile acids in breast milk samples. Liquid-liquid extraction using heptane containing acetic acid gave the best results for the analysis of breast milk samples, leading to extraction recoveries around 70% and matrix effects around 5%. The method showed good performances with respect linearity, trueness and precision. It has been applied with success to the determination of BA in three types of milk samples: breast milk, rat milk and infant milk powder. This made it possible to compare their composition in BA.

One of the main advantages of this method is the wide range of sensitivity, which allows, in addition to the most important BA species, the determination of minor species potentially relevant to the understanding of the establishment of the enterohepatic cycle in the newborn. These analyses are now applicable to BA analysis in milk in different physiopathological contexts, both in preclinical and clinical studies. It would be informative to compare BA in different IMP formulations.

References

- (1) García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. *J Lipid Res.* oct 2012;53(10):2231-41.
- (2) Zwicker BL, Agellon LB. Transport and biological activities of bile acids. *Int J Biochem Cell Biol.* 1 juill 2013;45(7):1389-98.
- (3) Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* mai 2017;152(7):1679-1694.e3.
- (4) De Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metab.* 7 mai 2013;17(5):657-69.
- (5) Humbert L, Maubert MA, Wolf C, Duboc H, Mahé M, Farabos D, et al. Bile acid profiling in human biological samples: Comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. *J Chromatogr B.* juin 2012;899:135-45.
- (6) Forsyth JS, Ross PE, Bouchier IAD. Bile salts in breast milk. *Eur J Pediatr.* avr 1983;140(2):126-7.

- (7) Forsyth JS, Donnet L, Ross PE. A Study of the Relationship between Bile Salts, Bile Salt-Stimulated Lipase, and Free Fatty Acids in Breast Milk: Normal Infants and Those with Breast Milk Jaundice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* août 1990;11(2):205-10.
- (8) Balistreri WF. Immaturity of Hepatic Excretory Function and the Ontogeny of Bile Acid Metabolism: *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1983;2:207-14.
- (9) Miller R, Lowe ME. Carboxyl Ester Lipase from Either Mother's Milk or the Pancreas Is Required for Efficient Dietary Triglyceride Digestion in Suckling Mice ., *J Nutr.* mai 2008;138(5):927-30.
- (10) Blazquez AMG, Macias RIR, Cives-Losada C, de la Iglesia A, Marin JJG, Monte MJ. Lactation during cholestasis: Role of ABC proteins in bile acid traffic across the mammary gland. *Sci Rep [Internet].* déc 2017 [cité 15 févr 2019];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-06315-8>
- (11) Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S, Nikolopoulou E, Briz O, Owen BM, Nikolova V, et al. Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring [Internet]. 2013 [cité 15 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/68927/pdf>
- (12) Brites D, Rodriguez CMP. Elevated levels of bile acids in colostrum of patients with cholestasis of pregnancy are decreased following ursodeoxycholic acid therapy. *J Hepatol.* nov 1998;29(5):743-51.
- (13) Batta AK, Salen G, Rapole KR, Batta M, Batta P, Alberts D, et al. Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. *J Lipid Res.* juin 1999;40(6):1148-54.
- (14) Nakayama F, Nakagaki M. Quantitative determination of bile acids in bile with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* sept 1980;183(3):287-93.
- (15) Burkard I, von Eckardstein A, Rentsch KM. Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 5 nov 2005;826(1-2):147-59.
- (16) Sarafian MH, Lewis MR, Pechlivanis A, Ralphs S, McPhail MJW, Patel VC, et al. Bile Acid Profiling and Quantification in Biofluids Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 6 oct 2015;87(19):9662-70.
- (17) Alnouti Y, Csanaky IL, Klaassen CD. Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC–MS/MS. *J Chromatogr B.* oct 2008;873(2):209-17.
- (18) Li H, Xia X, Xue Y, Tang S, Xiao X, Li J, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* juill 2012;900:59-63.
- (19) Cho SH, Park JA, Zheng W, Abd El-Aty AM, Kim SK, Choi JM, et al. Quantification of bupivacaine hydrochloride and isoflupredone acetate residues in porcine muscle, beef, milk, egg, shrimp, flatfish, and eel using a simplified extraction method coupled with liquid

chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* oct 2017;1065-1066:29-34.

- (20) Spinelli V, Lalloyer F, Baud G, Osto E, Kouach M, Daoudi M, et al. Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans. *Int J Obes.* août 2016;40(8):1260-7.

8 Applications dans le contexte de la maladie cardiométabolique

Les méthodes d'analyses développées pour le dosage des AB ont permis de contribuer à la réalisation d'une étude préclinique chez le minipig et de trois études cliniques. Ces travaux se placent dans le contexte de la maladie cardiométabolique, étudiant la chirurgie de l'obésité, le diabète de type 2 et la NASH. Ils seront brièvement présentés dans ce chapitre.

8.1 Étude des AB dans le contexte de la NASH

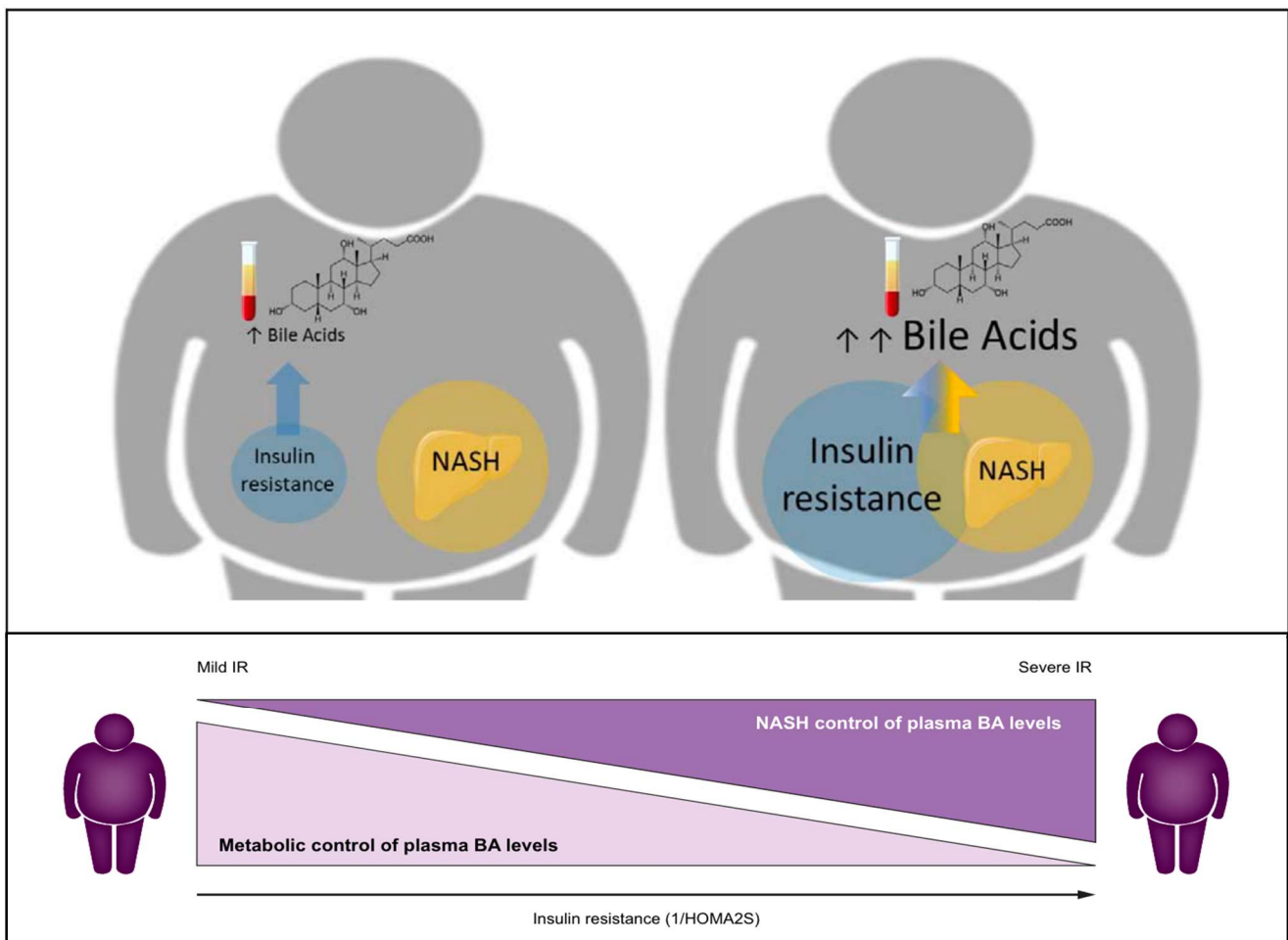


Figure 68 : Résumé graphique extrait de la publication Grzych et al. (2021) JEHP Reports.

NASH-related increases in plasma bile acid levels depend on insulin resistance



Guillaume Grzych,¹ Oscar Chávez-Talavera,¹ Amandine Descat,² Dorothée Thuillier,³ An Verrijken,^{4,5} Mostafa Kouach,² Vanessa Legry,¹ Hélène Verkindt,³ Violeta Raverdy,³ Benjamin Legendre,³ Robert Caiazzo,³ Luc Van Gaal,^{4,5} Jean-Francois Goossens,² Réjane Paumelle,¹ Sven Francque,^{4,6} François Pattou,³ Joel T. Haas,^{1,†} Anne Tailleux,^{1,†} Bart Staels^{1,*,†}

¹Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France; ²Univ. Lille, CHU Lille, EA 7365-GRITA-Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées, F-59000 Lille, France; ³Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1190 - EGID, F-59000, Lille, France; ⁴Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Antwerp, 2610 Wilrijk/Antwerp, Belgium; ⁵Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolism, Antwerp University Hospital, 2650 Edegem/Antwerp, Belgium; ⁶Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital, 2650, Edegem, Antwerp, Belgium

JHEP Reports 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100222>

Background & Aims: Plasma bile acids (BAs) have been extensively studied as pathophysiological actors in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). However, results from clinical studies are often complicated by the association of NASH with type 2 diabetes (T2D), obesity, and insulin resistance (IR). Here, we sought to dissect the relationship between NASH, T2D, and plasma BA levels in a large patient cohort.

Methods: Four groups of patients from the Biological Atlas of Severe Obesity (ABOS) cohort (Clinical Trials number NCT01129297) were included based on the presence or absence of histologically evaluated NASH with or without coincident T2D. Patients were matched for BMI, homeostatic model assessment 2 (HOMA2)-assessed IR, glycated haemoglobin, age, and gender. To study the effect of IR and BMI on the association of plasma BA and NASH, patients from the HEPADIP study were included. In both cohorts, fasting plasma BA concentrations were measured.

Results: Plasma BA concentrations were higher in NASH compared with No-NASH patients both in T2D and NoT2D patients from the ABOS cohort. As we previously reported that plasma BA levels were unaltered in NASH patients of the HEPADIP cohort, we assessed the impact of BMI and IR on the association of NASH and BA on the combined BA datasets. Our results revealed that NASH-associated increases in plasma total cholic acid (CA) concentrations depend on the degree of HOMA2-assessed systemic IR, but not on β -cell function nor on BMI.

Conclusions: Plasma BA concentrations are elevated only in those NASH patients exhibiting pronounced IR.

Lay summary: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a progressive liver disease that frequently occurs in patients with obesity and type 2 diabetes. Reliable markers for the diagnosis of NASH are needed. Plasma bile acids have been proposed as NASH biomarkers. Herein, we found that plasma bile acids are only elevated in patients with NASH when significant insulin resistance is present, limiting their utility as NASH markers.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association for the Study of the Liver (EASL). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) covers a spectrum of hepatic disorders ranging from isolated steatosis (non-alcoholic fatty liver [NAFL]) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH).¹ Although steatosis is generally considered benign, NASH, which combines steatosis with inflammation and hepatocyte damage (evidenced histologically by ballooning), is a risk factor for progressive fibrosis and, ultimately cirrhosis and hepatocellular

carcinoma, as well as for cardiovascular disease, type 2 diabetes (T2D) and other extra-hepatic consequences.² Given the importance of metabolic alterations in this disease, metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) has recently been proposed as a more accurate denomination of fatty liver disease associated with metabolic dysfunction.³ The pathogenesis of NAFLD remains poorly understood, and there is currently an urgent need to identify therapeutic targets.

Bile acids (BAs) are amphipathic molecules that facilitate absorption of dietary fat and lipophilic vitamins in the small intestine. Recently, BAs have attracted growing interest as they are also signalling molecules that control energy expenditure and glucose and lipid metabolism via receptors such as the farnesoid-X-receptor (FXR, *NR1H4*) and TGR5 (*GPBAR1*).^{4,5} BAs are synthesised in the liver as primary BAs (cholic acid [CA], chenodeoxycholic acid [CDCA], hyocholic acid [HCA]), secreted in

Keywords: NASH; NAFLD; Bile acids; Diabetes; Insulin resistance; Obesity; Translational study.

Received 5 October 2020; accepted 9 November 2020; available online 16 December 2020

[†] These authors co-supervised this study.

* Corresponding author. Address: INSERM U1011 - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille - EGID - 1 rue Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel.: +33 3 20 87 78 25; fax: +33 3 20 87 73 60.

E-mail address: bart.staels@pasteur-lille.fr (B. Staels).



Les maladies du foie gras d'origine non alcoolique (NAFLD) regroupent les lésions hépatiques allant de la stéatose isolée à la stéato-hépatite non alcoolique (NASH). La NASH associe la stéatose à une inflammation et à des lésions hépatocytaires et elle peut évoluer en fibrose progressive et, à terme, en cirrhose. La NASH est à l'origine d'importantes altérations métaboliques et il existe un besoin urgent d'identifier des cibles thérapeutiques permettant d'améliorer le diagnostic des patients. Elle est exclusivement diagnostiquée par biopsie et analyse histologique, technique invasive pour le patient et très dépendante de l'anatomo-pathologiste. Plusieurs études ont montré que les AB pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de la NASH et les voies de signalisation activées par les AB sont des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la maladie. Les AB ont également été proposés comme biomarqueurs circulants de la pathologie. Globalement, les concentrations plasmatiques en AB sont plus élevées chez les patients atteints de NASH que chez ceux qui n'en sont pas atteints. Cependant, des concentrations plasmatiques accrues en AB sont également observées chez les patients atteints de diabète de type 2 (DT2), d'insulinorésistance (IR) et d'obésité, qui sont des facteurs de risque majeurs pour la NASH. Ainsi, la relation complexe entre la NAFLD, l'obésité, l'IR et le DT2 complique l'établissement d'associations claires et indépendantes entre les altérations des AB plasmatiques et ces caractéristiques cliniques individuelles.

Une première étude réalisée par *Legry et al.* (291) avec la cohorte HEPADIP avait montré que, chez les patients NAFLD, non DT2, en comparant les patients NASH *versus* non NASH et en ajustant sur les valeurs de l'IR et de l'IMC, il n'y avait pas de différences qualitatives et quantitatives du pool des AB circulants. La présente étude cherche à déterminer s'il en est de même chez des patients DT2.

Pour cela, 219 patients de la cohorte ABOS (Biological Atlas of Severe Obesity) ont été répartis en 4 groupes en fonction de la présence ou de l'absence de NASH évaluée histologiquement, avec DT2 et sans DT2, ces derniers groupes permettant de vérifier les travaux de *Legry et al.*, en prenant soin d'ajuster les facteurs confondants tels que l'obésité et l'IR. Les patients ont été appariés en fonction de l'IMC, l'IR évalué par le modèle homéostatique 2 (HOMA2), l'hémoglobine glyquée, l'âge et le sexe. Les concentrations plasmatiques en AB à jeun ont été mesurées par la méthode LC-MS/MS développée au laboratoire.

Chez les patients DT2, une augmentation des AB a été mesurée chez les patients NASH *versus* non NASH. Cependant, de manière inattendue, la même augmentation a été observée chez les patients non DT2 et NASH *versus* non NASH, ce qui est en contradiction avec l'étude menée par *Legry et al.* Cependant, dans la cohorte ABOS de la présente étude, les patients non DT2 présentent une obésité et une IR bien plus sévère que ceux de la cohorte HEPADIP (*Legry et*

al.). Pour montrer le lien entre le degré d'IR et la variation des AB dans la NASH, nous avons évalué l'impact de l'IMC et de l'IR sur l'association de la NASH et des AB sur l'ensemble des données combinées des AB, incluant 58 patients de la cohorte HEPADIP, ajoutés aux patients de la cohorte ABOS, permettant de disposer d'un large panel d'IMC et d'IR. Dans cette cohorte combinée, une corrélation a été observée entre les concentrations en AB plasmatiques totaux, le CA, CDCA, DCA, leurs conjugués ainsi que le C4, marqueur circulant de la synthèse des AB, et les caractéristiques histologiques de la NASH. Au contraire, les AB 6 α -hydroxylés tels que l'HCA et l'HDCA ne sont pas corrélés aux lésions hépatiques mais négativement corrélés aux paramètres de l'évaluation de l'homéostasie du glucose chez les patients. Nos résultats ont révélé que les augmentations des concentrations plasmatiques en acide cholique total (CA, GCA et TCA) associées à la NASH dépendent du degré d'IR systémique évalué par HOMA2, mais pas de la fonction des cellules β ni de l'IMC.

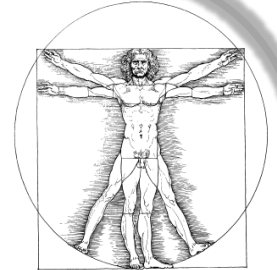
Les concentrations plasmatiques en AB ne sont élevées chez les patients atteints de NASH que s'ils présentent une IR prononcée : chez les patients souffrant d'une IR légère, la NASH n'affecte pas les concentrations d'AB circulants, qui sont déterminées par l'homéostasie métabolique. En revanche, chez les patients présentant une IR sévère, la NASH est associée à une augmentation des AB circulants, ce qui limite leur utilité en tant que biomarqueurs de la NASH.

