

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Marie LE DÛ-LACOSTE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE CHIMIE ANALYTIQUE DE L'ENVIRONNEMENT

**ETUDE DES PHENOMENES DE BIOTRANSFORMATION DES HYDROCARBURES
AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) PAR LES ORGANISMES AQUATIQUES (POISSONS).**

RELATION EXPOSITION - GENOTOXICITE

Soutenue le : 12 décembre 2008

Après avis de :

M^{me} PICHON Valérie
M^r BURGEOT Thierry

Maître de Conférences (HDR), CNRS, Paris
Chercheur (HDR), IFREMER, Nantes

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen composée de :

M^r CACHOT Jérôme
M^{me} PICHON Valérie
M^r BURGEOT Thierry
M^r LE BIZEC Bruno
M^{me} BUDZINSKI Hélène

Professeur, Université Bordeaux 1
Maître de Conférences (HDR), CNRS, Paris
Chercheur (HDR), IFREMER, Nantes
Professeur, ENVN, Nantes
Directeur de recherche, CNRS, Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Invité
Directeur de thèse

Remerciements

Ce manuscrit est le résultat de mon travail de thèse, réalisé au laboratoire de Physico-et Toxico-Chimie (LPTC) des systèmes naturels de l'université Bordeaux I. En avant-propos, je souhaiterais remercier les personnes ayant participé de près ou de loin à la bonne réalisation de ces travaux de recherche.

Je voudrais tout d'abord remercier Hélène Budzinski, directrice du groupe LPTC, d'avoir dirigé ma thèse.

Je remercie également Madame Valérie Pichon, Maître de Conférences au Laboratoire Environnement et Chimie Analytique (LECA) de l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles (ESPCI) de Paris, et Monsieur Thierry Burgeot, chercheur au Laboratoire d'Ecotoxicologie (DEL-PC) de l'Ifremer de Nantes, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de thèse et d'avoir apporté leurs observations avisées à ce manuscrit.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à Monsieur Jérôme Cachot, enseignant-chercheur au LPTC et à Monsieur Bruno Le Bizec, Directeur du Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ENVN), pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie Philippe Garrigues de m'avoir accueillie au sein de son Institut des Sciences Moléculaire (ISM) et de m'avoir ainsi permis de découvrir le travail de recherche dans lequel j'ai pu m'épanouir.

Je voudrais d'autre part réaffirmer toute ma gratitude à Hélène Budzinski pour m'avoir proposé de réaliser ce doctorat dans son groupe et d'avoir mis en œuvre tous les moyens nécessaires à la réalisation de ces travaux. Elle a su me faire confiance tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. Ces trois années passées au sein de son laboratoire ont été scientifiquement très enrichissantes grâce à la diversité et à l'originalité des outils analytiques que j'ai été amenés à utiliser, grâce à la pluridisciplinarité des thématiques abordées et grâce à mes nombreuses participations à des congrès nationaux et internationaux.

A travers Hélène, je souhaiterais bien sûr remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au LPTC pendant ce doctorat. Je pense bien évidemment dans un premier lieu à Karyn Le Menach, pour son aide et ses nombreux conseils, notamment en chromatographie en phase gazeuse. Sa grande disponibilité et sa gentillesse ont vraiment facilité mon travail au laboratoire et au cours des campagnes de terrain. Je veux également remercier Sylvie Augagneur, Marie-Hélène Devier Patrick Pardon et Laurent Peluhet, les encadrants du groupe, mais également à Anne Togola, Sophie Lardy, Nathalie Tapie, Alexia Crespo, Mathieu Cazaunau, Kilian Miet, Marion-Justine Capdeville, Nathalie Bodin et tous les étudiants côtoyés au laboratoire qui ont, dans le cadre de manipulations ou de missions de terrain, participé à ma thèse (et à son ambiance).

Je voudrais de plus ré-exprimer toute mon amitié à Thierry Burgeot ainsi qu'à Farida Akcha et Nathalie Wessel, du DEL-PC de Nantes, qui ont collaboré de près à ma thèse durant les campagnes en Estuaire de Seine et les expérimentations en laboratoire. Merci également pour tous les conseils scientifiques lors de la rédaction de ces travaux de recherche.

J'ai eu la chance de participer à plusieurs campagnes de prélèvements sur le chalutier océanographique de l'Ifremer, le Gwen Drez, où j'ai passé de très bons moments. Je remercie en particulier Thierry, Farida et Sabrina pour les dissections sur les pontons du Havre, les pesées « sportives » à quai (un vrai bizutage !!!) et les tris de poissons à la remontée du chalut. Je garderai de très bons souvenirs de ces semaines passées ensemble et, incontestablement, une dextérité à la dissection et à la levée de filets de poissons plats.

Enfin, plus personnellement, je tenais à remercier mes proches sans qui, je ne serais pas arrivée jusqu'ici aujourd'hui.

Tout d'abord merci à Anne pour son soutien durant les années passées ensemble au laboratoire (et ailleurs) et pour son soutien lors des moments difficiles et heureux qui ont jalonné cette thèse.

Merci à ma famille pour leur soutien et leurs encouragements. Neuf ans, c'est long ; mais c'est enfin fini.

Enfin, mon plus profond « merci » va à Thomas qui m'a accompagnée, soutenue et supportée durant ces trois longues années « dans la joie comme dans la douleur ». Ton soutien et ton amour sans faille ont été pour moi d'un grand réconfort.

La persévérance est la noblesse de l'obstination.

Adrien Decourcelle

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1 LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES.....	7
1.1 Les composés	7
1.2 Les origines des HAP.....	7
1.3 Caractérisation des sources de HAP.....	8
1.4 Comportement et devenir des HAP dans les écosystèmes aquatiques	9
1.4.1 Propriétés physico-chimiques.....	9
1.4.2 Cycle biogéochimique des HAP dans l'environnement	11
1.4.3 Biodisponibilité des HAP chez les poissons	13
1.4.4 Processus de bioaccumulation des HAP chez les poissons	13
À partir du sédiment	14
À partir de l'eau ou bioconcentration	14
Importance de la chaîne trophique.....	14
2 BIOTRANSFORMATION ET TOXICITE DE HAP DANS LE MILIEU AQUATIQUE.....	15
2.1 Les mécanismes de biotransformation des HAP chez les poissons	15
2.1.1 La phase de fonctionnalisation.....	16
2.1.2 La phase de conjugaison.....	16
2.2 Toxicité des HAP	18
2.2.1 Mécanismes de génotoxicité et de cancérogénicité.....	18
Les bases oxydées	18
Les adduits d'ADN.....	19
Les cassures de brins	19
2.2.2 Données toxicologiques.....	20
Toxicité aiguë.....	20
Toxicité chronique	20
Classement des HAP en fonction de leur toxicité et valeurs guides	20
2.2.3 Données écotoxicologiques	23
3 LES METABOLITES DE HAP	25
3.1 Techniques analytiques	25
3.1.1 Screening et techniques semi-quantitative.....	25
La chromatographie en phase liquide haute performance associée à la fluorimétrie (HPLC/F).....	25
La Fluorescence Fixe (FF).....	28
La Spectrométrie à Fluorescence Synchrone (SFS)	28
3.1.2 Dosage quantitatif des métabolites individuels	29
Préparation des échantillons	30
Techniques de séparation et de détection.....	34
Note particulière : la dérivation.....	35
Note particulière : UPLC™-MS/MS	37
3.1.3 Les différentes approches de normalisation des résultats	38
3.2 Etudes du métabolisme	39

3.2.1	Localisation de métabolites chez les organismes aquatiques	40
3.2.2	Identification des métabolites et étude cinétique du métabolisme	40
	Phénanthrène.....	41
	Pyrène.....	42
	Chrysène	43
	Benzo[a]pyrène	43
3.2.3	Facteurs influençant la formation des métabolites	45
	Le sexe	45
	L'âge	45
	La température du milieu	45
	L'état de jeûne des poissons	45
	Les interactions avec d'autres contaminants présents.....	46
	Les espèces de poissons	46
4	LA SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE : AVENIR DES METABOLITES	47
4.1	Notion de biosurveillance	47
4.2	L'intérêt de l'étude des métabolites dans le cadre d'une surveillance environnementale.....	48
 CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES		53
1	LE CHOIX DES COMPOSES ETUDIÉS	55
1.1	Les composés mono-hydroxylés	55
1.2	Les métabolites primaires.....	56
2	SITES D'ETUDES ET EXPERIMENTATIONS	57
2.1	Le Programme National d'Ecotoxicologie	57
2.2	Les modèles d'étude.....	59
2.2.1	Le modèle d'étude des campagnes de terrain : la limande (<i>Limanda limanda</i>).....	59
2.2.2	Le modèle d'étude des expérimentations en laboratoire : le turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>).....	59
2.3	Les expérimentations en laboratoire.....	60
2.3.1	Expérimentations préliminaires sur des turbots juvéniles	60
2.3.2	Expérimentation multi-sources sur des turbots juvéniles : Expérience : Juillet 2006.....	64
2.4	Etudes en milieu naturel	69
2.4.1	Suivi de la contamination chez la limande en Estuaire de Seine (Programme PNETOX GENOTOX).....	69
	Le site d'échantillonnage	69
	Le plan d'échantillonnage.....	70
2.4.2	La Baie de Guanabara au Brésil : Collaboration avec PETROBRAS.....	71
	Objet de la collaboration	71
	Contexte et sites d'échantillonnage	71
2.4.3	Programme MEDICIS-MERLUMED	73
	Objectif général	73
	Modèle d'étude	73
	Sites et plan d'échantillonnage.....	73
3	DOSAGE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)	75
3.1	Préparation des échantillons.....	75
3.1.1	Introduction des étalons internes.....	75
3.1.2	Extraction.....	76
	Extraction des HAP dissous dans l'eau	76
	Extraction micro-ondes des matrices solides	77
3.1.3	Concentration.....	77
3.1.4	Purification par chromatographie en phase liquide	77

3.2	Analyse par couplage GC/MS	77
3.2.1	Méthode de quantification	77
3.2.2	Validation des analyses	78
4	DOSAGE DES METABOLITES DE HAP MONO-HYDROXYLES	79
4.1	Protocoles de préparation des échantillons	79
4.1.1	Dosage total des formes libres et conjuguées : Protocole n°1 (Publication n°1)	79
	Ajout des étalons internes et déconjugaison enzymatique	79
	Extraction sur phase solide des métabolites de HAP	80
	Purification sur phase solide	81
4.1.2	Fractionnement formes libres / formes conjuguées : Protocole n°2.....	81
4.2	Analyse et Détection des métabolites de HAP (Publications n°1, 2 et 3).....	84
4.2.1	Détection par GC/MS (Publication n°1)	84
	Le principe	84
	La dérivation.....	84
	Les conditions d'analyse.....	85
4.2.2	Détection par GC-MS/MS (Publication n°2)	88
	Le principe	88
	La dérivation.....	89
	Les conditions d'analyse.....	90
4.2.3	Analyse par UPLC-MS/MS	92
	Principe de l'UPLC-MS/MS.....	93
	Choix du mode d'ionisation.....	94
	Conditions d'analyse.....	94
4.3	Validation des procédures d'extraction et de quantification	97
4.3.1	Les rendements d'extraction/ purification : dosage des métabolites totaux (protocole n°1)	97
4.3.2	Validation du protocole de fractionnement des métabolites conjugués (protocole n°2).....	98
4.3.3	Limites de détection	102
5	DOSAGE DES METABOLITES DE HAP PRIMAIRES PAR UPLC-MS/MS (PUBLICATION N° 4) 105	
5.1	La séparation et l'analyse des métabolites primaires (Publication n°4).....	105
5.2	Préparation des échantillons.....	108
5.3	Validation de la méthode de dosage et limites de détection.....	109
<u>CHAPITRE III : EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE.....</u>		111
1	EXPERIMENTATIONS PRELIMINAIRES.....	113
1.1	Expérimentation de mai 2005	113
1.1.1	Analyses chimiques.....	113
	Teneurs en HAP dans les muscles de turbots juvéniles	113
	Teneurs en métabolites de HAP dans la bile des turbots juvéniles	114
	Influence du sexe sur le devenir des HAP chez les poissons.....	117
1.1.2	Analyse biologique : Mesures des cassures de brins de l'ADN par le test des comètes.....	117
1.2	Expérimentation de janvier 2006.....	118
1.2.1	Analyse chimique : Teneurs en métabolites de HAP dans la bile de turbots juvéniles.....	118
1.2.2	Analyse biologique : Mesures des cassures de brins de l'ADN par le test des comètes.....	120
2	EXPERIMENTATION MULTI-SOURCES (PUBLICATION N°7)	123
<u>CHAPITRE IV : LE MILIEU NATUREL</u>		125

1	EXPOSITION ET EFFETS CHEZ LA LIMANDE (<i>LIMANDA LIMANDA</i>) DE BAIE DE SEINE (PUBLICATION N°8).....	127
2	ETUDE PRELIMINAIRE DE LA CONTAMINATION EN HAP DANS LA BAIE DE GUANABARA (BRESIL) VIA LA DETERMINATION DES METABOLITES BILIAIRES (PUBLICATION N°9).....	129
3	ETUDE DES METABOLITES DE HAP CHEZ LES MERLUS (<i>MERLUCCIUS MERLUCCIUS</i>) DE MEDITERRANEE.	131
3.1	Introduction	131
3.2	Campagne de mai 2005.....	131
3.3	Spéciation des métabolites de HAP biliaires	133
3.4	Conclusions	134
 <u>CHAPITRE V : SYNTHESE.....</u>		135
1	MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES METABOLITES DE HAP DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES.....	136
2	EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE (PUBLICATION N°7)	136
3	ETUDES EN MILIEU NATUREL (PUBLICATIONS N°8 ET 9).....	138
 <u>CONCLUSION GENERALE.....</u>		141
 <u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>		145
 <u>PUBLICATIONS</u>		171
 <u>ANNEXES</u>		343

Liste des Figures

Figure 1: Structures chimiques des HAP définis comme polluants prioritaires par l'US EPA.	7
Figure 2: Cycle biogéochimique en milieu océanique des HAP (d'après [1]).	12
Figure 3: Schéma général de biotransformation des HAP.	15
Figure 4: Formules des principaux conjugués formés chez les poissons	17
Figure 5: Régions structurales du benzo(a)pyrène	17
Figure 6 : Voies de métabolisation du BaP chez les vertébrés (d'après [126])	17
Figure 7: Formule semi-développée du phénanthrène	41
Figure 8: Formule semi-développée du chrysène.	43
Figure 9: Formule semi-développée du BaP.	44
Figure 10: Formules semi-développées de métabolites de HAP choisis pour l'étude. Seul un des isomères du phénanthrène est ici représenté, en position 9.	55
Figure 11: Formules semi-développées des métabolites primaires de HAP choisis pour l'étude.	57
Figure 12: La limande (<i>Limanda limanda</i>).	59
Figure 13: Le turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	60
Figure 14: Dispositif expérimental pour d'exposition les expérimentations préliminaires de mai 2005 et janvier 2006.	62
Figure 15: Dispositif expérimental mis en œuvre pour l'expérimentation sur les turbots juvéniles (Juillet 2006).	65
Figure 16: Localisation du site de prélèvement du sédiment utilisé dans l'expérimentation de juillet 2006.	67
Figure 17: Concentrations en fluoranthène et benzo(a)pyrène particulaire (ng.l ⁻¹) et valeurs seuils OSPAR (D'après [401])	70
Figure 18: Zones d'échantillonnages des campagnes effectuées dans le cadre du programme PNETOX GENOTOX.	70
Figure 19: Sites d'échantillonnage et espèces de poissons échantillonnés, en février, mars et avril 2006.	72
Figure 20 : Le merlu <i>Merluccius merluccius</i> .	73
Figure 21: Zones d'échantillonnages des campagnes effectuées dans le cadre du programme MERLUMED. Seules les zones entourées (I, III, IV, V) ont été étudiées au cours de cette thèse.	74
Figure 22: Protocole de dosage des HAP dans les eaux et les matrices biologiques.	75
Figure 23: Protocole de dosage des métabolites totaux (libres + conjugués) dans les fluides biologiques	80
Figure 24: Phase co-polymérique de la cartouche SPE Oasis MAX (Waters) Où AX = N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₄ H ₉ Cl ⁻ .	81
Figure 25: Protocole de dosage combiné des différentes formes des métabolites (conjugués et libres).	83

Figure 26: Chromatogramme obtenu en GC/MS par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés après dérivatisation. (1) 1-OHN, (2) 2-OHN, (3) 2-OHBi, (4) 9-OHFe, (5) 4-OHPhe, (6) 9-OHPhe, (7) Pyr d10, (8) 3-OHPhe, (9) 1-OHPhe, (10) 2-OHPhe, (11) 1-OHP d9, (12) 1-OHP, (13) 1-OHC, (14) 3-OHBaP.....	85
Figure 27: Principe de fonctionnement de la spectrométrie de masse en tandem	88
Figure 28: Chromatogramme obtenu en GC-MS/MS par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés après dérivatisation. 2-OHN, 1-OHPhe, 1-OHP d9, 1-OHP, 1-OHC, 3-OHBaP.....	90
Figure 29: Chromatogramme obtenu en UPLC-ESI-MS/MS (débit de 0,45 ml.min ⁻¹) par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés. 2-OHN, 1-OHPhe, 1-OHP d9, 1-OHP, 1-OHC, 3-OHBaP.....	95
Figure 30: Comparaison entre la somme des métabolites obtenus dans les différentes fractions (F1+ F2 + F3) (protocole n°2) et le dosage des métabolites totaux (protocole n°1). Concentrations exprimées en ng.g ⁻¹ de bile. Moyenne ± écartype, n = 3.	99
Figure 31: Comparaison entre les résultats obtenus pour les métabolites de la fraction libre (F1) (protocole n°2) et le dosage des métabolites libre (protocole n°1 sans la déconjugaison enzymatique). Concentrations exprimées en ng.g ⁻¹ de bile. Moyenne ± écartype, n = 3.	100
Figure 32 : Concentrations en métabolites obtenues dans les différentes fractions selon le protocole n°2. F1 : fraction libre, F2 : fraction des glucuronides, F3 : fraction des sulfates. Concentrations exprimées en ng.g ⁻¹ de bile. Moyenne ± écartype, n = 3.	100
Figure 33 : Chromatogramme d'un mélange étalon de métabolites primaires obtenu UPLC-MS/MS (temps exprimé en minutes)	106
Figure 34: Protocole simplifié de dosage (sans déconjugaison) des métabolites primaires dans les fluides biologiques (microsome, bile ...) par UPLC-MS/MS.....	109
Figure 35: Concentrations en HAP dans les muscles des turbots exposés à un mélange de HAP (ng.g ⁻¹ de poids sec).....	113
Figure 36: Influence de la lipophilie sur la bioconcentration des HAP dans les tissus musculaires.....	114
Figure 37: Concentrations en métabolites biliaires (ng.g ⁻¹ de bile) mesurées chez les turbots exposés à un mélange de HAP (analyses effectuées en triplicat)	115
Figure 38: Absence d'effet génotoxique chez le turbot après exposition au mélange de HAP dans les conditions d'expérimentation.....	118
Figure 39: Evolution de la concentration en métabolites de HAP (ng.g ⁻¹ de bile) dans la bile de turbots juvéniles exposés à un mélange de 7 HAPs.....	119
Figure 40: Effet génotoxique de l'exposition chez le turbot au cours de l'expérimentation préliminaire de Janvier 2006	121
Figure 41: Interaction significative des facteurs « temps » et « traitement » sur le niveau de dommage à l'ADN des érythrocytes de turbot.	121
Figure 42: Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de merlus (ng.g ⁻¹ de bile) échantillonnés en mai 2005 dans le Golfe du Lion sur les Station I (à proximité de l'embouchure du Rhône), Station III et IV (partie centrale du Golfe) et Station V (dans les plus hauts fonds) (moyenne, n=3).	133

Liste des Tableaux

Tableau 1: Valeurs de quelques indices moléculaires caractérisant l'origine des HAP	9
Tableau 2: Propriétés physico-chimiques des HAP	10
Tableau 3: Classement des HAP en fonction de leur génotoxicité et de leur cancérogénicité	21
Tableau 4: Récapitulatif des facteurs équivalent toxique au benzo(a)pyrène [41]	22
Tableau 5: Récapitulatif des critères d'évaluation écotoxicologique applicables aux HAP. Commission Oslo-Paris (OSPAR)	24
Tableau 6 : Préparation de l'échantillon et analyse HPLC de métabolites de HAP hydroxylés	27
Tableau 7: Principales études utilisant la SFS et la FF pour l'analyse des métabolites de HAP dans la bile de poissons	29
Tableau 8 : Travaux mettant en œuvre une extraction liquide des métabolites de HAP	32
Tableau 9 : Principaux protocoles mettant en œuvre une extraction sur phase solide C ₁₈ des métabolites de HAP	33
Tableau 10 : Principaux travaux mettant en œuvre la GC/MS pour la détection des métabolites de HAP	36
Tableau 11: Principaux travaux étudiant le métabolisme du phénanthrène chez les organismes marins.	42
Tableau 12: Principaux travaux étudiant le métabolisme du pyrène chez les organismes marins.....	42
Tableau 13: Proportions des principales classes de métabolites conjugués dans la bile de poissons exposés à du BaP radioactif.	44
Tableau 14: HAP parents et métabolites de HAP associés, choisis pour l'étude.....	55
Tableau 15: HAP parents et métabolites de HAP associés, choisis pour l'étude.....	56
Tableau 16 : Concentration en HAP dans la solution mère éthanolique et dans la solution d'eau de mère distribuée dans les aquariums - Expérimentation de mai 2005	63
Tableau 17 : Concentration en HAP dans la solution mère éthanolique et dans la solution d'eau de mère distribuée dans les aquariums - Expérimentation de janvier 2006.....	64
Tableau 18: Concentrations en HAP de la solution utilisée pour l'exposition par la voie dissoute. Les concentrations sont exprimées en quantité de HAP (mg) par litre d'eau de mer.	66
Tableau 19 : Concentrations en HAP dans le sédiment utilisé pour l'exposition par la voie sédimentaire. Les concentrations sont exprimées en quantité de HAP (µg) par kg de sédiment sec.	67
Tableau 20: Concentrations en HAP dans le pétrole utilisé et dans la solution des éluviats de pétrole distribuée dans les aquariums des turbots juvéniles en juillet 2006. Les concentrations sont exprimées en quantité de HAP (µg et mg) par gramme de fioul lourd et par litre d'eau de mer.	69
Tableau 21: Echantillonnage effectué pour 2006.....	72
Tableau 22: Liste des composés aromatiques étudiés, de leurs étalons internes de quantification et des rapports masse sur charge (m/z) utilisés pour leur détection en GC/MS.....	76

Tableau 23: Récapitulatif des composés utilisés	79
Tableau 24: Principaux ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par GC/MS avec et sans dérivation. Le nombre entre parenthèse est l'abondance de chaque ion par rapport au premier fixé à 100 %	86
Tableau 25: Linéarité des composés étudiés analysés en GC/MS (n=6). Les quantités injectées sont fixées à 1 µl.....	86
Tableau 26: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique (n =3, moyenne ± écartype).	87
Tableau 27: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (1 µl injecté) et calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.....	87
Tableau 28: Conditions MRM (transitions et énergie de collision) obtenues pour les métabolites hydroxylés dérivés.....	91
Tableau 29: Linéarité des composés étudiés analysés en GC-MS/MS (n=6).....	91
Tableau 30: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique (n =6, moyenne ± écartype).	91
Tableau 31: Précision de la méthode : Répétabilité et reproductibilité obtenues (n = 6)	92
Tableau 32: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (1 µl injecté) et calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.....	92
Tableau 33: Principaux ions (m/z) et conditions MRM (transitions, tension de cône et énergie de collision) obtenus pour les métabolites hydroxylés.....	95
Tableau 34: Linéarité des composés étudiés analysés en UPLC-MS/MS (n=3).....	95
Tableau 35: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée (10 µl injectés). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique (n = 3, moyenne ± écartype).....	96
Tableau 36: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (10 µl injectés) et calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.	96
Tableau 37: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés, calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3, selon les différentes méthodologies GC/MS, GC-MS/MS et UPLC-MS/MS.	96
Tableau 38: Rendement moyen du dosage total des métabolites de HAP dans des eaux supplémentées, à différentes concentrations (moyenne ± écartype, n = 3).....	97
Tableau 39: Rendement moyen du dosage total des métabolites de HAP dans des biles supplémentées, à différentes concentrations (moyenne ± écartype, n = 3).....	98
Tableau 40: Rendement moyen du dosage total des métabolites de HAP dans des plasmas supplémentés, à différentes concentrations (moyenne ± écartype, n = 3).....	98
Tableau 41: Teneurs en métabolites biliaires (ng.g ⁻¹ de bile) obtenues lors du dosage de bile de merlu selon les protocoles 1 (avec et sans déconjugaison) et 2. Moyenne ± écartype, n = 3.	99
Tableau 42: Distribution relative des différentes formes des métabolites dans la bile de merlu (100 % représentant la somme des métabolites détectés, toute forme confondue).....	101

Tableau 43: Limites de détection (LOD) selon la méthodologie utilisant la GC/MS pour différentes matrices. LOD exprimées en ng.l ⁻¹ d'eau et ng.g ⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.	102
Tableau 44: Limites de détection (LOD) selon la méthodologie utilisant la GC-MS/MS pour la matrice biliaire. LOD exprimées en ng.g ⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.	102
Tableau 45: Limites de détection (LOD) selon la méthodologie utilisant l'UPLC-MS/MS pour différentes matrices. LOD exprimées en ng.l ⁻¹ d'eau et ng.g ⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.	102
Tableau 46: Principaux ions (m/z) et conditions MRM (transitions, tension de cône et énergie de collision) obtenus pour les métabolites hydroxylés.	106
Tableau 47: Linéarité des composés étudiés analysés en UPLC-MS/MS (n=3).....	107
Tableau 48: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée (10 µl injectés). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique (n = 3, moyenne ± écartype).	107
Tableau 49: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (10 µl injectés) et en pg.µl ⁻¹ . LDI calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.	108
Tableau 50: Rendement moyen du dosage des métabolites primaires de HAP dans des biles supplémentées, à différentes concentrations (moyenne ± écartype, n = 3).....	109
Tableau 51: Limites de détection (LOD) dans la matrice biliaire, exprimées en ng.g ⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.	110
Tableau 52: Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de merlus échantillonnés dans le Golfe du Lion au cours des campagnes MERLUMED 3 en mai 2005. Concentrations moyennes exprimées en ng.g ⁻¹ de bile (n=3). Stations I et III : à proximité de l'embouchure du Rhône. Stations IV et V : partie centrale du Golfe. nd : non détectés (< LOD, publication n°1)	132

Liste des Abréviations

ADEME : Agence pour le Développement et la Maîtrise de l'Énergie

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AET : Apparent Effect Threshold

AFNOR : Agence Française de Normalisation

AFSSA : Agence Française Sanitaire et de Santé Alimentaire

AHH : Aryl Hydrocarbon Hydroxylase

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor

APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

BAF : Facteur de Bioaccumulation

BCF : Facteur de Bioconcentration

BCR : Bureau Communautaire de Référence de l'Union Européenne

BEH : Bridged Ethyl-siloxane/silica Hybrid

BPDE : benzo(a)pyrène 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde

BPH : Benzo(a)pyrène Hydroxylase

BSTFA : Bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide

[14C] : Isotope 14 du carbone

C18 : Octadécyl

CAT : Catalases

CEDRE : Centre de Documentation, de Recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux

CEMP : Coordinated Environmental Monitoring Programme

CL50 : Concentration Léthale à 50%

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CLHP/F : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance couplée à la spectrofluorimétrie

CLHP/SM : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse

CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CREMA : Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Marins et Aquacoles

CSHPF : Conseil de Sécurité et d'Hygiène Publique Française

CYP1A1 : Enzymes dépendantes du cytochrome P-450 1A1

DD : Dihydrodiol Déshydrogénases

DD : Enzymes Dihydrodiol-Déshydrogénases

DDD : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DDE : Dichlorodiphényléthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DHD : Dihydrodiol

