

## Caractérisation structurale par HPLC-MSn de métabolites de contaminants alimentaires

Emilien Jamin • Carine Jacques • Anne Riu • Vuthy TY • Daniel Zalko • Laurent Debrauwer

Dans le cadre de la sécurité chimique des aliments, les études toxicologiques menées sur les contaminants alimentaires requièrent l'identification de leurs métabolites. Dans ce contexte, la spectrométrie de masse représente un outil de choix, mais doit pouvoir surmonter plusieurs difficultés analytiques inhérentes au contexte de la toxicologie. L'évolution de la sensibilité des appareils analytiques doit notamment pouvoir suivre l'évolution des études qui s'intéressent à des doses d'exposition de plus en plus faibles. Outre une caractérisation structurale des métabolites initialement rendue complexe par la variabilité de structure et de polarité des produits à analyser dans des matrices complexes (métabolites de phase I et II), cette caractérisation est rendue encore plus délicate dans le cadre d'études concernant des faibles doses. Ces difficultés analytiques seront illustrées par l'étude structurale des métabolites de 2 contaminants alimentaires : le tétrachlorobisphénol-A (TCBPA) (1) et le benzo[a]pyrène (B[a]P). Le TCBPA est un contaminant environnemental émergent qui a récemment été détecté dans des emballages alimentaires. Il est principalement issu de la chloration du bisphénol-A, perturbateur endocrinien présent dans certains plastiques. L'étude présentée concerne la formation des métabolites du TCBPA par des microsomes de foie de rat. Le B[a]P est quant à lui une substance largement étudiée en raison de son caractère cancérigène avéré (2). Cet hydrocarbure aromatique polycyclique issu de la combustion des matières organiques est retrouvé dans certains aliments et a servi de molécule modèle dans le cadre de l'étude des capacités métaboliques d'un modèle biologique *ex vivo*.

Ces deux études ont été réalisées par l'utilisation de techniques analytiques complémentaires : la chromatographie liquide associée à un détecteur en ligne de radioactivité pour une détection sélective et une quantification relative des métabolites, ainsi que la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse pour leur identification. Des microsomes de foie de rat ont été exposés à du TCBPA avec une quantité de radioactivité fixée par l'ajout de [14C]-TCBPA. De même, un modèle *ex vivo* de tissu a été exposé à du [5,6-14C]-B[a]P. Dans les deux cas, les milieux d'incubation ont

été analysés par Radio-HPLC avec des paramètres analytiques optimisés pour séparer au maximum les métabolites. En parallèle, les milieux d'incubation ont été analysés par HPLC-MSn en utilisant un piège à ions tridimensionnel équipé d'une source d'ionisation ESI ou APCI, opérant en mode positif ou négatif, afin de réaliser les analyses structurales dans des conditions optimales de sensibilité.

L'étude par Radio-HPLC du TCBPA, qui possède un métabolisme inconnu, a montré la formation de 4 métabolites par les microsomes de foie de rat. La caractérisation structurale des métabolites a été réalisée de manière classique pour ce type d'étude en associant une ionisation par Electrospray et des expériences MSn. De manière originale, 2 des métabolites sont moins polaires que le TCBPA.

Au contraire de l'étude du TCBPA, l'étude structurale des métabolites du B[a]P s'est avérée beaucoup plus complexe et originale. En effet, l'analyse par Radio-HPLC des milieux de culture du modèle a montré la formation d'une vingtaine de métabolites. De plus, les analyses des métabolites standards et attendus du B[a]P ont montré qu'un seul mode d'ionisation n'était pas suffisant pour pouvoir tous les détecter, étant données les faibles doses étudiées (3). De plus, les conditions d'éluion chromatographique ont nécessité l'utilisation de différents paramètres d'ionisation en cours d'analyse pour permettre la caractérisation de certains métabolites. Ainsi, l'Electrospray en mode négatif avec une modification des paramètres d'ionisation en cours d'analyse a permis la détection de métabolites hydroxylés et conjugués, et l'APCI en mode positif a quant à lui permis la détection d'autres types de métabolites oxydés et non détectés avec l'ESI en mode négatif.

1. Fernandez ME, Arrebola JP, Taoufik J, Navalon A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL, Olea N, *Reprod Toxicol* (2007) 24, 259-264.

2. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1983), vol 32

3. Jacques C, Jamin EL, Perdu E, Duplan H, Mavon A, Zalko D, Debrauwer L, *Anal Bioanal Chem* (2010) 396, 1691-1701