8.2 Les AB, des biomarqueurs prédictifs du diabète de type 2 ?

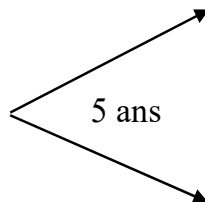
1) Les concentrations en AB circulants sont-elles associées à l'homéostasie du glucose ?

$$\frac{[HCA]_{\text{total}}}{[CDCA]_{\text{total}}}$$

Les AB 6 α -hydroxylés sont corrélés négativement à l'IMC et l'IR



Prédiabète
n=205



Diabète de type 2 (DT2)
n=69 (33,7 %)

Prédiabète
n=136 (66,3 %)

2) Les AB sont-ils prédictifs de la conversion des patients prédiabétiques en diabétiques de type 2 ?

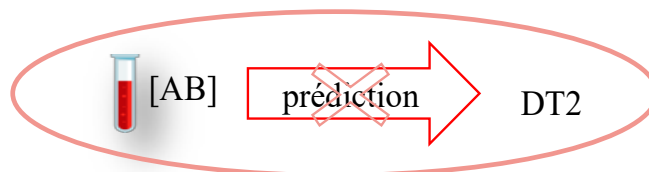


Figure 69 : Résumé graphique de la publication Chávez-Talavera et al. (2020) *Metabolism Clinical and Experimental*



Contents lists available at ScienceDirect

Metabolism Clinical and Experimental

journal homepage: www.metabolismjournal.com

Bile acids associate with glucose metabolism, but do not predict conversion from impaired fasting glucose to diabetes

Oscar Chávez-Talavera^{a,1}, Matthieu Wargny^{b,c,d,1}, Matthieu Pichelin^{b,c}, Amandine Descat^e,
Emmanuelle Vallez^a, Mostafa Kouach^e, Edith Bigot-Corbel^f, Marielle Joliveau^b, Jean-François Goossens^e,
Cédric Le May^c, Samy Hadjadj^{b,c}, Rémy Hanf^g, Anne Tailleux^{a,2}, Bart Staels^{a,2}, Bertrand Cariou^{b,c,*}

^a Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, F-59000 Lille, France^b L'institut du thorax, Department of Endocrinology, CIC 1413 INSERM, CHU Nantes, Nantes, France^c L'institut du thorax, INSERM, CNRS, Univ. Nantes, CHU Nantes, Nantes, France^d Clinique des Données, CHU Nantes, Nantes, France^e Plateau de Spectrométrie de Masse, PSM-GRITA EA 7365, Faculté de Pharmacie, F-59000 Lille, France^f Department of Biochemistry, CHU de Nantes, Nantes, France^g Genfit SA, Loos, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2019

Accepted 26 November 2019

Keywords:

Bile acids

Impaired fasting glucose

Prediabetes

New onset diabetes

Hyocholeic acid

C4

HOMA-IR

ABSTRACT

Objective: Bile acids (BAs) are signaling molecules controlling lipid and glucose metabolism. Since BA alterations are associated with obesity and insulin resistance, plasma BAs have been considered candidates to predict type 2 diabetes (T2D) risk. We aimed to determine (1) the association of BAs with glucose homeostasis parameters and (2) their predictive association with the risk of conversion from prediabetes to new-onset diabetes (NOD) in a prospective cohort study.

Design: 205 patients with impaired fasting glucose (IFG) were followed each year during 5 years in the IT-DIAB cohort study. Twenty-one BA species and 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4), a marker of BA synthesis, were quantified by LC/MS-MS in plasma from fasted patients at baseline. Correlations between plasma BA species and metabolic parameters at baseline were assessed by Spearman's coefficients and the association between BAs and NOD was determined using Cox proportional-hazards models.

Results: Among the analyzed BA species, total hyocholeic acid (HCA) and the total HCA/total chenodeoxycholic acid (CDCA) ratio, reflecting hepatic BA 6 α -hydroxylation activity, negatively correlated with BMI and HOMA-IR. The total HCA/total CDCA ratio also correlated negatively with HbA_{1c}. Conversion from IFG to NOD occurred in 33.7% of the participants during the follow-up. Plasma BA species were not independently associated with the conversion to NOD after adjustment with classical T2D risk factors.

Conclusions: Fasting plasma BAs are not useful clinical biomarkers for predicting NOD in patients with IFG. However, an unexpected association between 6 α -hydroxylated BAs and glucose parameters was found, suggesting a role for this specific BA pathway in metabolic homeostasis.

IT-DIAB study registry number: NCT01218061.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: 12 α -OH, 12 α -hydroxylated; 6 α -OH, 6 α -hydroxylated; C4, 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one; ANR, Agence Nationale pour la Recherche; BAs, Bile acids; BMI, body mass index; CDCA, chenodeoxycholic acid; HDL-c, cholesterol associated with high density lipoproteins; LDL-c, cholesterol associated with low density lipoproteins; CA, cholic acid; CYP27A1, CYP cholesterol 27 α -hydroxylase; CYP7A1, CYP cholesterol 7 α -hydroxylase; CYP, cytochrome P450; DCA, deoxycholic acid; ECLIA, electrochemiluminescent enzyme immunoassay; FXR, farnesoid X receptor; FPG, fasting plasma glucose; GLP-1, glucagon-like peptide-1; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; HR, hazard ratio; HMW, high molecular weight; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; HCA, hyocholeic acid; HDCA, hyodeoxycholic acid; IFG, impaired fasting glucose; IR, insulin resistance; IQR, interquartile range; LCA, lithocholic acid; LC-MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; MeOH, methanol; NOD, new onset diabetes; ND, non-diabetic group; RISC, Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular disease cohort; SFSTP, Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques; SD, standard deviation; TGR5, Takeda G protein coupled Receptor 5; MS/MS, tandem mass spectrometry; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; T2D, type 2 diabetes; UDCA, ursodeoxycholic acid.

* Corresponding author at: Clinique d'Endocrinologie, Hôpital Guillaume & René Laennec, Boulevard Jacques Monod, Saint-Herblain, 44093 Nantes Cedex 1, France.

E-mail address: bertrand.cariou@univ-nantes.fr (B. Cariou).

¹ Co-first authors.

² Co-last authors.

Le diabète de type 2 (DT2) apparaît progressivement et peut avoir de graves complications, en faisant un problème majeur de santé publique. Il s'agit d'une pathologie dont l'incidence augmente au niveau mondial et sa détection précoce est essentielle dans sa prise en charge, notamment chez des patients prédiabétiques, intolérants au glucose. Chez ces patients, l'insuline est sécrétée par les cellules β du pancréas, mais les tissus cibles (foie, muscle, tissu adipeux) sont résistants à son action. Progressivement, le pancréas produit de plus en plus d'insuline pour compenser l'IR et maintenir une glycémie normale. Cependant, cette hypersécrétion épuise le pancréas, les cellules β diminuent l'insuline sécrétée, causant une hyperglycémie à jeun, ou DT2. La recherche de biomarqueurs, prédictifs du DT2, est devenue un véritable enjeu de santé publique.

Depuis que les altérations des AB, molécules de signalisation qui contrôlent le métabolisme des lipides et du glucose, sont associées à l'obésité et à la résistance à l'insuline, les AB circulants ont été considérés comme de potentiels biomarqueurs permettant de prédire le risque de DT2. Cependant, leur utilité clinique n'a pas été démontrée lors d'études longitudinales. Nous avons cherché à répondre à deux questions dans le cadre d'une étude de cohorte prospective :

1. Les concentrations en AB circulants sont-elles associées aux paramètres de l'homéostasie du glucose chez des patients prédiabétiques ?
2. Les AB plasmatiques sont-ils prédictifs du risque de conversion du prédiabète en diabète ?

205 patients présentant une anomalie de la glycémie à jeun ont été suivis chaque année pendant 5 ans dans le cadre de l'étude de cohorte IT-DIAB. 21 espèces d'AB et la 7α -hydroxy-4-cholestène-3-one (C4), un marqueur de la synthèse de BA, ont été quantifiés par les méthodes LC-MS/MS développées au laboratoire dans le plasma de patients à jeun au moment de l'inclusion.

1. Analyse du profil des AB et des paramètres métaboliques chez des patients prédiabétiques. Les corrélations entre les espèces d'AB plasmatiques et les paramètres métaboliques initiaux ont été évaluées par des analyses de Spearman et l'association entre les AB et le diabète d'apparition récente a été déterminée à l'aide de modèles de risques proportionnels de Cox. Parmi les espèces d'AB analysées, l'acide hyocholique total (HCA) et le rapport HCA total/acide chénodésoxycholique total (CDCA), reflétant l'activité de la 6α -hydroxylation hépatique des AB *via* la CYP3A4, sont négativement corrélés à l'IMC et à l'HOMA-IR, indice de mesure de l'insulino-résistance. Le rapport HCA total/CDCA total est également en corrélation négative avec l'hémoglobine glyquée HbA1C. Il existe donc une association entre les AB 6α -hydroxylés et l'homéostasie du glucose. L'importance du rôle de ces AB 6α -

hydroxylés, pourtant minoritaires chez l'humain, a également été démontrée par *Zheng et al.* (292) la même année et par *Makki et al.* (293) plus récemment.

2. Analyse des AB chez des patients prédiabétiques comme marqueurs prédictifs de la conversion prédiabète/DT2.

La conversion du prédiabète en DT2 a été observée chez 33,7 % des participants au cours du suivi. Les espèces d'AB plasmatiques ne sont pas associées de manière indépendante à la conversion en diabète après ajustement avec les facteurs de risque classiques du DT2.

Les AB plasmatiques à jeun ne sont donc pas des biomarqueurs cliniques utiles, ni qualitativement ni quantitativement, pour prédire la survenue d'un diabète chez les patients prédiabétiques. Cependant, une association inattendue entre les AB 6 α -hydroxylés et les paramètres relatifs à l'homéostasie du glucose a été mise en évidence, suggérant un rôle de cette voie spécifique des AB dans l'homéostasie métabolique. Le rôle physiopathologique des AB 6 α -hydroxylés a été mis en évidence par l'équipe de *Zheng et al.* la même année (292).

8.3 Étude des AB dans le contexte de l'obésité et de la chirurgie bariatrique

L'obésité est une épidémie mondiale dont la prévalence ne cesse d'augmenter chez les adultes et les enfants, touchant aujourd'hui plus de 2 milliards de personnes à travers le monde. L'obésité chronique représente un défi majeur pour la santé, car elle est fréquemment associée à des complications métaboliques, tels que la résistance à l'insuline, le DT2, les dyslipidémies et l'hypertension artérielle, collectivement appelées syndrome métabolique.

Actuellement, la chirurgie bariatrique est l'option la plus efficace pour les patients souffrant d'obésité sévère, après l'échec des thérapies comportementales visant à la perte de poids. La chirurgie bariatrique favorise une réduction du poids à long terme, mais aussi une amélioration des comorbidités métaboliques. Le Roux-en-Y (RYGB) est la technique de chirurgie bariatrique la plus utilisée, la plus sûre et la plus efficace. Elle consiste en la création d'une petite poche à partir de la partie proximale de l'estomac, la reliant directement à l'intestin grêle et contournant une partie de l'estomac et du duodénum. Le bypass gastrique à une anastomose (OAGB) est une procédure plus récente qui permet d'obtenir une anse biliaire plus longue en éliminant l'anse alimentaire.

Les mécanismes exacts permettant une amélioration des paramètres métaboliques grâce à ces interventions chirurgicales ne sont pas complètement élucidés. Certains mécanismes ont été proposés, tels que des modifications du microbiote intestinal ou de la taille et de la composition

du pool d'AB, qui pourrait moduler le métabolisme par l'activation du récepteur FXR et du récepteur TGR5, ou encore l'hypertrophie de l'anse alimentaire.

1) Les mécanismes mis en jeu dans la procédure de Roux-en-Y menant à l'amélioration des paramètres métaboliques chez les patients ont été étudiés grâce à une cohorte de 26 patients (HEPADIP). Les cohortes de patients permettent l'accès à des prélèvements sanguins systémiques dans des contextes physiopathologiques particuliers, avant et après chirurgie bariatrique. C'est le cas de la cohorte ABOS du Pr François Pattou à Lille (EGID) et de la cohorte du Pr Francque à Anvers. Cette dernière comporte des prélèvements sanguins mais également des biopsies hépatiques, avant et après chirurgie bariatrique, un matériel biologique particulièrement précieux. Les limites éthiques chez l'humain ne permettent évidemment pas l'accès à d'autres tissus.

2) La procédure d'OAGB a pu être étudiée de manière approfondie, notamment grâce à l'expertise de l'équipe du Pr Pattou, chez le minipig, un modèle préclinique. Les modèles précliniques facilitent l'exploration de divers tissus. La souris est un modèle petit dans lequel il est très difficile de mettre en place une procédure de RYGB sans mortalité et pour lequel les volumes de prélèvements sanguins et tissulaires sont limités. En revanche, le minipig est omnivore et présente des caractéristiques anatomiques et physiologiques proches de celles de l'humain. Les prélèvements sanguins ne sont pas limités en volume, prélevés chez l'animal sans anesthésie, grâce à la pose de cathéters (veines portale et centrale). De plus, tous les tissus sont accessibles en quantité permettant de réaliser de nombreuses analyses, en particulier les différentes parties de l'intestin.

RESEARCH ARTICLE

Translational Physiology

Characterization of one anastomosis gastric bypass and impact of biliary and common limbs on bile acid and postprandial glucose metabolism in a minipig model

Camille Marciniak,^{1*} Oscar Chávez-Talavera,^{2*} Robert Caiazzo,¹ Thomas Hubert,¹ Lorea Zubiaga,¹ Gregory Baud,¹ Audrey Quenon,¹ Amandine Descat,³ Emmanuelle Vallez,² Jean François Goossens,³ Mostafa Kouach,³ Vincent Vangelder,¹ Mathilde Gobert,¹ Mehdi Daoudi,¹ Bruno Derudas,² Pascal Pigny,³ André Klein,⁵ Valéry Gmyr,¹ Violeta Raverdy,¹  Sophie Lestavel,² Blandine Laferrère,⁶ Bart Staels,^{2*} Anne Tailleux,^{2*} and  François Pattou^{1*}

¹U1190, Institut Pasteur de Lille, University of Lille, Inserm, Lille, France; ²U1011, Institut Pasteur de Lille, University of Lille, Inserm Lille, France; ³Mass Spectrometry Department, Pharmacy Faculty, PSM-GRITA, Lille, France; ⁴Jean-Pierre Aubert Research Center, University of Lille, Inserm, Lille, France; ⁵Metabolism and Glycosylation Diseases, Biology Pathology Center, Lille, France; and ⁶Division of Endocrinology, Department of Medicine, New York Obesity Research Center, Columbia University Irving Medical Center, New York, New York

Abstract

The alimentary limb has been proposed to be a key driver of the weight-loss-independent metabolic improvements that occur upon bariatric surgery. However, the one anastomosis gastric bypass (OAGB) procedure, consisting of one long biliary limb and a short common limb, induces similar beneficial metabolic effects compared to Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) in humans, despite the lack of an alimentary limb. The aim of this study was to assess the role of the length of biliary and common limbs in the weight loss and metabolic effects that occur upon OAGB. OAGB and sham surgery, with or without modifications of the length of either the biliary limb or the common limb, were performed in Gottingen minipigs. Weight loss, metabolic changes, and the effects on plasma and intestinal bile acids (BAs) were assessed 15 days after surgery. OAGB significantly decreased body weight, improved glucose homeostasis, increased postprandial GLP-1 and fasting plasma BAs, and qualitatively changed the intestinal BA species composition. Resection of the biliary limb prevented the body weight loss effects of OAGB and attenuated the postprandial GLP-1 increase. Improvements in glucose homeostasis along with changes in plasma and intestinal BAs occurred after OAGB regardless of the biliary limb length. Resection of only the common limb reproduced the glucose homeostasis effects and the changes in intestinal BAs. Our results suggest that the changes in glucose metabolism and BAs after OAGB are mainly mediated by the length of the common limb, whereas the length of the biliary limb contributes to body weight loss.

NEW & NOTEWORTHY Common limb mediates postprandial glucose metabolism change after gastric bypass whereas biliary limb contributes to weight loss.

bariatric; bariatric surgery; bile acids; biliary limb; bypass; common limb; one anastomosis gastric bypass

INTRODUCTION

The rapidly rising global prevalence of obesity and its complications represents a major public health problem. Bariatric surgery induces substantial and sustained body weight loss and is considered the most effective treatment for morbid obesity, as well as its comorbidities, such as type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease (1). Several bariatric surgery techniques have been developed over time,

but the most studied and, until recently, most performed, is the Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) (2). Surprisingly, RYGB, which excludes a portion of the stomach and the proximal intestine from the alimentary circuit, lowers glycemia more rapidly and to a greater extent than would be expected from the body weight loss alone. Numerous mechanisms of action have been proposed to explain this striking weight-loss-independent metabolic effect in preclinical models, but their clinical relevance remains unclear (3–5).

* C. Marciniak and O. Chávez-Talavera contributed equally to this work; B. Staels, A. Tailleux, and F. Pattou contributed equally to this work.

Correspondence: F. Pattou (francois.pattou@univ-lille.fr).