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPMA : Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture

EDF : Electricité De France

EH : Epoxydes Hydrolases

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER-L : Effect Range low

ER-M : Effect Range Medium

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

EROD : Ethoxyrésorufin-O-Dééthylase

ESI : Ionisation Electrospray

FAC : Composés Aromatiques Fluorescents

FET : Facteur d'Equivalent Toxique

FF : Fluorescence Fixe

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple

GC : Chromatographie en phase Gazeuse

GC-MS/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem

GESAMP: Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection

GSH : Glutathion

GST : Glutathion S-Transférases

[3H] : Isotope 3 de l'hydrogène

H₂O₂ : Hydroperoxyde d'hydrogène

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HPLC /F : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance couplée à la Fluorimétrie

HPLC/MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse simple

HPLC : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance

HPLC-MS/MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

IARC : International Agency for Research on Cancer

ICES : International Conference on Environmental Systems

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques

IPCS : Programme International de Sécurité Chimique

ITOPF : International Tanker Owners Pollution Federation

JAMP : Programme conjoint d'évaluation et de surveillance continue (Réalisé par l' OSPAR)

JOCE : Journal Officiel des Communautés Européennes

Kd ou Kp: coefficient de partage sédiment/eau

Kd : coefficient de partage sédiment/eau

kDa : Kilodaltons

Kea : Coefficient de partage eau/air

Koc : coefficient de partage carbone organique/eau

Kow : coefficient de partage n-octanol/eau

Ksa : Coefficient de partage sol/air

LC/MS : Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

LC : Chromatographie en phase Liquide

LDI : Limites de Détection Instrumentales

LIF : Fluorescence Induite par Laser

LOD : Limites de Détection

LOEC : Lowest Observed Effect Concentration

LPTC : Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des systèmes naturels

MATE : Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement

MEKC/F : Chromatographie Electrocinétique Micellaire couplée à la Fluorimétrie

MFO : Mixed Function Oxygenases

MRM Multiple Reaction Monitoring

MS : Détection par Spectrométrie de Masse

MTBE : Méthyl t-butyl éther : $(CH_3)_3C(OCH_3)$

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné

NaOH : Hydroxyde de sodium, soude

NOAA : National Oceanic and Atmospheric Administration (USA)

NOEC : No Observed Effect Concentration

NRC : National Research Council

NRCC : National Research Council of Canada

NTP: National Toxicologic Program

O₂^{•-} : Anion superoxyde

OH : Hydroxy

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OSPAR : Oslo - Paris

OSPARCOM : Commission Oslo - Paris

PCB : Polychlorobiphényles

PEC: Probable Environmental Concentration

PEL: Probable Effect Level

PNEC: Probable No Effect Concentration

PNEC: Programme National Environnement Côtier

PNETOX: Programme National d'Ecotoxicologie

ppm : Partie par million

PSWQAT : Puget Sound Water Quality Action Team

Q : Quinone

REBENT : Réseau Benthique

REMI : Réseau de contrôle Microbiologique

REPHY : Réseau de surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines

RNO : Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin

SFS : Spectrométrie de Fluorescence Synchrone

SIM : Single Ion Monitoring

SOD : Superoxydes Dismutases

SPE : Extraction sur Phase Solide

SPME : Micro-Extraction sur Phase Solide

SRM : Standard Reference Matrix

SRM : Single Reaction Monitoring

TBT: Tributylétain

TEL: Threshold Effect Level

UDPGT : Uridine-Diphosphate-Glucuronyltransférases

UPLCTM-MS/MS : l'Ultra Performance Chromatographie en phase Liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (marque déposée de Waters corporation)

US-EPA : Agence américaine de Protection de l'Environnement

INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'accélération de l'industrialisation des pays européens et nord américains au cours du XIX^{ème} siècle, l'environnement est soumis à une forte pression anthropique (surexploitation des ressources naturelles, contamination chimique et modification physique du milieu naturel ...). Les activités liées à cette révolution industrielle (production d'énergie, métallurgie, chimie de synthèse, agriculture, traitements des déchets, ...) ont engendré l'introduction en grandes quantités de divers contaminants dans l'environnement (hydrocarbures, substances radioactives, métaux, dioxines, solvants, polychlorobiphényles, alkylphénols, pesticides, engrais ...). Le milieu marin côtier, largement exploité pour ses richesses économiques (pêche, mariculture) et touristiques, subit de nombreuses pollutions provenant de rejets directs (effluents urbains et industriels, déversements de pétrole...) et indirects (apports fluviaux et atmosphériques) [1, 2]. La forte exploitation du charbon puis du pétrole s'est ainsi ajoutée à l'utilisation du bois pour le chauffage ainsi qu'aux phénomènes naturels (feux de forêts, volcanisme, fuite de réservoirs naturels de pétrole) comme sources naturelles d'hydrocarbures. Ces contaminants sont rejetés dans l'atmosphère, l'eau et les sols, et rejoignent *in fine* les océans selon divers processus de transport [3, 4, 5, 6].

Au sein de cette famille chimique, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont notamment considérés comme des **contaminants prioritaires des écosystèmes** tant terrestres que marins du fait de leur activité **mutagène et cancérigène** [7, 8]. L'expression des effets toxiques des HAP dépend non seulement de l'absorption de ces composés par les organismes exposés mais également de leur **biotransformation**. Si les processus cellulaires de biotransformation sont censés constituer des mécanismes de détoxification, ils peuvent également mener à la formation de **métabolites** qui s'avèrent parfois plus toxiques que les composés de départ. La présence de HAP peut nuire à la faune et à la flore et par voie de conséquence à l'homme. Seize de ces composés ont été retenus par l'EPA (Environment Protection Agency) comme polluants prioritaires à rechercher dans les eaux, les sols et l'atmosphère. Les HAP sont aussi inscrits sur la liste des substances dangereuses prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/CE).

Pour connaître le niveau de pollution en HAP du milieu marin, la mesure de la concentration en HAP dans l'eau et le sédiment est généralement réalisée. Ces études ont permis de progresser dans la compréhension des phénomènes gouvernant leurs flux et leur devenir dans ce milieu ainsi que leur impact toxique [1, 9-14]. Néanmoins, ces travaux ne reflètent pas nécessairement la biodisponibilité de ces contaminants vis-à-vis des organismes marins. **Pour pouvoir étudier la santé d'un écosystème marin et le potentiel toxique d'une pollution telle que celle liée à la présence de HAP, il est nécessaire de pouvoir accéder à la fraction des composés disponibles pour les organismes aquatiques et de connaître les effets toxiques des contaminants incriminés** (effets toxiques qui dépendent généralement de la capacité de biotransformation des espèces). Dans le cas des organismes supérieurs tels que les poissons, cette approche est d'autant plus importante qu'ils présentent des capacités de biotransformation qui leur permettent d'éliminer ces composés [15-17]. **Par conséquent, les concentrations tissulaires en HAP ne reflètent pas le niveau réel d'exposition des poissons.**

L'étude des poissons présente un intérêt particulier en raison de leur importance économique et de la fragilisation généralisée des stocks de poissons notamment observée en Atlantique nord-est [18]. A l'échelle de la France, quelques études recensent les niveaux de contamination en HAP dans des organismes marins [19, 20, 21]. Seules les données du RNO (Réseau National d'Observation, Ifremer) offrent une vision globale de la contamination du littoral français à travers l'analyse des différents composés minéraux et organiques dont les HAP, accumulés par deux organismes modèles, l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et la moule (*Mytilus sp.*).

Néanmoins, là encore, **les données disponibles ne sont pas complètes** puisque seuls les résultats des mesures se rapportant à un composé aromatique polycyclique, le fluoranthène, sont présentés malgré la mesure des seize HAP prioritaires. De plus, seules les analyses des HAP tissulaires chez les bivalves sont effectuées. Ces données qui portent principalement sur les bivalves ne traduisent pas les réelles contaminations subies par les organismes supérieurs, qui comme le poisson biotransforment plus efficacement les HAP. En outre, ces organismes ne sont pas forcément exposés via les mêmes voies ni les mêmes mécanismes que les organismes supérieurs. Quelques travaux ont été conduits ponctuellement dans le cadre du RNO sur le flet en estuaire de Seine et dans le cadre du programme Seine Aval [22, 23]. **En conséquent, la connaissance de l'état actuel de la contamination en HAP des organismes supérieurs et en particulier des poissons est insuffisante sur le littoral français.** Les informations existantes reposent sur des études ponctuelles n'intégrant que rarement les niveaux de contamination chimique et les effets biologiques. **Un effort de validation des biomarqueurs pertinents pour évaluer la génotoxicité des HAP en lien avec la contamination chimique des tissus et la production de métabolites est nécessaire.** Le Joint Assessment Monitoring (JAMP 2007) qui rédige les recommandations de surveillance pour le programme intégré de chimie biologie (CEMP : coordinated environmental monitoring programme) de surveillance des substances dangereuses en Atlantique Nord a ainsi identifié quelques biomarqueurs pertinents (Ethoxyrésorufin-O-Dééthylase, adduits à l'ADN, métabolites, micronoyaux et test des comètes après validation) pour évaluer les effets génotoxiques sur des sites fortement contaminés par les HAP (plate formes pétrolières en mer du Nord). **L'enjeu d'un positionnement français de biosurveillance sur la base d'une expérience acquise dans un site atelier français comme l'estuaire de Seine est donc de première importance sur le plan national et international.**

Ce manuscrit présente l'étude des phénomènes de biotransformation des HAP chez des poissons marins et en particulier l'évaluation de l'exposition des poissons aux HAP via la détermination des métabolites produits. De manière plus générale, la biosurveillance de l'environnement marin a été envisagée par une étude multi-biomarqueurs couplant les données chimiques et biologiques, correspondant à différents niveaux de réponse de l'organisme face à une contamination aux HAP.

Le premier axe d'investigation de ces travaux de thèse s'est donc porté sur l'étude des phénomènes de biodisponibilité, de bioaccumulation et de biotransformation des HAP chez des poissons marins et en particulier l'évaluation de l'exposition des poissons benthiques aux HAP via la détermination des métabolites produits. Pour cela, une méthode de dosage des métabolites de HAP biliaires a tout d'abord été mise au point.

Par la suite ce protocole analytique a été appliqué dans le cadre d'expérimentations en laboratoire et de campagnes de terrain qui avaient pour but principal la compréhension plus globale des mécanismes de génotoxicité de ces contaminants. Plus particulièrement il s'agissait de comprendre la relation entre présence des HAP dans le milieu, exposition des organismes à ces HAP, biotransformation et expression d'effets génotoxiques.

L'exposé de cette étude s'articule en différents chapitres. Le **Chapitre I** est consacré à une synthèse bibliographique sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques, leurs origines, ainsi que leur comportement et leur devenir dans l'environnement. Les phénomènes de biotransformation et les facteurs qui les régulent y sont décrits. Les outils disponibles pour la détermination et l'analyse des métabolites de HAP sont présentés. L'enjeu du suivi des métabolites dans la surveillance environnementale ainsi que leur intérêt dans l'évaluation du risque sont exposés.

Le **Chapitre II** regroupe les méthodologies analytiques mises en œuvre ainsi que les différentes études réalisées lors de ces travaux de recherche.

Dans une troisième partie (**Chapitre III**) l'ensemble des résultats, détaillés dans les chapitres suivants, est présenté sous forme de synthèse.

Le chapitre suivant (**Chapitre IV**) est consacré aux études en laboratoire sur des turbots (*Scophthalmus maximus*) exposés aux HAP selon différentes voies de contamination. En parallèle aux études en laboratoires, des études de terrain ont été menées afin de valider les outils développés en laboratoire (**Chapitre V**).

Enfin une **Conclusion Générale** ainsi que des **Perspectives** de recherche finalisent ce manuscrit. Les valorisations présentes et futures témoignent de l'intérêt à poursuivre les recherches initiées.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre expose le contexte scientifique de l'étude en établissant un état des lieux des connaissances actuelles sur l'étude des métabolites de HAP chez les organismes marins.

Résumé du chapitre :

Ce chapitre présente le contexte scientifique de l'étude en établissant un état des lieux des connaissances actuelles concernant la problématique des métabolites de HAP chez les organismes marins et plus particulièrement chez les poissons.

Après une présentation générale des composés parents, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de leurs origines et de leur devenir dans l'environnement aquatique, la synthèse s'attarde sur les divers processus de biotransformation de ces HAP observés chez les poissons, conduisant à la formation de métabolites de HAP. De nombreuses études ont montré que ces composés intermédiaires et très réactifs, se sont révélés être capables de former des liaisons covalentes avec des constituants cellulaires comme l'ADN ou les protéines, induisant alors des caractères cancérigènes et mutagènes.

Dans les années 70 et 80, des travaux ont été réalisés afin d'étudier le métabolisme des HAP par les poissons, de comprendre les mécanismes de toxicité, de localiser et d'identifier les métabolites produits. Ces recherches ont abouti à une localisation du principal lieu de stockage des métabolites, la vésicule biliaire. A partir des années 80, des études se sont intéressées aux métabolites de HAP comme biomarqueurs d'exposition des poissons aux HAP dans l'environnement afin d'évaluer le niveau de contamination du milieu et de mettre en évidence la biodisponibilité de ces contaminants vis-à-vis des organismes, de manière à prédire, *in fine*, les effets d'une telle contamination. La grande majorité de ces études ne vise qu'à évaluer une quantité globale de métabolites (ou classes de métabolites) produits dans la vésicule biliaire. Dans la plupart des cas, les méthodes utilisées sont des méthodes semi-quantitatives de détection, utilisant la fluorescence. Cependant, depuis les années 90, un nombre croissant de travaux quantifie des métabolites biliaires individuels. Les avancées technologiques, en particulier celles liées aux techniques de préparation des échantillons biologiques complexes et celles liées aux développements de la spectrométrie de masse, ont permis l'identification et la quantification d'un plus grand nombre de métabolites. Ceci a donc permis de mieux documenter les mécanismes de biotransformation et d'essayer de lier ces composés aux effets biologiques observés. Néanmoins, de grandes lacunes existent encore dans la compréhension des phénomènes de biotransformation des HAP chez les organismes supérieurs, pour lesquels la biodisponibilité de ces contaminants et leurs processus de métabolisation sont complexes.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

1.1 Les composés

Les HAP représentent une classe de contaminants organiques relativement stables comportant au minimum deux noyaux aromatiques accolés et constitués essentiellement d'atomes de carbone et d'hydrogène (Figure 1). Dans l'environnement, les HAP composés de 2 à 7 noyaux aromatiques sont les plus présents et les plus mobiles [2].

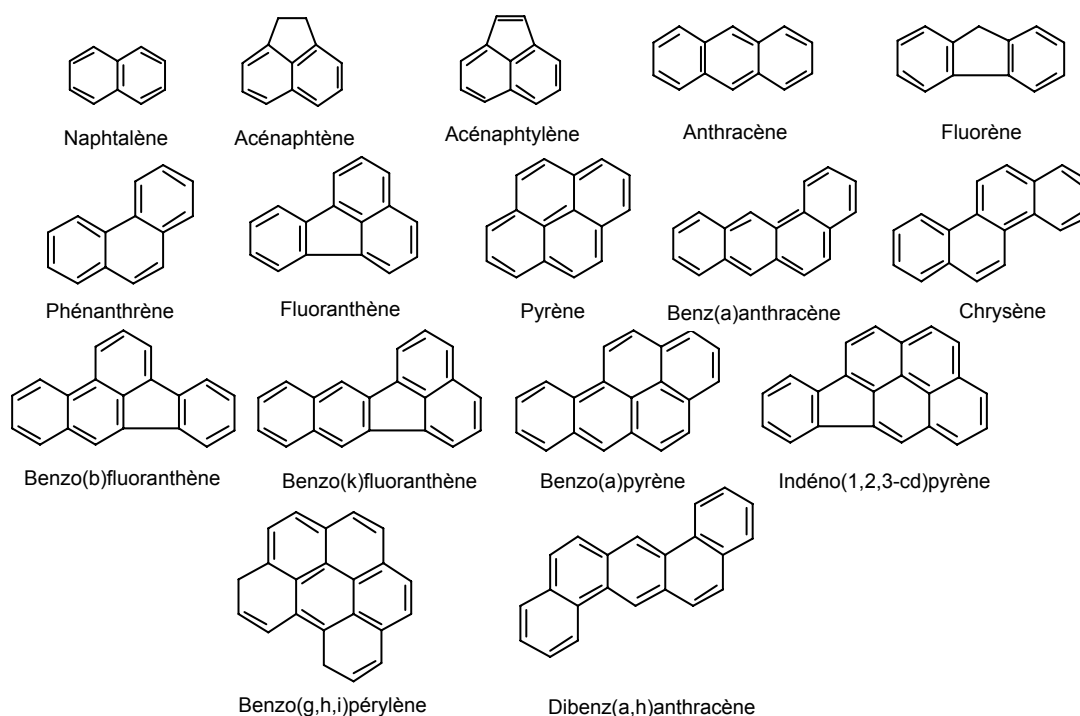


Figure 1: Structures chimiques des HAP définis comme polluants prioritaires par l'US EPA

1.2 Les origines des HAP

Plusieurs processus introduisent les HAP dans l'environnement [1, 2]. Les HAP sont principalement générés par combustion incomplète de la matière organique (origine pyrolytique), et par la lente maturation de la matière organique sous le gradient géothermique lors de la diagenèse dans le milieu sédimentaire profond (hydrocarbures pétroliers). Cependant, des hydrocarbures peuvent aussi être formés lors de la diagenèse précoce et, de façon plus controversée, par biosynthèse [2]. Deux grandes classes de sources doivent être considérées. La formation de HAP peut résulter de processus naturels, mais l'activité anthropique est généralement considérée comme la source majeure d'introduction de HAP dans l'environnement. En ce qui concerne les sources naturelles, des HAP pyrolytiques peuvent être générés par des feux de forêt ou de prairie ou lors d'éruptions volcaniques. Des fuites de réservoirs naturels de pétrole peuvent introduire des HAP pétroliers dans la mer et finalement des composés naturels peuvent dériver de précurseurs naturels. En ce qui concerne la pollution liée à l'activité anthropique, les HAP sont principalement générés par combustion incomplète de la matière organique à haute

température due à l'activité industrielle (source pyrolytique). Des hydrocarbures pétroliers peuvent être introduits dans l'environnement principalement au sein de plates-formes pétrolières ou lors du transport du carburant (source dite pétrogénique).

1.3 Caractérisation des sources de HAP

Trois grandes classes de HAP peuvent être considérées : les composés pyrolytiques, diagénétiques et pétroliers. Chaque source génère des HAP avec une empreinte caractéristique et il est ainsi possible de déterminer le processus par lequel ces composés ont été générés.

Les profils des HAP générés par combustion de la matière organique sont très complexes et caractérisés par une forte abondance de composés parents sans discrimination de masse, alors que les hydrocarbures pétroliers forment aussi un mélange très complexe [24], mais leur profil est dominé par les HAP de plus petite masse moléculaire (nombre de cycles aromatiques généralement inférieurs à 4). Les composés penta- et hexa-aromatiques sont seulement présents à l'état de traces [2]. Plusieurs facteurs tels que la composition chimique de la matière organique ou la température de combustion affectent les rendements et la distribution des HAP générés durant la maturation thermique. L'abondance des HAP substitués avec des fonctions alkyle dépend de la température de combustion [25]. La gamme de température de formation thermique des HAP est très grande. A faible température ($T < 200^{\circ}\text{C}$), la distribution des composés est gouvernée par leur stabilité thermodynamique et les composés les plus stables sont formés, alors qu'à haute température des composés de plus grande enthalpie de formation peuvent être générés. En effet, à de très hautes températures ($\approx 2000^{\circ}\text{C}$), certaines énergies d'activation peuvent être atteintes et certains composés sont alors formés dans ces conditions. A très haute température, les composés pyrolytiques sont principalement constitués d'un mélange de molécules non substitués. Si la température de pyrolyse diminue ($400\text{-}800^{\circ}\text{C}$), une proportion significative de composés substitués peut être générée. La formation du pétrole, dont la maturation thermique se produit à température généralement inférieure à 150°C , génère des HAP dont le profil est dominé par les HAP alkylés, qui sont plus abondants que les composés parents. L'étude de la distribution des séries de composés alkylés peut alors donner des informations sur les processus de formation. Les indices $\Sigma\text{C}_1\text{-HAP/HAP}$ (somme des concentrations des composés méthylés divisée par la concentration du composé parent) sont discriminants. Ils sont plus grands pour les HAP dérivés du pétrole que pour les HAP produits par combustion de la matière organique à haute et très haute température (Tableau 1).

Afin de mieux caractériser la distribution des HAP en fonction du processus qui les a générés, d'autres indices moléculaires basés sur les concentrations en HAP parents ou en HAP alkylés ont été développés. Les mêmes considérations de stabilité thermodynamique ont été appliquées à plusieurs couples d'isomères. Le phénanthrène est l'isomère tri-aromatique le plus thermodynamiquement stable. Des calculs thermodynamiques ont montré que le rapport Phe/Ant (concentration du phénanthrène divisée par la concentration de l'anthracène) est thermo-dépendant [26]. A hautes températures, comme celles atteintes lors de la combustion de la matière organique, des HAP caractérisés par un rapport faible Phe/Ant faible (< 10) sont générés alors que la lente maturation de la matière organique pendant la catagénèse conduit à des rapports beaucoup plus élevés (> 15) [27, 28], Tableau 1). Les mêmes considérations peuvent être appliquées au rapport d'isomères Fluo/Pyr (concentration en fluoranthène divisée par la concentration en pyrène). Les valeurs supérieures à 1 caractérisent une pollution d'origine pyrolytique [28, 29] alors que des valeurs inférieures à 1 sont associées à des hydrocarbures pétroliers (Tableau 1). Cependant, les limites entre les deux domaines ne sont pas si précises [21] et les différents indices doivent être considérés simultanément afin d'obtenir une bonne estimation des différentes sources de

HAP. Le 4,5 méthyl-phénanthrène est un produit typique absent des pétroles mais présent dans les sédiments localisés près des zones urbaines et /ou industrialisées [30, 31, 32]. L'indice moléculaire 4,5MP/ Σ MP (concentration du 4,5 méthyl-phénanthrène divisée par la somme des concentrations des méthyl-phénanthrènes) est très discriminant. Une absence de 4,5MP caractérise des HAP d'origine pétrogénique ou diagénétique. Dans le cas d'un mélange de pollutions, plus l'indice est grand, plus la proportion de la pollution d'origine pyrolytique est grande (Tableau 1).

Tableau 1: Valeurs de quelques indices moléculaires caractérisant l'origine des HAP

Indices	4,5MP/ Σ MP	Phe/Ant	Fluo/Pyr	Σ MPhe/Phe	Chrys/BaA	BeP/BaP
Produits pétroliers	0	> 25	< 1	> 2	> 1	> 5
Aérosols	0,1 - 0,2	10 - 25	> 1	< 1	-	-
Produits de pyrolyse	0,04 - 0,4	1 - 10	> 1	< 1	< 1	< 2
Références	[31]	[27]	[28, 29]	[31]	[33]	[34]

Quelques composés peuvent être reliés à une origine diagénétique. Ainsi, le pérylène pourrait dériver de précurseurs biogéniques par des processus diagénétiques assez rapides [35]. L'origine de ce composé est assez souvent controversée. Des concentrations relativement grandes de pérylène ont été observées dans des sédiments anoxiques recevant un apport important de matière organique terrestre [10, 36, 37, 38]. Cependant, des études ont montré que le pérylène peut aussi dériver de matériel aquatique ou de diatomées [35]. Dans le cas de processus diagénétiques, un cortège assez simple de composés est formé, en comparaison avec les mélanges complexes générés par les autres sources.

1.4 *Comportement et devenir des HAP dans les écosystèmes aquatiques*

La distribution des HAP dans les différents compartiments de l'environnement est directement régie par leurs propriétés physico-chimiques.

1.4.1 *Propriétés physico-chimiques*

Les HAP purs sont des solides habituellement colorés, cristallins à la température ambiante. Les propriétés physiques des HAP varient selon leur masse moléculaire et leur structure (tableau 2). Sauf dans le cas du naphthalène, leurs solubilités dans l'eau vont de très faibles à faibles et leurs tensions de vapeur, de faibles à modérément élevées. Leurs coefficients de partage octanol/eau (K_{ow}) sont relativement élevés, ce qui dénote un important potentiel d'adsorption sur les matières particulaires en suspension dans l'air et dans l'eau, ainsi qu'un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes [39]. Par ailleurs, les composés alkylés sont plus hydrophobes que les composés parents. Les HAP sont des composés aromatiques, leur réactivité sera donc relativement faible. Ils sont stables chimiquement et auront tendance à être rémanents. Ils sont néanmoins sensibles pour certains (anthracène, benzo(a)pyrène) à l'oxydation chimique, photochimique et biologique [39].