Submitted 13 July 2020 / Revised 20 January 2021 / Accepted 20 January 2021



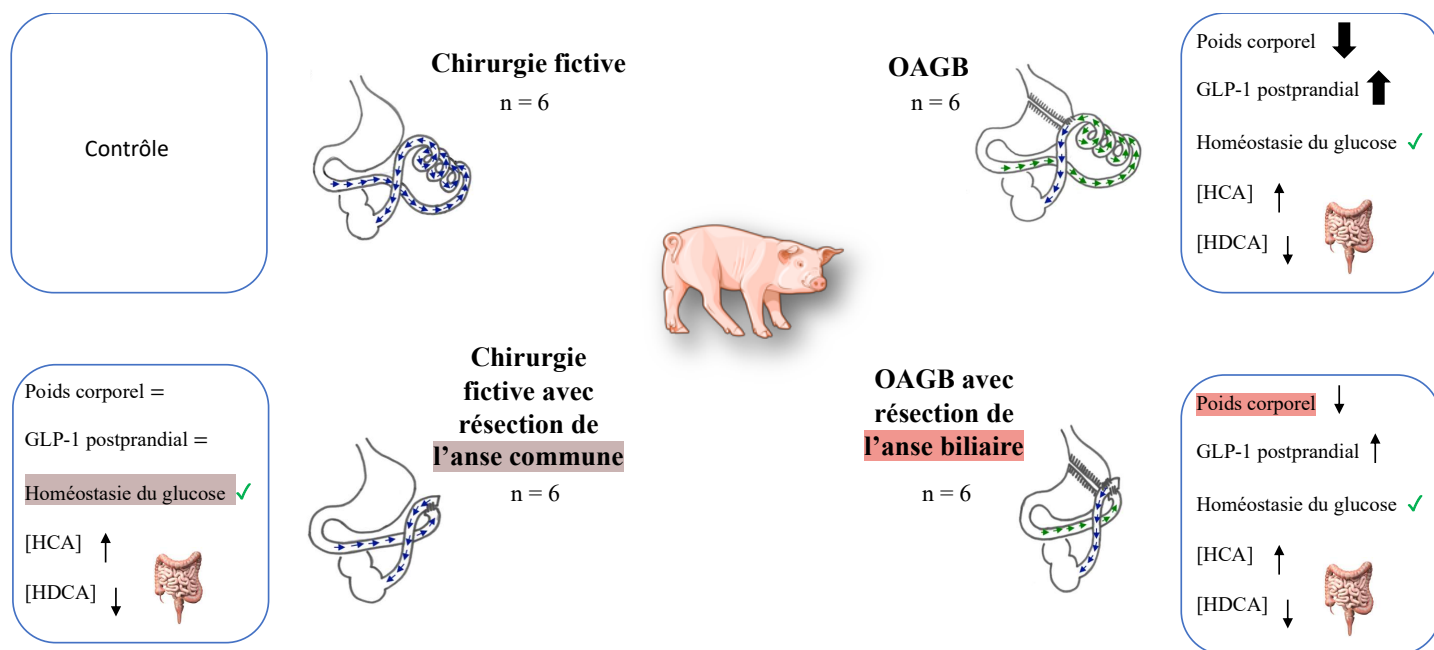


Figure 70 : Résumé graphique de la publication Marciniak et al. (2021) *Am J Physiol Endocrinol Metab*

Il est suggéré que l'anse alimentaire soit un élément clé des améliorations métaboliques indépendantes de la perte de poids qui se produisent lors d'une chirurgie bariatrique. Cependant, la procédure de dérivation gastrique à une seule anastomose (OAGB), qui consiste en une longue anse biliaire et une anse commune courte, induit des effets métaboliques bénéfiques similaires à ceux de la dérivation gastrique de Roux-en-Y (RYGB) chez l'humain, malgré l'absence d'anse alimentaire.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer le rôle respectif de la longueur de l'anse biliaire et de l'anse commune dans la perte de poids et les effets métaboliques qui se produisent lors d'un OAGB. 24 minipigs femelles de Gottingen ont été répartis en 4 groupes :

- Un groupe soumis à une OAGB
- Un groupe soumis à une OAGB avec résection de l'anse biliaire
- Un groupe soumis à une chirurgie fictive
- Un groupe soumis à une chirurgie fictive avec résection de l'anse commun

La perte de poids, les changements métaboliques et les effets sur les AB plasmatiques et intestinaux ont été évalués 15 jours après la chirurgie. L'OAGB a significativement diminué le poids corporel, amélioré l'homéostasie du glucose et augmenté le GLP-1 postprandial. Le dosage des AB a été réalisé par LC-MS/MS dans le plasma, les différentes parties de l'intestin

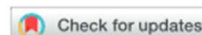
(duodénum, jéjunum, iléon, colon) ainsi que dans le contenu caecal. Il est à noter que le profil des AB chez le cochon est sensiblement différent de celui chez l'humain, notamment de par la présence majoritaire des espèces hyo-cholique (HCA) et hyodésoxy-cholique (HDCA). Cependant, après OAGB, les concentrations en AB plasmatiques à jeun ont été significativement augmentées, en corrélation avec une forte augmentation de l'expression hépatique du gène codant CYP7A1. Les espèces d'AB présentes dans l'intestin ont été modifiées qualitativement. La concentration en HCA est particulièrement élevée dans l'intestin, et le contenu caecal après OAGB, à l'inverse de la concentration en HDCA qui est fortement diminuée. La concentration en C4 plasmatique n'a pas évolué.

La résection de l'anse biliaire a limité les effets de perte de poids de l'OAGB et a atténué l'augmentation postprandiale du GLP-1. Des améliorations de l'homéostasie du glucose ainsi que des modifications des AB plasmatiques et intestinaux ont été observées après l'OAGB, quelle que soit la longueur de l'anse biliaire. La résection uniquement de l'anse commune a mené aux mêmes effets sur l'homéostasie du glucose et les modifications des AB intestinaux. Ces travaux suggèrent que les changements dans le métabolisme du glucose et des AB après l'OAGB sont principalement médiés par la longueur de l'anse commune, alors que la longueur de l'anse biliaire contribue à la perte de poids corporel.

Roux-en-Y gastric bypass induces hepatic transcriptomic signatures and plasma metabolite changes indicative of improved cholesterol homeostasis

Fanny Lalloyer^{1,†}, Denis A. Mogilenko^{1,2,†}, Ann Verrijken^{3,4}, Joel T. Haas¹, Antonin Lamazière⁵, Mostafa Kouach⁶, Amandine Descat⁶, Sandrine Caron¹, Emmanuelle Vallez¹, Bruno Derudas¹, Céline Gheeraert¹, Eric Bauge¹, Gaëtan Despres⁵, Eveline Dirinck^{3,4}, Anne Tailleur¹, David Dombrowicz¹, Luc Van Gaal^{3,4}, Jérôme Eeckhoutte¹, Philippe Lefebvre¹, Jean-François Goossens⁶, Sven Francque^{3,7}, Bart Staels^{1,*}

Journal of Hepatology 2023. vol. 79 | 898–909



Background & Aims: Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), the most effective surgical procedure for weight loss, decreases obesity and ameliorates comorbidities, such as non-alcoholic fatty liver (NAFLD) and cardiovascular (CVD) diseases. Cholesterol is a major CVD risk factor and modulator of NAFLD development, and the liver tightly controls its metabolism. How RYGB surgery modulates systemic and hepatic cholesterol metabolism is still unclear.

Methods: We studied the hepatic transcriptome of 26 patients with obesity but not diabetes before and 1 year after undergoing RYGB. In parallel, we measured quantitative changes in plasma cholesterol metabolites and bile acids (BAs).

Results: RYGB surgery improved systemic cholesterol metabolism and increased plasma total and primary BA levels. Transcriptomic analysis revealed specific alterations in the liver after RYGB, with the downregulation of a module of genes implicated in inflammation and the upregulation of three modules, one associated with BA metabolism. A dedicated analysis of hepatic genes related to cholesterol homeostasis pointed towards increased biliary cholesterol elimination after RYGB, associated with enhancement of the alternate, but not the classical, BA synthesis pathway. In parallel, alterations in the expression of genes involved in cholesterol uptake and intracellular trafficking indicate improved hepatic free cholesterol handling. Finally, RYGB decreased plasma markers of cholesterol synthesis, which correlated with an improvement in liver disease status after surgery.

Conclusions: Our results identify specific regulatory effects of RYGB on inflammation and cholesterol metabolism. RYGB alters the hepatic transcriptome signature, likely improving liver cholesterol homeostasis. These gene regulatory effects are reflected by systemic post-surgery changes of cholesterol-related metabolites, corroborating the beneficial effects of RYGB on both hepatic and systemic cholesterol homeostasis.

© 2023 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Obesity is a global epidemic, the prevalence of which continues to increase in adults and children, now affecting more than 2 billion people. Chronic obesity represents a major health challenge, since it is frequently associated with metabolic complications, such as insulin resistance and type 2 diabetes (T2D), dyslipidemia and high blood pressure, collectively called the metabolic syndrome, which leads to a reduction in life expectancy and quality.¹ Currently, bariatric surgery is the most effective option for patients with severe obesity, after the failure of behavioral and pharmacological weight-loss therapies. Bariatric surgery promotes sustained long-term weight reduction, which is associated with improvements in obesity-associated metabolic comorbidities and reduced cardiovascular mortality.^{2–4} Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is the most used and efficacious bariatric surgery technique. RYGB is a surgical procedure that creates a small pouch

from the proximal portion of the stomach, attaching it directly to the small intestine and bypassing part of the stomach and duodenum. Compared to other procedures, RYGB is among the safest with a good tolerability profile and limited complications (such as bowel obstruction, dumping syndrome, or malnutrition). This is the treatment of choice for morbid obesity as it results in long-term weight loss and impressive metabolic benefits, including a strong amelioration of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), remission of T2D, and a significant reduction of inflammation.^{5–7}

The liver is a key metabolic organ, which controls carbohydrate, lipid and amino acid metabolism, the synthesis and breakdown of proteins, the storage of vitamins and metals and xenobiotic metabolism. In addition, the liver has an excretory function through the secretion of metabolic and waste products into the biliary system, which drains into the

Keywords: Roux-en-Y gastric bypass; transcriptome; liver; cholesterol; bile acid.

Received 3 October 2022; received in revised form 18 April 2023; accepted 8 May 2023; available online 23 May 2023

* Corresponding author. Address: Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette BP245 59019 LILLE - France;

E-mail address: bart.staels@pasteur-lille.fr (B. Staels).

† These authors contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.05.012>



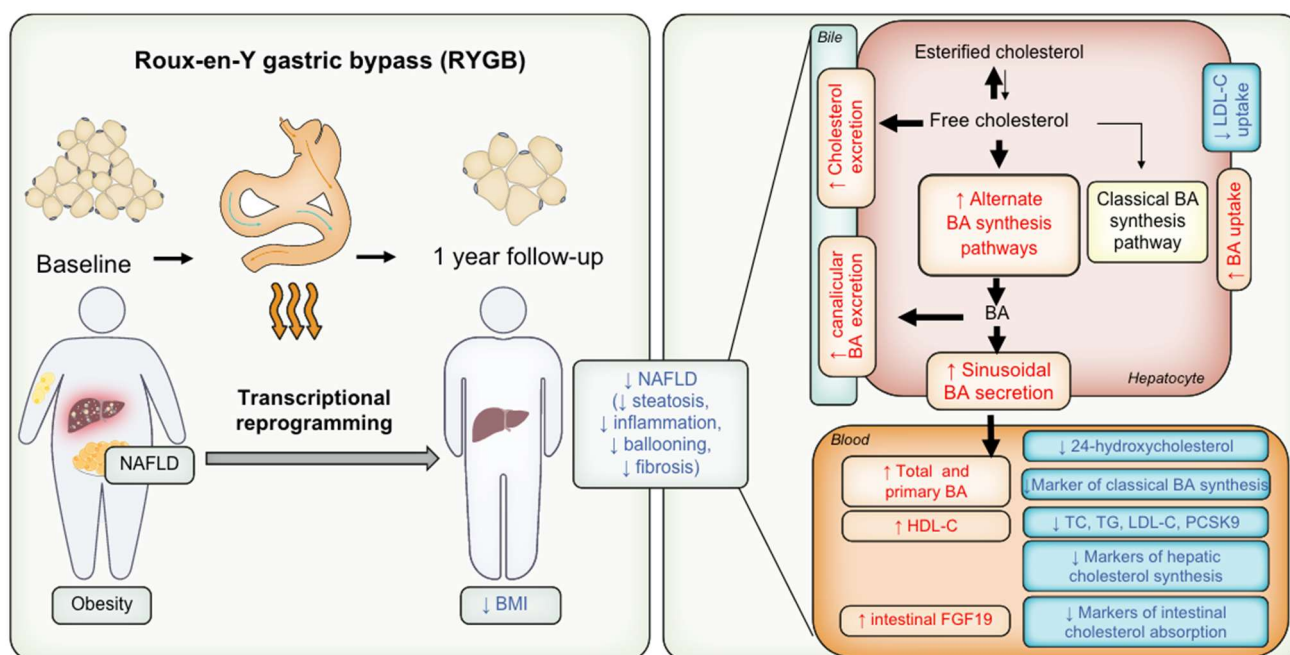


Figure 71 : Résumé graphique de la publication Lalloyer et al. (2023) Journal of Hepatology

Le Roux-en-Y (RYGB) est la procédure chirurgicale la plus efficace pour la perte de poids. Elle réduit l'obésité et améliore les comorbidités, telles que la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et les maladies cardiovasculaires (CVD). Le cholestérol est un facteur de risque majeur de CVD et un modulateur du développement de la NAFLD. Son métabolisme est étroitement contrôlé par le foie. La manière dont la chirurgie RYGB module le métabolisme systémique et hépatique du cholestérol n'est pas encore claire et le but de cette étude a été d'y apporter des éléments de réponse.

Le transcriptome hépatique de 26 patients souffrant d'obésité mais pas de diabète, avant et un an après avoir subi une RYGB, a été étudié. Ceci a été possible grâce à la réalisation d'une biopsie hépatique pour chaque patient, avant et un an après son opération. Parallèlement, les changements quantitatifs des métabolites du cholestérol plasmatique et des AB ont été mesurés, notamment à l'aide des méthodes de dosage par LC-MS/MS développées au laboratoire.

Les dosages plasmatiques ont montré une forte diminution des taux de cholestérol après chirurgie ainsi qu'une augmentation des concentrations plasmatiques en AB primaires tels que le CA, le HCA, le GHCA et le THCA. L'analyse transcriptomique a révélé des altérations spécifiques dans le foie après RYGB : (1) la diminution de l'expression d'un module de gènes appelé TAN impliqué dans l'inflammation et (2) l'augmentation de l'expression d'un module de gènes appelé GreenYellow associé au métabolisme des AB. Une analyse spécifique des gènes hépatiques liés à l'homéostasie du cholestérol a mis en évidence une augmentation de

l'élimination biliaire du cholestérol après RYGB, notamment *via* la voie alternative de biosynthèse des AB, impliquant la CYP27A1 et la CYP7B1. L'expression de la CYP7A1, enzyme impliquée dans la voie classique de biosynthèse des AB, n'est, quant à elle, pas modifiée après chirurgie. Parallèlement, les modifications de l'expression des gènes impliqués dans l'absorption du cholestérol et son trafic intracellulaire indiquent une diminution de l'accumulation du cholestérol libre dans le foie. Enfin, les concentrations des marqueurs plasmatiques de la synthèse *de novo* du cholestérol, tels que le lanostérol ou encore le desmostérol, sont fortement diminuées après opération. En résumé, la diminution de la synthèse hépatique *de novo* du cholestérol ainsi que l'accélération du catabolisme du cholestérol *via* la voie alternative de biosynthèse des AB permettent d'expliquer l'amélioration du profil métabolique des patients après RYGB.

Une amélioration du statut NAFLD a également été observée après chirurgie, en corrélation positive avec les taux de FGF19 plasmatiques et en corrélation négative avec la concentration en C4.

Ces résultats mettent en lumière les effets régulateurs spécifiques du RYGB sur l'inflammation et le métabolisme du cholestérol. Le RYGB modifie la signature du transcriptome hépatique, améliorant l'homéostasie hépatique du cholestérol. Ces effets régulateurs sur les gènes se reflètent par des changements systémiques post-opératoires des métabolites provenant du cholestérol, ce qui corrobore les effets bénéfiques du RYGB sur l'homéostasie du cholestérol à la fois hépatique et systémique, mettant en évidence l'importance de la communication inter-organes, en l'occurrence le lien intestin-foie, dans l'homéostasie métabolique.

Discussion et perspectives

Ce travail s'est articulé en deux axes. Le **premier axe de travail** a consisté en l'étude des plastifiants. Les plastifiants les plus couramment utilisés en addition au PVC sont les phtalates, largement employés dans les emballages alimentaires, les cosmétiques, les jouets et les dispositifs médicaux. Le DEHP, un ortho-phtalate, est le phtalate le plus utilisé sur le marché de par ses propriétés de plastification inégalées, mais aussi celui qui suscite le plus de préoccupations en matière de santé publique (25). En effet, son relargage est très important en présence d'une solution favorisant ce phénomène et il présente de nombreux effets néfastes sur la santé humaine. Il est classé CMR 1B depuis 2008 par UE *regulation* 1272/2008 (26) et son usage a été interdit dans les jouets et les produits de puériculture (27,28). Des plastifiants alternatifs ont alors vu le jour tels que le DINCH, un cyclohexanoate, ou encore le DEHT, un téréphtalate. Le DINCH et le DEHT sont considérés comme des plastifiants alternatifs prometteurs. Le DINCH a été introduit sur le marché en 2002 et a été largement étudié (123,294,295). Cependant, le DEHT, présent sur le marché depuis la même année, demeure peu étudié. De manière intéressante, ce plastifiant et ses métabolites n'ont pas été catégorisés comme reprotoxiques ni perturbateurs endocriniens (150) et il a été montré que le DEHT est peu irritant lors d'une exposition cutanée (148). Nous avons choisi de focaliser nos études sur le DEHP, le DEHT et leurs métabolites primaires et secondaires, rapidement formés par le foie (101).

Le **premier objectif** de cet axe d'étude a été de développer des méthodes de dosage de ces plastifiants et de leurs métabolites primaires et secondaires.

Le dosage du DEHP et de son métabolite primaire, le MEHP, a été développé en LC-MS/MS. La mise en place de la méthode s'est avérée délicate à cause de l'omniprésence du DEHP dans l'environnement. En effet, dès les premières injections, les blancs ont montré une contamination importante de l'analyse par un signal du DEHP saturant le détecteur de spectrométrie de masse. Des investigations ont été menées afin de déceler la source de cette contamination, qui s'est avérée être un relargage de DEHP par les tubulures de l'HPLC à mesure que le gradient d'élution comporte une proportion importante en solvant organique. Dans le but de s'affranchir de ce phénomène, une colonne chromatographique dite de piégeage de type C₁₈ a été mise en

place entre la chambre de mélange des solvants et l'injecteur du système LC. Cette configuration a permis de distinguer le DEHP présent dans l'échantillon du DEHP apporté par la contamination environnementale. Cette astuce technique originale a contribué à la publication d'un article scientifique dans le *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* en 2020 (296). Par la suite, plusieurs méthodes de dosage du DEHP utilisant une colonne de piégeage de type C₁₈ ont également été décrites dans la littérature (71,297).

Un des plastifiants alternatifs au DEHP, le DINCH, ainsi que son métabolite primaire, le MINCH, ont été ajoutés à cette méthode d'analyse par LC-MS/MS dans le but de pouvoir les doser en un seul run. L'élution du DINCH a été optimisée en modifiant la composition de la phase mobile et le gradient d'élution afin d'améliorer le signal (nombre de plateaux théoriques et asymétrie). Cependant, le DINCH étant un mélange complexe de produits d'hydrogénation du diisononyl benzène-1,2-dicarboxylate (DINP) (298), l'étendue de son élution n'a pu être réduite qu'à 1,5 minutes. Il en a été de même pour son métabolite primaire, qui a été élué sur une plage de 30 secondes. Malgré leur profil chromatographique inhabituel, les temps de rétention associés aux signaux du DINCH et du MINCH se sont montrés répétables (CV < 10 %, n = 10), de même que les surfaces correspondantes.

Le développement d'une analyse par LC-MS/MS d'un échantillon contenant le DEHP et de ses plastifiants alternatifs, le DEHT et son métabolite primaire, le MEHT, n'a pas abouti à un résultat satisfaisant. En effet, un signal correspondant au dimère du DEHT [2M+H]⁺ s'est avéré majoritaire, au détriment du signal du monomère du DEHT [M+H]⁺. L'instabilité de ce signal ne permet pas d'obtenir des analyses répétables. La LOQ du DEHT déterminée par LC-MS/MS est égale à 714 nM alors que celles obtenues pour le DEHP et le DINCH sont, respectivement, de 8 nM et de 0,5 nM. Cette problématique liée à l'analyse en spectrométrie de masse du DEHT est en accord avec la littérature qui fait état d'une seule publication présentant le dosage du DEHT par LC-MS/MS dans du sang total contenu dans une poche en PVC-plastifié (299), avec cependant une LOQ supérieure à 2000 nM, valeur trop élevée pour la détermination de faibles concentrations. L'analyse de ce plastifiant alternatif n'étant pas optimale en LC-MS/MS, une méthode de dosage par LC-UV a été développée, aussi bien pour l'analyse du DEHT que pour le MEHT. La LOQ obtenue pour le DEHT est 7 fois plus basse (110 nM) qu'en LC-MS/MS. La détection par UV est donc bien plus adaptée à l'analyse de ce plastifiant. Cette méthode a fait l'objet d'une publication dans *Separation Science plus* en 2022 (300).

Dans le but d'un dosage de ces plastifiants et de leurs métabolites primaires dans des produits sanguins labiles (PSL), une méthode d'extraction liquide-liquide a été développée et optimisée. Le solvant permettant l'extraction du DEHP, MEHP, DINCH et MINCH de plasma, concentré

de globules rouges (CGR), concentré plaquettaire (CP) et sang total (ST) a été un mélange heptane/acétate d'éthyle 1/2 (v/v). Le DEHT et le MEHT ont été extraits de ces matrices grâce à un mélange heptane/acétate d'éthyle 2/1 (v/v).

Ces deux méthodes de dosage, d'une part du DEHP, du DINCH et de leurs métabolites primaires par LC-MS/MS, et d'autre part du DEHT et du MEHT par LC-UV, dans des PSL ont été validées selon les critères EMA.

Afin d'approfondir l'analyse et l'étude du DEHT, une méthode de dosage des métabolites secondaires de ce plastifiant a été développée en LC-MS/MS. Cette technique a été privilégiée pour deux raisons : l'ionisation efficace en electrospray de ces métabolites et le besoin de spécificité, leurs structures chimiques étant proches. Les LOQ obtenues varient entre 0,1 et 2 nM, de 30 à 60 fois plus basses que celles présentées dans la littérature (114). Le dosage des métabolites du DEHT dans un lysat cellulaire (lignée d'hépatocytes humains HepG2) a été optimisé dans le cadre d'études *in vitro* visant à étudier les effets des plastifiants sur ces cellules, notamment sur le profil des AB. Des essais préliminaires ont été réalisés en incubant les cellules HepG2 avec le DEHT et le MEHT durant 48 h à une concentration de 50 µM et ont permis de démontrer la faisabilité du dosage du MEHT, du 5-OH-MEHT et du 5-cx-MEHT dans un lysat cellulaire.

Le second objectif de cet axe a été d'appliquer ces méthodes dans deux études portant sur l'évaluation de la migration de ces plastifiants à partir de poches de sang en PVC-DEHP, PVC-DINCH ou en PVC-DEHT. La première étude a comparé le relargage du DINCH à partir d'une poche de sang en PVC-DINCH au relargage du DEHP à partir d'une poche de sang en PVC-DEHP dans 4 PSL. Après une seule journée de stockage, il s'avère que le DINCH migre environ 8 fois moins que le DEHP, quel que soit le PSL étudié. Les concentrations relarguées dépendent cependant de la nature du PSL. En effet, les concentrations de plastifiants étaient plus élevées dans le plasma et le ST (valeurs moyennes de 48 et 7 µM pour le DEHP et le DINCH, respectivement) que dans le CGR et le CP (valeur moyenne de 17 et 2 µM pour le DEHP et le DINCH, respectivement). Le MINCH et le MEHP ont été détectés dans le plasma et le sang total, provenant potentiellement de la dégradation du plastifiant lors de la stérilisation des poches de sang (301–303). La seconde étude a permis d'évaluer le relargage du DEHT à partir de poches de sang en PVC-DEHT sur 49 jours. A J1, les concentrations en DEHT et en MEHT ont été estimées inférieures à 750 nM dans le CP et le ST. De J1 à J35, les concentrations en DEHT et en MEHT dans le plasma ont varié respectivement de 490 à 2880 nM et de 450 à 760

nM. Dans le CGR, elles ont atteint respectivement 19000 et 9000 nM. Un plateau a été observé de J35 à J49. A J1, les concentrations relarguées en DEHT dans les PSL sont bien moindres que celles en DEHP et en DINCH, ce qui souligne l'intérêt d'utiliser le DEHT comme plastifiant alternatif dans les poches de sang. Les concentrations en MEHP (15 μ M) et en MINCH (5 μ M) déterminées dans les poches, respectivement, en PVC-DEHP et PVC-DINCH, sont supérieures à celle du MEHT (450 nM) déterminée dans une poche en PVC-DEHT. Il s'agit d'un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation du DEHT comme plastifiant alternatif.

Les méthodes de dosage développées ont montré leur intérêt dans le cadre d'études de migration des plastifiants à partir de dispositifs médicaux. Elles pourront également permettre de mesurer l'exposition humaine à ces plastifiants dans différents contextes. La littérature fait état de plusieurs travaux qui étudient l'exposition de la population générale aux plastifiants présents dans la poussière, les emballages alimentaires ou encore leur lieu de vie, en dosant les métabolites urinaires de ces plastifiants (44,45,111). Mais d'autres contextes d'exposition seraient également intéressants à étudier, tels que l'hospitalisation en soins intensifs, qui mène à l'utilisation d'un grand nombre de dispositifs médicaux simultanément. Les méthodes mises en place pourraient permettre de doser les plastifiants et leurs métabolites directement dans le sang du patient hospitalisé, à l'entrée et à la sortie des soins intensifs afin d'évaluer son exposition. De manière originale, le projet IATROFEED-NEO intitulé « Exposition iatrogène des nouveau-nés par le lait maternel aux contaminants issus des dispositifs médicaux » a récemment été déposé par notre équipe de recherche ULR 7365 GRITA par le Dr Morgane Masse, afin d'étudier l'exposition des nouveau-nés aux plastifiants issus des dispositifs médicaux *via* le lait maternel de 128 femmes hospitalisées durant leur grossesse (séjour supérieur à 48 h). L'inclusion se déroulera sur 24 mois. Les dosages pourront s'effectuer directement dans le plasma et le lait maternel mais également dans les cheveux des mamans et des nouveau-nés, de manière non invasive, dans le but de mesurer leur exposition aux plastifiants. Ce projet permettra de poursuivre le développement de l'extraction des plastifiants et de leurs métabolites à partir de nouvelles matrices biologiques, qui s'annonce être un véritable challenge de par la complexité des matrices étudiées et les faibles concentrations en plastifiants attendues.

Le **deuxième axe de travail** a consisté en l'étude des acides biliaires (AB). Les AB sont synthétisés dans le foie et l'intestin et représentent la voie principale de catabolisme du cholestérol. Le C4 est un marqueur circulant de la synthèse des AB. Ces derniers jouent un rôle

essentiel dans l'absorption des lipides alimentaires mais également dans la signalisation cellulaire, étant ligands de FXR et TGR5, récepteurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose, des lipides et de la dépense énergétique. Un changement qualitatif et/ou quantitatif du profil des AB peut donc induire une modification de l'homéostasie métabolique. Des pathologies telles que l'obésité, le DT2, l'IR et la NAFLD sont associées à une modification du pool des AB chez l'humain (228,233,234,237,238).

Le premier objectif de cet axe a été de développer une méthode de dosage du C4 dans diverses matrices biologiques. Afin de disposer d'une méthode spécifique et permettant d'obtenir de faibles LOQ, l'analyse par LC-MS/MS a été privilégiée. Une méthode robuste et fiable a été développée et la LOQ a été déterminée à 0,25 nM, de 10 à 20 fois plus faible que les données de la littérature (160,279). Le dosage du C4 a pu ainsi être appliqué dans le plasma grâce à une préparation d'échantillon utilisant l'extraction en phase solide (SPE) (rendement de 88 %) et dans le lysat cellulaire (lignée d'hépatocytes humains HepG2) avec succès. Cette méthode pourra donc être utilisée pour la suite de ce projet et aussi bien lors d'études *in vivo* qu'*in vitro*.

Le deuxième objectif de cet axe a été de développer des méthodes de dosage des différentes espèces d'AB dans diverses matrices biologiques. Une première méthode de dosage par LC-MS/MS a été développée pour le dosage de 31 AB, de formes libres et conjuguées à la taurine, et la glycine, et, pour le CA, à la phénylalanine, à la tyrosine ou à la leucine. Après l'optimisation de la détection en spectrométrie de masse de chacun des AB, la difficulté de la mise en place de cette méthode a résidé dans la séparation chromatographique. En effet, la séparation de certains AB possédant des transitions MRM identiques a été difficile à obtenir. L'optimisation du gradient d'élution mais principalement celle de la composition de la phase mobile a permis de séparer de manière résolutive les espèces $\alpha/\beta/\omega$ MCA, les T $\alpha/\beta/\omega$ MCA, l'UDCA de l'HDCA, le TUDCA du THDCA et le GUDCA du GHDCA sur une phase stationnaire de type C₁₈. L'acide cholique (CA) conjugué à la phénylalanine, la tyrosine et la leucine sont des AB minoritaires conjugués dans l'intestin et peu étudiés jusqu'à maintenant (151,170). Cependant, leurs concentrations augmentent dans un contexte d'inflammation sévère et leur dosage pourrait apporter des informations précieuses lors de futures études. Les LOQ obtenues pour chacun des AB sont comprises entre 0,3 et 10,2 nM, comparables à celle décrites dans la littérature (156,164). La méthode a été validée pour le dosage dans deux matrices biologiques (plasma et lait maternel) en termes de spécificité, de fidélité et de justesse. L'extraction des AB a été optimisée dans diverses matrices biologiques dans le but de permettre

leur dosage dans différentes cohortes et contextes physiopathologiques. Les AB ont pu être extraits à partir de plasma par précipitation de protéines avec des rendements d'extraction supérieurs à 91 %. L'extraction en phase solide (SPE) a permis d'extraire les AB du foie, du contenu caecal et des urines avec des rendements d'extraction respectivement supérieurs à 73 %, 84 % et 87 %. De manière originale et novatrice, les AB ont pu être dosés dans du lysat cellulaire (lignée d'hépatocytes humains HepG2) avec succès mais également dans du lait maternel grâce à une extraction liquide-liquide menant à des rendements d'extraction d'environ 70 %. Ce dernier développement a fait l'objet d'un article qui est en cours de soumission. Les AB présents dans cette matrice n'ont été que très peu décrits (283,287,289) mais peuvent mener à une meilleure compréhension de la mise en place du cycle enterohépatique et de la régulation de l'homéostasie métabolique chez le nouveau-né par l'apport maternel.

Deux AB dérivés du LCA, le 3-oxo-LCA et l'isoallo-LCA, n'ont pas pu être intégrés à la méthode précédemment développée. En effet, leurs masses molaires et leurs propriétés physico-chimiques étant très proches de celles du LCA, les conditions chromatographiques mises en place n'ont pas permis une séparation résolutive et une identification exacte de ces AB. Une deuxième méthode de dosage par LC-MS/MS a donc été développée spécifiquement pour l'analyse de ces deux AB minoritaires, synthétisés dans l'intestin et impliqués dans la régulation de la différenciation et de l'activité de cellules immuno-inflammatoires intestinales (152,153). La séparation chromatographique de l'isoallo-LCA et du LCA, deux isomères, a nécessité l'utilisation d'une phase stationnaire de type F5 et d'une phase mobile acide composée d'un mélange de méthanol et d'acétonitrile. Les LOQ obtenues grâce à cette méthode sont égales à 3 nM (isoallo-LCA) et 1 nM (3-oxo-LCA). Ces AB ont déjà été détectés dans le cecum chez la souris et dans les fèces chez l'humain à des concentrations très faibles, de l'ordre d'une dizaine de pmol/mg (152,153). Une méthode d'extraction à partir de contenu caecal a donc été développée spécifiquement pour ces deux AB. Malgré de nombreux essais d'extraction par SPE ou encore Hybrid-SPE, la présence d'un bruit de fond très élevé (1×10^6 coups/sec) pour chacune des transitions pseudo-MRM a demeuré constant malgré nos différents essais, ne permettant pas la visualisation des signaux des deux AB d'intérêt dans la matrice. Plusieurs pistes sont encore à l'étude actuellement afin d'améliorer leur extraction : l'ajout d'une étape de dérivation lors de la préparation des échantillons, la réduction du bruit de fond grâce à la fragmentation des ions précurseurs *via* un autre type de cellule de collision (appareillage de type Q-Orbitrap) ou encore l'utilisation de la mobilité ionique (appareillage de type TIMS-QTOF). Ces pistes me permettront d'élargir mon champ d'expertise par l'utilisation d'autres types de spectromètres de masse.

Le dernier objectif de cet axe a été d'appliquer ces méthodes de dosage dans différents contextes de la maladie cardiométabolique. Les méthodes d'analyses développées pour le dosage du C4 et des AB ont permis de contribuer à la réalisation d'une étude préclinique chez le minipig et de trois études cliniques. Ces travaux se sont placés dans le contexte de la maladie cardiométabolique, étudiant la chirurgie de l'obésité, le diabète de type 2 et la NASH et ont fait l'objet de quatre publications. Chez l'humain, le dosage des AB peut permettre d'associer profil d'AB et physiopathologie, bien qu'il soit complexe d'établir s'ils sont acteurs dans le processus de la pathogenèse ou biomarqueurs. Chez l'animal, chez qui il est possible de réaliser des études interventionnelles, leur dosage participe à l'élucidation de mécanismes moléculaires.

Perspectives

Les méthodes d'analyse développées pour la quantification des plastifiants et des AB ont été validées et appliquées dans des études précliniques et cliniques. Les outils analytiques développés durant ce travail de thèse permettent d'ouvrir des perspectives originales d'étude, notamment l'étude des potentiels effets des phtalates sur l'homéostasie métabolique *via* la régulation du métabolisme des AB. Ce projet est sous-tendu par les arguments suivants :

1/ L'homéostasie métabolique est altérée par les perturbateurs endocriniens - Il est décrit que le métabolisme humain, notamment l'homéostasie du cholestérol, peut être modifié par les perturbateurs endocriniens. Chez le rongeur, des études ont montré que l'exposition au DEHP par voie intrapéritonéale à une dose de 500 mg / kg de poids corporel / jour favorise l'accumulation du cholestérol hépatique en perturbant son homéostasie (116). Des corrélations positives ont été montrées entre concentrations urinaires en métabolites du DEHP et prédisposition à l'obésité (143,144) au DT2 (84), à l'IR (146) et aux NAFLD (115). Étant donné l'implication potentielle du DEHP dans ces pathologies, qui sont associées à une modification du pool des AB chez l'humain, il est légitime de s'interroger sur l'impact direct de ce plastifiant et du plastifiant alternatif étudié, le DEHT, sur le métabolisme des AB.