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques des HAP

Composés	Masse moléculaire (g .mol ⁻¹) ⁽⁵⁾	Point de fusion (°C) ⁽⁵⁾	Pression de vapeur saturante à 25°C (Pa) ⁽¹⁾	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.l ⁻¹)	Log Kow ⁽⁴⁾	Log Koc ⁽²⁾	Log Kp ou Kd ⁽⁵⁾	Log Kea ⁽¹⁾	Cste de Henry à 25°C (atm.m ³ .mol ⁻¹) ⁽²⁾
Naphtalène	128	80,5	10,5 ⁽²⁾	31,8 ⁽²⁾	3,4 ⁽²⁾	3,0	1,7 ⁽⁴⁾	1,7	483 ⁽²⁾
Acénaphène	154	95	0,356 ⁽²⁾	3,7 ⁽²⁾	3,9 ⁽²⁾	3,7	-	-	145
Fluorène	166	116,5	0,09 ⁽²⁾	1,98 ⁽²⁾	4,2 ⁽²⁾	3,9	-	-	91
Phénanthrène	178	101	0,018	1,2 ⁽²⁾	4,6 ⁽²⁾	4,2	2,73	2,8	39,3
Anthracène	178	216	7,5.10 ⁻⁴	1,29 ⁽²⁾	4,6	4,4	2,73	-	49,7
C1-Phe	192	-	-	1,53 ⁽⁶⁾	-	-	-	-	-
Fluoranthène	202	111	1,2.10 ⁻³ ⁽²⁾	0,26 ⁽²⁾	5,1 ⁽²⁾	4,9	3,7 ⁽³⁾	3,5	11,6-16,1 ⁽²⁾
Pyrène	202	156	8,86.10 ⁻⁴	0,15	5,2 ⁽⁴⁾	-	3,7 ⁽³⁾	3,7	5 ⁽³⁾
Benzo(a)anthracène	228	162	7,3.10 ⁻⁶	0,011	5,84	-	4,19	-	-
Chrysène	228		5,7.10 ⁻⁷	0,003	5,84	-	4,19	-	-
Benzo(b)fluoranthène	252	168	-	0,001 ⁽⁴⁾	6,6 ⁽²⁾	5,2-5,8	5,0 ⁽³⁾	3,3	12 ⁽³⁾
Benzo(k)fluoranthène	252	217	6.10 ⁻⁷	7,6.10 ⁻⁴ ⁽²⁾	6,8 ⁽²⁾	5,9	4,88	-	0,68
Benzo(j)fluoranthène	252	166	-	0,0025	6,44	-	4,88	-	-
Benzo(e)pyrène	252		-	6,3.10 ⁻³	6,44	-	4,88	-	-
Benzo(a)pyrène	252	179	7,3.10 ⁻⁷ ⁽²⁾	0,003 ⁽²⁾	6,0 ⁽²⁾	6,0	4,88	4,2	0,4
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276	164	-	1,9.10 ⁻⁴	6,0 ⁽²⁾	6,8	5,57	-	0,29

Références : (1) [40] ; (2) [41]; (3) [42]; (4) [43]; (5) Merck Index, 1989 ; (6) [44]

Kow : coefficient de partage n-octanol/eau

Koc : coefficient de partage carbone organique/eau

Kd : coefficient de partage sédiment/eau

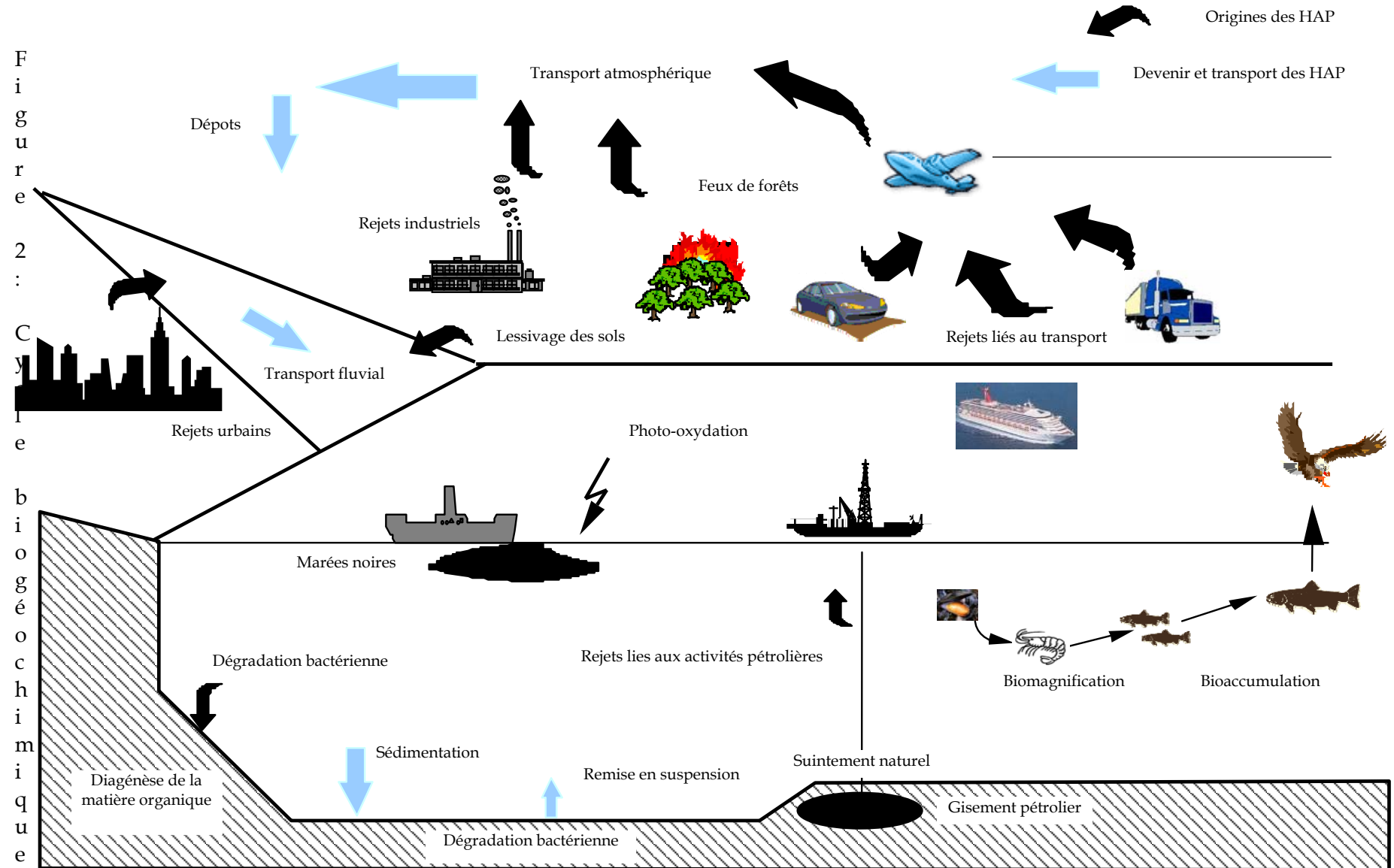
Kea : coefficient de partage eau/air

1.4.2 Cycle biogéochimique des HAP dans l'environnement

La conjonction des diverses causes de pollution décrites dans les paragraphes précédents se traduit par une contamination étendue de l'hydrosphère par les HAP. Celle-ci résulte soit des rejets directs d'effluents domestiques et industriels pollués par ces composés, soit par les apports dus aux précipitations qui, par action conjointe du dépôt sur le sol et du ruissellement, transfèrent ces molécules de l'atmosphère vers les eaux superficielles continentales et marines. Ceci explique leur présence même dans des zones littorales reculées telles que les côtes du Groenland ou la péninsule Antarctique (Figure 2.).

Par suite de leur faible solubilité dans l'eau et de leur faible pression de vapeur, les HAP sont adsorbés par la matière organique particulaire et colloïdale et incorporés dans les sédiments dans lesquels ils peuvent s'accumuler pour donner de très fortes concentrations [39, 45]. En 1997, une étude de Lipiatou *et al.* [6], concernant la zone ouest de la Méditerranée a estimé que 50 % des HAP introduits dans cette zone finissent incorporés dans les sédiments côtiers (0-200m de profondeur) et près de 13 % dans les sédiments compris entre 1000 et 2000m de profondeur. Les phénomènes de bioturbation, de resuspension et de diffusion les remettent ensuite en circulation dans les eaux marines. Ils peuvent être absorbés (ou ingérés) par les organismes dits « filtreurs » [46, 47]. Ces composés passent ensuite dans les réseaux trophiques océaniques où ils présentent divers processus de bioaccumulation voire de bioamplification., surtout chez les invertébrés [48, 49]. Cependant chez les vertébrés marins, les HAP ne s'accumulent que faiblement dans les tissus, empêchant la bioamplification au niveau supérieur de la chaîne alimentaire [17, 47].

Bien que les HAP puissent être partiellement métabolisés par les animaux aquatiques, ils sont en grande partie rejetés dans les excréta et les matières fécales (Figure 2) ou encore libérés par la décomposition des organismes morts et recyclés à nouveau dans les sédiments. La connaissance des phénomènes de métabolisation et de détoxification chez les organismes marins est essentielle à la compréhension des effets toxiques et à leur prédiction. Dans le cas d'une pollution, il est nécessaire de distinguer les fractions de contaminant auxquelles les organismes sont exposés (biodisponibilité) et les fractions accumulées par ces mêmes organismes (bioaccumulation).



en milieu océanique des HAP (d'après [1]).

1.4.3 Biodisponibilité des HAP chez les poissons

La biodisponibilité d'un contaminant pour un organisme est définie comme la fraction du contaminant présent dans un (ou des) compartiment(s) de l'environnement et qui est susceptible de subir des modifications liées à des processus physiques, chimiques et/ou biologiques [50-55].

En général, on observe une partition du contaminant entre les 4 phases du milieu aquatique : la phase sédimentaire, particulaire, dissoute et le biota. Les sédiments jouent un rôle majeur dans la biodisponibilité des HAP dans l'environnement aquatique. En effet, ils agissent comme des puits mais aussi comme des sources permanentes de contamination aux HAP à cause des phénomènes de resuspension et de bioturbation. Les différences physico-chimiques qui caractérisent les sédiments, comme la taille et la forme des grains et leur composition organique, peuvent influencer profondément la biodisponibilité et le degré de toxicité des contaminants associés aux sédiments.

Le facteur majeur régissant la bioaccumulation d'un contaminant dans le sédiment est son caractère hydrophobe mesuré par le coefficient de partage eau/octanol (K_{ow}). Ainsi, du fait de leur caractère hydrophobe, les HAP ont tendance à s'accumuler facilement dans les sédiments où ils peuvent atteindre des concentrations 3 à 4 fois plus élevées que dans les eaux surnageantes [39, 56]. La biodisponibilité de ces contaminants diminue avec l'augmentation du K_{ow} . Les composés de faible masse moléculaire se retrouvent plutôt en phase dissoute et ceux de haut poids moléculaire sont préférentiellement adsorbés sur la phase particulaire réduisant ainsi leur disponibilité envers les organismes. Une dynamique de piégeage et de relargage du contaminant s'instaure donc avec ces phénomènes d'adsorption et de désorption en phase particulaire. Cette dynamique est liée aux taux de matière organique, i.e. au taux de carbone organique, présent dans le sédiment, à la taille des particules et au temps de contact sédiment-contaminant [57]. Dans l'eau, les contaminants aromatiques hydrophobes sont donc présents : sous forme dissoute, sous forme adsorbée et/ou complexée sur la matière organique dissoute et sous forme adsorbée sur les particules en suspension. L'eau interstitielle joue également un rôle important pour le partage des composés entre le sédiment et l'eau et donc pour leur biodisponibilité. Les colloïdes présents dans les eaux interstitielles peuvent stabiliser les HAP hydrophobes et de ce fait augmenter leur concentration dans ces eaux, la rendant supérieure à la solubilité du contaminant en phase dissoute [58]. Enfin la granulométrie peut également influencer les phénomènes d'adsorption des HAP sur le sédiment et donc influencer leur distribution relative. Les particules les plus fines sont généralement enrichies en HAP de plus grande masse moléculaire relativement aux fractions de sédiment plus grossières enrichies en HAP de plus faible masse moléculaire [59, 60].

1.4.4 Processus de bioaccumulation des HAP chez les poissons

Le terme bioaccumulation désigne la capacité des organismes à concentrer et à accumuler des substances chimiques à des concentrations bien supérieures à celles où ces substances se trouvent présentes dans l'eau qui les environne.

La bioaccumulation considère deux principales voies d'entrée des substances chimiques dans l'organisme : l'eau par le biais de la respiration et la consommation d'aliments eux-mêmes contaminés. Les substances ingérées sont susceptibles d'être éliminées de diverses façons. Il y a bioaccumulation lorsque les quantités de substances apportées à l'individu dépassent les quantités éliminées. Les substances bioaccumulées doivent d'abord être bioconcentrées, stockées dans les graisses et ne pas être biotransformées. Pour les HAP, cette bioaccumulation, chez les organismes vertébrés supérieurs, est très minoritaire en comparaison aux phénomènes de biotransformation [61, 62, 63, 64-66]. Néanmoins, différents processus d'accumulation peuvent être distingués :

À partir du sédiment

Le facteur de bioaccumulation (BAF) est calculé pour estimer la fraction d'un contaminant issu du sédiment accumulé par un organisme (rapport entre la concentration du contaminant dans l'organisme et la concentration du contaminant dans le sédiment).

Dans le cas des contaminations en HAP, les particules les plus fines sont les plus enrichies en HAP de haut poids moléculaire. Par conséquent, les organismes proches du fond, où les sédiments peuvent être remis en suspension, et ceux situés dans une colonne d'eau ayant une turbidité élevée seront exposés à un milieu enrichi en HAP de plus haut poids moléculaire et en HAP les moins solubles [67].

À partir de l'eau ou bioconcentration

La bioconcentration signifie l'accumulation par les organismes aquatiques de substances à une concentration supérieure à celle mesurée dans l'eau. Le facteur de bioconcentration (BCF) est le rapport entre la concentration du contaminant dans l'organisme et la concentration du contaminant dans l'eau. Il dépend de la nature des contaminants et particulièrement de leur caractère hydrophobe. Des corrélations entre le facteur de bioconcentration et le coefficient de partage octanol-eau ont pu être établies [67, 68].

Importance de la chaîne trophique

La bioamplification (ou bioaccumulation écologique) traduit l'augmentation des concentrations des contaminants tout au long des chaînes alimentaires. Il y a passage des substances chimiques de la forme dissoute à l'état particulaire, associées à des matières en suspension vivantes ou détritiques. C'est une première étape de bioconcentration. Ensuite, par la consommation de ce matériel, phytoplancton ou particules détritiques, les contaminants vont progresser dans le réseau trophique par consommation de proies contaminées. Dans le cas des HAP, la grande capacité des organismes à métaboliser ces composés ne permet pas la bioamplification. Néanmoins on assiste à une bioaccumulation via la chaîne trophique [55, 69-72] (Figure 3).

2 Biotransformation et toxicité de HAP dans le milieu aquatique

Les HAP sont considérés comme des contaminants importants de l'environnement du fait de leur ubiquité. Ainsi en 1976, l'US-EPA a classé seize d'entre eux comme contaminants prioritaires (figure 1) en raison de leur abondance dans l'environnement et/ou de leur toxicité [73]. En 1983, l'IARC [74] a également donné une liste de HAP classés comme cancérogènes.

De nombreuses études ont montré que des organismes aquatiques marins collectés dans des zones fortement polluées aux HAP ne présentaient que de faibles teneurs en contaminants [16, 68, 69] alors qu'une forte corrélation entre le degré de contamination du milieu et la présence de lésions hépatiques, notamment de nature cancéreuse, a été démontrée [75, 76].

Ces observations traduisent le fait que, d'une part des phénomènes de biotransformation ont lieu chez les organismes aquatiques exposés et d'autre part, que ces HAP ont une faible toxicité aiguë mais une forte toxicité chronique. Leur toxicité semble augmenter après avoir subi une étape de biotransformation. De nombreuses études ont ainsi été menées afin de mieux comprendre le devenir de ces HAP dans les organismes aquatiques, notamment chez les poissons, et afin de mieux connaître les mécanismes de transformation et de toxicité de ces composés.

2.1 Les mécanismes de biotransformation des HAP chez les poissons

La métabolisation des HAP s'effectue en deux phases qui sont la fonctionnalisation (phase I) et la conjugaison (phase II) (Figure 3). La plupart des mécanismes impliqués dans ces étapes sont de type enzymatique.

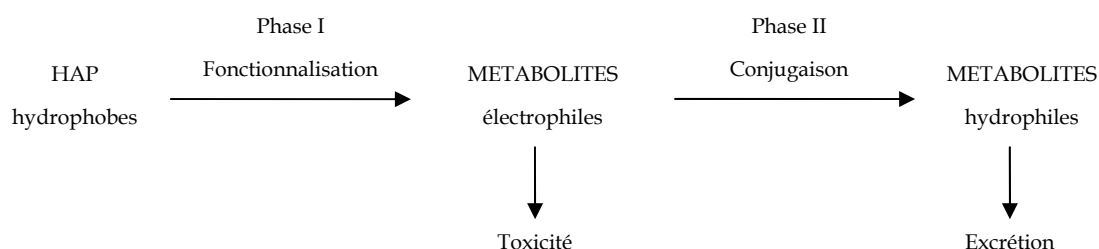


Figure 3: Schéma général de biotransformation des HAP

Plusieurs auteurs ont étudié le métabolisme des HAP chez les poissons depuis les années 1980 [77-83].

Les différentes études de la métabolisation des HAP chez les poissons, ont montré une forte accumulation de métabolites dans la vésicule biliaire [82, 84]. Viennent ensuite le foie, principal organe de biotransformation, puis la peau et d'autres organes comme les branchies, les gonades, les reins, les intestins, la vessie, le cerveau, le sang et la rate avec des ordres variables selon les études. En effet, une fois absorbés, les HAP sont principalement acheminés jusqu'au foie (pour les poissons) où ils se fixent sur les membranes des cellules en raison de leur hydrophobicité. Ces cellules hépatiques vont ensuite mettre en œuvre les processus de biotransformation afin de pouvoir excréter les HAP sous forme de métabolites via les reins et la vessie (urine) ou, majoritairement, via la vésicule biliaire puis les intestins (excréments). La bile apparaît donc comme le fluide biologique de choix pour étudier les phénomènes de biotransformation.

2.1.1 La phase de fonctionnalisation

La phase I du processus de biotransformation est appelée phase de fonctionnalisation et a pour but de former des métabolites électrophiles plus enclins que les composés parents à se lier à des groupements hydrophiles lors de la phase II.

Au cours de la phase de fonctionnalisation, les HAP sont métabolisés par les enzymes du système mono-oxygénase (MFO: mixed function oxygenases) du cytochrome P450, en composés plus hydrophiles comme les phénols et les époxydes. Ces enzymes sont essentiellement localisées dans les microsomes (fraction sub-cellulaire du réticulum endoplasmique lisse) des cellules de foie des poissons mais également dans les mitochondries et le cytosol des cellules hépatiques ainsi que dans les branchies, les intestins, la peau, les reins, les gonades, le placenta, le sérum, les glandes surrénales, etc. ... [85, 86].

Le cytochrome P-450 a notamment été étudié chez les poissons [85, 87-97], chez les invertébrés [45, 49, 62, 98, 99, 100-104]. Ces études montrent que de grandes capacités de biotransformation existent entre ces différents organismes. Ainsi un classement de ces organismes en terme de capacité de biotransformation a pu être réalisé : Mammifères > Poissons > Crustacés > Mollusques

Cette première étape de biotransformation aboutit en général à la formation d'époxydes et de phénols qui peuvent ensuite être pris en charge par les enzymes de phase II. En outre, les époxydes formés peuvent aussi être hydratés par des enzymes microsomales non dépendantes du système cytochrome P450, appelées époxydes hydrolases (EH), pour former des dihydrodiols. Ces molécules peuvent à nouveau être prises en charge par le cytochrome P450 conduisant alors à la formation de diols-époxydes. Les dihydrodiols peuvent également être transformés en quinone ou en diols (catéchols) par des enzymes dihydrodiol-déshydrogénases (DD) [105-108].

D'une manière générale, les HAP sont principalement transformés en époxydes, phénols, phénols-oxydes, dihydrodiols, dihydrodiols-époxydes, quinones, diols, triols et tétrols [61, 109].

De plus, lors de l'oxydation des HAP par les enzymes mono-oxygénases du cytochrome P450, les transferts d'électrons réalisés peuvent provoquer un stress oxydatif par la production de formes très instables et très réactives de l'oxygène tel que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$) et l'hydroperoxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces radicaux peuvent aussi réagir avec les HAP et leurs métabolites pour former notamment des peroxydes [110].

2.1.2 La phase de conjugaison

En phase II, phase de conjugaison, la plupart des métabolites issus de la phase I est prise en charge par les enzymes dites de phase II [88, 98, 111, 112-114]. Les molécules oxydées vont alors se lier à des groupements hydrophiles dans le but de favoriser leur excréation [115-118]. Ces molécules hydrophiles peuvent être l'acide glucuronique, l'acide sulfurique, le glutathion, des acides aminés. Les principaux conjugués produits sont représentés dans la Figure 4. Chez les poissons, la sulfoconjugaison est en général bien moins importante que la glucuronidation ou que la conjugaison au glutathion [88, 98, 101, 111-116, 119, 120].

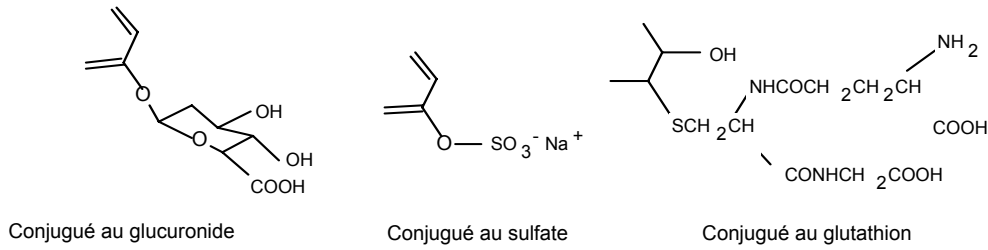


Figure 4: Formules des principaux conjugués formés chez les poissons

Des différences de régiosélectivités des cytochromes P450 de poissons conduisent à des oxydations préférentielles dans certaines régions structurales des HAP (Figure 5) produisant ainsi des métabolites préférentiels différents d'une espèce animale à l'autre [81, 82, 121, 122, 123, 124, 125].

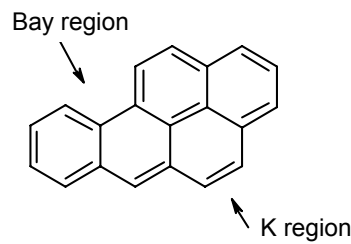
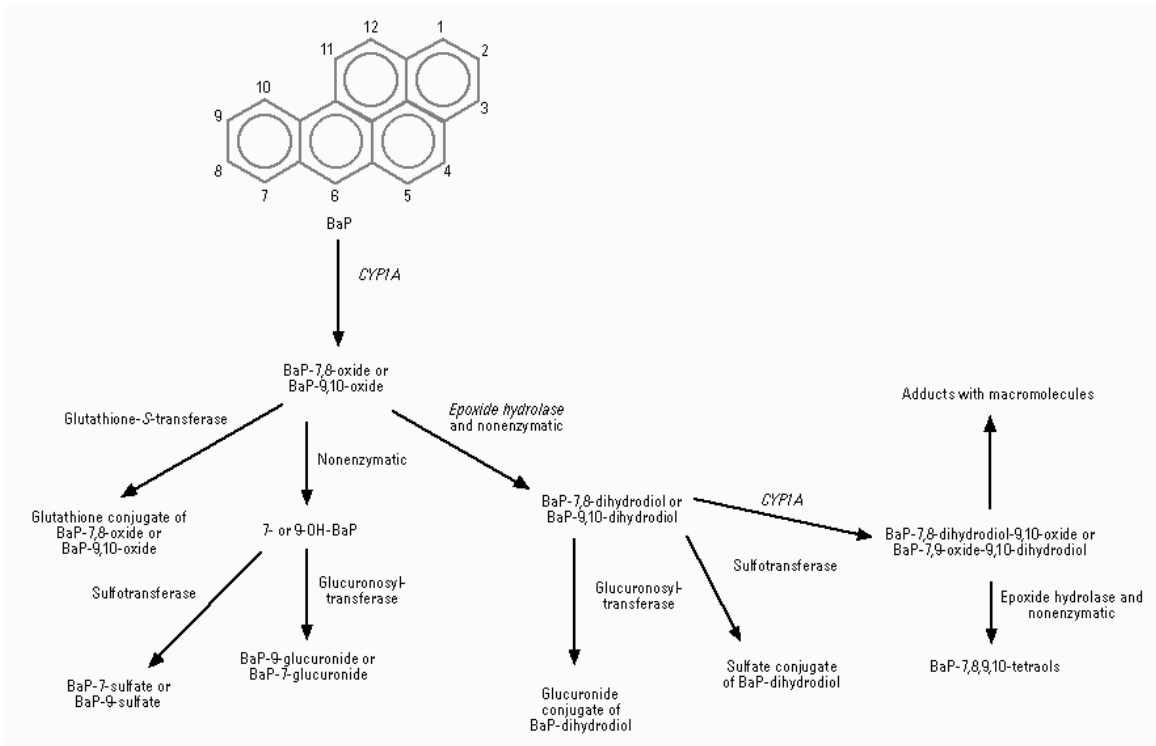


Figure 5: Régions structurales du benzo(a)pyrène

Ainsi chez les poissons, l'oxydation préférentielle dans la « Bay Region » conduit à la formation de diol-époxydes qui sont des molécules cancérigènes [124].



CYP1A : enzymes mono-oxygénases du cytochrome P-450 1A

Figure 6 : Voies de métabolisation du BaP chez les vertébrés (d'après [126])

Dans l'organisme, les métabolites formés se trouvent sous forme libre (métabolites I^{aires}) ou sous forme conjuguée (métabolites II^{aires}) (Figure 6). Dans la bile, la forme conjuguée est prépondérante même si le pourcentage de conjugaison est variable d'un métabolite à l'autre [127, 128]. Ainsi des études portant sur la biotransformation du BaP chez le carlottin anglais (*Parophrys vetulus*) ont montré que les principaux métabolites du BaP mesurés dans la bile sont des conjugués glucuronidés (entre 32 et 56%) tandis que les conjugués sulfatés sont en très faibles proportions (entre 2 et 16%) [81, 82, 121].

De manière générale, on note que, chez les poissons :

- les conjugués sulfatés des HAP sont en quantité moins importante que les glucuronidés [81, 127, 129]
- les conjugués sulfatés sont majoritairement éliminés via l'urine [130]
- les glucuronidés sont majoritairement excrétés dans la bile [127, 129]

2.2 Toxicité des HAP

La toxicité est la capacité inhérente à une substance de produire des effets délétères sur un organisme. Les HAP n'ont pas tous les mêmes propriétés toxiques ni les mêmes effets toxiques. De nombreuses études ont évalué les toxicités aiguë et chronique des HAP sur différents organismes aquatiques. Le benzo(a)pyrène est le HAP le plus étudié en raison des importantes propriétés toxiques de ses métabolites. La génotoxicité, la cancérogénicité, l'effet sur la reproduction et le développement [49, 131-137, 138, 139] et l'immunotoxicité des HAP [140] ont été principalement mis en évidence à des degrés divers selon les HAP.

Dans cette synthèse bibliographique, ne seront abordés que les caractères génotoxiques et cancérogènes des HAP, qui sont les aspects les plus étudiés à ce jour du fait de l'importance sur les organismes des effets associés.

2.2.1 Mécanismes de génotoxicité et de cancérogénicité

L'exposition des organismes aquatiques aux HAP peut entraîner une interaction de ces polluants par le biais de leurs métabolites avec l'ensemble des constituants de l'organisme. Cette perspective revêt un aspect particulièrement critique pour l'ADN, compte tenu du rôle clé de cette macromolécule dans l'expression et la transmission de l'information génétique. Ainsi, la mesure des modifications induites sur l'ADN par les HAP peut être reliée au niveau d'exposition d'un vertébré aquatique à un polluant génotoxique [141]. Ces altérations de l'ADN induites par les HAP après biotransformation peuvent être utilisées comme biomarqueurs de génotoxicité [142].

Deux altérations sont fréquemment rencontrées dans les études des contaminations aux HAP. La première, d'ordre chimique, correspond à la formation de produits d'addition entre le xénobiotique et les nucléotides, appelés adduits. La seconde, d'ordre physique, correspond à la cassure au niveau d'un seul brin, ou des deux brins, d'ADN conduisant, dans ce dernier cas, à la formation de petites entités qui peuvent s'individualiser sous la forme de micronoyaux.

Les bases oxydées

L'ADN est une macromolécule constituée d'un squelette de phospho-désoxyriboses sur lequel sont greffées, suivant des séquences bien déterminées, des bases pures (A :

adénine, G: guanine) et pyrimidiques (T: thymine, C: cytosine). Ces bases azotées constitutives de l'ADN représentent des cibles privilégiées pour les métabolites électrophiles réactifs issus de la biotransformation des HAP. Ainsi des lésions primaires de l'ADN de type bases oxydées sont formées au cours de la réaction entre l'ADN et les métabolites. Ces derniers sont soit des métabolites électrophiles susceptibles de se lier à l'ADN ; soit des métabolites pro-oxydants (quinone, o-quinone) qui résultent de l'activation métabolique des HAP par les monooxygénases du cytochrome P450.

Une des lésions de l'ADN les plus représentées est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG). Sa présence sur l'ADN provoque des erreurs de lecture lors de la réplication de l'ADN [143] et des mutations par substitutions GC → TA apparaissent alors sur le brin d'ADN répliqué [144].

Bien que la 8-oxodG soit très utilisée comme biomarqueur de contamination aux HAP chez les organismes vertébrés supérieurs, peu d'études ont été menées sur les organismes aquatiques *in vitro* ou *in vivo*. Quelques travaux ont été réalisés sur la moule [145, 146] et sur certaines espèces de poissons [145, 147, 148].

Les adduits d'ADN

Différents travaux réalisés en milieu naturel ont montré l'intérêt de l'emploi de la détection des adduits d'ADN comme biomarqueur d'exposition et de génotoxicité des HAP chez les poissons. Ainsi, la présence d'adduits a été démontrée dès 1987 par Dunn *et al.* [149] dans le foie des poissons-chats (*Ictalurus nebulosus*) capturés dans des effluents contaminés. En 1989, Varanasi *et al.* [123, 150] ont observé une excellente corrélation entre le niveau d'adduits à l'ADN hépatique chez une sole, le niveau de composés aromatiques fluorescents dans la bile des individus capturés et le niveau de contamination par les HAP des sédiments des lieux de capture. Plus récemment, une étude [148, 151] sur des limandes prélevées en Baie de Seine a mis en évidence la présence d'adduits HAP dans l'ADN. Au cours de cette étude, des différences qualitatives dans les profils d'adduits obtenus ont été observées en fonction de l'âge et du sexe des individus analysés.