2/ L'impact des plastifiants sur le métabolisme des AB pourrait passer par PPAR α - Des données de la littérature ont montré que l'homéostasie du cholestérol est perturbée par l'exposition au DEHP *via* son activité sur PPAR α et une diminution de l'expression du gène codant la CYP7A1, enzyme majeure de la synthèse hépatique des AB (116,117) et gène cible de PPAR α . Des essais préliminaires de transfection transitoire réalisés au laboratoire ont confirmé que le métabolite primaire du DEHP est un agoniste de h-PPAR α , MEHP (EC₅₀ =

9,35 μM). Nos essais ont également montré que le MEHT, métabolite primaire du DEHT, est aussi un agoniste de h-PPAR α ($\text{EC}_{50} = 80 \mu\text{M}$). Les deux métabolites, MEHP et MEHT, pourraient ainsi moduler l'expression d'un de ses gènes cibles, la CYP7A1, et par conséquent, moduler le profil des AB produits par le foie et présents dans la circulation sanguine.

3/ L'impact des plastifiant sur le métabolisme des AB pourrait passer par FXR - L'étude récente menée par *Zhen et al.* chez des rats suggère que l'exposition au DEHP par gavage à une dose de 0,5 mg / kg de poids corporel / jour altère l'homéostasie du cholestérol *via* FXR, inhibant l'expression de la CYP7A1 (gène cible de FXR) et réduisant la conversion du cholestérol en AB (304). Il serait donc également intéressant de déterminer l'activité des plastifiants et de leurs métabolites sur FXR, par des tests de transfection transitoire.

Les effets de plastifiants et de leurs métabolites sur le métabolisme hépatique des AB sera étudié *in vitro* dans des modèles expérimentaux tels que des lignées cellulaires murines ou humaines (un premier essai a été réalisé dans des cellules HepG2), des hépatocytes primaires ou encore des organoïdes de foie. Les cellules seront incubées avec les plastifiants et/ou leurs métabolites. Grâce aux méthodes développées dans ce travail de thèse, les plastifiants et leurs métabolites seront dosés dans les lysats cellulaires. Des étapes d'optimisation (dose-réponses, cinétique sur 6, 12, 24, 48 et 72 h) seront nécessaires afin de déterminer les conditions expérimentales optimales. En parallèle du dosage des plastifiants et leurs métabolites dans ces lysats cellulaires, il sera intéressant de doser également les AB, grâce aux méthodes développées dans ce travail de thèse, et d'étudier l'éventuelle variation de leur pool en fonction de la cinétique et de la concentration d'incubation des plastifiants. En parallèle de ces dosages (plastifiants et AB), les mécanismes moléculaires seront déterminés par l'analyse d'expression des gènes codant les enzymes du métabolisme des AB (par QCPR ou par analyse transcriptomique). L'implication de PPAR α et/ou FXR dans ces processus sera étudiée en reproduisant les expériences dans les modèles cellulaires invalidés ou non pour PPAR α et FXR.

L'ensemble de ce travail de thèse et de ses perspectives contribueront à améliorer la compréhension a /des mécanismes moléculaires sous-tendant les effets délétères des phtalates, b/ des effets des AB dans la physiopathologie de la maladie cardio-métabolique, et c/ des effets conjoints des phtalates et des AB dans la régulation de l'homéostasie métabolique, et permettront d'ouvrir des perspectives thérapeutiques dans un problème de santé publique majeur.

Bibliographie

1. Rhodes CJ. Plastic Pollution and Potential Solutions. Sci Prog. 1 sept 2018;101(3):207-60.
2. Plastics - the Facts 2022 • Plastics Europe [Internet]. Plastics Europe. [cité 26 avr 2023]. Disponible sur: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022-2/>
3. Classification des matières plastiques- Version 2- Avril 2019 – INRS - Recherche Google [Internet]. [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Classification+des+matie%CC%80res+plastiques-+Version+2-+Avril+2019+%E2%80%93+INRS>
4. Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 27 juill 2009;364(1526):2097-113.
5. Hahladakis JN, Velis CA, Weber R, Iacovidou E, Purnell P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. J Hazard Mater. 15 févr 2018;344:179-99.
6. Les additifs- Version 2- Avril 2019- INRS - Recherche Google [Internet]. [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=Les+additifs-+Version+2-+Avril+2019-+INRS&client=firefox-b-d&ei=SalaZNfeNtCbkdUP6LmksAY&ved=0ahUKEwiXp4-Nhun-AhXQTaQEHegeCWYQ4dUDCA4&uact=5&oq=Les+additifs-+Version+2-+Avril+2019-+INRS&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQAzIFCAAQogQyBQgAEKIEMgUIABCiBDIFCAAQogQ6CggAEecQ1gQQsANKBAhBGABQ9gNY9gNg1QVoAXABeACAAZYBiAGWAZIBAzAuMZgBAKABAqABAcgBCMABAQ&sclient=gws-wiz-serp
7. Campanale C, Massarelli C, Savino I, Locaputo V, Uricchio VF. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. Int J Environ Res Public Health. janv 2020;17(4):1212.
8. Aurisano N, Huang L, Milà i Canals L, Jolliet O, Fantke P. Chemicals of concern in plastic toys. Environ Int. 1 janv 2021;146:106194.
9. 14:00-17:00. ISO. [cité 26 avr 2023]. ISO 472:2013. Disponible sur: <https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/04/41/44102.html>

10. Techniques de l'Ingénieur [Internet]. [cité 26 avr 2023]. Plastifiants. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/adjuvants-des-plastiques-42138210/plastifiants-a3231/>
11. Bui TT, Giovanoulis G, Cousins AP, Magnér J, Cousins IT, de Wit CA. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *Sci Total Environ*. 15 janv 2016;541:451-67.
12. Plasticisers - Information Center [Internet]. [cité 26 avr 2023]. Home. Disponible sur: <https://www.plasticisers.org/>
13. Eljezi T. Synthèse des métabolites des plastifiants présents dans les dispositifs médicaux pour évaluation de leur cytotoxicité et de l'exposition des patients en chirurgie cardiaque [Internet] [These de doctorat]. Université Clermont Auvergne (2017-2020); 2019 [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2019CLFAS028>
14. Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(7):899-911.
15. Šimunović A, Tomić S, Kranjčec K. Medical devices as a source of phthalate exposure: a review of current knowledge and alternative solutions. *Arch Ind Hyg Toxicol*. 1 sept 2022;73(3):179-90.
16. Eljezi TB. Synthèse des métabolites des plastifiants présents dans les dispositifs médicaux pour évaluation de leur cytotoxicité et de l'exposition des patients en chirurgie cardiaque.
17. Godwin A. Plasticizers. In: *Applied Plastics Engineering Handbook*. 2000. p. 157-75.
18. Rahman M, Brazel CS. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Prog Polym Sci*. 1 déc 2004;29(12):1223-48.
19. Testai E, Epstein M, Emri I, Hartemann P, Hoet P, Leitgeb N, et al. The safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk (2015 update). *Regul Toxicol Pharmacol*. 1 avr 2016;76:209-10.
20. Bourdeaux D, Yessaad M, Chennell P, Larbre V, Eljezi T, Bernard L, et al. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS. *J Pharm Biomed Anal*. 25 janv 2016;118:206-13.
21. RÈGLEMENT (UE) 2017/ 745 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL - du 5 avril 2017 - relatif aux dispositifs médicaux, modifiant la directive 2001/ 83/ CE, le règlement (CE) no 178/ 2002 et le règlement (CE) no 1223/ 2009 et abrogeant les directives du Conseil 90/ 385/ CEE et 93/ 42/ CEE.
22. Règlement (UE) no 10/2011 de la Commission du 14 janvier 2011 concernant les

matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

23. Bernard L, Cueff R, Breyse C, Décaudin B, Sautou V. Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. *Int J Pharm.* 15 mai 2015;485(1):341-7.
24. Huang S, Qi Z, Ma S, Li G, Long C, Yu Y. A critical review on human internal exposure of phthalate metabolites and the associated health risks. *Environ Pollut.* 15 juin 2021;279:116941.
25. Chang WH, Herianto S, Lee CC, Hung H, Chen HL. The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *Sci Total Environ.* 10 sept 2021;786:147371.
26. Règlement (CE) n o 1272/2008 du Parlement européen et du Con... - EUR-Lex [Internet]. [cité 7 mai 2023]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/FR/legal-content/summary/classification-packaging-and-labelling-of-chemical-substances-and-mixtures.html>
27. Eckert E, Müller J, Höllerer C, Purbojo A, Cesnjevar R, Göen T, et al. Plasticizer exposure of infants during cardiac surgery. *Toxicol Lett.* 15 sept 2020;330:7-13.
28. COMMISSION REGULATION (EU) 2018/ 2005 - of 17 December 2018 - amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907 / 2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP), benzyl butyl phthalate (BBP) and diisobutyl phthalate (DIBP).
29. Den Braver-Sewradj SP, Piersma A, Hessel EVS. An update on the hazard of and exposure to diethyl hexyl phthalate (DEHP) alternatives used in medical devices. *Crit Rev Toxicol.* 13 sept 2020;50(8):650-72.
30. De Jong WH, De Jong WH, Borges T, Ion RM, Panagiotakos D, Testai E, et al. Guidelines on the benefit-risk assessment of the presence of phthalates in certain medical devices covering phthalates which are carcinogenic, mutagenic, toxic to reproduction (CMR) or have endocrine-disrupting (ED) properties. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1 mars 2020;111:104546.
31. Thelliez A. Évaluation de l'impact des plastifiants du PVC sur la sécurité et la performance des dispositifs médicaux destinés à la collecte, la préparation et le stockage des produits sanguins labiles [Internet] [These de doctorat]. Université de Lille (2022-....); 2022 [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2022ULILS005>
32. Genay S, Feutry F, Masse M, Barthélémy C, Sautou V, Odou P, et al. Identification and

quantification by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of seven plasticizers in PVC medical devices. *Anal Bioanal Chem.* 1 févr 2017;409(5):1271-80.

33. Fernandez-Canal C, Pinta PG, Eljezi T, Larbre V, Kauffmann S, Camilleri L, et al. Patients' exposure to PVC plasticizers from ECMO circuits. *Expert Rev Med Devices.* 4 mai 2018;15(5):377-83.

34. Eckert E, Münch F, Göen T, Purbojo A, Müller J, Cesnjevar R. Comparative study on the migration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and tri-2-ethylhexyl trimellitate (TOTM) into blood from PVC tubing material of a heart-lung machine. *Chemosphere.* 1 févr 2016;145:10-6.

35. Gosetti F, Bolfi B, Robotti E, Manfredi M, Binotti M, Ferrero F, et al. Study of endocrine disrupting compound release from different medical devices through an on-line SPE UHPLC-MS/MS method. *Anal Chim Acta.* 26 déc 2018;1042:141-54.

36. Bernard L, Eljezi T, Clauson H, Lambert C, Bouattour Y, Chennell P, et al. Effects of flow rate on the migration of different plasticizers from PVC infusion medical devices. *PLoS ONE.* 23 févr 2018;13(2):e0192369.

37. Sasakawa S, Mitomi Y. Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) Content of Blood or Blood Components Stored in Plastic Bags. *Vox Sang.* 1978;34(2):81-6.

38. Katsikantami I, Sifakis S, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kalantzi OI, Tsatsakis AM, et al. A global assessment of phthalates burden and related links to health effects. *Environ Int.* 1 déc 2016;97:212-36.

39. Keresztes S, Tatár E, Czégény Z, Záray G, Mihucz VG. Study on the leaching of phthalates from polyethylene terephthalate bottles into mineral water. *Sci Total Environ.* août 2013;458-460:451-8.

40. Bernard L, Cueff R, Chagnon Mc, Abdoulouhab F, Décaudin B, Breyse C, et al. Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. *Int J Pharm.* oct 2015;494(1):136-45.

41. echa 2014 plasticizers - Recherche Google [Internet]. [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=echa+2014+plasticizers&client=firefox-b-d&ei=HLdaZPfhJYStkdUPh52kqAQ&ved=0ahUKEwj338Gkk-n-AhWEVqQEHYcOCUUQ4dUDCA4&uact=5&oq=echa+2014+plasticizers&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQAzIFCCEQoAE6CggAEecQ1gQQsAM6BAghEBU6BwghEKABEApKB AhBGABQhgZYlRVg7hhoAnABeACAAWmIAf4GkgEEMTEuMZgBAKABAcgBAsABA Q&scient=gws-wiz-serp

42. Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism

and internal exposure – an update and latest results1. *Int J Androl*. 2006;29(1):155-65.

43. Becker K, Güen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuß H, Müller J, et al. GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health*. 1 nov 2009;212(6):685-92.

44. Tang S, He C, Thai P, Vijayasathay S, Mackie R, Toms LML, et al. Concentrations of phthalate metabolites in Australian urine samples and their contribution to the per capita loads in wastewater. *Environ Int*. 1 avr 2020;137:105534.

45. Zhang X, Tang S, Qiu T, Hu X, Lu Y, Du P, et al. Investigation of phthalate metabolites in urine and daily phthalate intakes among three age groups in Beijing, China. *Environ Pollut*. 1 mai 2020;260:114005.

46. Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, Malek NA, Reidy JA, Needham LL, et al. Quantitative Detection of Eight Phthalate Metabolites in Human Urine Using HPLC–APCI–MS/MS. *Anal Chem*. 1 sept 2000;72(17):4127-34.

47. Herrero L, Calvarro S, Fernández MA, Quintanilla-López JE, González MJ, Gómara B. 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. *Anal Chim Acta*. 1 janv 2015;853:625-36.

48. Hartmann C, Uhl M, Weiss S, Koch HM, Scharf S, König J. Human biomonitoring of phthalate exposure in Austrian children and adults and cumulative risk assessment. *Int J Hyg Environ Health*. 1 juill 2015;218(5):489-99.

49. Lu S, Yang D, Ge X, Li L, Zhao Y, Li C, et al. The internal exposure of phthalate metabolites and bisphenols in waste incineration plant workers and the associated health risks. *Environ Int*. 1 déc 2020;145:106101.

50. Cirillo T, Fasano E, Castaldi E, Montuori P, Amodio Cocchieri R. Children's Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate and Dibutylphthalate Plasticizers from School Meals. *J Agric Food Chem*. 12 oct 2011;59(19):10532-8.

51. Fu X, Du Q. Uptake of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate of Vegetables from Plastic Film Greenhouses. *J Agric Food Chem*. 9 nov 2011;59(21):11585-8.

52. Fierens T, Servaes K, Van Holderbeke M, Geerts L, De Henauw S, Sioen I, et al. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food Chem Toxicol*. 1 juill 2012;50(7):2575-83.

53. Alp AC, Yerlikaya P. Phthalate ester migration into food: effect of packaging material and time. *Eur Food Res Technol*. mars 2020;246(3):425-35.

54. Kim S, Lee J, Park J, Kim HJ, Cho G, Kim GH, et al. Concentrations of phthalate

metabolites in breast milk in Korea: Estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. *Sci Total Environ.* mars 2015;508:13-9.

55. Khatri P, Desai D, Shelke N, Minko T. Role of plasticizer in membrane coated extended release oral drug delivery system. *J Drug Deliv Sci Technol.* avr 2018;44:231-43.

56. Sathyanarayana S. Phthalates and Children's Health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 1 févr 2008;38(2):34-49.

57. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What Are the Sources of Exposure to Eight Frequently Used Phthalic Acid Esters in Europeans? *Risk Anal.* 2006;26(3):803-24.

58. Qu M, Wang L, Liu F, Zhao Y, Shi X, Li S. Characteristics of dust-phase phthalates in dormitory, classroom, and home and non-dietary exposure in Beijing, China. *Environ Sci Pollut Res.* 1 juill 2021;28(28):38159-72.

59. Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, Alkylphenols, Pesticides, Polybrominated Diphenyl Ethers, and Other Endocrine-Disrupting Compounds in Indoor Air and Dust. *Environ Sci Technol.* 1 oct 2003;37(20):4543-53.

60. Teil MJ, Moreau-Guigon E, Blanchard M, Alliot F, Gasperi J, Cladière M, et al. Endocrine disrupting compounds in gaseous and particulate outdoor air phases according to environmental factors. *Chemosphere.* 1 mars 2016;146:94-104.

61. Xia M, Ouyang X, Wang X, Shen X, Zhan Y. Occupational exposure assessment of phthalate esters in indoor and outdoor microenvironments. *J Environ Sci.* 1 oct 2018;72:75-88.

62. Koch HM, Lorber M, Christensen KLY, Pälme C, Koslitz S, Brüning T. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: Results of a 48h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *Int J Hyg Environ Health.* 1 nov 2013;216(6):672-81.

63. Health Care Without Harm [Internet]. 2013 [cité 7 mai 2023]. Summary of the FDA Safety Assessment of DEHP Released from PVC Medical Devices: What it Says, What's Next. Disponible sur: <https://noharm-uscanada.org/documents/summary-fda-safety-assessment-dehp-released-pvc-medical-devices-what-it-says-what%E2%80%99s-next>

64. Hubinger JC. A survey of phthalate esters in consumer cosmetic products. *J Cosmet Sci.* 2010;61(6):457-65.

65. Koniecki D, Wang R, Moody RP, Zhu J. Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure. *Environ Res.* 1 avr 2011;111(3):329-36.

66. Tang Z, Chai M, Cheng J, Wang Y, Huang Q. Occurrence and Distribution of Phthalates

in Sanitary Napkins from Six Countries: Implications for Women's Health. *Environ Sci Technol*. 3 déc 2019;53(23):13919-28.

67. Viñas P, Campillo N, Pastor-Belda M, Oller A, Hernández-Córdoba M. Determination of phthalate esters in cleaning and personal care products by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 9 janv 2015;1376:18-25.

68. Guo Y, Kannan K. A Survey of Phthalates and Parabens in Personal Care Products from the United States and Its Implications for Human Exposure. *Environ Sci Technol*. 17 déc 2013;47(24):14442-9.

69. Gong M, Weschler CJ, Zhang Y. Impact of Clothing on Dermal Exposure to Phthalates: Observations and Insights from Sampling Both Skin and Clothing. *Environ Sci Technol*. 19 avr 2016;50(8):4350-7.

70. Poitou K. Les plastifiants dans les gants à usage professionnel : de l'analyse de leur composition à l'évaluation de leur toxicité endothéliale par une approche in vitro [Internet] [These de doctorat]. Normandie; 2022 [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2022NORMR036>

71. Poitou K, Rogez-Florent T, Lecoœur M, Danel C, Regnault R, Vérité P, et al. Analysis of Phthalates and Alternative Plasticizers in Gloves by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–UV Detection: A Comparative Study. *Toxics*. sept 2021;9(9):200.

72. Inoue K, Kawaguchi M, Yamanaka R, Higuchi T, Ito R, Saito K, et al. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin Chim Acta*. août 2005;358(1-2):159-66.

73. Guo Y, Kannan K. Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Anal Bioanal Chem*. 1 nov 2012;404(9):2539-54.

74. Tsochatzis ED, Tzimou-Tsitouridou R, Gika HG. Analytical Methodologies for the Assessment of Phthalate Exposure in Humans. *Crit Rev Anal Chem*. 4 juill 2017;47(4):279-97.

75. Chen M, Tao L, Collins EM, Austin C, Lu C. Simultaneous determination of multiple phthalate metabolites and bisphenol-A in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 1 sept 2012;904:73-80.

76. Calafat AM, Slakman AR, Silva MJ, Herbert AR, Needham LL. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *J Chromatogr B*. juin 2004;805(1):49-56.

77. Servaes K, Voorspoels S, Lievens J, Noten B, Allaerts K, Van De Weghe H, et al. Direct

analysis of phthalate ester biomarkers in urine without preconcentration: Method validation and monitoring. *J Chromatogr A*. 14 juin 2013;1294:25-32.

78. Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson AM. Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol*. 1 sept 2010;34(7):400-10.

79. Myridakis A, Balaska E, Gkaitatzi C, Kouvarakis A, Stephanou EG. Determination and separation of bisphenol A, phthalate metabolites and structural isomers of parabens in human urine with conventional high-pressure liquid chromatography combined with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 1 mars 2015;407(9):2509-18.

80. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol*. 1 juill 2005;79(7):367-76.

81. Mazzeo P, Pasquale DD, Ruggieri F, Fanelli M, D'Archivio AA, Carlucci G. HPLC with diode-array detection for the simultaneous determination of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in seminal plasma. *Biomed Chromatogr*. 2007;21(11):1166-71.

82. Anderson WAC, Barnes KA, Castle L, Damant AP, Scotter MJ. Determination of isotopically labelled monoesterphthalates in urine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*. 10 sept 2002;127(9):1193-7.

83. Monfort N, Ventura R, Balcells G, Segura J. Determination of five di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in urine by UPLC-MS/MS, markers of blood transfusion misuse in sports. *J Chromatogr B*. 1 nov 2012;908:113-21.

84. Kim M, Song NR, Choi JH, Lee J, Pyo H. Simultaneous analysis of urinary phthalate metabolites of residents in Korea using isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Sci Total Environ*. 1 févr 2014;470-471:1408-13.

85. Elliani R, Naccarato A, Malacaria L, Tagarelli A. A rapid method for the quantification of urinary phthalate monoesters: A new strategy for the assessment of the exposure to phthalate ester by solid-phase microextraction with gas chromatography and tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2020;43(15):3061-73.

86. Colón I, Dimandja JMD. High-throughput analysis of phthalate esters in human serum by direct immersion SPME followed by isotope dilution-fast GC/MS. *Anal Bioanal Chem*. 1 sept 2004;380(2):275-83.

87. Mousa A, Basheer C, Rahman Al-Arfaj A. Application of electro-enhanced solid-phase microextraction for determination of phthalate esters and bisphenol A in blood and seawater

samples. *Talanta*. 15 oct 2013;115:308-13.

88. Kondo F, Ikai Y, Hayashi R, Okumura M, Takatori S, Nakazawa H, et al. Determination of Five Phthalate Monoesters in Human Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1 juill 2010;85(1):92-6.

89. Silva MJ, Samandar E, Preau JL, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B*. 1 déc 2007;860(1):106-12.

90. Kato K, Silva MJ, Brock JW, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, et al. Quantitative Detection of Nine Phthalate Metabolites in Human Serum Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol*. 1 juill 2003;27(5):284-9.

91. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B*. 25 janv 2003;784(1):169-82.

92. Preuss R, Koch HM, Angerer J. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 25 févr 2005;816(1):269-80.

93. Irvin EA, Calafat AM, Silva MJ, Aguilar-Villalobos M, Needham LL, Hall DB, et al. An estimate of phthalate exposure among pregnant women living in Trujillo, Peru. *Chemosphere*. 1 sept 2010;80(11):1301-7.

94. Takatori S, Kitagawa Y, Kitagawa M, Nakazawa H, Hori S. Determination of di-(2-ethylhexyl)phthalate and mono-(2-ethylhexyl)phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 25 mai 2004;804(2):397-401.

95. Nakazawa H, Iwasaki Y, Ito R. Analytical Methods for the Quantification of Bisphenol A, Alkylphenols, Phthalate Esters, and Perfluorinated Chemicals in Biological Samples. *Anal Sci*. janv 2014;30(1):25-30.

96. Qureshi MS, Yusoff AR bin M, Wirzal MDH, Barek J, Afridi HI, Üstündag Z. Methods for the Determination of Endocrine-Disrupting Phthalate Esters. *Crit Rev Anal Chem*. 3 mars 2016;46(2):146-59.

97. Tkalec Ž, Codling G, Tratnik JS, Mazej D, Klánová J, Horvat M, et al. Suspect and non-targeted screening-based human biomonitoring identified 74 biomarkers of exposure in urine of Slovenian children. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 15 nov 2022;313:120091.

98. EU RISK ASSESSMENT.

99. PEC32-Diethylhexyl-phthalate-DEHP.pdf [Internet]. [cité 15 mai 2023]. Disponible

sur: <https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/PEC32-Diethylhexyl-phthalate-DEHP.pdf>

100. Diisononyl phthalate. Sydney, N.S.W., Sydney, NSW: National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme; 2012.
101. Adamo C, Antignac JP, Auger J, Balaguer P, Bourc'his D, Bujan L, et al. Reproduction et environnement.
102. Dostal LA, Weaver RP, Schwetz BA. Transfer of di(2-ethylhexyl) phthalate through rat milk and effects on milk composition and the mammary gland. *Toxicol Appl Pharmacol.* déc 1987;91(3):315-25.
103. Höllerer C, Becker G, Göen T, Eckert E. Human metabolism and kinetics of tri-(2-ethylhexyl) trimellitate (TEHTM) after oral administration. *Arch Toxicol.* 1 sept 2018;92(9):2793-807.
104. Schütze A, Otter R, Modick H, Langsch A, Brüning T, Koch HM. Additional oxidized and alkyl chain breakdown metabolites of the plasticizer DINCH in urine after oral dosage to human volunteers. *Arch Toxicol.* 1 janv 2017;91(1):179-88.
105. Silva MJ, Samandar E, Ye X, Calafat AM. In Vitro Metabolites of Di-2-ethylhexyl Adipate (DEHA) as Biomarkers of Exposure in Human Biomonitoring Applications. *Chem Res Toxicol.* 21 oct 2013;26(10):1498-502.
106. Silva MJ, Samandar E, Preau JL, Needham LL, Calafat AM. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology.* 15 févr 2006;219(1):22-32.
107. Daniel JW, Bratt H. The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology.* 1 mars 1974;2(1):51-65.
108. Barber ED. Genetic toxicology testing of di(2-ethylhexyl) terephthalate. *Environ Mol Mutagen.* 1994;23(3):228-33.
109. McKee RH, El-Hawari M, Stoltz M, Pallas F, Lington AW. Absorption, disposition and metabolism of di-isononyl phthalate (DINP) in F-344 rats. *J Appl Toxicol.* 2002;22(5):293-302.
110. Silva MJ, Reidy JA, Preau JL, Needham LL, Calafat AM. Oxidative Metabolites of Diisononyl Phthalate as Biomarkers for Human Exposure Assessment. *Environ Health Perspect.* août 2006;114(8):1158-61.
111. Lessmann F, Correia-Sá L, Calhau C, Domingues VF, Weiss T, Brüning T, et al. Exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHTP) in Portuguese children – Urinary metabolite levels and estimated daily intakes. *Environ Int.* 1 juill 2017;104:25-32.
112. Koch HM, Müller J, Angerer J. Determination of secondary, oxidised di-iso-

nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers. *J Chromatogr B*. 1 mars 2007;847(2):114-25.

113. Koch HM, Schütze A, Pälme C, Angerer J, Brüning T. Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH®) in humans after single oral doses. *Arch Toxicol*. mai 2013;87(5):799-806.

114. Lessmann F, Schütze A, Weiss T, Langsch A, Otter R, Brüning T, et al. Metabolism and urinary excretion kinetics of di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHTP) in three male volunteers after oral dosage. *Arch Toxicol*. juill 2016;90(7):1659-67.

115. Milošević N, Milanović M, Sudji J, Bosić Živanović D, Stojanoski S, Vuković B, et al. Could phthalates exposure contribute to the development of metabolic syndrome and liver disease in humans? *Environ Sci Pollut Res*. 1 janv 2020;27(1):772-84.

116. Zhao JF, Hsiao SH, Hsu MH, Pao KC, Kou YR, Shyue SK, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arch Toxicol*. 1 janv 2016;90(1):181-90.

117. Ito Y, Kamijima M, Nakajima T. Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced toxicity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a review. *Environ Health Prev Med*. déc 2019;24(1):47.

118. Maloney EK, Waxman DJ. trans-Activation of PPAR α and PPAR γ by Structurally Diverse Environmental Chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*. déc 1999;161(2):209-18.

119. Hurst CH, Waxman DJ. Activation of PPAR and PPAR by Environmental Phthalate Monoesters. *Toxicol Sci*. 1 août 2003;74(2):297-308.

120. Yu Z, Shi Z, Zheng Z, Han J, Yang W, Lu R, et al. DEHP induce cholesterol imbalance via disturbing bile acid metabolism by altering the composition of gut microbiota in rats. *Chemosphere*. janv 2021;263:127959.

121. Toxicity Review of DEHA.pdf [Internet]. [cité 20 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.cpsc.gov/s3fs-public/Toxicity%20Review%20of%20DEHA.pdf>

122. Chen XH, Ma L, Hu YX, Wang DX, Fang L, Li XL, et al. Transcriptome profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by tris (2-ethylhexyl) trimellitate (TOTM) in mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1 janv 2016;41:62-71.

123. Eljezi T, Pinta P, Richard D, Pinguet J, Chezal JM, Chagnon MC, et al. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere*. 1 avr 2017;173:452-9.

124. Bernard L, Bailleau M, Eljezi T, Chennell P, Souweine B, Lautrette A, et al. How does continuous venovenous hemofiltration theoretically expose (ex-vivo models) inpatients to

diethylhexyladipate, a plasticizer of PVC medical devices? *Chemosphere*. 1 juill 2020;250:126241.

125. Barber ED, Topping DC. Subchronic 90-day oral toxicology of Di(2-ethylhexyl) terephthalate in the rat. *Food Chem Toxicol*. nov 1995;33(11):971-8.

126. Chen J, Zhou X, Zhang H, Liu Y, Cao C, Dong R, et al. Association between urinary concentration of phthalate metabolites and impaired renal function in Shanghai adults. *Environ Pollut*. 1 févr 2019;245:149-62.

127. Vasconcelos AL, Silva MJ, Louro H. In vitro exposure to the next-generation plasticizer diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH): cytotoxicity and genotoxicity assessment in human cells. *J Toxicol Environ Health A*. 3 mai 2019;82(9):526-36.

128. Morgenstern R, Whyatt RM, Insel BJ, Calafat AM, Liu X, Rauh VA, et al. Phthalates and thyroid function in preschool age children: Sex specific associations. *Environ Int*. 1 sept 2017;106:11-8.

129. Huang HB, Pan WH, Chang JW, Chiang HC, Guo YL, Jaakkola JJK, et al. Does exposure to phthalates influence thyroid function and growth hormone homeostasis? The Taiwan Environmental Survey for Toxicants (TEST) 2013. *Environ Res*. 1 févr 2017;153:63-72.

130. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between Urinary Phthalate and Bisphenol A Concentrations and Serum Thyroid Measures in U.S. Adults and Adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007–2008. *Environ Health Perspect*. oct 2011;119(10):1396-402.

131. Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect*. févr 2003;111(2):139-45.

132. Campioli E, Duong TB, Deschamps F, Papadopoulos V. Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue. *Environ Res*. juill 2015;140:145-56.

133. Engel A, Buhrke T, Kasper S, Behr AC, Braeuning A, Jessel S, et al. The urinary metabolites of DINCH® have an impact on the activities of the human nuclear receptors ER α , ER β , AR, PPAR α and PPAR γ . *Toxicol Lett*. 1 mai 2018;287:83-91.

134. Bloom MS, Whitcomb BW, Chen Z, Ye A, Kannan K, Buck Louis GM. Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population. *Hum Reprod Oxf Engl*. nov 2015;30(11):2645-57.

135. Kim JH, Kim SH. Exposure to Phthalate Esters and the Risk of Endometriosis. *Dev Reprod*. 2020;24(2):71-8.

136. Ku HY, Tsai TL, Wang PL, Su PH, Sun CW, Wang CJ, et al. Prenatal and childhood phthalate exposure and attention deficit hyperactivity disorder traits in child temperament: A 12-year follow-up birth cohort study. *Sci Total Environ*. 10 janv 2020;699:134053.
137. Engel SM, Villanger GD, Nethery RC, Thomsen C, Sakhi AK, Drover SSM, et al. Prenatal Phthalates, Maternal Thyroid Function, and Risk of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the Norwegian Mother and Child Cohort. *Environ Health Perspect*. 10 mai 2018;126(5):057004.
138. van den Dries MA, Guxens M, Spaan S, Ferguson KK, Philips E, Santos S, et al. Phthalate and Bisphenol Exposure during Pregnancy and Offspring Nonverbal IQ. *Environ Health Perspect*. 27 juill 2020;128(7):077009.
139. Bekö G, Callesen M, Weschler CJ, Toftum J, Langer S, Sigsgaard T, et al. Phthalate exposure through different pathways and allergic sensitization in preschool children with asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic dermatitis. *Environ Res*. 1 févr 2015;137:432-9.
140. Ku HY, Su PH, Wen HJ, Sun HL, Wang CJ, Chen HY, et al. Prenatal and Postnatal Exposure to Phthalate Esters and Asthma: A 9-Year Follow-Up Study of a Taiwanese Birth Cohort. *PLoS ONE*. 13 avr 2015;10(4):e0123309.
141. Zhang S hui, Shen Y xin, Li L, Fan T tong, Wang Y, Wei N. Phthalate exposure and high blood pressure in adults: a cross-sectional study in China. *Environ Sci Pollut Res*. 1 juin 2018;25(16):15934-42.
142. Su TC, Hwang JJ, Sun CW, Wang SL. Urinary phthalate metabolites, coronary heart disease, and atherothrombotic markers. *Ecotoxicol Environ Saf*. 30 mai 2019;173:37-44.
143. Hatch EE, Nelson JW, Qureshi MM, Weinberg J, Moore LL, Singer M, et al. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999–2002. *Environ Health*. 3 juin 2008;7:27.
144. Buser MC, Murray HE, Scinicariello F. Age and sex differences in childhood and adulthood obesity association with phthalates: Analyses of NHANES 2007–2010. *Int J Hyg Environ Health*. 1 juill 2014;217(6):687-94.
145. Kim SH, Park MJ. Phthalate exposure and childhood obesity. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 30 juin 2014;19(2):69-75.
146. Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH. Concentrations of Urinary Phthalate Metabolites Are Associated with Increased Waist Circumference and Insulin Resistance in Adult U.S. Males. *Environ Health Perspect*. juin 2007;115(6):876-82.
147. Kim JH, Park HY, Bae S, Lim YH, Hong YC. Diethylhexyl Phthalates Is Associated

with Insulin Resistance via Oxidative Stress in the Elderly: A Panel Study. PLoS ONE. 19 août 2013;8(8):e71392.

148. Registration Dossier - ECHA [Internet]. [cité 20 mai 2023]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/15238/7/4/2>

149. David RM, Lockhart LK, Ruble KM. Lack of sensitization for trimellitate, phthalate, terephthalate and isobutyrate plasticizers in a human repeated insult patch test. Food Chem Toxicol. 1 avr 2003;41(4):589-93.

150. Danish EPA. 2014. Alternatives to classified phthalates in medical devices. Environmental Project no. 1557. - Recherche Google [Internet]. [cité 9 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Danish+EPA.+2014.+Alternatives+to+classified+phthalates+in+medical+devices.+Environmental+Project+no.+1557.>

151. Quinn RA. Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations. 2020;22.

152. Song X, Sun X, Oh SF, Wu M, Zhang Y, Zheng W, et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ + regulatory T cell homeostasis. Nature. 16 janv 2020;577(7790):410-5.