Les voies métaboliques d'activation des HAP, responsables de la formation d'adduits à l'ADN font intervenir des cytochromes P450. Après oxydation par le cytochrome P450 et hydratation catalysée par l'époxyde hydrolase (EH), des métabolites dihydrodiol sont formés et oxydés en Région Bay (Figure 6) en métabolites diol-époxydes. Ces derniers vont alors se lier de manière covalente avec une base de l'ADN pour former des adduits dits stables.

Dans l'exemple du benzo(a)pyrène, le HAP le plus étudié en termes de toxicité, il a été montré que la régiosélectivité des enzymes de biotransformation était cruciale en termes de toxicité. Ainsi, la biotransformation du benzo(a)pyrène peut aboutir à la formation du composé *anti*- ou *syn*-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde benzo(a)pyrène (*anti*- ou *syn*-BPDE) où l'époxyde positionné en « Région Bay » (Figure 5) lui confère une forte capacité à se lier avec l'ADN [105, 108, 152-154]. Le principal adduit détecté dans le foie de poissons ou des microsomes hépatiques exposés à du benzo(a)pyrène est l'*anti*-BPDE-deoxyguanosine [150, 155, 156, 157].

Les cassures de brins

Les cassures de brins de l'ADN ont également été très mesurées chez les poissons grâce au test des comètes [87, 148, 158, 159]. Dans le cas d'une exposition aux HAP, la réparation incomplète des adduits stables et dépurinables de l'ADN par les systèmes de réparation semble être à l'origine d'une grande partie des cassures de brins de l'ADN. Outre la formation de métabolites électrophiles réactifs pour l'ADN, l'activation métabolique des HAP par les monooxygénases du cytochrome P450 produit également des quinones et o-

quinones dont l'entrée dans le cycle redox génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) [160]. Ces ERO peuvent ainsi fragmenter les brins de l'ADN soit directement (cas de H₂O₂ et de OH[•]) ou indirectement via la réparation incomplète des bases oxydées de l'ADN [161].

2.2.2 Données toxicologiques

Des tests en laboratoire ont été réalisés afin d'évaluer la toxicité aiguë et chronique des HAP sur les organismes aquatiques. La toxicité dépend de plusieurs facteurs environnementaux (température, lumière) mais aussi de paramètres propres à l'organisme (espèce, stade de développement, voie de contamination). Ainsi il a été observé une toxicité plus importante des HAP pour les organismes à leurs premiers stades de développement et en présence de lumière [162].

Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est évaluée par une brève exposition d'un organisme à une substance chimique à forte dose. Ces tests permettent d'établir des valeurs de CL₅₀ (concentration létale). La CL₅₀ est la concentration d'une substance déduite statistiquement qui devrait provoquer au cours d'une exposition ou, après celle-ci, pendant une période définie, la mort de 50% des animaux exposés pendant une durée déterminée (JOCE (Journal Officiel des Communautés Européennes) n° L383A).

La toxicité aiguë des HAP est faible à modérée (valeur de CL₅₀). Différentes études réalisées sur des poissons sont résumées dans en Annexe 1 et montrent une toxicité généralement plus forte des HAP de plus haut poids moléculaire [163]. Ainsi des tests réalisés sur *Pimephales promelas* (cyprinidé, poisson d'eau douce) ont montré des valeurs de CL₅₀ de 7900 µg.l⁻¹ pour le naphthalène et de 1,8 µg.l⁻¹ pour le benzo(a)anthracène. De plus, il a été observé que la toxicité aiguë des HAP variait peu d'une espèce de poisson à une autre [101, 164-174].

Toxicité chronique

La toxicité chronique est évaluée par une exposition faible d'un organisme à une substance chimique sur une longue durée. Ces tests permettent d'établir des valeurs de NOEC (No Observed Effect Concentration) et LOEC (Lowest Observed Effect Concentration). La NOEC correspond à la plus forte concentration testée n'entraînant pas d'effet statistiquement significatif par rapport au témoin. La LOEC correspond à la plus faible concentration testée entraînant un effet statistiquement significatif par rapport au témoin. Différentes études réalisées sur des organismes marins sont résumées dans l'Annexe 1. Comme pour la toxicité aiguë, les HAP de plus haut poids moléculaire présentent une toxicité chronique plus forte : valeur de NOEC de 450 µg.l⁻¹ pour le naphthalène et de 5,4 µg.l⁻¹ pour l'anthracène [163].

Classement des HAP en fonction de leur toxicité et valeurs guides

Certains organismes internationaux comme l'IPCS (Programme International de Sécurité Chimique) ont classé les HAP en fonction de leur potentiel mutagène et cancérigène envers les mammifères (Tableau 3). L'US-EPA a retenu 16 HAP (Figure 1) comme polluants prioritaires à rechercher dans les eaux, les sols et l'atmosphère. Le benz(a)anthracène, le benzo(a)pyrène et le dibenz(a,h)anthracène sont généralement considérés comme les HAP les plus toxiques. On trouve ensuite principalement le chrysène, les benzofluoranthènes ainsi que l'indéno(1,2,3-cd)pyrène.

Le CSHPF (Conseil de Sécurité et d'Hygiène Publique Française) a quant à lui désigné 7 HAP à suivre dans les aliments : le benz(a)anthracène, les benzo(b+j)fluoranthènes, le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, le dibenz(a,h)anthracène et l'indéno(1,2,3,cd)pyrène. Le dibenz(a,c)anthracène coéluant avec le dibenz(a,h)anthracène en GC/MS, on quantifie en fait 8 HAP.

Le concept de facteur d'équivalent toxique (FET) a également été développé afin d'établir une valeur toxicologique pour des effets cancérigènes induits par un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même d'action. Ce concept suppose que l'organe ciblé ainsi que l'activité toxique soient identiques pour chaque molécule apparentée. L'étape essentielle dans l'approche FET consiste à estimer le potentiel toxique d'un HAP qui servira de référence à partir de laquelle le potentiel toxique des autres HAP sera établi. Un facteur d'équivalence toxique (FET) de 1 est arbitrairement donné à la substance de référence. Dans la plupart des cas, le benzo(a)pyrène est choisi comme substance de référence car c'est le HAP le plus étudié et en conséquence le mieux connu. De plus, il est souvent présent dans les mélanges de HAP. Une échelle de toxicité a donc été réalisée par différents organismes en calculant un FET au benzo(a)pyrène.

Ces données sont récapitulées dans le Tableau 4. L'US-EPA ne fournit de FET que pour les 7 HAP les plus toxiques (classés B2).

Tableau 3: Classement des HAP en fonction de leur génotoxicité et de leur cancérogénicité

Composé	Génotoxicité		Cancérogénicité	
	IPCS [162] ^a	IPCS [162] ^a	US-EPA [175] ^b	IARC [74] ^c
Naphtalène	-	(?)	C	2B (2002)
Acénaphthylène	(?)		D	
Acénaphthène	(?)	?		
Fluorène	-	-	D	3
Phénanthrène	?	(?)	D	3
Anthracène	-	-	D	3
Fluoranthène	+	(+)	D	3
Pyrène	(?)	(?)	D	3
Benzo(a)Anthracène	+	+	B2	2A
Chrysène	+	+	B2	3
1-,2-,3-,4- et 6-C ₁ Chrysène				3
5-C ₁ Chrysène				2B
Thiophène				3
Benzo(b)Fluoranthène	+	+	B2	2B
Benzo(j)Fluoranthène	+	+		2B
Benzo(k)Fluoranthène	+	+	B2	2B
Benzo(a)Pyrène	+	+	B2	2A
Indéno(1,2,3-c,d)Pyrène	+	+	B2	2B
Dibenzo(a,h)Anthracène	+	+	B2	2A
Dibenzo(a,c)Anthracène				3
Benzo(g,h,i)Perylène			D	3

^a Classification IPCS :

+ : effet positif

- : effet négatif

? : incertain

() : résultats dérivant d'un faible nombre de données

^b Classification US-EPA :

A : cancérogène pour l'homme

B1 et B2 : cancérogène probable pour l'homme

C : cancérogène possible pour l'homme

D : inclassable

E : probablement non cancérogène

^c Classification IARC :

1 : cancérogène pour l'homme

2A : probablement cancérogène pour l'homme

2B : possiblement cancérogène pour l'homme

3 : inclassable

Tableau 4: Récapitulatif des facteurs équivalent toxique au benzo(a)pyrène [41]

Composé	US-EPA [175]	Kalberlah <i>et al.</i> [176]	Nisbet et Lagoy [177]	Baars [178]	INERIS [41]
Acénaphène	-	0,001	0,001	0,010	0,001
Anthracène	-	-	0,010	-	0,010
Benzo(a)anthracène	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Benzo(a)pyrène	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Benzo(b)pyrène	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Benzo(g,h,i)perylène	-	-	0,010	-	0,010
Benzo(j)fluoranthène	-	0,100	-	-	-
Benzo(k)fluoranthène	0,010	0,010	0,100	0,100	0,100
Chrysène	0,001	0,010	0,010	0,010	0,010
Dibenzo(a,h)anthracène	1,000	1,000	5,000	1,000	1,000
Fluoranthène	-	0,010	0,001	0,010	0,001
Fluorène	-	-	0,001	-	0,001
Indeno(1,2,3-c,d)pyrène	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Naphtalène	-	-	0,001	-	0,001
Phénanthrène	-	< 0,001	0,001	0,001	0,001
Pyrène	-	0,001	0,001	0,001	0,001

US-EPA: Agence américaine de protection de l'environnement;

INERIS: Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

2.2.3 Données écotoxicologiques

Les sédiments marins et estuariens sont un réservoir pour de nombreux polluants, et particulièrement pour les HAP hydrophobes. L'impact des contaminants sédimentaires sur les organismes aquatiques est aujourd'hui bien connu. Aux Etats-Unis, les autorités estiment que 10 % des rivières, lacs et baies sont contaminés par des composés toxiques qui peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques mais aussi affecter la santé des personnes qui consomment poissons et crustacés de ces milieux [179, 180]. La gestion de la qualité des milieux aquatiques et en particulier de leur phase sédimentaire est donc devenue une priorité pour de nombreux pays.

La toxicité potentielle de ces sédiments est évaluée à l'aide de bioessais et d'études sur la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Il est recommandé d'utiliser plusieurs tests biologiques faisant appel à plusieurs organismes (bactéries, algues bivalves, amphipodes, polychètes, poissons). Ceci permet de prendre en compte la différence de sensibilité des espèces vis à vis des différents contaminants et d'évaluer l'impact des sédiments sur des organismes occupant différents niveaux des chaînes trophiques.

Toutes ces approches intégrées ont été utilisées afin de développer des seuils de toxicité pour les sédiments. Les premiers seuils de toxicité ont été initialement développés par Long et Morgan [181], suite à de nombreuses études sur la baie du Puget Sound (Etat de Washington, USA). A partir des niveaux de contamination des sédiments, des résultats des bioessais et d'études de la structure des communautés benthiques, ils ont défini des seuils de qualité (AET : Apparent Effect Threshold, concentrations les plus fortes pour lesquelles aucun effet biologique n'est observé) pour de nombreux contaminants.

En France, il existe une approche similaire, permettant d'évaluer le risque toxique que représente un sédiment. Elle consiste à déterminer pour chaque contaminant une PEC (Probable Environmental Concentration) qui est obtenue soit par dosage, soit déterminée à l'aide de la PEC dans l'eau multiplié par le coefficient de partage du composé (K_p) étudié et par 1000. On détermine également une PNEC (Probable No Effect Concentration) qui correspond à la concentration la plus forte d'un composé sans effets biologiques observés. La PNEC est déterminée à l'aide de bioessais ou à partir de modèle similaire à ceux développés par Di Toro *et al.* [182, 183]. Les rapports entre les PEC et les PNEC des différents contaminants présents dans un sédiment permettent de caractériser le risque toxique de ce dernier.

Plus récemment Long *et al.* [13] et MacDonalds *et al.* [63] ont respectivement défini des seuils de toxicité et déterminé des valeurs ER-L (Effect Range low) et ER-M (Effect Range Medium) dans le premier cas et TEL (Threshold Effect Level) et PEL (Probable Effect Level) dans le second. Ces seuils ou critères de toxicité ont été obtenus de manière empirique, c'est à dire en compilant les résultats de nombreuses études réalisées soit au laboratoire, soit en milieu naturel et pour lesquelles, le niveau de contamination et de toxicité des sédiments étaient disponibles. A partir de cette banque de données, ces auteurs ont défini pour chaque contaminant les concentrations pour lesquelles des effets biologiques sont rarement (en dessous des ERL et TEL), occasionnellement (entre les ER-L et ERM ou entre TEL et PEL) ou fréquemment rencontrés (au dessus des ER-M ou PEL). De cette façon, les seuils de toxicité développés prennent en compte les effets dus au mélange de contaminants ainsi que de nombreuses caractéristiques du sédiment.

Ces seuils de toxicité permettent de classer les sédiments en fonction de leur toxicité potentielle [180, 184], d'identifier les contaminants les plus problématiques, ainsi que les zones méritant être étudiées et/ou restaurées [185], de corréler des effets biologiques observés au niveau de contamination des sédiments [186] et d'interpréter des résultats analytiques obtenus lors de programmes de surveillance sur le plan du risque environnemental [187]. Cependant, ils ne sont pas à l'heure actuelle reconnus par la législation et ne peuvent en aucun cas remplacer les tests de toxicité, d'accumulation ou les

études sur les communautés benthiques [179] dans l'évaluation de la qualité d'un sédiment. En effet, la détermination de valeurs seuils de tous les composés toxiques n'est pas possible, de plus leur utilisation est souvent plus coûteuse que celle des bio-essais. Plusieurs limites existent, notamment avec les sédiments présentant des contaminations intermédiaires (entre ER-L et ER-M). La biodisponibilité des contaminants, ainsi que la présence d'un composé non déterminé ou pour lequel il n'existe pas de valeur guide peuvent avoir un impact important sur la toxicité du sédiment. De plus, ils ne tiennent pas compte des produits de dégradation des composés organiques (comme les métabolites de HAP) qui peuvent être plus toxiques que les composés parents. Enfin lors des études écotoxicologiques, les corrélations entre les effets biologiques et la qualité des sédiments définie à l'aide de ces seuils de toxicité ne permettent pas d'en déduire des relations de causes à effets et par conséquent d'identifier avec justesse les contaminants responsables des effets observés.

Ces critères de toxicité n'ont pas pour but d'évaluer avec exactitude la qualité d'un sédiment ou de remplacer la réalisation de tests biologiques. Ils ont été développés pour donner un outil pratique et relativement fiable aux gestionnaires afin qu'ils puissent déterminer quelles sont les zones côtières, estuariennes et portuaires les plus impactées par une pollution, les classer en fonction de leur contamination, identifier celles qui doivent être restaurées en priorité et supporter ou recommander le développement de programme de surveillance de la qualité des sédiments (Tableau 5). L'utilisation de ces seuils de toxicité constitue des outils puissants pour évaluer la qualité d'un milieu lorsqu'ils sont couplés à des tests de toxicité, d'accumulation ou des études sur les communautés benthiques [63].

Tableau 5: Récapitulatif des critères d'évaluation écotoxicologique applicables aux HAP. Commission Oslo-Paris (OSPAR)

Composés	Eau ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Sédiment (mg.kg^{-1} poids sec)	Moule (mg.kg^{-1} poids sec)
Naphtalène	5 - 50 *	0,05 - 0,5 *	0,5 - 5 **
Phénanthrène	0,5 - 5 **	0,1 - 1 *	5 - 50 **
Anthracène	0,001 - 0,01 **	0,05 - 0,5 *	0,005 - 0,05 **
Fluoranthène	0,01 - 0,1 **	0,5 - 5 **	1 - 10 **
Pyrène	0,05 - 0,5 **	0,05 - 0,5 **	1 - 10 **
Benzo(a)anthracène	nd	0,1 - 1 **	nd
Chrysène	nd	0,1 - 1 **	nd
Benzo(a)pyrène	0,01 - 0,1 **	0,1 - 1 **	5 - 50 **

D'après (<http://www.ospar.org/fr/html/qsr2000/qfc4.htm>, le 29/09/08). Les données des sédiments sont basées sur une teneur de référence de 1% de carbone organique.

* données fermes ; ** données provisoires ; nd : aucune donnée n'est disponible ou les données disponibles sont insuffisantes.

3 Les métabolites de HAP

3.1 Techniques analytiques

En raison de la faible accumulation des HAP dans les organismes supérieurs et de la toxicité des métabolites, il est apparu nécessaire de rechercher les métabolites de HAP dans les organismes de manière à établir des relations entre l'exposition aux HAP et la toxicité observée [64]. Des protocoles analytiques ont donc été développés afin d'identifier et de quantifier ces métabolites.

Le dosage des métabolites de HAP nécessite la mise au point de techniques analytiques applicables aux matrices biologiques.

Le caractère complexe des échantillons de bile de poisson exposé aux HAP est un défi pour le chimiste analytique, et la méthode analytique choisie dépendra des questions à résoudre. Différentes techniques existent pour caractériser les métabolites dans les fluides biologiques des poissons. Elles peuvent être distinguées en deux grandes catégories : les méthodes dites de screening ou semi-quantitatives estimant la totalité des métabolites et les méthodes quantitatives permettant de déterminer individuellement les composés.

3.1.1 Screening et techniques semi-quantitative

Les techniques de screening ou semi-quantitatives sont fondées sur une détection spectrofluorimétrique. Celle-ci repose sur la propriété qu'ont les composés aromatiques d'émettre une fluorescence lorsqu'ils sont soumis à une excitation, du fait de la présence d'électrons délocalisés sur leurs noyaux aromatiques.

De nombreuses techniques spectrofluorimétriques ont été utilisées pour déterminer les composés aromatiques fluorescents (FAC) dans la bile de poissons. Krahn *et al.* [188] ont introduit la chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la fluorimétrie (HPLC/F) pour la quantification ; Lin *et al.* [189] ont présenté une méthode basée sur la fluorescence synchrone (SFS) et Aas *et al.* [190] décrivent une méthode fondée sur la fluorescence fixe (FF). Ces trois techniques étant les plus couramment utilisées, elles sont détaillées dans les paragraphes suivants. Néanmoins, d'autres méthodes peuvent également être envisagées comme le balayage des longueurs d'onde d'émissions à une longueur d'onde d'excitation fixée à 254 nm [191] ou la fluorescence induite par laser (LIF) [192, 193, 194, 195, 196, 197] ou encore la chromatographie électrocinétique micellaire couplée à la fluorimétrie (MEKC/F) [198, 199].

La chromatographie en phase liquide haute performance associée à la fluorimétrie (HPLC/F)

Dans la plupart des techniques utilisant la HPLC/F, les métabolites de HAP sont séparés par chromatographie de partage utilisant des phases stationnaires inversées (reversed phase) avec des colonnes de type octadécyle (C₁₈). Le tableau 5 établit une liste des méthodes les plus fréquemment rencontrées dans la littérature. Elles sont principalement dérivées de la méthode de Krahn *et al.* [200-202]. Des techniques utilisant des phases stationnaires normales sont également rencontrées, notamment pour séparer les métabolites de types diols du BaP dans la bile de poissons [203].

Le principal avantage de cette technique HPLC/F réside dans l'absence d'étape de préparation d'échantillon. En effet, les échantillons de bile non hydrolysés, regroupant donc les métabolites libres (de phase I) et les métabolites conjugués (de phase II), sont directement injectés dans le système chromatographique et la fluorescence émise par les composés est mesurée à de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission fixes. Cette technique est semi

quantitative puisque les métabolites ne sont pas quantifiés individuellement mais évalués par intégration du massif non résolu représentant les composés aromatiques fluorescents globaux (FACs). Les mesures sont effectuées à 290/335 nm pour les métabolites de type naphthaléniques (généralement, indicateurs d'une contamination pétrolière), à 260/380 nm pour les métabolites du phénanthrène et à 380/430 nm pour ceux du BaP (généralement indicateurs d'une source pyrolytique). En outre, des métabolites du pyrène sont également quantifiés à 340/384 nm [204] et ceux du chrysène à 290/390 nm [205]. Dans ces conditions, la contribution de composés interférents au signal global est considérée comme faible. Cependant, la présence d'interférents dans les chromatogrammes HPLC est parfois notée dans la bile de poissons aux longueurs d'onde des métabolites du naphthalène et du phénanthrène [206]. Les concentrations sont exprimées en équivalents naphthalène, phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène, utilisés comme étalons externes. Néanmoins, certains métabolites du phénanthrène répondent aux longueurs d'onde du naphthalène et inversement, et ceux du fluoranthène et du pyrène peuvent également répondre à celles du benzo(a)pyrène [206]. Ainsi, certaines études utilisent les mono-hydroxy HAP, comme le 1-hydroxypyrene (1-OHP) ou le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHBP) comme étalons externes à la place des composés parents pour quantifier, en autres, les métabolites du benzo(a)pyrène [207, 208]. De ce fait, la quantification est effectuée grâce à des composés ayant une structure moléculaire la plus proche de celles de composés présents dans l'échantillon. On peut également noter l'utilisation du tétrahydrotétrabenzo(a)pyrène comme étalon interne [209].

Enfin, il faut noter que certains travaux rapportent l'utilisation d'une déconjugaison enzymatique des échantillons de bile avant quantification globale des métabolites [202, 210, 211-213]. En effet, les métabolites se trouvant sous différentes formes conjuguées dans l'organisme, il est possible de recourir à une étape de déconjugaison afin de quantifier les métabolites sous forme libre (non conjuguée). Pour cela, une technique faisant appel à des enzymes est principalement utilisée [81, 201, 214, 215, 216]. Ces enzymes, β -glucuronidase et aryl-sulfatase, sont généralement utilisées en mélange afin de libérer les métabolites conjugués à l'acide glucuronique et aux sulfates. Elles peuvent être également être utilisées individuellement, notamment par l'inhibition de l'une ou de l'autre forme [81, 82, 84, 217].

Certaines études ont également recours à une attaque acide avec de l'acide chlorhydrique [83, 211, 218] ou avec de l'acide sulfurique [217] afin de libérer des métabolites conjugués au glutathion. Steward *et al.* [84, 203] ont montré la possible utilisation d'une autre enzyme, appelée gamma-glutamyltransférase, afin de libérer les conjugués au glutathion.

Les principaux avantages de la méthodologie HPLC/F sont les suivants : elle est disponible dans beaucoup de laboratoires de part son faible coût à l'achat et en fonctionnement. La détection par fluorescence est très sensible et la spécificité est relativement bonne mais très dépendante de la matrice de l'échantillon.

En revanche la technique HPLC/F souffre de plusieurs désavantages comme la nécessité d'avoir une grande quantité d'échantillon si les concentrations recherchées sont faibles.

Tableau 6 : Préparation de l'échantillon et analyse HPLC de métabolites de HAP hydroxylés

Composés	Préparation de l'échantillon			Analyse HPLC			Référence	
	Traitement enzymatique	Incubation	Solvant d'extraction	Etalon interne	Colonne	Phase mobile		Détecteur
Métabolites du BaP	β -glucuronidase ou sulfatase	37 °C, 6 h.	Ethylacétate et acétone		Zorbax ODS 5 μ m; 4.6 mm \times 250 mm	Gradient: eau, acétonitrile et méthanol	Compteur à scintillation	[84]
1-OHP	β -glucuronidase et sulfatase	37 °C, 2 h.	Ethanol, \approx 50 ou 100 %		Rosil C-18 HL; 3.1 mm \times 200 mm	Acétonitrile: eau (70:30 v/v)	Fluorescence	[210]
Métabolites du pyrène	Pas de traitement ou d'hydrolyse acide	Hydrolyse acide à 80 °C, 3 h.	Méthanol ou méthylène chloride		Marck [®] LiChroCART [®] RP-18 5 μ m; 4.0 mm \times 125 mm	Gradient: tampon acétate d'ammonium, 10 mM, et acétonitrile	LC-APCI-MS/MS	[217]
Métabolites du BaP	β -glucuronidase, sulfatase ou γ -glutamyltranspeptidase	37 °C, 6 h.	Ethylacétate et acétone	6-OHC, Benzantracène-7,12-dione	S80A C-18 ECQ 5 μ m; 4.6 mm \times 250 mm	Gradient: eau et méthanol	LC-APCI-MS	[113, 114]
Composés hydroxylés de 2- à 5-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase		Ethanol	Anthracène-d ₁₀	Xterra RP-18	Gradient: eau contenant 1 mg l ⁻¹ d'acide ascorbique et acétonitrile	Fluorescence	[219]
Composés hydroxylés de 2- à 5-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase		Ethanol		RP silica C-18	Gradient: eau et acétonitrile	Fluorescence	[219]
BaP metabolites	β -glucuronidase et sulfatase ou HCl, pH 0	37 °C, 1 h. ou 30 °C, 30 min.	Méthanol (50 %)		Vydac 201TP54 C-18; 4.6 mm \times 250 mm	Gradient: eau et méthanol	Fluorescence	[220]
Composés hydroxylés de 2- à 4-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase	37 °C, 1 h.	Ethanol (84 %)		Vydac 201TP54 C-18; 4.6 mm \times 250 mm	Gradient: eau acidifiée à pH 4 et acétonitrile	Fluorescence	[221]
Composés hydroxylés de 3- à 5-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase	37 °C, 45 min.	Methanol (50 %)		Vydac 201TP54 C-18; 4.6 mm \times 250 mm	Gradient: eau et méthanol	Fluorescence	[222, 223]
Composés hydroxylés de 2- à 5-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 2 h.	Acétonitrile (80%)	Triphénylamine	Vydac 201TP52 C-18 5 μ m; 2.1 mm \times 250 mm	Gradient: tampon acétate d'ammonium, à pH 4 et acétonitrile	Fluorescence	[208]
Métabolites du chrysène	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 2 h.	Acétonitrile (70%)	Pérylène	Vydac 201TP52 C-18 5 μ m; 2.1 mm \times 250 mm	Gradient: tampon acétate d'ammonium, à pH 4 et acétonitrile	Fluorescence	[205, 224]

La Fluorescence Fixe (FF)

La fluorescence fixe (F) est considérée comme la méthode fluorimétrique la plus simple pour l'étude semi-quantitative des métabolites de HAP. En effet, elle consiste en une mesure directe de la fluorescence des échantillons de bile dilués, à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées. La plupart des travaux publiés sont fondés sur les études de Lin *et al.* [225], Beyer *et al.* [226] et Aas *et al.* [95, 190]. La quantification se fait par étalonnage externe soit par rapport aux composés étalons phénoliques disponibles (équivalents 1-hydroxynaphtalène, 9-hydroxyphénanthrène, 1-hydroxypyrene ou 3-hydroxybenzopyrène), soit par rapport aux HAP parents. Les couples de longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont globalement les mêmes que ceux utilisés pour la HPLC/F. Cependant, on peut noter que Beyer *et al.* [226] ont réalisé un dosage combiné des métabolites du naphthalène et du phénanthrène à 275/383 nm, alors que Lin *et al.* [225] ont mesuré les métabolites du naphthalène à 290/335 nm et ceux du benzo[a]pyrene à 380/430 nm et que Fillman *et al.* [227] ont dosé ceux du phénanthrène seul à 252/357 nm. Le Tableau 7 récapitule les études de détection par la fluorescence fixe.

Comparé à la HPLC/F, la détection par FF donne des valeurs en unités relatives équivalentes [225]. Néanmoins, on peut noter que les valeurs obtenues pour les métabolites du benzo(a)pyrène par HPLC/F sont toujours supérieures à celles obtenues par FF alors que ce n'est pas le cas pour les métabolites du naphthalène où le rapport entre les deux méthodes est beaucoup plus variable [225].

Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle ne permet pas de différencier, pour une paire spécifique de longueurs d'onde, les différents composés qui fluorescent, incluant alors les composés parents, leurs métabolites et les dérivés alkylés parents ainsi que leurs métabolites [201]. Cependant, les rapports des intensités des signaux pour les trois paires 290/350, 341/383 et 380/430 nm, peuvent fournir des informations sur les origines des sources de HAP [228, 229]. Ainsi une forte intensité de fluorescence à 290/335 nm peut être l'empreinte d'un mélange complexe de métabolites naphthaléniques non alkylés et alkylés, qui sont typiquement trouvés chez les poissons exposés à une contamination pétrogénique. Par ailleurs, les sources de type combustion (transports, chauffages domestiques, effluents industriels) conduisent à des signaux de fluorescence fixe plus importants à 341/383 et 380/430 nm en raison de la présence de composés comportant 4 et 5 cycles [228, 229].

La Spectrométrie à Fluorescence Sychrone (SFS)

Afin de diminuer le temps d'analyse, de simplifier le protocole expérimental et de réduire les coûts de l'analyse, la SFS peut être considérée comme une méthode alternative à la FF et à la HPLC/F. Cette technique consiste à balayer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission monochromatiques des échantillons dilués avec une différence de longueurs d'onde constante. Dans la littérature, la majorité des études traitant de la SFS sont basées sur les travaux d'Ariese *et al.* [210], Lin *et al.* [189] et van der Oost *et al.* [230] pour le dosage des métabolites globaux du pyrène (Tableau 6). En effet, bien que le benzo(a)pyrène soit l'un des HAP les plus étudiés pour son caractère fortement cancérigène, le pyrène et ses métabolites semblent être de plus sensibles indicateurs d'une exposition aux HAP. Ainsi trois raisons principales ont justifié leur choix lors des développements de méthode SFS [189]. Tout d'abord, le pyrène est toujours présent dans les mélanges environnementaux de HAP et il est souvent le constituant majoritaire [74]. Deuxièmement, le pyrène a un schéma de biotransformation beaucoup moins complexe que le benzo(a)pyrène, puisque le 1-hydroxypyrene est le seul métabolite prépondérant du pyrène alors que le benzo(a)pyrène est métabolisé en plus de 20 métabolites différents [74]. Enfin il a été démontré que 1-hydroxypyrene était fortement présent dans la bile de poisson alors que les métabolites du benzo(a)pyrène ne contribuait que faiblement à la fluorescence globale mesurée [188, 210].

Pour ces différentes raisons, les composés sont généralement quantifiés par rapport au 1-hydroxypyrene et exprimés en équivalents hydroxypyrene.

Cependant, le dosage des métabolites du phénanthrène a également été réalisé par cette technique dans l'urine et l'hémolymphe de crabe [227].

Tableau 7: Principales études utilisant la SFS et la FF pour l'analyse des métabolites de HAP dans la bile de poissons

Composés	Détection	Contexte	Référence
Pyrène	SFS	Estuaire (à proximité d'une usine aluminium)	[231]
		Mer de Wadden Estuaire	[232] [142]
Pyrène, Benzo(a)pyrène	SFS	Estuaire (caging)	[233]
		Mer du Nord (à proximité d'une station offshore)	[234]
Naphtalène, Phénanthrène, Benzo(a)pyrène	FF	Détroit (à proximité d'une usine aluminium)	[204]
		Port (caging)	[235]
		Baie	[236]
Naphtalène + Phénanthrène, Pyrène, Benzo(a)pyrène	FF	Fjord (caging)	[226]
Pyrène	FF	Détroit (à proximité d'une usine aluminium)	[237]
		Fjord (caging)	[190]
Pyrène, Benzo(a)pyrène	FF	Estuaire (caging)	[233]

3.1.2 Dosage quantitatif des métabolites individuels

Bien que, conventionnellement, la spectroscopie de fluorescence ait une excellente sensibilité pour l'analyse de HAP à l'état de trace, son application aux mélanges des composés fluorescents est limitée [238]. Cette limitation devient particulièrement évidente lors de l'analyse de composés aux structures très similaires, comme les métabolites isomères et même les HAP parents et leurs métabolites. De plus, dans l'optique d'établir des liens entre structure et activité, et de comprendre les différents mécanismes de biotransformation des HAP, des outils plus spécifiques et plus sensibles, ont donc été développés.

La chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la fluorescence (HPLC/F) reste encore la méthode la plus fréquemment utilisée, également pour un dosage quantitatif. En effet elle permet, avec un étalonnage externe, de cibler un composé pour un couple de longueur d'onde définies [65, 205, 208, 224, 239, 240, 241].

Cependant depuis les années 80, la détection par spectrométrie de masse (MS) a permis des progrès considérables en termes de sensibilité et de spécificité dans l'analyse de métabolites de HAP dans les différentes matrices biologiques. Les paragraphes suivants s'attachent à décrire les techniques associées à la détection par spectrométrie de masse simple ou en tandem utilisées pour l'analyse quantitative des métabolites de HAP (leurs caractéristiques, leur applicabilité aux échantillons naturels et leurs limites).

Ces techniques de séparation et de détection très sensibles qui permettent de doser les métabolites dans les matrices biologiques, doivent obligatoirement être associées à une préparation préalable des échantillons. En effet, le caractère complexe des matrices biologiques, la multiplicité des sources d'interférents et la nécessité fréquente de concentrer les échantillons naturels, ont rendu indispensable la mise en œuvre de protocole de préparation des échantillons, comportant plusieurs étapes : de l'extraction à la séparation et la détection des composés.

Préparation des échantillons

La déconjugaison

Comme décrit précédemment, les métabolites se trouvent, principalement, sous la forme conjuguée (glucuronide, sulfate, glutathion) dans l'organisme et en particulier dans la bile de poisson (Chapitre I, § 2.1.2). Pour quantifier la totalité des métabolites individuels formés (sous forme libre et conjuguée), il est judicieux de recourir à une étape de déconjugaison au cours de laquelle, les métabolites conjugués sont hydrolysés et ainsi libérés sous forme de métabolites hydroxylés.

Différentes raisons justifient cette étape de déconjugaison. Premièrement, dans le cas de quantifications individuelles totales, très peu de standards conjugués sont accessibles pour effectuer une calibration, alors que de nombreux métabolites de type I sont commercialisés. De plus, les composés conjugués ne peuvent pas être analysés avec une technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC/MS) en raison des problèmes de volatilisation de ces composés. Enfin, dans le cadre d'un diagnostic d'une exposition, la conversion des différents conjugués sous une forme unique de type I, augmente l'intensité du signal pour une meilleure détection. Par ailleurs, d'un point de vue toxicologique, il serait plus intéressant de quantifier uniquement les métabolites formés exclusivement durant la phase I, car ce sont eux qui engendrent les propriétés toxiques.

La technique la fréquemment plus utilisée est celle faisant appel à un mélange d'enzymes, β -glucuronidase et arylsulfatase, ajouté directement à l'échantillon de bile dilué et homogénéisé (Tableau 6). Les temps d'incubation vont de 2 à 24 heures [81, 82, 84, 201, 210, 211, 214, 216, 217, 222, 242, 243]. Ainsi les conjugués glucuronidés et sulfates peuvent être simultanément hydrolysés par ajout de β -glucuronidase contenant une activité arylsulfatase dans un échantillon dilué par à un tampon acétate au pH compris entre 4,8 et 5,0 et suivi d'une incubation allant de 1 à 24 heures à 37-40°C [84, 188, 203, 208, 220, 244].

La majorité des publications concernant l'analyse des métabolites de HAP dans la bile de poisson se concentre sur la détermination des glucuronides et des sulfates. Cependant une partie non négligeable des métabolites conjugués est représentée par les conjugués liés au glutathion [156]. A la différence des glucuronidés et des sulfates, ces métabolites conjugués sont plus facilement retenus dans le foie [156]. Ainsi l'emploi de γ -glutamyltransférase, pour déconjuguer les métabolites associés au glutathion, est mentionné dans la littérature [203]. Enfin, certaines études mentionnent également l'utilisation d'une attaque acide avec de l'acide chlorhydrique [83, 212, 218] ou de l'acide sulfurique [217, 243] pour libérer les métabolites conjugués au glutathion.

Afin de prévenir toute oxydation des métabolites hydrolysés, Ariese *et al.* [219] et Richardson *et al.* [221] préconisent l'ajout de 0,5 et 4 % d'acide ascorbique, respectivement, au mélange de bile et d'enzymes de déconjugaison. Mazéas et Budzinski [245] ont, pour leur part, ajouté du β -mercaptoéthanol, un anti-oxydant, à l'échantillon de bile en début de protocole avant les étapes de déconjugaison et d'extraction.

L'extraction

Cette étape permet d'extraire les composés de leur matrice biologique. Les techniques utilisées dépendent de la matrice dans laquelle se trouve l'échantillon.

Ainsi pour des matrices aqueuses, la technique de choix se révèle être l'extraction liquide-liquide. Elle est la plus utilisée pour extraire les métabolites de HAP (avec ou sans déconjugaison) provenant des milieux aquatiques [242, 246-248]. Différentes combinaisons de solvants sont rapportées dans la littérature (Tableau 8). L'acétate d'éthyle [84, 208, 212, 214], le dichlorométhane en mélange avec le méthanol [216, 246] et le mélange hexane et méthyl-t-butyl éther (2/1, v /v) [242] ne sont que des exemples.

D'autres techniques sont également utilisées. C'est le cas de l'extraction sur phase solide (SPE) qui permet d'extraire des métabolites des matrices liquides par adsorption des composés sur une phase solide [94, 217]. Une fois déposés, les composés sont récupérés par élution avec un solvant organique dont l'affinité avec les molécules adsorbées est suffisante pour les décrocher de la phase et ainsi les éluer. La technique SPE offre de nombreux avantages en comparaison à l'extraction liquide-liquide comme une capacité d'automatisation, un temps d'analyse réduit, une quantité réduite de solvants permettant une reconcentration des échantillons.

La SPE a été largement développée pour l'étude des métabolites de HAP, et en particulier des métabolites du pyrène, dans l'urine humaine [249-253]. Cependant, très peu de travaux ont rapporté son emploi dans l'environnement marin [48, 94, 217, 245, 254]. La plupart des études faisant appel à cette technique d'extraction utilisent des cartouches remplies de phase octadécyle (C₁₈) ou plus rarement, des disques en fibre de verre greffées C₁₈.

Le Tableau 8 regroupe les principaux protocoles mettant en œuvre une extraction sur phase solide des métabolites de HAP. Un protocole pour l'extraction du 1-hydroxypyrene a été décrit par Jongeneelen *et al.* [255, 256] puis utilisé par différentes équipes [257, 258]. Le passage de l'échantillon à la cartouche se fait après l'hydrolyse enzymatique et centrifugation. Après une étape de rinçage de la phase, les composés sont extraits de la phase par élution de méthanol. Les rendements varient de 81 à 91%.

Au cours des dernières années, un certain nombre de compagnies ont développé les sorbents polymériques bi-fonctionnels spécifiques, basés sur un squelette de polymère de styrène-divinylbenzène, fonctionnalisés par des groupements polaires, synthétisés de manière à améliorer le contact avec l'échantillon aqueux pendant la percolation en mettant en œuvre des caractéristiques mixtes hydrophiles et hydrophobes, démontrant une meilleure mouillabilité et une plus grande sélectivité [252]. Ainsi des protocoles de dosage des métabolites de HAP, utilisant ces nouvelles phases polymériques ont vu le jour [250, 252].

La sélectivité peut de plus être optimisée par exemple en jouant sur le pH de l'échantillon et la nature et le pH des solvants. L'ajout d'étapes de rinçage des cartouches et d'élution des interférents permet d'augmenter la spécificité et par la même, la sensibilité de cette technique d'extraction.

Tableau 8 : Travaux mettant en œuvre une extraction liquide des métabolites de HAP

Matrice	Exposition	Solvant d'extraction	Référence
Foie et peau	Naphtalène	C ₆ H ₁₄ et NaOH	[259]
Bile	Ports	C ₆ H ₁₄ / (CH ₃)C(OCH ₃) (2:1, v:v)	[242]
Bile	Sédiment contaminé	C ₆ H ₁₄	[210, 260]
Microsomes hépatiques	Sédiment contaminé	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[261, 262]
Foie	Benzo(a)pyrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[122]
Foie	Benzo(a)pyrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[263]
Muscle, foie et bile	Benzo(a)pyrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[77]
Fraction hépato-pancréas de crabe	Fluorène et Benzo(a)pyrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[218]
Bile	Naphtalène et Benzo(a)pyrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[81]
Bile	Naphtalène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[214]
Foie	Phénanthrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[264]
Microsomes	Phénanthrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[125]
Bile	Chrysène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[205, 208]
Microsomes	Dibenzo(a,l)pyrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[124]
Bile	Milieu aquatique	CH ₃ COOC ₂ H ₅	[211, 212, 248, 265]
Bile	Benzo(a)pyrène	CH ₃ COOC ₂ H ₅ / (CH ₃) ₂ CO puis CH ₃ COOC ₂ H ₅	[84]
Bile	Pyrène	CH ₂ Cl ₂	[217]
Crabe entier	Pyrène	CH ₂ Cl ₂	[266]
Bile	Pétrole	CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH puis CH ₂ Cl ₂	[213, 216]
Bile	Milieu marin	CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH (10:1, v:v) puis CH ₂ Cl ₂	[246, 247]
Bile	Pétrole	CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH (10:1, v:v) puis CH ₂ Cl ₂	[83]
Bile	Milieu marin	CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH	[206]
Micro-crustacé entier	Benzo(a)pyrène et Fluoranthène	CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH / H ₂ O	[191]
Néréis	Pyrène marqué	CHCl ₃ / CH ₃ OH / H ₂ O	[267]
Bile	Benzo(a)pyrène	CH ₃ OH / CHCl ₃ , BHT	[82]
Bile, foie	Phénanthrène et rétène	CH ₃ OH	[94]
Poisson entier	Benzo(a)pyrène	CH ₃ CN	[268]
Poisson entier	Pyrène	CH ₃ CN	[254]

C₆H₁₄ : hexane ; NaOH : soude ; (CH₃)C(OCH₃) : méthyl t-butyl éther (MTBE) ; CH₃COOC₂H₅ : acétate d'éthyle ; (CH₃)₂CO : acétone ; CH₂Cl₂ : dichlorométhane ; CH₃OH : méthanol ; H₂O : eau ; CHCl₃ : chloroforme ; CH₃C₆H₂OH(C(CH₃)₃)₂ : 2,6-di-tert-butyl-p-crésol (BHT) ; CH₃CN : acétonitrile

Tableau 9 : Principaux protocoles mettant en œuvre une extraction sur phase solide C₁₈ des métabolites de HAP

Métabolite	Matrice	Rinçage	Elution	Référence
1-OHP	urine	H ₂ O	CH ₃ OH	[256, 258, 269]
1-OHPG	urine	H ₂ O / CH ₃ OH (70:30, v:v)	H ₂ O / CH ₃ OH (20:80, v:v)	[270]
OHN et conjugués	urine	H ₂ O	CH ₃ OH acidifié	[271]
1-OHP	urine	H ₂ O puis C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	[239]
3-OHBaP et 3-OHBaA	urine	H ₂ O	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅	[272]
Métabolites du Benzo(a)anthracène	Eau	H ₂ O	CH ₃ CN	[48]
Métabolites du Pyrène	Eau	H ₂ O	CH ₃ CN / H ₂ O puis CH ₃ CN	[254]
Métabolites du Pyrène	Bile de poisson	H ₂ O / CH ₃ OH (70:30, v:v)	CH ₃ OH	[217]
Métabolites du Phénanthrène et rétène	Bile et foie de poisson	Non précisé	Non précisé	[94]

Enfin on peut également noter l'utilisation de la micro-extraction sur phase solide (SPME). La SPME est une technique qui a les avantages de ne pas utiliser de solvant organique et d'être très facilement coupable avec une analyse par chromatographie en phase gazeuse [273]. Elle consiste en l'adsorption des composés sur une fibre. Les composés sont généralement désorbés thermiquement directement dans l'injecteur du système chromatographique en phase gazeuse. Comme pour la SPE, cette technique n'a essentiellement été appliquée qu'aux échantillons d'urine humaine. Gmeiner *et al.* [273] préconisent l'emploi d'une fibre polyacrylate plongée pendant 45 minutes dans l'échantillon d'urine préalablement hydrolysé, pour l'analyse des hydroxypyrrènes (1-, 2-, 4-hydroxypyrrène), des hydroxynaphtalènes (1- et 2-hydroxynaphtalène) et des hydroxyphénanthrènes (1-, 2-, 3-, 4- et 9-hydroxyphénanthrène). La méthode a été modifiée en 2002 [274] afin d'extraire les métabolites hydroxylés du fluorène (1-, 2-, 4- et 9-hydroxyfluorène). La fibre reste lors immergée dans l'échantillon toute une nuit, sous agitation et à 35°C.

La purification

Les matrices biologiques étant composées d'un mélange complexe de molécules, certains constituants peuvent interférer avec les métabolites à doser et polluer les appareils d'analyse. Une étape de purification est donc souvent envisagée pour éliminer certains constituants de la matrice. Les techniques utilisées sont fondées sur les affinités relatives des composés pour une phase stationnaire solide et pour une phase mobile liquide. Ainsi, des protocoles mettant en œuvre la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), en phase inverse et en phase normale, sont fréquemment utilisés [80, 82, 83, 127, 254].

L'utilisation de l'extraction en phase solide (SPE) permet également de purifier les échantillons. Ainsi une étude récente [245] propose un protocole basé sur la SPE pour la détermination quantitative de métabolites individuels de HAP dans des échantillons biologiques. Elle montre que l'utilisation d'une cartouche NH₂ est essentielle pour purifier

les échantillons de bile avant une injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les rendements (protocole entier) obtenus pour la majorité des métabolites étudiés oscillent entre 70 et 96 %.

Techniques de séparation et de détection

Associés à la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou à la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) en tant que techniques de séparation, il existe de nombreux types de détecteurs pouvant permettre la détection des hydrocarbures aromatiques polycycliques et de leurs métabolites dans les échantillons environnementaux. Nous avons précédemment exposé les techniques de screening ainsi que les dosages semi-quantitatifs des métabolites de HAP.

Dans le cas de dosages quantitatifs, les techniques de spectrométrie de masse (simple ou en tandem), couplées à la chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide et actuellement en plein essor, se sont révélées être des techniques de choix pour l'analyse des métabolites de HAP dans les matrices environnementales. Elles sont décrites dans le chapitre suivant.

Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple ou en tandem (GC/MS ou GC-MS/MS)

Le rôle du chromatographe est de séparer les constituants d'un mélange. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur. Il existe différents types de détecteurs mais le spectromètre de masse tend aujourd'hui à supplanter tous les autres car il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie. Les principes et caractéristiques techniques de cet outil sont présentés en Annexe 2.

Concernant l'étude des métabolites de HAP, la GC/MS est une technique utilisée d'une part pour l'identification des métabolites en laboratoire et d'autre part lors des dosages de ces composés dans le milieu marin. Cette technique permet, à la différence de l'HPLC/F, de pouvoir obtenir une meilleure résolution lors de la séparation des métabolites isomères.

Après une série d'étapes de préparation de l'échantillon, la quantification finale des métabolites individuels se fait par GC/MS en mode d'impact électronique (EI). Une étape de dérivation (cf paragraphe suivant) est souvent ajoutée avant l'injection. Le Tableau 10 regroupe les différentes études utilisant la GC/MS pour détecter les métabolites de HAP dans les organismes marins.

Les métabolites sont identifiés en comparant leur temps de rétention et leur spectre de masse à ceux des standards de référence. Chaque spectre de masse est caractérisé par la présence d'un ion moléculaire et des ions spécifiques de fragmentation qui dépendent de l'agent de dérivation utilisé. Ainsi, pour les métabolites dérivés (e.g. TMS-éthers), les ions de fragmentation les plus abondants sont $[M-15]^+$ et $[M-31]^+$, et une forte abondance de l'ion $[M-89]^+$, ion $[-O-Si(CH_3)_3]$ indique la présence du groupement hydroxyle [83]. Pour les métabolites non dérivés, l'ion de fragmentation majoritaire est l'ion $[M-29]^+$ [92, 211, 246].

Les limites de la GC/MS sont celles de la chromatographie en phase gazeuse. Le facteur limitant étant la volatilité des analytes, cette technique est réservée à l'analyse de molécules aisément vaporisables et thermiquement stables, c'est à dire, en première approximation, de composés de poids moléculaire faible à moyen (inférieur à 700 Da). Une

seconde limitation, non négligeable, reste le coût plus excessif d'un couple GC/MS en comparaison à un couplage HPLC/F.

Ces limites admises, la GC/MS est un formidable outil d'analyse. La diversité des modes d'injection et des colonnes capillaires (géométrie, nature de la phase stationnaire) autorise la séparation de mélanges extrêmement complexes. Contrairement aux autres détecteurs, le spectromètre de masse fournit des informations structurales sur les analytes étudiés et peut permettre leur identification instantanée si ceux-ci sont répertoriés dans des bibliothèques de spectres. Le spectromètre de masse permet également de quantifier les analytes, même co-élus, à des concentrations inférieures au ng.l⁻¹. C'est sa capacité à détecter spécifiquement une ou plusieurs molécules au sein d'un échantillon très complexe qui en fait un détecteur idéal pour l'analyse de traces. Cette grande sensibilité et cette haute spécificité sont davantage accrues avec l'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution (HRMS), au coût d'achat et de fonctionnement également très supérieurs à la GC/MS conventionnelle.

Note particulière : la dérivation

Les métabolites de HAP ne sont pas des candidats idéaux pour une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC/MS) en raison de leur très faible volatilité. Ainsi l'ajout d'un agent dérivant va rendre possible l'analyse en GC/MS, en modifiant la fonctionnalité de la molécule. La dérivation permet également de réduire l'adsorption de l'analyte sur le système GC et d'augmenter la réponse du détecteur, d'améliorer la séparation des pics, la symétrie des pics et ainsi, améliorer la séparation et les limites de détection [208, 275]. Enfin, la dérivation empêche la déshydratation des dihydrodiols dans le système chromatographique [188, 201, 275].

En général, l'acylation et la silylation sont les techniques utilisées pour les métabolites biliaries hydrolysés avant injection en GC/MS. Différents réactifs de dérivation sont commercialisés. L'un des plus fréquemment utilisés est le N,O-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA), agent de silylation. Il forme facilement des TMS-éthers avec les groupements alcools [276]. Après ajout de 100-200 µl de BSTFA dans un extrait reconcentré [208] ou dans un extrait évaporé à sec [188], la dérivation est finalisée par incubation du mélange à 60°C pendant 2 heures. Mazéas et Budzinski [245] recommandent également l'emploi de 30 µl de BSTFA suivi d'une incubation de 30 minutes à 65°C. Le triméthylsilylimidazole (TMSI) dans la pyridine (1:4, v:v) forme également des TMS-éthers avec les groupements phénoliques des métabolites ainsi qu'avec les diols et les tétrols, lors d'une dérivation à température ambiante durant 15 min [224, 277]. En outre, on note également l'emploi du 1,1,1,3,3,3-hexaméthylidisilazane (SYLON TP) [214] et du N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) [217] comme agents de silylation des métabolites. Enfin l'acylation est rapportée par Hellou et Payne [216, 244] au moyen de diazométhane éther.

Néanmoins, même si la dérivation facilite l'analyse des métabolites de HAP en GC/MS, son utilisation présente plusieurs inconvénients. Des études ont souligné la perte de sensibilité induite par l'étape de dérivation [201, 211, 213]. Il a été montré que le rendement de la dérivation diminuait avec l'augmentation du nombre de noyaux aromatiques du composé, conduisant ainsi à des rendements plus faibles et à une sensibilité réduite pour les métabolites de plus haut poids moléculaire. De plus, la réaction de dérivation est parfois difficile à stabiliser. Pour une seule molécule, plusieurs formes dérivées peuvent coexister diminuant ainsi la sensibilité de la technique lors de la recherche d'un ion spécifique. Enfin, les composés présents dans les matrices complexes peuvent interférer sur la dérivation et l'identification des spectres obtenus est rendue plus difficile.

Tableau 10 : Principaux travaux mettant en œuvre la GC/MS pour la détection des métabolites de HAP

Composés étudiés	Préparation des échantillons				Analyse GC/SM			Référence
	Traitement enzymatique	Incubation	Solvant d'extraction	Dérivant	Etalon interne	Colonne	Détection	
Métabolites du phénanthrène	β -glucuronidase sulfatase	37 °C, 10 h.	Acétate d'éthyle	TMS-éthers	α -naphtol	SE-54 5% phenyl; 20 m \times 0.33 mm	MS EI, 70 eV	[214]
Composés hydroxylés de 2- à 4-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 4 h.	Dichlorométhane et isopropanol	TMS-éthers	hexaméthylbenzène	J & W DB5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[188, 201]
Composés hydroxylés de 2- à 3-noyaux aromatiques alkylés et non-alkylés	β -glucuronidase	37 °C, 24 h.	Dichlorométhane et méthanol	TMS-éthers	n-pentadécane	SE-30	MS EI, 70 eV	[216]
Composés hydroxylés de 2- à 4-noyaux aromatiques alkylés et non-alkylés	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 3 h.	Dichlorométhane et méthanol		2,6-dibromophénol	J & W DB5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[246]
Composés hydroxylés de 2- à 5-noyaux aromatiques alkylés et non-alkylés	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 2 h.	Dichlorométhane et méthanol	TMS-éthers	2,6-dibromophénol, 1-naphtol-d ₈ , phen-d ₁₀ , chry-d ₁₂ , flu-d ₁₀ et BaP-d ₁₂	J & W DB5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[83]
Composés hydroxylés de 2- à 4-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 2 h.	Acétate d'éthyle		2,6-dibromophénol hexaméthylbenzène	HP-5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[211, 212]
Composés hydroxylés de 1- à 4-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase	37 °C toute la nuit	Hexane : méthyl-t-butyl éther (2:1)		octadécane	MSBP5 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[242]
Composés hydroxylés de 2- à 4-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase			TMS-éthers	décachlorobiphényle	GC separation	MS EI, 70 eV	[219]
Composés hydroxylés de 2- à 4-noyaux aromatiques	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 2 h.	Acétate d'éthyle	TMS-éthers	2,6-dibromophénol	CP-Sil 8 5% phenyl; 50 m \times 0.25	MS EI, 70 eV	[208]
Métabolites du chrysène	β -glucuronidase sulfatase	40 °C, 2 h.	Acétate d'éthyle	TMS-éthers	4-Cl-naphtol pérylène	CP-Sil 8 5% phenyl; 50 m \times 0.25	MS EI, 70 eV	[205, 224]

Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse simple ou en tandem (HPLC/MS ou HPLC-MS/MS)

La combinaison du pouvoir de séparation de l'HPLC et de la sélectivité de la détection par spectrométrie de masse constitue un outil puissant pour l'analyse des composés polaires et réactifs que sont les métabolites conjugués [217, 254, 271, 278] et les métabolites hydroxylés des HAP [113, 279]. Les principes et caractéristiques techniques de cet outil sont présentés en Annexe 3.

La possibilité de détection des composés glucuronidés et des sulfates permet une simplification des protocoles (plus d'étape de déconjugaison) et fournit des informations essentielles sur la spéciation des différents composés (formes libres, formes conjuguées) dans l'organisme. Ces informations sont très utiles dans l'étude de la toxicité des HAP. La HPLC/MS a particulièrement été utilisée pour la quantification des métabolites de HAP chez les mammifères terrestres et très peu chez les organismes marins [127, 217, 254]. La plupart de travaux en HPLC/MS cités dans la littérature traitent de l'analyse des métabolites de HAP dans l'urine humaine [279, 280, 281].

Les sources d'ionisation dites APCI (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique) et ESI (Ionisation Electrospray), ont toutes deux été utilisées dans les modes positif et négatif [158]. Dans l'étude des métabolites biliaires chez le poisson, cette technique n'a pas été établie en dosage de routine car elle souffre de problèmes liés à l'adsorption, la contamination, les réactions de surface et autres interférences, rendant impossibles les analyses aux concentrations inférieures au ng.g^{-1} [282]. Cependant quelques essais ont été tentés. Law *et al.* [217] ont utilisé l'analyse HPLC/MS pour caractériser les métabolites dans la bile et dans l'urine de truites (*Oncorhynchus mykiss*) exposées au pyrène. Après une première séparation des composés libres et des conjugués par une colonne HPLC en phase inversée, chaque fraction était identifiée en HPLC/APCI/MS. Dans une autre étude, Willet *et al.* [113] ont été capables de mesurer le 3-hydroxybenzo(a)pyrène, deux BaP-dihydrodiols et trois BaP-diones dans la bile déconjuguée de poisson grâce à la HPLC/APCI/MS. Les limites de détection (LOD) étaient excellentes pour les diones (1 ng injecté) et très bonnes pour les dihydrodiols et le 3-OHBaP (2,5-25 ng injectés) [113].

Plus récemment des travaux mettant en œuvre la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) ont fait leur apparition [239, 253]. Le mode de transitions sélectionnées ou mode MRM « Multiple Reactions Mode », utilisé en spectrométrie de masse en tandem, est un outil très puissant pour l'analyse quantitative [283, 284, 285] en raison de sa haute sensibilité, spécificité et sélectivité, rendant alors inutiles les longues et fastidieuses procédures de nettoyage de l'échantillon.

Note particulière : UPLC™-MS/MS

Au cours des dernières années, une nouvelle technique a vu le jour : l'Ultra Performance Chromatographie en phase Liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem. L'UPLC est une marque déposée de Waters corporation qui désigne ses systèmes de chromatographie en phase liquide à très haute pression.

Introduite en 2004, l'UPLC apporte un progrès majeur dans trois domaines : résolution chromatographique, vitesse d'analyse et sensibilité.

L'emploi dans la phase stationnaire de particules de 1,7 micromètres (alors que les colonnes HPLC utilisent des particules de 5 à 3 micromètres) est à l'origine de l'UPLC. La courbe de Van Deemter, régie par une équation à trois composantes, montre que la gamme de débit utilisable avec un tel diamètre de particules est bien plus large que pour des

diamètres supérieurs. De ce fait il est possible d'augmenter le débit, et donc la vitesse d'analyse, sans altérer les performances chromatographiques. L'avènement de l'UPLC a toutefois nécessité le développement instrumental d'un nouveau système de chromatographie en phase liquide, pouvant tirer avantage des performances de séparation et compatible avec les pressions générées (de l'ordre de 8 000 à 15 000 PSI, à comparer avec 2 500 à 5 000 PSI en HPLC).

Les chromatographistes sont habitués aux compromis ; le plus fréquent d'entre-eux consiste à sacrifier la résolution au détriment de la vitesse. La technologie UPLC permet d'éviter de telles démarches.

En revanche, pour bénéficier des atouts analytiques de la technologie UPLC, les détecteurs associés doivent fonctionner avec une vitesse d'acquisition très rapide. C'est pourquoi, les spectromètres de masse sont privilégiés par rapport aux autres types de détecteurs (Fluorescence ou barrettes à diodes). En outre la spectrométrie de masse en tandem est, à son tour, privilégiée par rapport à la spectrométrie de masse simple, permettant ainsi d'associer la spécificité à la sensibilité de la méthode d'analyse.

Ainsi couplée à la spectrométrie de masse en tandem (exemple : un triple quadripôle Quattro Premier™, Micromass, USA) ce couplage intègre les technologies les plus récentes et les plus innovantes permettant l'identification et le dosage simultané d'un grand nombre de composés. L'utilisation de différents modes d'ionisation (APCI, ESI) au cours de la même analyse devient possible tout en maintenant les performances tant au niveau de la sensibilité et de la sélectivité qu'au niveau de la résolution spectrale et chromatographique.

La technologie UPLC augmente la concentration des pics en réduisant la dispersion chromatographique et en améliorant l'efficacité de la source ce qui implique des gains conséquents en sensibilité et en qualité spectrale. Grâce à l'obtention de pics plus fins et à l'augmentation de la résolution chromatographique, la technologie UPLC renforce les performances et la productivité de toute analyse en LC/MS et LC-MS/MS.

A l'heure actuelle, seuls les travaux de Zhu *et al.* (2008) ont montré l'utilisation de la technologie UPLC couplée à la spectrométrie de masse simple dans l'analyse des métabolites de HAP, en particulier les métabolites polaires du BaP. Des limites de détection de l'ordre de 10 pg.µl⁻¹ de bile étaient atteintes. Les travaux en UPLC-MS/MS effectués au cours de cette thèse ont permis d'établir des limites de détection inférieures à 0,1 pg.µl⁻¹ de bile pour les métabolites mono-hydroxylés étudiés [286]. Enfin si on compare ces résultats à ceux obtenus dans une méthode d'analyse plus conventionnelle, la GC/MS, les limites de détection atteintes sont comprises entre 4 et 21 pg.µl⁻¹ pour les métabolites étudiés [287] avec une moins bonne sensibilité obtenue pour les métabolites de plus haut poids moléculaires (métabolites du chrysène et du BaP)

De manière plus générale, l'intérêt de l'UPLC-MS/MS, technologie innovante et très sensible, est largement démontré dans des études récentes s'intéressant à des composés plus polaires comme les substances pharmaceutiques, certains produits phytosanitaires ou encore des substances destinées à l'usage thérapeutique [288-297].

3.1.3 Les différentes approches de normalisation des résultats

La mesure de la fluorescence biliaire est devenue un biomarqueur très utilisé pour démontrer l'exposition des poissons aux HAP. Des résultats conflictuels ont été publiés sur

les méthodes de normalisation à appliquer à ces mesures de fluorescence [95]. Trois méthodes ont été proposées et testées :

- Unités de fluorescence par volume de bile ou masse de bile ;
- Unités de fluorescence par mg de protéines dans la bile ;
- Unités de fluorescence par quantité de biliverdine dans la bile.

La première méthode semble être la plus simple et directe, mais le volume de bile est extrêmement variable et il dépend des fréquences d'alimentation des poissons. Sous des conditions de restriction alimentaire, les concentrations semblent suivre les volumes de bile produite [298]. Ceci rend l'expression de la fluorescence par rapport aux volumes de bile très aléatoire et variable. L'expression de la fluorescence par rapport à la quantité de biliverdine a été examinée mais là encore, a conduit à des résultats contradictoires [95, 223, 228]. Dans ces études, les conclusions données pour la normalisation ont été fondées sur la réduction de la variabilité des données et non sur les mécanismes biologiques. La biliverdine est le produit de décomposition de l'hème, partie contenant l'atome de fer dans les molécules d'hémoglobine et dans les enzymes des cytochromes. L'hème s'inscrit dans le cycle physiologique continu du cytochrome et l'excès de cette molécule est métabolisé dans le foie, par les enzymes oxygénases qui catalysent sa conversion en biliverdine [299]. Ainsi l'excrétion de la biliverdine dans la bile est modulée par l'activité de l'hème oxygénase. Des études ont par ailleurs montré une modification de cette activité enzymatique en relation avec les polluants de l'environnement, en particulier chez les poissons [300, 301]. L'induction de l'activité de l'hème oxygénase par l'exposition aux polluants environnementaux conduit à l'hypothèse que l'excrétion de la biliverdine est également reliée au stress chimique et que par conséquent, la méthode qui relie la fluorescence à la quantité de biliverdine dans la bile d'animaux exposés à un mélange de HAP et de contaminants de l'environnement, ne constitue pas une méthode fiable. Dans une étude récente, Van den Hurk [302] a cherché à savoir si la méthode de normalisation par la biliverdine était une méthode appropriée et il a ainsi mis en place des expériences visant à comprendre la mécanistique de l'excrétion de la biliverdine chez les poissons soumis à des stress chimiques différents. Les résultats ont montré des relations linéaires entre les protéines biliaires et la biliverdine pour chaque type de stress. Mais la corrélation semble augmenter significativement pour les poissons ayant subi un stress chimique plus important. Une forte corrélation a par ailleurs été montrée entre l'activité de l'hème oxygénase et la concentration de la biliverdine dans la bile. Ceci permet de conclure que le stress chimique induit une augmentation de l'excrétion de la biliverdine. L'élucidation de cette mécanistique justifie que les mesures de fluorescence biliaire ne devraient plus être exprimées par rapport à l'absorption de la biliverdine et que l'expression de ces résultats en fonction de la quantité totale de protéines biliaires serait une méthode plus sûre.

3.2 Etudes du métabolisme

Dans le cadre des recherches sur les phénomènes de bioaccumulation et de biotransformation des HAP, de nombreuses espèces animales, vertébrées et invertébrées, ont été étudiées.

Dans la recherche de la localisation des métabolites dans l'organisme, différents organes ont été étudiés et principalement le foie, la vésicule biliaire, le plasma et l'urine.

Concernant l'étude du métabolisme en général et la caractérisation des cinétiques de formation et des chemins de métabolisation, des approches utilisant des microsomes hépatiques ont été préférées que se soient dans les études sur les rongeurs [82, 117, 124, 141, 303-312, 313, 314, 315-317] mais également pour les études sur les organismes aquatiques [100, 113, 114, 117, 125, 315, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325].

3.2.1 Localisation de métabolites chez les organismes aquatiques

Parmi les organismes aquatiques, les poissons ont été les plus étudiés. Les recherches ont été fréquemment menées au moyen de composés radiomarqués qui sont plus facilement détectables à très faibles concentrations dans les tissus [80, 81, 214, 259, 326-332]. Les chemins métaboliques et les organes d'accumulation des métabolites produits ont ainsi pu être mis en évidence. En général, bien que des différences existent entre les espèces, il a été montré une forte accumulation des métabolites dans la vésicule biliaire après une exposition des organismes à des HAP. Vient ensuite généralement le foie, principal organe de biotransformation, puis la peau et d'autres organes comme les branchies, les gonades, les reins, les intestins, la vessie, le sang, le cerveau et la rate avec des ordres variables selon les études. Les muscles quant à eux, ne présentent en général que des concentrations très faibles [17].

3.2.2 Identification des métabolites et étude cinétique du métabolisme

Différentes études ont montré que les poissons transformaient les HAP en métabolites de structures comparables à ceux produits par les rongeurs, en majorité des composés hydroxylés [82, 124, 125, 157, 263, 333]. Chez les mollusques, il a été montré que les quinones représentaient la majorité des métabolites produits, laissant ainsi supposer un mécanisme de biotransformation majoritairement radicalaire associée à une faible activité enzymatique du cytochrome P450 [62].

De manière générale, le temps de résidence des métabolites dans les tissus et dans les fluides est plus long que celui des composés parents chez les différents organismes marins [81, 123, 150, 156, 259, 334-336]. Il a été montré dans les paragraphes précédents que les métabolites peuvent se retrouver sous une forme libre mais également sous des formes conjuguées dans l'organisme. Dans la bile, les formes conjuguées sont généralement prépondérantes même si d'un composé à l'autre, le pourcentage de conjugaison reste très variable [127, 214, 259, 326, 329, 337]. Si on prend l'exemple des métabolites du benzo(a)pyrène, il apparaît qu'une proportion importante des métabolites biliaires du benzo(a)pyrène est constituée de 42 à 70% de thio-éthers (conjugués au glutathion) les glucuronides et les sulfates représentant de 23 à 58% des métabolites (Tableau 12). De plus, le 7,8-diol-9,10-époxyde-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène-glutathion (BPDE-GSH) a été identifié comme étant le principal thio-éther présent dans la bile [123, 338]. Néanmoins, il a été montré que, en général, les composés sulfatés sont moins abondants que les glucuronides chez les poissons [81, 84, 127, 129, 157, 203] et majoritairement éliminés via l'urine [130], alors que les conjugués glucuronidés sont majoritairement excrétés dans la bile [127, 129].

Dans cette synthèse bibliographique, il a été choisi quatre composés parents pour traiter en détail de l'identification des métabolites chez les organismes marins exposés individuellement à ces HAP. Ce sont le phénanthrène, le pyrène, le chrysène et le benzo(a)pyrène.

Phénanthrène

Le phénanthrène (Figure 7) est un composé présent dans les produits pétroliers qui a été montré comme facilement absorbé par les poissons après exposition [94, 127, 214, 326, 328, 330, 331].

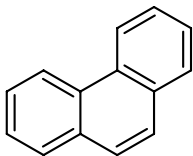


Figure 7: Formule semi-développée du phénanthrène

Son temps de résidence dans l'organisme, évalué chez la truite arc-en-ciel est l'un des plus long parmi les HAP avec en moyenne 9 jours de résidence contre 6 pour le fluoranthène et 7 pour le fluorène et l'anthracène à 11°C [339]. Par ailleurs, il a été également montré que le phénanthrène n'induisait que de très faibles activités enzymatiques EROD [94, 340-344, 345, 346]. En effet, le phénanthrène ne possède pas d'affinité de liaison avec le récepteur AhR, ce qui rend impossible l'induction de l'activité enzymatique CYP1A [340, 341, 344]. En outre, il a été montré qu'en milieu naturel, le phénanthrène, présent en mélange avec des composés qui vont induire l'activité enzymatique CYP1A, est alors fortement métabolisé. Shailaja et Da Silva [347] ont montré une augmentation de la capacité de métabolisation du phénanthrène par l'organisme proportionnelle aux quantités de phénanthrène appliquées. En effet, on observe de plus faibles teneurs en composé parent dans le foie des poissons (*Oreochromis mossambicus*) exposés aux plus fortes doses de phénanthrène provoquant ainsi une induction enzymatique et donc une augmentation de l'activité EROD.

Le Tableau 11 présente des expérimentations réalisées sur différentes espèces marines. Elles ont permis de mettre en évidence les principales voies de biotransformation du phénanthrène qui conduisent principalement à la formation de composés de type « dihydrodiols », détectables après hydrolyse enzymatique.

Les métabolites identifiés dans les différents tissus et fluides biologiques sont regroupés en deux familles, les hydroxylés avec les isomères 1-, 2-, 3-, 4- et 9-hydroxyphénanthrènes et les dihydrodiols avec les 1, 2-,3 ,4- et 9,10-dihydrodiols. Selon les espèces et les organes étudiés, les proportions de ces métabolites varient.

Par ailleurs, toutes ces études mettent en évidence la prépondérance des conjugués dans la bile et Leonard et Hellou [127] montrent qu'il s'agit majoritairement de conjugués glucuronidés.

Tableau 11: Principaux travaux étudiant le métabolisme du phénanthrène chez les organismes marins.

Espèce	Matrice	Référence
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bile, microsome hépatique	[127]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bile, microsome hépatique	[94]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bile, microsome hépatique	[346]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bile, microsome hépatique	[343, 344, 348]
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Bile, foie	[347]
<i>Squalus acanthias</i>	Bile	[326, 329]
<i>Pollachius virens</i>	Urine, bile	[214, 327]
<i>Platichthys flesus</i>	Estomac, intestin, bile, urine	[328]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Intestin, bile	[326, 329]
<i>Gadus morhua</i>	Bile, microsome hépatique	[264, 332]
<i>Gadus morhua</i> & <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Microsome hépatique	[349]
<i>Ameriurus nebulosus</i>	Microsome hépatique	[125]

Pyrène

A la différence des autres HAP, le pyrène semble avoir un schéma de métabolisation moins complexe, conduisant à la détection d'un seul métabolite de phase I, le 1-hydroxypyrene. Le Tableau 12 présente les principaux travaux sur le métabolisme du pyrène chez les organismes aquatiques. Néanmoins il faut noter que Krahn *et al.* [200, 201, 350] ainsi que Law *et al.* [217] ont pu mettre en évidence à très faibles quantités d'autres phénols et des dihydrodiols dans la bile de carlottin anglais et de truite arc-en-ciel après déconjugaison enzymatique.

Concernant la spéciation de formes conjuguées, les glucuronides sont là encore majoritaires dans la bile de poisson alors que les glucosides et les sulfates sont majoritaires chez des organismes moins évolués comme les crustacées et les mollusques.

Tableau 12: Principaux travaux étudiant le métabolisme du pyrène chez les organismes marins.

Espèce	Matrice	Référence
<i>Parophrys vetulus</i>	Bile	[200, 201, 350]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bile, urine	[217]
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Bile	[127]
<i>Platichthys flesus</i>	Bile	[325]
<i>Porcellio scaber</i>	Hépatopancréas et intestins	[325, 351]
<i>Cancer magister</i>	Hémolymphe	[352]
<i>Mya arenaria</i>	Organisme entier	[254]
<i>Protothaca staminea</i>	Organisme entier	[254]

Chrysène

Le chrysène, présent à des concentrations importantes dans les produits pétroliers [71, 72, 74, 353] mais également dans les résidus de combustion de fioul fossile et de tout autre procédé industriel de combustion, est constitué de quatre noyaux aromatiques organisés en une structure à deux régions Bay (Figure 8). En règle générale, ce composé est rapidement adsorbé sur la matière organique et inorganique en raison de sa faible solubilité et il devient donc peu biodisponible pour le biota aquatique, excepté pour les poissons benthiques. Cependant, sur des zones proches des relargages d'effluents industriels, le chrysène peut être présent dans la colonne d'eau [354] et ainsi être plus biodisponible pour les poissons via une absorption au travers des branchies [237].

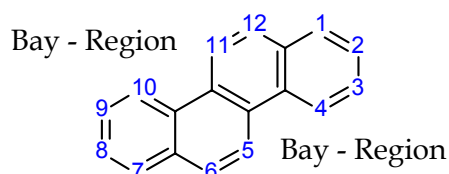


Figure 8: Formule semi-développée du chrysène.

Le chrysène possède un faible pouvoir carcinogène après une activation métabolique via les dihydrodiols et les dihydrodiol-époxydes [355-358, 359, 360]. Le chrysène a été identifié comme un précurseur de la formation de l'ultime métabolite carcinogène du chrysène, le 1,2-dihydroxy-3,4-époxy-1,2,3,4-tétrahydrochrysène (un diol-époxyde en région Bay) [361]. Pangrekar *et al.* [125, 362] ont étudié *in vitro* le métabolisme du chrysène dans les microsomes hépatiques de la barbotte (*Ameriurus nebulosus*). Plus récemment, Jonsson *et al.* [205, 224] ont exposé *in vivo* des cabillauds (*Gadus morhua*) au chrysène par voie intrapéritonéale et intra-musculaire. Les oxydations sur les positions 1,2- et 3,4- résultant dans la formation de deux dihydrodiols, 1,2-dihydroxy-1,2-dihydro et 3,4-dihydroxy-3,4-dihydrochrysène et de quatre phénols, 1-, 2-, 3- et 4-hydroxychrysène ont été identifiées comme les principaux chemins de métabolisation. L'oxydation sur la position 5,6- (K-region) semble être la voie la moins favorable [361]. De manière générale, le principal métabolite formé est le 1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysène. Puis sont formés dans de plus faibles quantités le 3,4-dihydroxy-3,4-dihydrochrysène, les hydroxychrysènes et le 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrochrysène.

Benzo[a]pyrène

Le schéma métabolique du BaP chez les poissons est aujourd'hui bien connu grâce aux très nombreuses études *in vitro* et *in vivo* effectuées sur ce composé (Tableau 13). En raison de la lipophilie élevée du BaP (Figure 9) et de ses métabolites, l'extraction de ces composés des tissus riches en lipides (foie, muscle, gonades) pose un problème. C'est pourquoi, dans la plupart des études recensées, l'identification des métabolites du BaP est limitée aux composés hydrosolubles présents dans la bile.

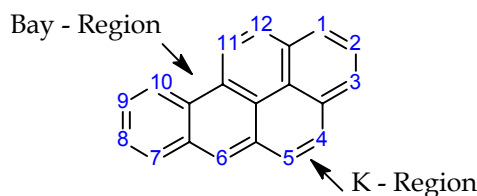


Figure 9: Formule semi-développée du BaP.

Concernant la spéciation des formes conjuguées (Tableau 13), il apparaît qu'une proportion importante des métabolites biliaires est constituée de thio-éthers (conjugués du glutathion), les glucuronides et les sulfates ne représentant que 23 à 58 % des métabolites. Le composé prépondérant dans la bile a été identifié comme étant le 7,8-diol-9,10-époxyde-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène-glutathion (BPDE-GSH) [81, 121-123, 150, 338, 363-366, 367].

Dans la bile de nombreuses espèces de poissons, les principaux métabolites détectés sont des conjugués glucuronidés de phénols et de 7,8-dihydrodiol tandis que les conjugués sulfatés sont en très faibles proportions [81, 82, 84, 121]. Après déconjugaison enzymatique, les métabolites biliaires de phase I détectés sont principalement le 1- et le 3-hydroxybenzo(a)pyrène et le 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène [77, 368, 369]. Selon les espèces de poissons, des différences dans la distribution de ces métabolites biliaires sont constatées. Néanmoins le composé le plus abondant reste le 3-hydroxybenzo(a)pyrène, représentant 18 à 46 % des métabolites identifiés.

Tableau 13: Proportions des principales classes de métabolites conjugués dans la bile de poissons exposés à du BaP radioactif.

Espèce	% de glucuronides et de sulfates	% de thio-éthers	Référence
<i>Parophrys vetulus</i> (adulte)	32	68	[370]
<i>Parophrys vetulus</i> (juvénile)	43	57	[370]
<i>Parophrys vetulus</i> (adulte)	53	47	[82]
<i>Parophrys vetulus</i> (juvénile)	56	44	[82]
<i>Platichthys stellatus</i> (adulte)	58	42	[82]
<i>Platichthys stellatus</i> (juvénile)	43	57	[82]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	54	46	[371]

3.2.3 Facteurs influençant la formation des métabolites

Plusieurs facteurs sont à prendre en compte lors de la formation des métabolites et sont donc très importants à connaître lors de l'étude de métabolites des HAP chez les poissons.

Le sexe

Plusieurs études ont montré que des niveaux de métabolites biliaires similaires étaient obtenus chez des individus de sexe opposés de différentes espèces de poissons [77, 128, 371, 372]. Cependant il a été également démontré qu'au cours des périodes de reproduction, des différences de métabolisme et de bioaccumulation des composés parents étaient notables [373]. Ainsi le sexe ne semble pas être un facteur influençant les phénomènes de biotransformation excepté lorsque les poissons sont en période de reproduction.

L'âge

Des expérimentations ont été effectuées *in vitro* sur des juvéniles et des adultes de soles [374] et sur des carlottins anglais [82], montrant une formation d'adduits à l'ADN bien plus élevée chez les juvéniles que chez les adultes ainsi qu'une production de métabolites plus importante chez les juvéniles que chez les adultes.

La température du milieu

Chez les poissons, des études ont montré que quel que soit le mode de contamination, une diminution de l'adsorption des HAP est constatée lors d'une diminution de la température du milieu [375]. En revanche Collier et Varanasi [376] ont rapporté une augmentation de l'accumulation des HAP légers dans les tissus de poissons à basse température alors que les niveaux de métabolites biliaires restent constants. Ceci confirme les résultats obtenus par d'autres équipes [81, 128]. Dans le cadre d'exposition de microsomes hépatiques de truite arc-en-ciel, Egaas et Varanasi [263] ont montré une production de métabolites plus importantes à 7°C qu'à 16°C, d'une part, et une plus grande proportion de métabolites non conjugués à 7°C qu'à 16°C, d'autre part. Cette augmentation de la quantité de métabolites est expliquée par l'augmentation de acides gras polyinsaturés au niveau des membranes hépatiques à 7°C, qui favoriseraient alors l'oxydation des HAP [263].

Enfin des différences, selon la température du milieu, entre les temps de résidence des composés ont été observées. La tendance était à une augmentation du métabolisme et du temps de résidence des métabolites liée à une diminution des températures du milieu [78, 128, 216, 337].

L'état de jeûne des poissons

Jimenez *et al.* [375] ont montré que l'état de jeûne du poisson était très important dans l'étude du métabolisme. En effet, chez le crapet arlequin, l'absorption du benzo(a)pyrène est deux fois plus rapide, son taux de métabolisation accéléré et son excrétion dix fois plus importante lorsque le poisson est nourri. En outre, dans le cas des métabolites biliaires, l'état de jeûne du poisson au moment de la dissection est très important car il a une influence sur les concentrations mesurées. En effet, juste après s'être alimentés, la vésicule biliaire des poissons se vide et contient donc une plus faible quantité de métabolites [210, 219, 376].

Les interactions avec d'autres contaminants présents

Une étude réalisée par James *et al.* [377] a montré une synergie des actions des HAP et des PCB induisant une augmentation du pouvoir carcinogène du 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène sur des microsomes hépatiques. Une formation plus importante d'adduits à l'ADN a été observée lorsque les microsomes étaient exposés à un mélange de BaP et de PCB par rapport à une exposition au BaP seul (5 fois plus élevée). Eggas et Varanasi [263] ont également montré des résultats similaires sur des microsomes hépatiques de truite arc-en-ciel, traités avec un mélange de PCB (l'Arochlor) et exposés à du BaP.

Une activité antagoniste au métabolisme du BaP a été démontrée lors de l'exposition de saumon à du TBT (tributylétain), induisant une diminution de la production de métabolites [378].

Enfin, la présence de nitrites lors d'une exposition aux HAP, peut induire la formation de composés très réactifs et cancérigènes, les nitro-HAP ainsi que leurs métabolites [379].

Les espèces de poissons

Dans les paragraphes précédents, il a été montré que des différences notables existaient entre les différentes espèces de poissons lorsqu'il s'agissait d'identifier et de localiser les métabolites dans les organes. Ces différences sont d'ordres qualitatifs mais également quantitatifs.

D'un point de vue quantitatif, l'étude de la métabolisation du benzo(a)pyrène par des microsomes de truites de lac (*Salmo trutta lacustris*), de gardons (*Rutilus rutilus*) et de rats a permis de mettre en évidence des différences très nettes entre les trois espèces. Les microsomes de gardon biotransforment ainsi très faiblement le benzo(a)pyrène alors qu'une très forte activation métabolique est constatée chez la truite, environ 3 à 4 fois supérieure à celle du rat [155]. Une autre étude comparant la métabolisation du benzo(a)pyrène par des microsomes de carlottins anglais, de plies étoilées et de rats concluant à des taux de transformation environ trois fois plus faibles chez les deux espèces de poisson par rapport au rat [82], on peut en déduire que la truite biotransforme le benzo(a)pyrène en proportion beaucoup plus importante que les deux autres espèces de poisson.

D'un point de vue qualitatif, une étude consistant à étudier la métabolisation du benzo(a)pyrène par des carlottins anglais et des plies étoilées exposés à du benzo(a)pyrène a tout d'abord permis de montrer que ce HAP était biotransformé à des vitesses similaires par les microsomes des deux espèces de poisson et que la vitesse de formation du 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène était la même chez les deux espèces [82]. Pourtant une plus grande quantité de 7,8-dihydrodiol était mesurée dans la bile de soles. La plie étoilée avait par contre une activité GST environ 3 fois plus forte. La faible proportion de benzo(a)pyrènediolépoxyde (BPDE) constatée chez la plie étoilée s'expliquerait donc par la forte conjugaison des premiers métabolites formés, époxydes et phénols, avec le glutathion. De cette manière, une part moins importante de BPDE se forme chez la plie étoilée, ce qui se traduit par l'observation d'adduits à l'ADN hépatique plus nombreux chez le carlottin anglais.

4 La surveillance environnementale : Avenir des métabolites

4.1 Notion de biosurveillance

La biosurveillance repose sur l'étude de la réponse biologique des organismes vivants aux polluants. Ainsi le concept de « biomarqueurs » retient depuis ces dernières années l'attention croissante des écotoxicologues. Un biomarqueur est défini comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ». Un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même éventuellement de prédire, les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel.

On distingue trois types de biomarqueurs (NAS/NRC, 1989) : les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effets de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition. Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme.