153. Hang S, Paik D, Yao L, Kim E, Trinath J, Lu J, et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. Nature. 5 déc 2019;576(7785):143-8.

154. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. Physiol Rev. janv 2009;89(1):147-91.

155. Spinelli V, Lalloyer F, Baud G, Osto E, Kouach M, Daoudi M, et al. Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans. Int J Obes. août 2016;40(8):1260-7.

156. García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. J Lipid Res. oct 2012;53(10):2231-41.

157. Zwicker BL, Agellon LB. Transport and biological activities of bile acids. Int J Biochem Cell Biol. 1 juill 2013;45(7):1389-98.

158. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. World J Gastroenterol. 2009;15(7):804.

159. Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Gastroenterology. mai 2017;152(7):1679-1694.e3.

160. Kang L, Connolly TM, Weng N, Jian W. LC-MS/MS quantification of 7 α -hydroxy-4-

cholesten-3-one (C4) in rat and monkey plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 oct 2017;1064:49-55.

161. Russell DW. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu Rev Biochem.* juin 2003;72(1):137-74.

162. Chiang JYL. Bile acids: regulation of synthesis: Thematic Review Series: Bile Acids. *J Lipid Res.* 1 oct 2009;50(10):1955-66.

163. Norlin M, Toll A, Björkhem I, Wikvall K. 24-Hydroxycholesterol is a substrate for hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A). *J Lipid Res.* 1 oct 2000;41(10):1629-39.

164. Humbert L, Maubert MA, Wolf C, Duboc H, Mahé M, Farabos D, et al. Bile acid profiling in human biological samples: Comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. *J Chromatogr B.* juin 2012;899:135-45.

165. Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diasio RB. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem.* juill 1994;269(30):19375-9.

166. Alnouti Y. Bile Acid Sulfation: A Pathway of Bile Acid Elimination and Detoxification. *Toxicol Sci.* avr 2009;108(2):225-46.

167. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* 1 févr 2006;47(2):241-59.

168. Stellwag EJ, Hylemon PB. 7 α -Dehydroxylation of cholic acid and chenodeoxycholic acid by *Clostridium leptum*. *J Lipid Res.* mars 1979;20(3):325-33.

169. Batta AK, Salen G, Arora R, Shefer S, Batta M, Person A. Side chain conjugation prevents bacterial 7-dehydroxylation of bile acids. *J Biol Chem.* juill 1990;265(19):10925-8.

170. Fu T, Huan T, Rahman G, Zhi H, Xu Z, Oh TG, et al. Paired microbiome and metabolome analyses associate bile acid changes with colorectal cancer progression. *Cell Rep* [Internet]. 29 août 2023 [cité 8 oct 2023];42(8). Disponible sur: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(23\)01008-2](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(23)01008-2)

171. Devlin AS, Fischbach MA. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat Chem Biol.* sept 2015;11(9):685-90.

172. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. *Nature.* juill 2012;487(7405):104-8.

173. Dietschy JM. Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. *J Lipid Res.* mai 1968;9(3):297-309.

174. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation [Internet].

[cité 13 juill 2023]. Disponible sur:
<https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/physrev.00027.2002>

175. Kullak-ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 1 janv 2004;126(1):322-42.
176. Ballatori N, Li N, Fang F, Boyer JL, Christian WV, Hammond CL. OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Front Biosci-Landmark*. 1 janv 2009;14(8):2829-44.
177. Meier PJ, Stieger B. Bile Salt Transporters. *Annu Rev Physiol*. 2002;64(1):635-61.
178. Mi LZ, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R, Willson TM, et al. Structural Basis for Bile Acid Binding and Activation of the Nuclear Receptor FXR. *Mol Cell*. 1 avr 2003;11(4):1093-100.
179. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science*. 21 mai 1999;284(5418):1362-5.
180. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, et al. Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science*. 21 mai 1999;284(5418):1365-8.
181. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids *. *J Biol Chem*. 14 mars 2003;278(11):9435-40.
182. Campana G, Pasini P, Roda A, Spampinato S. Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: Role of the farnesoid X receptor. *Biochem Pharmacol*. 15 juin 2005;69(12):1755-63.
183. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, et al. Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab*. 5 févr 2013;17(2):225-35.
184. Mueller M, Thorell A, Claudel T, Jha P, Koefeler H, Lackner C, et al. Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity. *J Hepatol*. 1 juin 2015;62(6):1398-404.
185. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metab*. 7 mai 2013;17(5):657-69.
186. Chiang JY, Stroup D. Identification and characterization of a putative bile acid-responsive element in cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene promoter. *J Biol Chem*. juill 1994;269(26):17502-7.
187. Stroup D, Crestani M, Chiang JY. Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene CYP7A. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*

[Internet]. 1 août 1997 [cité 13 juill 2023]; Disponible sur: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1997.273.2.G508>

188. Zhang M, Chiang JYL. Transcriptional Regulation of the Human Sterol 12 α -Hydroxylase Gene (CYP8B1): ROLES OF HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4 α IN MEDIATING BILE ACID REPRESSION *. *J Biol Chem*. 9 nov 2001;276(45):41690-9.
189. Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK, et al. Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase Gene Induction by Bile Acid Activated Farnesoid X Receptor *. *J Biol Chem*. 9 nov 2001;276(45):42549-56.
190. Gnerre C, Blättler S, Kaufmann MR, Looser R, Meyer UA. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the: CYP3A4: gene. *Pharmacogenet Genomics*. oct 2004;14(10):635.
191. Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo YY, et al. A Pathway Involving Farnesoid X Receptor and Small Heterodimer Partner Positively Regulates Hepatic Sirtuin 1 Levels via MicroRNA-34a Inhibition *. *J Biol Chem*. 23 avr 2010;285(17):12604-11.
192. Song KH, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang JYL. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology*. janv 2009;49(1):297-305.
193. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted Disruption of the Nuclear Receptor FXR/BAR Impairs Bile Acid and Lipid Homeostasis. *Cell*. 15 sept 2000;102(6):731-44.
194. Lambert G, Amar MJA, Guo G, Brewer HB, Gonzalez FJ, Sinal CJ. The Farnesoid X-receptor Is an Essential Regulator of Cholesterol Homeostasis *. *J Biol Chem*. 24 janv 2003;278(4):2563-70.
195. Cariou B, Harmelen K van, Duran-Sandoval D, Dijk TH van, Grefhorst A, Abdelkarim M, et al. The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice *. *J Biol Chem*. 21 avr 2006;281(16):11039-49.
196. Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor. *Mol Endocrinol*. 1 févr 2003;17(2):259-72.
197. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, et al. Glucose Regulates the Expression of the Farnesoid X Receptor in Liver. *Diabetes*. 1 avr 2004;53(4):890-8.
198. Dijk TH van, Grefhorst A, Oosterveer MH, Bloks VW, Staels B, Reijngoud DJ, et al. An Increased Flux through the Glucose 6-Phosphate Pool in Enterocytes Delays Glucose

Absorption in Fxr^{-/-} Mice *. J Biol Chem. 17 avr 2009;284(16):10315-23.

199. TRABELSI MS, DAOUDI M, PRAWITT J, DUCASTEL S, TOUCHE V, SAYIN SI, et al. Farnesoid X Receptor Inhibits Glucagon-Like Peptide-1 Production by Enteroendocrine L-cells. Nat Commun. 2 juill 2015;6:7629.

200. Lien F, Berthier A, Bouchaert E, Gheeraert C, Alexandre J, Porez G, et al. Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk. J Clin Invest. 3 mars 2014;124(3):1037-51.

201. Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, et al. Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR): Berrabah et al. Hepatology. mai 2014;59(5):2022-33.

202. Zhong M. TGR5 as a therapeutic target for treating obesity. Curr Top Med Chem. 2010;10(4):386-96.

203. Keitel V, Häussinger D. TGR5 in the Biliary Tree. Dig Dis. 17 juin 2011;29(1):45-7.

204. Portincasa P, Di Ciaula A, Wang HH, Palasciano G, van Erpecum KJ, Moschetta A, et al. Coordinate regulation of gallbladder motor function in the gut-liver axis. Hepatol Baltim Md. juin 2008;47(6):2112-26.

205. Keitel V, Reich M, Häussinger D. TGR5: Pathogenetic Role and/or Therapeutic Target in Fibrosing Cholangitis? Clin Rev Allergy Immunol. 1 juin 2015;48(2):218-25.

206. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. - Universit#233; de Lille [Internet]. [cité 18 juill 2023]. Disponible sur: <https://lillocat.univ-lille.fr>

207. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. Biochem Biophys Res Commun. 1 avr 2005;329(1):386-90.

208. Kumar DP, Rajagopal S, Mahavadi S, Mirshahi F, Grider JR, Murthy KS, et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. Biochem Biophys Res Commun. 26 oct 2012;427(3):600-5.

209. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, et al. Serum Bile Acids Are Higher in Humans With Prior Gastric Bypass: Potential Contribution to Improved Glucose and Lipid Metabolism. Obesity. 2009;17(9):1671-7.

210. Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Häussinger D. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. Biochem Biophys Res Commun. 18 juill 2008;372(1):78-84.

211. Cipriani S, Mencarelli A, Chini MG, Distrutti E, Renga B, Bifulco G, et al. The Bile

Acid Receptor GPBAR-1 (TGR5) Modulates Integrity of Intestinal Barrier and Immune Response to Experimental Colitis. PLOS ONE. 27 oct 2011;6(10):e25637.

212. Zhang YKJ, Guo GL, Klaassen CD. Diurnal Variations of Mouse Plasma and Hepatic Bile Acid Concentrations as well as Expression of Biosynthetic Enzymes and Transporters. PLOS ONE. 8 févr 2011;6(2):e16683.

213. Gälman C, Angelin B, Rudling M. Bile Acid Synthesis in Humans Has a Rapid Diurnal Variation That Is Asynchronous With Cholesterol Synthesis. Gastroenterology. 1 nov 2005;129(5):1445-53.

214. Steiner C, Othman A, Saely CH, Rein P, Drexel H, von Eckardstein A, et al. Bile Acid Metabolites in Serum: Intraindividual Variation and Associations with Coronary Heart Disease, Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus. PLoS ONE. 14 nov 2011;6(11):e25006.

215. Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JYL. Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. J Lipid Res. 1 nov 1998;39(11):2192-200.

216. Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HMG. Fibrates Suppress Bile Acid Synthesis via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Mediated Downregulation of Cholesterol 7 α -Hydroxylase and Sterol 27-Hydroxylase Expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 2001;21(11):1840-5.

217. Bass J, Takahashi JS. Circadian Integration of Metabolism and Energetics. Science. 3 déc 2010;330(6009):1349-54.

218. Pathak P, Li T, Chiang JYL. Retinoic Acid-related Orphan Receptor α Regulates Diurnal Rhythm and Fasting Induction of Sterol 12 α -Hydroxylase in Bile Acid Synthesis *. J Biol Chem. 27 déc 2013;288(52):37154-65.

219. Martelot GL, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, Sasso GL, et al. REV-ERB α Participates in Circadian SREBP Signaling and Bile Acid Homeostasis. PLOS Biol. 1 sept 2009;7(9):e1000181.

220. Gälman C, Angelin B, Rudling M. Pronounced variation in bile acid synthesis in humans is related to gender, hypertriglyceridaemia and circulating levels of fibroblast growth factor 19. J Intern Med. 2011;270(6):580-8.

221. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis. Mol Cell. 1 sept 2000;6(3):517-26.

222. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. Cell

Metab. 1 oct 2005;2(4):217-25.

223. Sun W, Zhang D, Wang Z, Sun J, Xu B, Chen Y, et al. Insulin Resistance is Associated With Total Bile Acid Level in Type 2 Diabetic and Nondiabetic Population: A Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore)*. mars 2016;95(10):e2778.

224. Ginos BNR, Navarro SL, Schwarz Y, Gu H, Wang D, Randolph TW, et al. Circulating bile acids in healthy adults respond differently to a dietary pattern characterized by whole grains, legumes and fruits and vegetables compared to a diet high in refined grains and added sugars: A randomized, controlled, crossover feeding study. *Metab - Clin Exp*. 1 juin 2018;83:197-204.

225. Chávez-Talavera O, Haas J, Grzych G, Tailleux A, Staels B. Bile acid alterations in nonalcoholic fatty liver disease, obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: what do the human studies tell? *Curr Opin Lipidol*. juin 2019;30(3):244-54.

226. Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W, et al. Hepatic Insulin Resistance Directly Promotes Formation of Cholesterol Gallstones. *Nat Med*. juill 2008;14(7):778-82.

227. Li H, Xia X, Xue Y, Tang S, Xiao X, Li J, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. juill 2012;900:59-63.

228. Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S, Accili D, Ferrannini E. Human Insulin Resistance Is Associated With Increased Plasma Levels of 12 α -Hydroxylated Bile Acids. *Diabetes*. 16 nov 2013;62(12):4184-91.

229. Kaur A, Patankar JV, de Haan W, Ruddie P, Wijesekara N, Groen AK, et al. Loss of Cyp8b1 Improves Glucose Homeostasis by Increasing GLP-1. *Diabetes*. 22 oct 2014;64(4):1168-79.

230. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. 15 nov 2002;298(5):714-9.

231. Lew JL, Zhao A, Yu J, Huang L, Pedro N de, Peláez F, et al. The Farnesoid X Receptor Controls Gene Expression in a Ligand- and Promoter-selective Fashion *. *J Biol Chem*. 2 mars 2004;279(10):8856-61.

232. Brufau G, Stellaard F, Prado K, Bloks VW, Jonkers E, Boverhof R, et al. Improved glycemic control with colesevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatol Baltim Md*. oct 2010;52(4):1455-64.

233. Vincent RP, Omar S, Ghozlan S, Taylor DR, Cross G, Sherwood RA, et al. Higher

circulating bile acid concentrations in obese patients with type 2 diabetes. *Ann Clin Biochem.* 1 juill 2013;50(4):360-4.

234. Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, Roesch SL, Petrick AT, Gabrielsen J, et al. A Role for Fibroblast Growth Factor 19 and Bile Acids in Diabetes Remission After Roux-en-Y Gastric Bypass. *Diabetes Care.* juill 2013;36(7):1859-64.

235. Sonne DP, van Nierop FS, Kulik W, Soeters MR, Vilsbøll T, Knop FK. Postprandial Plasma Concentrations of Individual Bile Acids and FGF-19 in Patients With Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 août 2016;101(8):3002-9.

236. Boursier J, Diehl AM. Implication of Gut Microbiota in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS Pathog.* 27 janv 2015;11(1):e1004559.

237. Prinz P, Hofmann T, Ahnis A, Elbelt U, Goebel-Stengel M, Klapp BF, et al. Plasma bile acids show a positive correlation with body mass index and are negatively associated with cognitive restraint of eating in obese patients. *Front Neurosci* [Internet]. 2015 [cité 23 juill 2023];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00199>

238. Haeusler RA, Camastra S, Nannipieri M, Astiarraga B, Castro-Perez J, Xie D, et al. Increased Bile Acid Synthesis and Impaired Bile Acid Transport in Human Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2016;101(5):1935-44.

239. Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the Microbiota. *Gastroenterology.* 1 mai 2009;136(5):1476-83.

240. Deweerdt S. Microbiome: A complicated relationship status. *Nature.* avr 2014;508(7496):S61-3.

241. Friedrich D, Marschall HU, Lammert F. Response of fibroblast growth factor 19 and bile acid synthesis after a body weight-adjusted oral fat tolerance test in overweight and obese NAFLD patients: a non-randomized controlled pilot trial. *BMC Gastroenterol.* 4 juin 2018;18:76.

242. Spinelli V, Lalloyer F, Baud G, Osto E, Kouach M, Daoudi M, et al. Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans. *Int J Obes.* août 2016;40(8):1260-7.

243. Steinert RE, Peterli R, Keller S, Meyer-Gerspach AC, Drewe J, Peters T, et al. Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery: A 1-year prospective randomized pilot trial. *Obesity.* 2013;21(12):E660-8.

244. Lalloyer F, Mogilenko DA, Verrijken A, Haas JT, Lamazière A, Kouach M, et al. Roux-en-Y gastric bypass induces hepatic transcriptomic signatures and plasma metabolite changes indicative of improved cholesterol homeostasis. *J Hepatol.* mai 2023;S0168827823003410.

245. Puri P, Daita K, Joyce A, Mirshahi F, Santhekadur PK, Cazanave S, et al. THE PRESENCE AND SEVERITY OF NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS IS ASSOCIATED WITH SPECIFIC CHANGES IN CIRCULATING BILE ACIDS. *Hepatology*. Baltimore Md. févr 2018;67(2):534-48.
246. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma Metabolomic Profile in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism*. mars 2011;60(3):404-13.
247. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. nov 2015;60(11):3318-28.
248. Jiao N, Baker SS, Chapa-Rodriguez A, Liu W, Nugent CA, Tsompana M, et al. Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut*. 1 oct 2018;67(10):1881-91.
249. Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson D, Reily MD, et al. Decreased Hepatotoxic Bile Acid Composition and Altered Synthesis in Progressive Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 avr 2013;268(2):132-40.
250. Tacke F, Puengel T, Loomba R, Friedman SL. An integrated view of anti-inflammatory and antifibrotic targets for the treatment of NASH. *J Hepatology*. août 2023;79(2):552-66.
251. Yamazaki M, Miyake M, Sato H, Masutomi N, Tsutsui N, Adam KP, et al. Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 avr 2013;268(1):79-89.
252. Lieu T, Jayaweera G, Zhao P, Poole DP, Jensen D, Grace M, et al. The Bile Acid Receptor TGR5 Activates the TRPA1 Channel to Induce Itch in Mice. *Gastroenterology*. 1 déc 2014;147(6):1417-28.
253. Li T, Jahan A, Chiang JYL. Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene via the JNK/c-Jun pathway. *Hepatology*. Baltimore Md. juin 2006;43(6):1202-10.
254. Sarafian MH, Lewis MR, Pechlivanis A, Ralphs S, McPhail MJW, Patel VC, et al. Bile Acid Profiling and Quantification in Biofluids Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 6 oct 2015;87(19):9662-70.
255. Zhang GH, Cong AR, Xu GB, Li CB, Yang RF, Xia TA. An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 31 déc 2004;326(1):87-92.
256. VandenHeuvel WJA, Sweeley CC, Horning EC. Microanalytical separations by gas chromatography in the sex hormone and bile acid series. *Biochem Biophys Res Commun*. juill

1960;3(1):33-6.