L'utilisation des biomarqueurs d'effets permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, il a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique. Dans l'étude de la contamination aux HAP, la formation d'adduits à l'ADN est couramment utilisée [150, 230] comme biomarqueurs d'effet à ces molécules cancérogènes et génotoxiques.

Enfin les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition sont reliés aux variations d'origine génétique entraînant une variation de la sensibilité (résistance par exemple) de l'organisme après une exposition au xénobiotique.

La commission Oslo-Paris (OSPAR) pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est a mis en place un Programme conjoint d'évaluation et de surveillance continue (JAMP) (OSPAR, 2004). Dans les stratégies définies en 2003 et révisées en 2004 (numéro de référence 2004/17), une stratégie spécifique visant les substances dangereuses et incluant de ce fait les HAP a été établie. Une des lignes directrices JAMP est la surveillance continue des effets biologiques et de l'intégration à la surveillance continue chimique des substances dangereuses. Il est prévu depuis 2005 de mettre en place un système de collecte des informations portant sur les résultats de la surveillance continue des effets biologiques dans les zones où ces effets peuvent se produire en raison des niveaux potentiels de contamination.

Dans le cadre de la surveillance des effets biologiques des composés HAP et du risque d'exposition dans le milieu aquatique, des biomarqueurs sont aujourd'hui recommandés par la littérature [64] et soutenus par l'OSPAR (SIME, 2001). Il s'agit pour les poissons de l'activité EROD (éthoxyrésorufine-O-dééthylase), des métabolites de HAP, des adduits à l'ADN et du test des comètes (test d'électrophorèse en gel d'agarose sur des cellules isolées qui permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages et enfin lors de processus secondaire de fragmentations de l'ADN tel que l'apoptose). Dans cette perspective, l'utilisation des métabolites des HAP est très prometteuse (publication OSPAR 2005/235; www.ospar.org/fr/html/welcome.html). A l'heure actuelle, un nombre croissant de programme combinant l'étude des données obtenues avec ces différents biomarqueurs, essayent de mettre en évidence et de comprendre les relations entre présence des HAP dans le milieu, exposition des organismes à ces HAP, biotransformation et expression d'effets génotoxiques.

4.2 L'intérêt de l'étude des métabolites dans le cadre d'une surveillance environnementale

Suite à l'identification des composés issus de la biotransformation des HAP et à la compréhension des mécanismes gouvernant leur production, des études ont cherché à appliquer le dosage de ces molécules en milieu naturel afin de disposer d'un outil de diagnostic de l'exposition des organismes aux HAP dans l'environnement.

La quasi-totalité des travaux consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP chez les animaux aquatiques étudient les métabolites dans la bile de poissons. Quelques travaux se sont intéressés au dosage des métabolites dans l'hémolymphe [231, 352, 380] ou l'urine de crabe [227]. Une étude plus récente a montré l'application du dosage combiné des HAP parents et des métabolites dans le foie de guillemots exposés lors de marées noires [381].

En outre, la plupart de ces études s'attachent à effectuer des campagnes de prélèvements d'organismes résidents et seule une minorité de travaux utilisent la méthode dite du « caging », consistant à placer des organismes non contaminés dans des cages sur des sites choisis [226, 233, 234, 235, 237, 382, 383]. Afin d'évaluer la biodisponibilité des HAP provenant d'un compartiment isolé du milieu d'étude, certaines équipes réalisent des prélèvements de sédiments ou d'eau sur le terrain afin d'exposer des organismes non contaminés en mésocosmes [210, 233, 364, 373, 384, 385, 386, 387].

L'évaluation de l'exposition des organismes est généralement effectuée par un suivi de l'environnement (sédiment/sol, eau, et l'air). Cependant, la biosurveillance peut fournir une évaluation de la quantité totale assimilée par l'organisme selon toutes les voies d'exposition. Ce concept est très important puisque seule, la quantité biodisponible du contaminant peut être assimilée et concentré dans les tissus, les fluides et les excréments. Cependant, en raison de la complexité des échantillons biologiques, des protocoles analytiques longs et complexes doivent être mis en œuvre. C'est pourquoi les méthodes conventionnellement utilisées en biosurveillance, dans le cas des HAP, sont souvent grandes consommatrices de temps, de travail et d'argent. Actuellement, le 1-OHP est testé comme biomarqueur pour l'évaluation d'une exposition à faible dose en HAP chez une population d'organismes. Des études effectuées par Vyskocil *et al.* [388], Zhao *et al.* [389] Kanoh *et al.* [390] et Jongeneelen [391] ont suggéré que les niveaux en 1-OHP mesurés reflétaient les niveaux d'exposition environnementaux en HAP, via différentes sources comme l'air, la nourriture ou le sédiment sur lequel l'organisme évolue. Cependant dans son étude, [388] a montré que d'autres facteurs contribuaient de manière substantielle à l'exposition globale de l'organisme, en particulier le régime alimentaire. Ainsi dans une étude menée récemment au Chili, des niveaux les plus élevés en 1-OHP et en métabolites du BaP ont été trouvés dans la bile de poissons-chats collectés dans une zone de gros transports maritimes et à fortes pressions industrielles. Alors que d'un autre côté, les métabolites de HAP plus légers (type naphthalène) ont été mesurés dans tous les échantillons de bile prélevés, quel que soit le site, incluant le site de référence.

Ces métabolites de HAP plus légers, plus solubles et donc plus biodisponibles semblent montrer qu'une partie des HAP d'origine pétrogénique sont ubiquistes [392]. De manière similaire, [393], ont montré des résultats semblables sur une étude effectuée aux Etats-Unis, en Ohio, où là encore, les métabolites des HAP plus légers et plus biodisponibles étaient mesurés quel que soit le site choisi. L'origine pétrogénique de la contamination ne semble pourtant pas être totalement certifiée car seul le dosage de métabolites de composés alkylés pourrait corroborer l'origine de la contamination.

Il apparaît donc nécessaire et urgent de mettre en place des outils d'évaluation du risque environnemental. La plupart des données actuellement disponibles se réfèrent aux teneurs en xénobiotiques dans le biota, comme les métaux, les HAP, les pesticides ou les composés organochlorés [21, 394, 395, 396]. Cependant, les informations sur le devenir et la toxicité de ces composés, rejetés dans l'environnement marin, sont rares. Très peu de programmes de suivi définissent comme prérogative l'utilisation intégrée des analyses

chimiques et des réponses biochimiques et cellulaires de l'organisme [397 , 398]. C'est dans cette direction et via l'analyse des métabolites de HAP, que les programmes de suivi de la contamination en HAP de l'environnement marin se mettent en place et tendent à répondre aux nombreuses questions en suspens.

BUT DES TRAVAUX

Afin d'évaluer l'état de santé d'un écosystème marin du point de vue de la contamination en hydrocarbures aromatiques polycycliques, il apparaît essentiel de connaître la biodisponibilité de ces composés vis-à-vis des organismes. Afin d'élucider le comportement des contaminants dans l'environnement aquatique et d'évaluer l'exposition des organismes aquatiques, les marqueurs de bioaccumulation (en particulier les mesures des concentrations tissulaires en HAP) sont fréquemment utilisés chez les poissons. Or il est impossible de prédire le devenir des contaminants par des simples modèles de partition. Lorsque l'évaluation du risque environnemental est effectuée au seul moyen des facteurs de bioconcentration et de bioaccumulation, la démarche est insuffisante et peut être complètement faussée par d'autres processus comme la biotransformation et d'autres phénomènes de dégradation. C'est pourquoi la complexité des phénomènes de bioaccumulation/biotransformation doit être prise en compte ce qui sous-entend l'évaluation du processus global de bioaccumulation, incluant la toxicocinétique, le métabolisme et les facteurs de bioconcentration et de bioaccumulation dans les tissus.

Les travaux de cette thèse ont consisté dans un premier temps à développer un outil de dosage de certains produits de biotransformation des HAP chez les poissons. Il s'agissait de mettre au point un protocole analytique permettant de quantifier les métabolites de HAP individuellement dans différentes matrices complexes et plus particulièrement dans la bile, grâce à l'utilisation de techniques analytiques sensibles et spécifiques. L'étude de la relation entre exposition et génotoxicité des HAP chez les poissons a également influencé l'orientation des travaux de recherche vers l'analyse de classes de composés plus réactifs, responsables de dommages génotoxiques graves et irréversibles.

Le développement de nouveaux outils analytiques innovants, sensibles et spécifiques avait pour but de combler les manques et les faiblesses des méthodes existantes, conventionnellement utilisées pour l'analyse des métabolites de HAP chez les organismes marins.

Les outils ainsi développés ont par la suite été appliqués dans le cadre de programmes environnementaux de suivi de la contamination des organismes marins aux HAP. Un programme pilote de cette thèse, Programme National d'Ecotoxicologie volet Génotoxicité (PNETOX-GENOTOX), a permis l'application des outils de biosurveillance sur des limandes (*Limanda limanda*) échantillonnées dans une zone côtière connue pour être contaminée en HAP, l'Estuaire de la Seine. En parallèle aux campagnes de terrain effectuées en Mars et Septembre 2005 et 2006, des expérimentations en laboratoire effectuées sur des turbots juvéniles (*Scophthalmus maximus*) ont permis d'évaluer l'influence de différents facteurs sur le comportement, la biotransformation et la génotoxicité des HAP (sexe, voie de contamination).

Le dosage des métabolites de HAP a également été effectué chez des merlus échantillonnés en Méditerranée. Au travers de cette étude, il s'agissait de comparer la contamination en HAP des merlus de Méditerranée avec celle des limandes de la baie de Seine, via la détermination des métabolites de HAP. Enfin, dans le cadre de l'évaluation de la qualité de milieu à très forte pression anthropique, la biotransformation des HAP a été évaluée chez différentes espèces de poissons de la Baie de Guanabara au Brésil, polluée par les rejets industriels chroniques et accidentels.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre recense les techniques employées pour l'étude des métabolites de HAP dans les matrices environnementales sélectionnées. Les schémas expérimentaux, les sites et la méthodologie d'échantillonnage, ainsi que les procédures analytiques développées sont décrits.

Résumé du chapitre :

Dans une première partie, les différentes études réalisées dans ce travail sont présentées. Le chapitre précédent a montré le caractère ubiquiste des HAP. Ainsi, aucun écosystème n'échappe à la pollution par les HAP et de nombreux programmes de recherche sur l'étude des HAP et de leurs métabolites, ont vu le jour depuis une quinzaine d'années en France, en Europe et dans le monde entier, avec comme enjeux une connaissance des répercussions finales sur les écosystèmes mais aussi sur la santé humaine. La diversité des enjeux des programmes décrits dans ce chapitre en est le reflet. Premièrement, le Programme National d'Ecotoxicologie « PNETOX » (volet génotoxicité) est présenté. Il comporte deux approches complémentaires : une approche *in vivo* avec des campagnes en Estuaire de Seine sur un modèle de référence qu'est la limande (*Limanda limanda*) et une approche en laboratoire avec des expérimentations en aquariums sur des turbots (*Scophthalmus maximus*).

Une seconde étude a également été menée durant ces travaux. Elle résulte d'une collaboration avec F. Meniconi de PETROBRAS, groupe pétrolier brésilien. Le but était l'évaluation des impacts sur l'écosystème aquatique de la Baie de Guanabara (Brésil) d'une usine pétrolière et en particulier de ses rejets chroniques ou accidentels dans le milieu. Dans chacune de ces études, l'utilisation des métabolites de HAP comme biomarqueurs d'une contamination aux HAP a été réalisée afin d'établir un outil de surveillance validé et applicable dans diverses problématiques.

Enfin une évaluation de l'exposition de merlus (*Merluccius merluccius*) de Méditerranée occidentale aux HAP a été effectuée via la détermination des métabolites de HAP. Situés au large de la ville de Marseille et dans le panache du Rhône, les sites d'étude ont été choisis en raison de leur caractère potentiellement contaminé en HAP.

Dans une seconde partie, les différentes techniques analytiques utilisées au cours de ces études sont décrites. Les protocoles de dosage des HAP et de leurs métabolites (sous formes libres et conjuguées) dans les matrices environnementales et biologiques y sont détaillés. Les développements analytiques conduisant à des méthodologies innovantes sont présentés sous la forme de six publications scientifiques.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1 Le choix des composés étudiés

1.1 Les composés mono-hydroxylés

Compte tenu de la complexité des processus de métabolisation des HAP chez les poissons, il a fallu établir une liste des composés à étudier. Concernant le choix des composés parents, la variété des HAP associée à la variété des sources de HAP a conduit à un choix de 7 HAP parents, reflète de la diversité de cette famille de composés (Tableau 14). Par ailleurs, la rareté des métabolites de HAP disponibles dans le commerce a orienté les recherches majoritairement vers les composés mono-hydroxylés associés à ces HAP parents (Figure 10).

Néanmoins, le choix de ces composés a également été mué par leurs représentativités concernant les origines des contaminations en HAP. La synthèse bibliographique (Chapitre I) reprend les principales origines des HAP et métabolites cités ci-dessous.

Tableau 14: HAP parents et métabolites de HAP associés, choisis pour l'étude

HAP PARENT		METABOLITE ASSOCIE	
Nom usuel	Abréviation	Nom usuel	Abréviation
Naphthalène	N	1-hydroxynaphtalène	1-OHN
		2-hydroxynaphtalène	2-OHN
Biphényle	Bi	2-hydroxybiphényle	2-OHBi
Fluorène	Fe	9-hydroxyfluorène	9-OHFe
		1-hydroxyphénanthrène	1-OHPhe
		2-hydroxyphénanthrène	2-OHPhe
		3-hydroxyphénanthrène	3-OHPhe
		4-hydroxyphénanthrène	4-OHPhe
		9-hydroxyphénanthrène	9-OHPhe
Pyrène	P	1-hydroxypyrene	1-OHP
Chrysène	C	1-hydroxychrysène	1-OHC
Benzo(a)pyrène	BaP	3-hydroxybenzo(a)pyrène	3-OHBaP

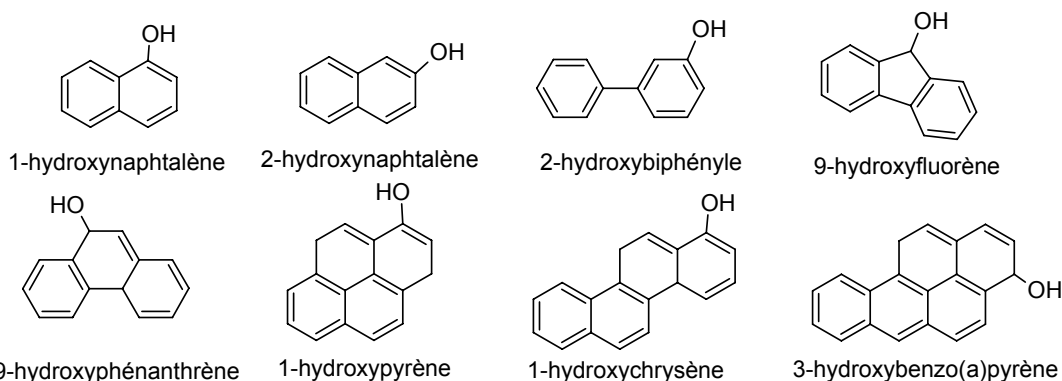


Figure 10: Formules semi-développées de métabolites de HAP choisis pour l'étude. Seul un des isomères du phénanthrène est ici représenté, en position 9.

Les travaux de cette thèse portent donc essentiellement sur l'analyse de ces composés dans les organismes aquatiques. Par ailleurs, afin mieux documenter les phénomènes de biotransformation et le lien qu'il peut exister entre exposition et génotoxicité, d'autres classes de métabolites ont été l'objet de développements analytiques annexes. Il s'agit de métabolites réactifs et électrophiles (diols, di-hydrodiols, époxyde, quinones), qui sont des précurseurs des composés mono-hydroxylés et qui sont directement responsables de la formation d'adduits à l'ADN. Ces métabolites sont dits métabolites primaires.

1.2 *Les métabolites primaires*

De même que pour les composés hydroxylés, le choix s'est tourné vers les métabolites du benzo(a)pyrène, fréquemment étudiés pour leur génotoxicité et pour lesquels le choix des composés est assez important. De plus, faisant l'objet d'un programme de recherche développé conjointement avec le laboratoire d'Ecotoxicologie de l'Ifremer de Nantes, les métabolites du fluoranthène ont également été étudiés. Au total neuf métabolites supplémentaires ont été introduits dans ces travaux de recherche (Tableau 15 et Figure 11) et ont été l'objet d'un développement analytique en UPLC-MS/MS ainsi qu'à une application en laboratoire (Publications n° 3 et 4).

Tableau 15: HAP parents et métabolites de HAP associés, choisis pour l'étude

HAP Parent	Métabolites de HAP	
	Nom usuel	Abréviation
Benzo(a)pyrène	Benzo(a)pyrène-trans-4,5-dihydrodiol (+/-)	4,5-DHDBaP
	Benzo(a)pyrène-trans-7,8-dihydrodiol (+/-)	7,8-DHDBaP
	Benzo(a)pyrène-1,6-dione	1,6-dioneBaP
	Benzo(a)pyrène-3,6-dione	3,6-dioneBaP
	9-hydroxybenzo(a)pyrène	9-OHBaP
Fluoranthène	Fluoranthène-trans-2,3-dihydrodiol	2,3-DHDFluo
	Fluoranthène-2,3-dione	2,3-dioneFluo
	3-hydroxyfluoranthène	3-OHFluo

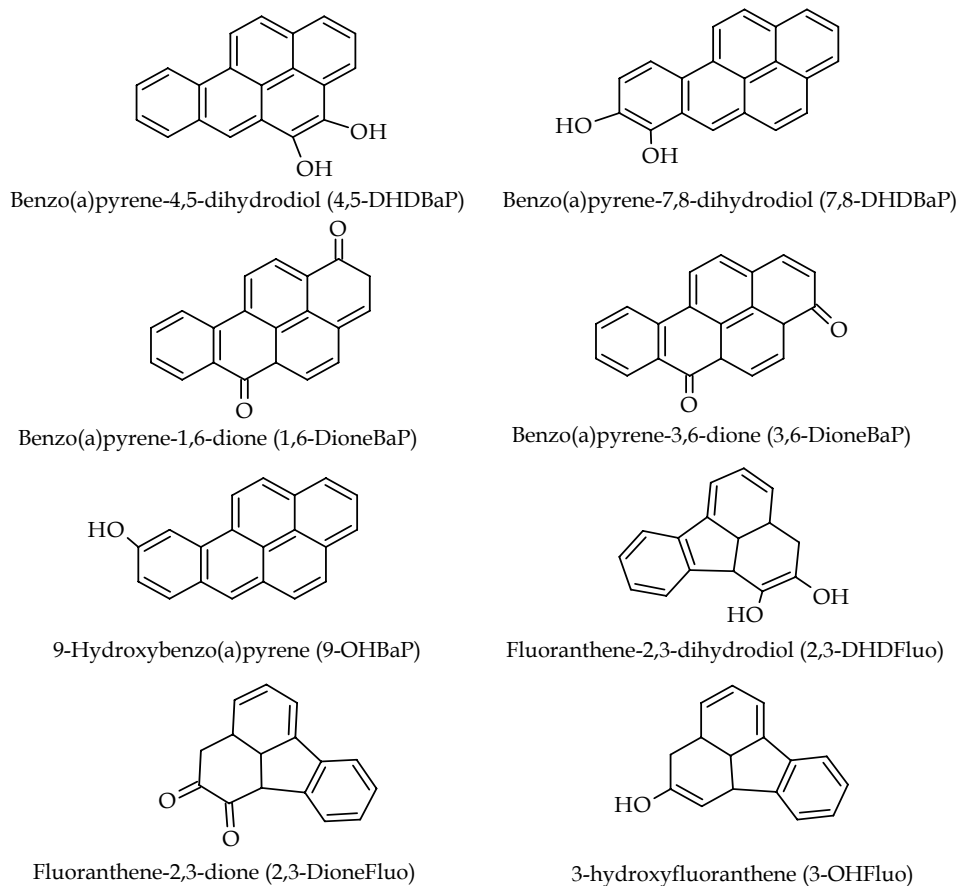


Figure 11: Formules semi-développées des métabolites primaires de HAP choisis pour l'étude

2 Sites d'études et expérimentations

2.1 *Le Programme National d'Ecotoxicologie*

Ce travail de thèse prend place dans le cadre d'un projet national mené par le Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC) de l'Université Bordeaux 1, dirigé par Hélène Budzinski, consistant à utiliser les métabolites de HAP comme bioamrqueurs d'exposition des organismes marins aux HAP. Ce projet intitulé « Étude des phénomènes de bioaccumulation/biotransformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons) - Relation exposition-génotoxicité » fait partie intégrante du Programme National d'Ecotoxicologie (PNETOX) (<http://www.ecologie.gouv.fr/ecologie/Etude-des-phenomenes-de.html>, le 25/09/08), financé par le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable.

Les thèmes fondateurs du PNETOX sont les suivants :

- ⇒ la connaissance des effets toxiques : développement et validation d'outils de diagnostic et de prédiction d'effets sur les individus ; développement de biomarqueurs moléculaires dans la mesure où ils débouchent sur des outils de diagnostic et de compréhension utilisables.
- ⇒ la caractérisation des expositions : développement d'outils visant à améliorer le volet « exposition » des procédures d'évaluation des risques.
- ⇒ la caractérisation des risques : intégration des différents outils de caractérisation des expositions et d'évaluation des effets dans un système cohérent.

L'objectif général du projet PNETOX GENOTOX est de développer des outils utiles à la surveillance des effets biologiques des contaminants chimiques dans une zone de surveillance définie : la Baie de Seine. Les paramètres étudiés sont les indicateurs biologiques préconisés par le programme de surveillance international de coordination et surveillance de la Commission d'Oslo-Paris (OSPAR) : le « Co-ordinated Environmental Monitoring Program » (CEMP). Trois objectifs sont identifiés pour le volet GENOTOX :

- ⇒ Etudier les phénomènes de biodisponibilité, bioaccumulation et biotransformation des HAP chez la limande (*Limanda limanda*) par mesure des HAP dans les tissus, de l'activité enzymatique de biotransformation dans le foie et des métabolites d'HAP dans la bile.
- ⇒ Evaluer les effets génotoxiques des HAP dans les foies de limandes par mesure des altérations primaires de l'ADN (le test des comètes et les adduits à l'ADN) issues pour partie de la production de métabolites de HAP.
- ⇒ Optimiser la stratégie d'échantillonnage pour l'interprétation des effets génotoxiques sur les populations de limandes.

Deux volets ont été menés en parallèle au cours de ce projet. Le premier volet consistait à une approche expérimentale en laboratoire afin d'étudier les phénomènes de bioaccumulation et de biotransformation des HAP chez les poissons en milieux simplifiés et contrôlés. Les expérimentations ont été menées au LPTC sur des turbots juvéniles (*Scophthalmus maximus*). Des mesures de génotoxicité ont également été faites sur les organismes exposés afin de mieux comprendre la relation entre exposition et génotoxicité.

Le second volet a été une approche de terrain, qui avait pour but de confronter les profils obtenus dans le cas d'une exposition chimique diffuse de populations de limandes (âge, sexe) au sein d'un des estuaires les plus contaminés d'Europe par les HAP et de valider les méthodes obtenues en laboratoire sur les juvéniles de turbots pour la surveillance et l'évaluation du risque chimique. Pour des raisons techniques et des contraintes de captures, des juvéniles de turbots ont été préférés aux juvéniles de limandes plus difficiles à maintenir en aquarium.

Sur la base de travaux menés en estuaire de Seine depuis une quinzaine d'années [399], la finalité de cette étude était d'évaluer les effets génotoxiques des HAP sur la base d'une batterie de biomarqueurs reflétant à la fois les recommandations méthodologiques du JAMP pour les adduits à l'ADN, l'activité enzymatique du cytochrome P450 et les métabolites et notre expérience française sur des biomarqueurs prometteurs mais qui demandent à être approfondis dans le cadre d'une application in situ, comme les cassures de brins de l'ADN et la base oxydée 8oxodG. Une surveillance intégrée chimie et biologie a été initiée sur deux années consécutives, suivant une démarche de cartographie spatiale et temporelles des effets de la contamination en HAP chez une espèce de référence des

programmes de surveillance de la mer du Nord : la limande (*Limanda limanda*) et dans un estuaire à forte pression anthropique et économique : l'Estuaire de la Seine.

2.2 Les modèles d'étude

2.2.1 Le modèle d'étude des campagnes de terrain : la limande (*Limanda limanda*)

Le modèle d'étude pour les campagnes terrain défini dans le cadre de ce programme est la limande, *Limanda limanda* (Figure 12).



Figure 12: La limande (*Limanda limanda*)

Depuis environ 35 ans, le Conseil International d'Exploitation de la Mer entretient, à des fins halieutiques, des programmes d'études sur des espèces d'intérêt commercial, notamment sur la limande. Cette espèce benthique est une espèce de référence des programmes de surveillance de la Mer du Nord (JAMP, 2007). En effet, c'est une des espèces Pleuronectiformes les plus communes en Mer du Nord et une des plus exploitées en Atlantique Nord-Est. La Limande commune est bien implantée du nord de la Norvège à l'Islande jusqu'au Golfe de Gascogne. Selon certaines estimations, son stock est particulièrement important en mer du Nord (environ 1,5 million de tonne) et fait dire que la Limande est le poisson plat le plus présent en nombre d'individus. Ce poisson vit sur des fonds sableux et vaseux et à des profondeurs comprises entre 5 et 150 mètres. La limande dont la couleur lui permet de se confondre avec les fonds, est peu méfiante et peut être approchée sans grande difficulté. La limande se situe au milieu du réseau trophique. Elle se nourrit essentiellement de vers et de crustacés et accessoirement de petits poissons.

Si la période de frai peut paraître très étendue (janvier à août), c'est que la limande se reproduit en fait plus tardivement quand on remonte vers le nord de sa zone d'implantation. La maturité sexuelle du mâle intervient vers l'âge de 2 ans, tandis que celle de la femelle intervient plus tardivement vers la 4^{ème} année. Elle pond entre 50 000 et 150 000 oeufs dans des profondeurs comprises entre 20 et 40 mètres. En fonction de la température ceux-ci éclosent en moyenne après une semaine. Leur croissance est lente.

Toutes ces caractéristiques propres au mode de vie et au cycle de reproduction de la limande ont conditionné le plan d'échantillonnage des campagnes de terrain. Celui-ci sera détaillé dans les paragraphes suivants (Chapitre II, § 2.4.1).

2.2.2 Le modèle d'étude des expérimentations en laboratoire: le turbot (*Scophthalmus maximus*)

Le turbot (*Scophthalmus maximus*) a été choisi pour les expérimentations en laboratoire car son élevage aquacole est bien maîtrisé et disponible en France. Pour les expérimentations en laboratoire, les approvisionnements en turbots ont été effectués, d'une part à la « Ferme Aquacole de l'Île de RÉ » (Loix en Ré, France) et d'autre part, chez « France Turbot », filiale du Groupe Adrien, (Île de Noirmoutier, France).

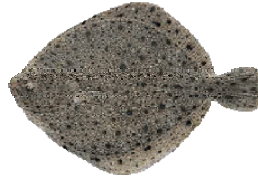


Figure 13: Le turbot (*Scophthalmus maximus*)

Le turbot vit à des profondeurs moyennes comprises entre 20 et 100 mètres, sur des fonds de sables et graviers, voire de roches. Ce poisson plat se nourrit très souvent de poissons de fond, de lançons et de petites morues ainsi que de gros crustacés ou de certains coquillages. Si on estime que les mâles vivent environ 17 ans et les femelles jusqu'à 27 ans, il est à noter que les mâles sont en surnombre et sont plus petits que les femelles. La maturité sexuelle du Turbot est atteinte vers l'âge de 3 à 5 ans. A des profondeurs faibles (10 à 40 m), la ponte du turbot est importante. Une femelle peut pondre jusqu'à 15 millions d'œufs pélagiques qui éclosent après une bonne semaine. Dès que les larves atteindront la taille de 25 mm, elles rejoindront les hauts fonds et resteront près des côtes. La croissance est variable suivant son implantation. Ainsi il est constaté qu'en Mer du Nord le Turbot mesure 30 à 35 cm à l'âge de 3 ans, tandis que dans la Baltique il ne fera pas plus de 15 à 20 cm au même âge.