257. Street JM, Setchell KDR. Chromatographic methods for bile acid analysis. *Biomed Chromatogr.* 1987;2(6):229-41.

258. Batta AK, Salen G, Rapole KR, Batta M, Batta P, Alberts D, et al. Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. *J Lipid Res.* juin 1999;40(6):1148-54.

259. Griffiths WJ, Sjövall J. Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *J Lipid Res.* 1 janv 2010;51(1):23-41.

260. Yamaga N, Ikebuchi J, Kohara H, Ogura Y, Yamada K. Analysis of Bile Acids in Urine Specimens from Healthy Humans: Determination of Several Bile Acids with β -Hydroxyl and Carbonyl Groups. *J Biochem (Tokyo).* 1 avr 1996;119(4):725-30.

261. Kimura A, Suzuki M, Murai T, Inoue T, Kato H, Hori D, et al. Perinatal bile acid metabolism: analysis of urinary bile acids in pregnant women and newborns. *J Lipid Res.* oct 1997;38(10):1954-62.

262. Kumar BS, Chung BC, Lee YJ, Yi HJ, Lee BH, Jung BH. Gas chromatography–mass spectrometry-based simultaneous quantitative analytical method for urinary oxysterols and bile acids in rats. *Anal Biochem.* 15 janv 2011;408(2):242-52.

263. Alnouti Y, Csanaky IL, Klaassen CD. Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC–MS/MS. *J Chromatogr B.* oct 2008;873(2):209-17.

264. Li Y, Zhang X, Chen J, Feng C, He Y, Shao Y, et al. Targeted metabolomics of sulfated bile acids in urine for the diagnosis and grading of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Genes Dis.* déc 2018;5(4):358-66.

265. Krautbauer S, Liebisch G. LC-MS/MS Analysis of Bile Acids. In: Giera M, éditeur. *Clinical Metabolomics: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 [cité 24 juill 2023]. p. 103-10. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7592-1_8

266. Plumb RS, Rainville PD, Potts WBI, Johnson KA, Gika E, Wilson ID. Application of Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry to Profiling Rat and Dog Bile. *J Proteome Res.* 1 mai 2009;8(5):2495-500.

267. Hagio M, Matsumoto M, Fukushima M, Hara H, Ishizuka S. Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS³. *J Lipid Res.* 1 janv 2009;50(1):173-80.

268. Hamilton JP, Xie G, Raufman JP, Hogan S, Griffin TL, Packard CA, et al. Human cecal

bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* juill 2007;293(1):G256-63.

269. SUZUKI Y, KANEKO R, NOMURA M, NAITO H, KITAMORI K, NAKAJIMA T, et al. SIMPLE AND RAPID QUANTITATION OF 21 BILE ACIDS IN RAT SERUM AND LIVER BY UPLC-MS-MS: EFFECT OF HIGH FAT DIET ON GLYCINE CONJUGATES OF RAT BILE ACIDS. *Nagoya J Med Sci.* févr 2013;75(1-2):57-72.

270. Cai X, Liu Y, Zhou X, Navaneethan U, Shen B, Guo B. An LC-ESI-MS method for the quantitative analysis of bile acids composition in fecal materials. *Biomed Chromatogr.* 2012;26(1):101-8.

271. Bobeldijk I, Hekman M, de Vries-van der Weij J, Coulier L, Ramaker R, Kleemann R, et al. Quantitative profiling of bile acids in biofluids and tissues based on accurate mass high resolution LC-FT-MS: Compound class targeting in a metabolomics workflow. *J Chromatogr B.* 15 août 2008;871(2):306-13.

272. Burkard I, von Eckardstein A, Rentsch KM. Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 5 nov 2005;826(1-2):147-59.

273. Qiao X, Ye M, Liu C fang, Yang W zhi, Miao W juan, Dong J, et al. A tandem mass spectrometric study of bile acids: Interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers. *Steroids.* 1 févr 2012;77(3):204-11.

274. Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B.* 1 déc 2007;860(1):10-7.

275. Han J, Liu Y, Wang R, Yang J, Ling V, Borchers CH. Metabolic Profiling of Bile Acids in Human and Mouse Blood by LC–MS/MS in Combination with Phospholipid-Depletion Solid-Phase Extraction. *Anal Chem.* 20 janv 2015;87(2):1127-36.

276. Laurenzana EM, Coslo DM, Vigilar MV, Roman AM, Omiecinski CJ. Activation of the Constitutive Androstane Receptor by Monophthalates. *Chem Res Toxicol.* 17 oct 2016;29(10):1651-61.

277. Huq SW, Lomas S. Effective Sample Preparation and LC-MS/MS Analysis of Unconjugated Bile Acids from Human Serum.

278. Trass M, Lomas S. Methoxybenzene Isomers Separation Using a Kinetex® F5 Core-Shell LC Column.

279. Steiner C, von Eckardstein A, Rentsch KM. Quantification of the 15 major human bile acids and their precursor 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in serum by liquid chromatography–

tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. oct 2010;878(28):2870-80.

280. Yang T, Shu T, Liu G, Mei H, Zhu X, Huang X, et al. Quantitative profiling of 19 bile acids in rat plasma, liver, bile and different intestinal section contents to investigate bile acid homeostasis and the application of temporal variation of endogenous bile acids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1 sept 2017;172:69-78.

281. Zheng X, Huang F, Zhao A, Lei S, Zhang Y, Xie G, et al. Bile acid is a significant host factor shaping the gut microbiome of diet-induced obese mice. *BMC Biol*. 14 déc 2017;15(1):120.

282. Xie G, Wang Y, Wang X, Zhao A, Chen T, Ni Y, et al. Profiling of Serum Bile Acids in a Healthy Chinese Population Using UPLC–MS/MS. *J Proteome Res*. 6 févr 2015;14(2):850-9.

283. Forsyth JS, Ross PE, Bouchier IAD. Bile salts in breast milk. *Eur J Pediatr*. avr 1983;140(2):126-7.

284. Forsyth JS, Donnet L, Ross PE. A Study of the Relationship between Bile Salts, Bile Salt-Stimulated Lipase, and Free Fatty Acids in Breast Milk: Normal Infants and Those with Breast Milk Jaundice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. août 1990;11(2):205-10.

285. Balistreri WF. Immaturity of Hepatic Excretory Function and the Ontogeny of Bile Acid Metabolism: *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1983;2:207-14.

286. Miller R, Lowe ME. Carboxyl Ester Lipase from Either Mother's Milk or the Pancreas Is Required for Efficient Dietary Triglyceride Digestion in Suckling Mice ., *J Nutr*. mai 2008;138(5):927-30.

287. Blazquez AMG, Macias RIR, Cives-Losada C, de la Iglesia A, Marin JJG, Monte MJ. Lactation during cholestasis: Role of ABC proteins in bile acid traffic across the mammary gland. *Sci Rep* [Internet]. déc 2017 [cité 15 févr 2019];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-06315-8>

288. Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S, Nikolopoulou E, Briz O, Owen BM, Nikolova V, et al. Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring [Internet]. 2013 [cité 15 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/68927/pdf>

289. Brites D, Rodriguez CMP. Elevated levels of bile acids in colostrum of patients with cholestasis of pregnancy are decreased following ursodeoxycholic acid therapy. *J Hepatol*. nov 1998;29(5):743-51.

290. Cho SH, Park JA, Zheng W, Abd El-Aty AM, Kim SK, Choi JM, et al. Quantification of bupivacaine hydrochloride and isoflupredone acetate residues in porcine muscle, beef, milk, egg, shrimp, flatfish, and eel using a simplified extraction method coupled with liquid

chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* oct 2017;1065-1066:29-34.

291. Legry V, Francque S, Haas JT, Verrijken A, Caron S. Bile Acid Alterations Are Associated With Insulin Resistance, but Not With NASH, in Obese Subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;

292. Zheng X, Chen T, Jiang R, Zhao A, Wu Q, Kuang J, et al. Hyocholic acid species improve glucose homeostasis through a distinct TGR5 and FXR signaling mechanism. *Cell Metab.* avr 2021;33(4):791-803.e7.

293. Makki K, Brolin H, Petersen N, Henricsson M, Christensen DP, Khan MT, et al. 6 α -hydroxylated bile acids mediate TGR5 signalling to improve glucose metabolism upon dietary fiber supplementation in mice. *Gut.* févr 2023;72(2):314-24.

294. Dumont LJ, Baker S, Dumont DF, Herschel L, Waters S, Calcagni K, et al. Exploratory in vitro study of red blood cell storage containers formulated with an alternative plasticizer. *Transfusion (Paris).* 2012;52(7):1439-45.

295. Morishita Y, Nomura Y, Fukui C, Kawakami T, Ikeda T, Mukai T, et al. Pilot study on novel blood containers with alternative plasticizers for red cell concentrate storage. *PLOS ONE.* 28 sept 2017;12(9):e0185737.

296. Descat A, Lecoecur M, Kouach M, Goossens L, Thelliez A, Odou P, et al. Simultaneous determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and diisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylate and their monoester metabolites in four labile blood products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* mars 2020;181:113063.

297. Hu A, Qiu M, Liu H, Xu Y, Tao Y, Yang G, et al. Simultaneous determination of phthalate diesters and monoesters in soil using accelerated solvent extraction and ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* août 2020;1626:461347.

298. Dziwiński EJ, Poźniak BP, Lach J. GC/MS and ESI/MS identification of the new generation plasticizers - cis and trans isomers of some 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid di(n- and isononyl) esters. *Polym Test.* sept 2017;62:319-24.

299. Graminske S, Puca K, Schmidt A, Brooks S, Boerner A, Heldke S, et al. In vitro evaluation of di(2-ethylhexyl)terephthalate–plasticized polyvinyl chloride blood bags for red blood cell storage in AS-1 and PAGGSM additive solutions. *Transfusion (Paris).* 2018;58(5):1100-7.

300. Thelliez A. High-performance liquid chromatography–ultraviolet detection method to evaluate the migration of di(2-ethylhexyl) terephthalate and its metabolite from polyvinyl

chloride bag in four labile blood products. 5(3-4):65-74.

301. Ito R, Seshimo F, Miura N, Kawaguchi M, Saito K, Nakazawa H. Effect of sterilization process on the formation of mono(2-ethylhexyl)phthalate from di(2-ethylhexyl)phthalate. J Pharm Biomed Anal. 3 mai 2006;41(2):455-60.

302. Ito R, Miura N, Ushiro M, Kawaguchi M, Nakamura H, Iguchi H, et al. Effect of gamma-ray irradiation on degradation of di(2-ethylhexyl)phthalate in polyvinyl chloride sheet. Int J Pharm. 6 juill 2009;376(1):213-8.

303. Haishima Y, Isama K, Hasegawa C, Yuba T, Matsuoka A. A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration. J Biomed Mater Res A. 2013;101A(9):2630-43.

304. Yu Z, Shi Z, Zheng Z, Han J, Yang W, Lu R, et al. DEHP induce cholesterol imbalance via disturbing bile acid metabolism by altering the composition of gut microbiota in rats. Chemosphere. janv 2021;263:127959.

inn

Résumé

Ce travail de thèse s'articule autour de deux axes :

1/ Les plastifiants, y compris les phtalates, ont été identifiés comme cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques (CMR) de catégorie 1b et comme perturbateurs endocriniens. Le di-2-éthylhexyle phtalate (DEHP) est l'un des plastifiants les plus courants et est généralement associé au polychlorure de vinyle (PVC) dans les dispositifs médicaux. Le DEHP n'étant pas lié de manière covalente au PVC, il peut facilement migrer dans des matrices lipophiles et atteindre ensuite la circulation sanguine. Il est métabolisé par le foie en mono-2-éthylhexyle phtalate (MEHP), tout aussi toxique. Ces dernières années, des plastifiants alternatifs au DEHP ont été développés, notamment le di-2-éthylhexyl téréphtalate (DEHT), qui est métabolisé *in vivo* en mono-2-éthylhexyl téréphtalate (MEHT).

La première partie de ce travail de thèse a consisté à développer des méthodes de dosage des plastifiants et de leurs métabolites dans diverses matrices biologiques, comme par exemple le plasma. Deux méthodes LC-MS/MS ont été développées pour la détermination du DEHP et du MEHP ainsi que des métabolites du DEHT. L'ionisation par spectrométrie de masse du DEHT étant très faible, une méthode LC-UV a été développée pour quantifier ce téréphtalate. Ces méthodes ont permis d'estimer le relargage du DEHP et du DEHT à partir de poches de sang et le dosage de leurs métabolites primaires dans les produits sanguins.

2/ Les acides biliaires (AB) constituent une large famille de stéroïdes composée de nombreuses espèces. Ils sont synthétisés dans le foie et l'intestin et représentent la voie principale de catabolisme du cholestérol. Le 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) est le marqueur circulant de la synthèse des AB. Les AB jouent un rôle essentiel dans l'absorption des lipides mais également dans la signalisation cellulaire, étant ligands du récepteur nucléaire « Farnesoid X receptor » (FXR) et/ou du récepteur membranaire couplé aux protéines G, TGR5. Ces récepteurs, et donc leurs ligands, sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose, des lipides et de la dépense énergétique. Toute modulation du profil des AB peut donc conduire à une modification de l'homéostasie métabolique.

La deuxième partie de ce travail de thèse a consisté à développer deux méthodes de dosage par LC-MS/MS de 31 espèces d'AB et du C4 dans différentes matrices biologiques, dont le plasma. Une méthode spécifique permettant le dosage d'AB dérivés du LCA, récemment décrits, dans du contenu caecal est en cours d'optimisation. Ces méthodes ont permis d'analyser les variations du profil des AB dans divers contextes de la maladie cardiométabolique (obésité, insulino-résistance, diabète de type 2, NAFLD).

Pour conclure, les méthodes d'analyse développées pour la quantification des plastifiants et des AB ont été validées et appliquées dans des études précliniques et cliniques. De manière intéressante, des données de la littérature ainsi que des essais préliminaires de transfection transitoire ont montré que des phtalates et leurs métabolites modulent l'activité du récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR α), régulateur clé de l'homéostasie métabolique et de l'expression de l'enzyme CYP7A1 (enzyme majeure de la synthèse hépatique des AB). Les outils analytiques développés dans cette thèse permettent d'ouvrir des perspectives originales d'étude des effets des phtalates sur l'homéostasie métabolique *via* la régulation du métabolisme des AB.

L'ensemble de ces travaux a permis de lier développements analytiques et applications dans le domaine de la biologie et de la santé.

Abstract

This thesis has two main focuses:

1/ Plasticizers, including phthalates, have been identified as category 1b carcinogenic, mutagenic and reprotoxic (CMR) and as endocrine disruptors. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) is one of the most common plasticizers and is generally associated with polyvinyl chloride (PVC) in medical devices. As DEHP is not covalently bound to PVC, it can easily migrate into lipophilic matrices and then reach the bloodstream. It is metabolized by the liver into mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), which is just as toxic. In recent years, alternative plasticizers to DEHP have been developed, notably di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHT), which is metabolized *in vivo* to mono-2-ethylhexyl terephthalate (MEHT).

The first part of this thesis involved developing methods for measuring plasticizers and their metabolites in various biological matrices, such as plasma. Two LC-MS/MS methods were developed for the determination of DEHP and MEHP as well as DEHT metabolites. As the ionization in mass spectrometry of DEHT is very low, a LC-UV method was developed to quantify this terephthalate. These methods have made it possible to estimate the release of DEHP and DEHT from blood bags and to measure their primary metabolites in blood products.

2/ Bile acids (BA) are a large family of steroids made up of numerous species. They are synthesized in the liver and intestine and represent the main route of cholesterol catabolism. 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) is the circulating marker of BA synthesis. BA play an essential role in lipid absorption but also in cell signaling, as they are ligands for the nuclear receptor 'Farnesoid X receptor' (FXR) and/or the G protein-coupled membrane receptor, TGR5. These receptors, and hence their ligands, are involved in glucose homeostasis, lipid homeostasis and energy expenditure. Any modulation of the BA profile can therefore lead to changes in metabolic homeostasis.

The second part of this thesis involved developing two LC-MS/MS assay methods for 31 BA species and C4 in different biological matrices, including plasma. A specific method for the determination of recently described BA derived from LCA in caecal contents is currently being optimized. These methods have made it possible to analyze variations in the BA profile in various cardiometabolic disease contexts (obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, NAFLD).

In conclusion, the analytical methods developed for quantifying plasticizers and BA have been validated and applied in preclinical and clinical studies. Interestingly, data from the literature and preliminary transient transfection assays have shown that phthalates and their metabolites modulate the activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), a key regulator of metabolic homeostasis and expression of CYP7A1 (a major enzyme in hepatic BA synthesis). The analytical tools developed in this thesis open up original perspectives for studying the effects of phthalates on metabolic homeostasis *via* the regulation of BA metabolism.

All of this work has made it possible to link analytical developments and applications in the field of biology and health.