Les turbots sont présents, sans être très nombreux, de la Norvège et l'Islande jusqu'au Maroc ainsi qu'en Méditerranée et en Mer Noire. Il a été introduit avec un certain succès dans les eaux de Nouvelle-Zélande. Il s'agit enfin d'un poisson aux intérêts économiques et commerciaux importants en raison de sa chair réputée.

2.3 Les expérimentations en laboratoire

Trois expositions en laboratoire ont été effectuées en mai 2005, janvier 2006 et juillet 2006. Les deux premières expériences étaient des expérimentations préliminaires. Elles étaient nécessaires afin de mettre en place un système expérimental suffisamment fiable et robuste pour être reproduit et dans lequel les poissons étaient en bonne condition pour l'exposition. De plus, comme peu de données existent dans la littérature sur des contaminations en HAP par voie dissoute sur des turbots et en particulier sur les doses nécessaires pour obtenir des effets génotoxiques (type dommages à l'ADN), il semblait nécessaire de faire des essais préliminaires pour évaluer des niveaux de contamination (par la voie dissoute) suffisant pour induire des effets génotoxiques sur des turbots juvéniles à cours terme (5 ou 7 jours).

La troisième expérimentation réalisée en juillet 2006 a mis en œuvre différentes voies de contamination (phase dissoute, sédiment, éluviats de pétrole) de manière à évaluer les différences dans les processus de biotransformation (nature et vitesse des métabolites produits) et dans les réponses génotoxiques associées.

2.3.1 Expérimentations préliminaires sur des turbots juvéniles

Dans le cas des deux expérimentations préliminaires, des turbots juvéniles (~ 50 g) provenant de la Ferme Aquacole de l'Île de Ré. Les tailles et masses des poissons ont été mesurées à leur mise en place dans les aquariums. La taille moyenne est de 112 mm \pm 4 et la masse moyenne est de 51 g \pm 1.

Plan expérimental et plan de prélèvement des échantillons

Le but des expérimentations préliminaires est de contaminer les poissons par la voie dissoute. Ils ont donc été placés dans des bacs de 100L et contaminés en continu pendant la phase de contamination par un mélange de HAP dissous. La contamination en continu s'est faite au moyen d'une pompe péristaltique fonctionnant en débit continu moyen de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (Pompe ANALOG REGLO 4/8, ISMATEC, France). Pour chaque expérimentation, les solutions distribuées dans les aquariums sont présentées dans les paragraphes suivants (fabrication et teneurs en HAP dans les solutions).

Pendant toute la durée de l'expérimentation, à intervalle régulier, cinq individus ont été prélevés. Individuellement, des prélèvements de sang sont effectués pour le dosage des dommages à l'ADN et placés dans l'azote liquide à -170°C . La bile de chaque poisson est récoltée et regroupée par lot ($n=5$) pour l'analyse des métabolites de HAP et placée dans un cryotube à -80°C . Un morceau de foie est prélevé individuellement pour le dosage de la 8-oxodG et placé également à -80°C . Un bout de foie est aussi récolté pour chaque individu et regroupé en lot pour les individus d'un même bac pour le dosage des adduits à l'ADN ($n=5$). Ces lots sont alors conservés dans l'azote liquide. Enfin, des lots de muscles et de foies restants ($n=5$) sont constitués pour les individus d'un même bac et placés à -20°C pour le dosage des HAP.

Descriptif du dispositif expérimental commun pour les deux expérimentations

Deux expérimentations préliminaires différentes ont été réalisées dans des aquariums de 100L en verre. Les poissons ont été acclimatés dans de l'eau salée synthétique (30 psu) fabriquée sur place à partir d'eau osmosée et de sel synthétique (Instant Ocean, Aquarium systems, Sarrebourg, France). Chaque aquarium est équipé d'un système de filtration d'eau, d'oxygénation (bulleur) et d'un éclairage permettant d'ajuster la photopériode (6 heures de luminosité, 18 heures d'obscurité). La salle d'expérimentation était climatisée assurant ainsi la stabilisation de la température de l'air (16°C) et par conséquent celle de l'eau (Figure 14). La filtration des unités expérimentales est à la fois biologique et mécanique ; des tubes en céramique et des mousses synthétiques jouent le rôle de nids à bactéries, acteurs primordiaux de la dégradation de la matière organique. Du sable de corail a été utilisé pour stabiliser le pH entre 7,5 et 8,0. Avant et après expérimentation, l'aquarium a été nettoyé de toute trace de contaminants par l'utilisation de charbon actif dans le système de filtration.

Au cours de l'acclimatation et de l'expérimentation, les poissons sont maintenus à l'état de jeûne, afin de simuler une accumulation de la bile dans la vésicule biliaire.

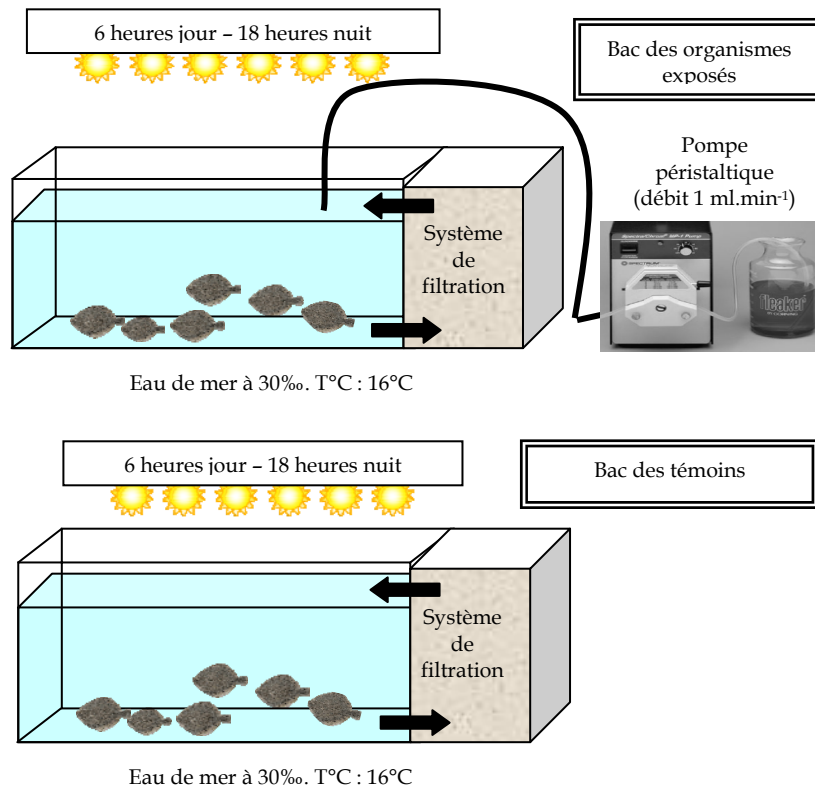


Figure 14: Dispositif expérimental pour d'exposition les expérimentations préliminaires de mai 2005 et janvier 2006.

Expérience : Mai 2005

Des turbots mâles et femelles ont été exposés durant 5 jours à un mélange de 9 HAP parents : phénanthrène (Phe), fluoranthène (Fluo), pyrène (Pyr), anthracène (Ant), benzo(a)anthracène (BaA), chrysène (Chrys), benzo(a)pyrène (BaP), benzo(e)pyrène (BeP), 2-méthylphénanthrène (2-MPhe). Afin d'être disponibles pour les organismes dans l'eau des aquariums, les HAP ont été dissous dans une première solution mère éthanolique. Puis cette solution dans l'éthanol a été diluée dans de l'eau de mer (1% d'éthanol pour 99% d'eau de mer) et distribuée dans les bacs au moyen d'une pompe péristaltique avec un débit de 1 ml.min⁻¹ (Pompe ANALOG REGLO 4/8, ISMATEC, France). Afin de contrôler un effet éventuel de l'éthanol sur les organismes, une solution d'éthanol diluée dans de l'eau de mer a été distribuée aux organismes des bacs de témoin de contrôle. Les teneurs en HAP dans les deux solutions préparées (solution mère dans l'éthanol et solution fille diluée dans l'eau de mer, distribuée dans les aquariums) sont résumées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Concentration en HAP dans la solution mère éthanolique et dans la solution d'eau de mère distribuée dans les aquariums – Expérimentation de mai 2005

Composés	Concentration dans la solution éthanolique (mg.g ⁻¹ d'éthanol)	Concentration dans la solution distribuée dans les aquariums (µg.l ⁻¹ d'eau de mer)
2-MPhe	0,4	25,6
Phe	0,4	25,6
Ant	0,4	25,2
Fluo	0,3	22,5
Pyr	0,4	25,6
Chrys	0,3	19,4
BaA	0,3	23,0
BaP	0,3	24,7
BeP	0,3	23,4

Puis les poissons exposés ont subi une phase de décontamination de 5 jours. Les aquariums ont été intégralement nettoyés, l'eau entièrement changée et du charbon actif a été introduit dans la filtration afin de piéger les éventuels résidus de contaminants présents dans le système. Conjointement, le dosage des teneurs en HAP dans l'eau des aquariums a été réalisé chaque jour afin de suivre la contamination du milieu. Parallèlement aux bacs contaminés, un bac témoin dans lesquels les turbots évoluaient dans de l'eau de mer non contaminée, a servi de contrôle.

Il faut ici préciser que la différenciation mâle/femelle a été faite visuellement. A ce stade de développement, les individus ne sont pas totalement différenciés et des incertitudes persistent sur la détermination du sexe

Expérience : Janvier 2006

Des turbots juvéniles, non différenciés sexuellement, ont été exposés durant 7 jours à un mélange de 7 HAP parents (phénanthrène, fluoranthène, pyrène, anthracène, benzo(b)fluoranthène, chrysène, benzo(a)pyrène). De manière identique à l'expérimentation de mai 2005, les HAP ont été tout d'abord dissous dans de l'éthanol. Puis cette solution éthanolique de HAP dissous a été diluée dans de l'eau de mer et distribuée dans les aquariums (1% d'éthanol pour 99% d'eau de mer). Le Tableau 17 résume les teneurs en HAP dans les différentes solutions de l'expérimentation de Janvier 2006.

Tableau 17 : Concentration en HAP dans la solution mère éthanolique et dans la solution d'eau de mère distribuée dans les aquariums – Expérimentation de janvier 2006

Composés	Concentration dans la solution éthanolique (mg.g ⁻¹ d'éthanol)	Concentration dans la solution distribuée dans les aquariums (mg.l ⁻¹ d'eau de mer)
Phe	2,8	159,6
Ant	3,7	210,9
Fluo	2,0	111,2
Pyr	3,5	199,5
Chrys	2,6	145,4
B(b)F	0,4	20,0
BaP	1,9	108,3

2.3.2 Expérimentation multi-sources sur des turbots juvéniles : Expérience : Juillet 2006

Pour les besoins de cette expérimentation, les turbots ont été fournis par un autre fournisseur (France Turbot, Groupe Adrien, Ile de Noirmoutier). Ils ont été acheminés par container réfrigéré et oxygéné. Les turbots juvéniles (~ 100 g), non différenciables sexuellement. Les tailles et masses des poissons ont été mesurées à leur mise en place dans les aquariums. La taille moyenne est de 152 mm ± 4 et la masse moyenne est de 101 g ± 1.

Plan expérimental et plan de prélèvement des échantillons

Le but des expérimentations préliminaires est de contaminer les poissons selon différentes voies de contamination : la voie dissoute, sédimentaire et par les éluviats de pétrole.

A leur arrivée en container réfrigéré et oxygéné, 255 poissons ont été placés dans des bacs d'acclimatation. Après une période d'acclimatation de 26 jours, 30 poissons ont été placés dans des aquariums de 100 L. Les poissons ont été exposés durant 4 jours et ont subi une période de décontamination de 6 jours.

A l'issue de la période de contamination, les poissons restants dans les aquariums contaminés ont été placés dans des aquariums non contaminés (identiques aux aquariums des témoins de contrôle) et soumis à une période de décontamination de 6 jours consécutifs.

Pendant toute la durée de l'expérimentation et à l'issue de la période de décontamination, à intervalle régulier, cinq individus ont été prélevés dans chaque aquarium. Individuellement, des prélèvements de sang sont effectués pour le dosage des dommages à l'ADN et placés dans l'azote liquide à -170°C. La bile de chaque poisson est récoltée et regroupée par lot (n=5) pour l'analyse des métabolites de HAP et placée dans un cryotube à -80°C. Un morceau de foie est prélevé individuellement pour le dosage de la 8-oxodG et placé également à -80°C. Un bout de foie est aussi récolté pour chaque individu et regroupé en lot pour les individus d'un même bac pour le dosage des adduits à l'ADN (n=5). Ces lots sont alors conservés dans l'azote liquide. Enfin, des lots de muscles et de foies restants (n=5) sont constitués pour les individus d'un même bac et placés à -20°C pour le dosage des HAP.

Descriptif du dispositif expérimental

Les expérimentations ont été réalisées dans les aquariums de 100L en verre similaires à ceux utilisés pour les expérimentations préliminaires (Chapitre II, § 2.3.1). Chaque aquarium est équipé d'un système de filtration d'eau, d'oxygénation (bulleur) et d'un éclairage permettant d'ajuster la photopériode (6 heures de luminosité, 18 heures d'obscurité). La salle d'expérimentation était climatisée assurant ainsi la stabilisation de la température de l'air (16°C) et par conséquent celle de l'eau. La filtration des unités expérimentales est à la fois biologique et mécanique ; des tubes en céramique et des mousses synthétiques jouent le rôle de nids à bactéries, acteurs primordiaux de la dégradation de la matière organique. Du sable de corail a été utilisé pour stabiliser le pH entre 7,5 et 8,0. Une modification a été néanmoins apportée pour l'exposition au sédiment. La filtration de l'aquarium a été arrêtée durant la période d'exposition (4 jours) afin de ne pas transférer le sédiment contaminé vers le système de filtration. Ceci a permis d'éviter d'une part la diminution de la quantité de sédiment disponible pour les organismes et d'autre part l'encombrement du système de filtration par le sédiment.

Avant et après expérimentation, tous les aquariums ont été nettoyés de toute trace de contaminants par l'utilisation de charbon actif dans le système de filtration.

Au cours de l'acclimatation et de l'expérimentation, les poissons sont maintenus à l'état de jeûne, afin de simuler une accumulation de la bile dans la vésicule biliaire.

Dans les paragraphes suivants, les différentes voies d'exposition sont décrites. Les concentrations en HAP distribués dans les aquariums, les teneurs en HAP dans le sédiment ainsi que les niveaux d'exposition sont détaillés. La Figure 15 résume schématiquement le dispositif expérimental mis en œuvre durant cette expérimentation.

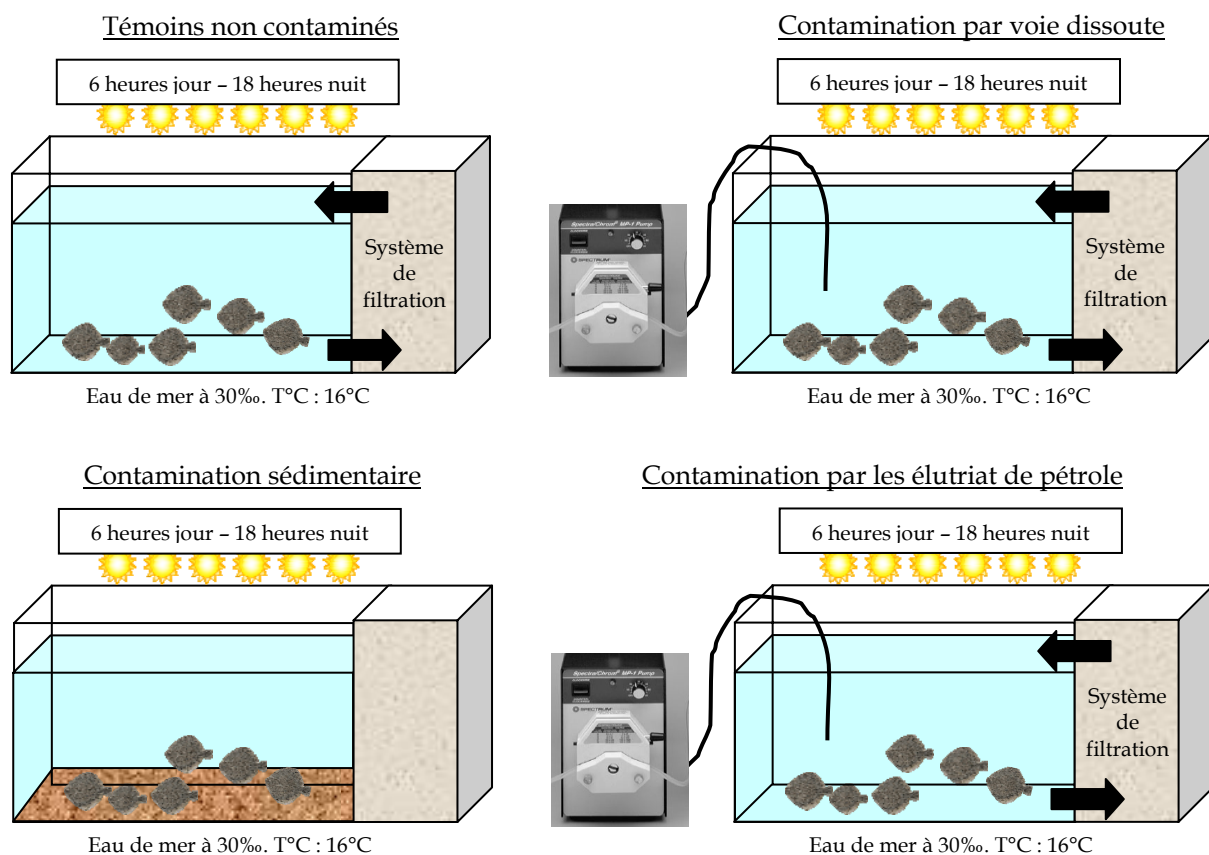


Figure 15: Dispositif expérimental mis en œuvre pour l'expérimentation sur les turbots juvéniles (Juillet 2006).

En outre les paramètres physico-chimiques (taux de nitrites, taux de nitrates, pH, salinité et température) des aquariums sont suivis quotidiennement et des prélèvements d'eau (100 ml) sont effectués tous les jours et dans chaque bac afin de quantifier la contamination en HAP du milieu au cours du temps.

Contamination par voie dissoute : témoin positif

Un mélange de 7 HAP est dissous dans une solution d'éthanol et puis cette solution est à nouveau diluée dans l'eau de mer de manière à être distribuée dans les aquariums (1% d'éthanol pour 99% d'eau de mer). Le Tableau 18 résume les teneurs dans les deux solutions de HAP préparées. Les 7 HAP choisis sont le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène, le pyrène, le fluoranthène, le chrysène et le benzo(a)pyrène. Cette solution est apportée en flux continu au moyen d'une pompe péristaltique (Pompe ANALOG REGLO® 4/8 de chez ISMATEC, Fisher BioBlock, France) durant les 4 jours de contamination. Le débit de la pompe est contrôlé périodiquement ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Tableau 18: Concentrations en HAP de la solution utilisée pour l'exposition par la voie dissoute. Les concentrations sont exprimées en quantité de HAP (mg) par litre d'eau de mer.

Composés	Concentration dans la solution de HAP distribuée dans le bac ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)
Naphtalène	10,6
Anthracène	10,2
Phénanthrène	7,5
Fluoranthène	15,3
Pyrène	3,3
Chrysène	15,5
Benzo(a)pyrène	5,2
Somme des HAP	67,5

Les mesures des concentrations en HAP dissous dans l'eau des aquariums au cours de l'expérimentation sont présentées dans l'Annexe 11.

Contamination par le sédiment

Le sédiment utilisé provient du port d’Arcachon en Gironde (Figure 16).



Figure 16: Localisation du site de prélèvement du sédiment utilisé dans l’expérimentation de juillet 2006.

Le choix de la zone de prélèvement du sédiment a été justifié par la connaissance de la contamination sur ce site et la proximité des activités nautiques et portuaires, laissant à penser des concentrations non négligeables en HAP d’origine pyrolytique mais également d’origine pétrogénique.

Après quantification des HAP dans le sédiment (Tableau 19), il est apparu que bien que prélevé dans l’enceinte portuaire, ce sédiment ne présentait pas de fortes teneurs en HAP. Néanmoins, il restait très utile à cette expérimentation car il reflétait un niveau de contamination environnemental.

Tableau 19 : Concentrations en HAP dans le sédiment utilisé pour l’exposition par la voie sédimentaire. Les concentrations sont exprimées en quantité de HAP (μg) par kg de sédiment sec.

Composés	Concentration en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids sec de sédiment
Naphtalène	2
Phénanthrène	96
Acénaphthylène	8
Acénaphène	3
Fluorène	10
Anthracène	18
Fluoranthène	362
Pyrène	281
Benzo[a]anthracène	193
Chrysène	201
Benzo[b]fluoranthène + Benzo[k]fluoranthène + Benzo[j]fluoranthène	465
Benzo[e]pyrène	145
Benzo(a)pyrène	190

Pérylène	87
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	306
Dibenzo[a,c]anthracène + Dibenzo[a,h]anthracène	35
Benzo[ghi]pérylène	159
Somme HAP	2561

Les sédiments ont été prélevés au mois de juin 2006. Seule la surface du sédiment (1er cm : fraction oxygène) a été prélevée à l'aide de cuillères préalablement lavées (détergent RBS) et pyrolysées. Les sédiments ont ensuite été acheminés au laboratoire dans une glacière, puis ont été congelés, lyophilisés et stockés dans des bouteilles hermétiques à l'abri de la lumière.

La technique d'exposition utilisée ici est appelée sédiment contact. Les poissons sont exposés directement à du sédiment décanté. Le sédiment contact est préparé en mélangeant du sédiment réhydraté (adjonction au sédiment lyophilisé de la quantité d'eau Milli-Q nécessaire pour retrouver sa teneur en eau initiale) et de l'eau de mer naturelle filtrée à 0,2 µm à une salinité de 30 ‰. Les suspensions de sédiments sont laissées décanter 2 heures avant de placer les organismes tests, ceci afin d'éliminer tout risque d'effets mécaniques des particules sédimentaires sur les individus [400]. Par ailleurs, durant les phases de préparation des suspensions et de décantation, les teneurs en ammoniacque et en ammonium ont été mesurées. Tant que celles-ci n'étaient pas nulles, des changements d'eau et des remises en suspension ont été effectuées, limitant ainsi l'impact toxique sur les poissons.

Les mesures des concentrations en HAP dissous dans l'eau des aquariums au cours de l'expérimentation sont présentées dans l'Annexe 11.

Contamination par le pétrole

Cette expérimentation consiste à exposer les turbots juvéniles à un fuel lourd n°2 de l'ERIKA, introduit sous forme dispersée dans la colonne d'eau. Le fuel lourd n°2 de l'ERIKA est un produit utilisé pour deux types d'applications : la combustion industrielle (centrales thermiques, fours, cimenteries, etc) et l'alimentation des navires propulsés par des moteurs diesels lents et de grosse puissance. Les fuels lourds sont les résidus de la distillation des pétroles bruts. Le fuel utilisé ici provient de la raffinerie de Donges (provenance CEDRE, ERIKA-O).

La forme dispersée, ou élutriat de pétrole, est obtenue en dissolvant 60 g de fuel lourd dans 2 litres d'acétone. Cette solution est alors homogénéisée sous agitation magnétique pendant une nuit. Puis elle est diluée à nouveau dans 2 litres d'eau de mer (16°C, 30‰). Cette solution finale est apportée en flux continu au moyen d'une pompe péristaltique (Pompe ANALOG REGLO® 4/8 de chez ISMATEC, Fisher BioBlock, France) durant les 4 jours de contamination. Le débit de la pompe est contrôlé périodiquement (1 ml.min⁻¹). Le Tableau 20 récapitule les niveaux de contamination atteints lors de l'exposition à l'élutriat de pétrole.

Tableau 20: Concentrations en HAP dans le pétrole utilisé et dans la solution des éluviats de pétrole distribuée dans les aquariums des turbots juvéniles en juillet 2006. Les concentrations sont exprimées en quantité de HAP (μg et mg) par gramme de fioul lourd et par litre d'eau de mer.

Composés	Concentration dans le fuel lourd n°2 ERIKA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Concentration dans la solution d'éluviat de pétrole distribuée dans le bac ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
Phénanthrène	614	5,5
Anthracène	90	0,8
Fluoranthène	46	0,4
Pyrène	218	2,0
Chrysène	324	2,9
Benzo(a)pyrène	96	0,9

Les mesures des concentrations en HAP dissous dans l'eau des aquariums au cours de l'expérimentation sont présentées dans l'Annexe 11.

2.4 Etudes en milieu naturel

2.4.1 Suivi de la contamination chez la limande en Estuaire de Seine (Programme PNETOX GENOTOX)

Le volet terrain du projet PNETOX GENOTOX consistait en un suivi sur deux années (2005-2006) de la contamination en HAP des limandes (*Limanda limanda*) de la Baie de Seine.

Le site d'échantillonnage

L'estuaire de la Seine est un milieu complexe soumis à des facteurs environnementaux multiples auxquels viennent s'ajouter de nombreux aménagements et de flux de contaminants d'origine diverses. L'estuaire de Seine recouvre une notion plus large que celle « d'embouchure ». La fonction de navigabilité du fleuve a largement été privilégiée depuis plus d'un siècle conduisant à une chenalisation extrême de l'estuaire (digues, dragages, infrastructures portuaires, barrages ...) et a favorisé le comblement progressif de l'estuaire et la dégradation de la qualité des eaux. La présence de la région parisienne à l'amont, la densité de population du bassin versant, où vit un tiers de la population française et où 40% de l'activité économique nationale est présente, conduit à une contamination généralisée de l'estuaire. La contamination microbiologique et chimique est importante, liée en partie à la présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). On peut retrouver des teneurs en HAP importantes dans la phase particulaire supérieures à $100 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pour des composés tels que le fluoranthène ou le benzo(a)pyrène (Figure 17). Ces valeurs sont bien au dessus de celles fixées par la commission OSPAR (SIME, 2001). Ainsi à la vue de ces résultats, l'évaluation de l'impact de ces contaminants sur les poissons peuplant l'estuaire de Seine est apparue essentielle.

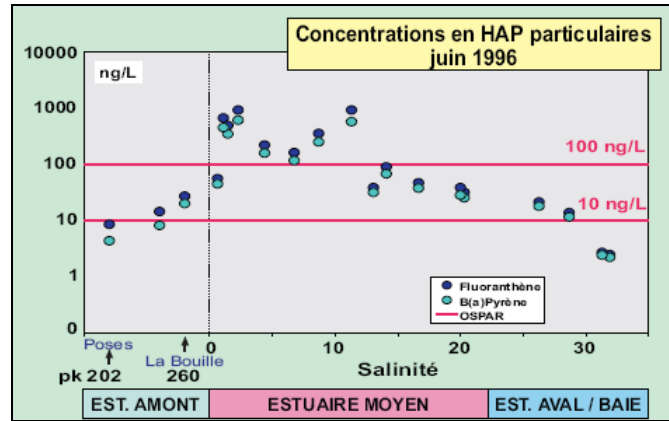


Figure 17: Concentrations en fluoranthène et benzo(a)pyrène particulaire (ng.l^{-1}) et valeurs seuils OSPAR (D'après [401])

Le plan d'échantillonnage

Quatre campagnes d'échantillonnage ont été menées avec l'IFREMER en mars 2005, septembre 2005, mars 2006 et septembre 2006 sur deux stations. La première se situe dans le panache de la Seine à la sortie de l'estuaire et la seconde est dans la zone centrale de la Baie de Seine (zone à granulats) (Figure 18).

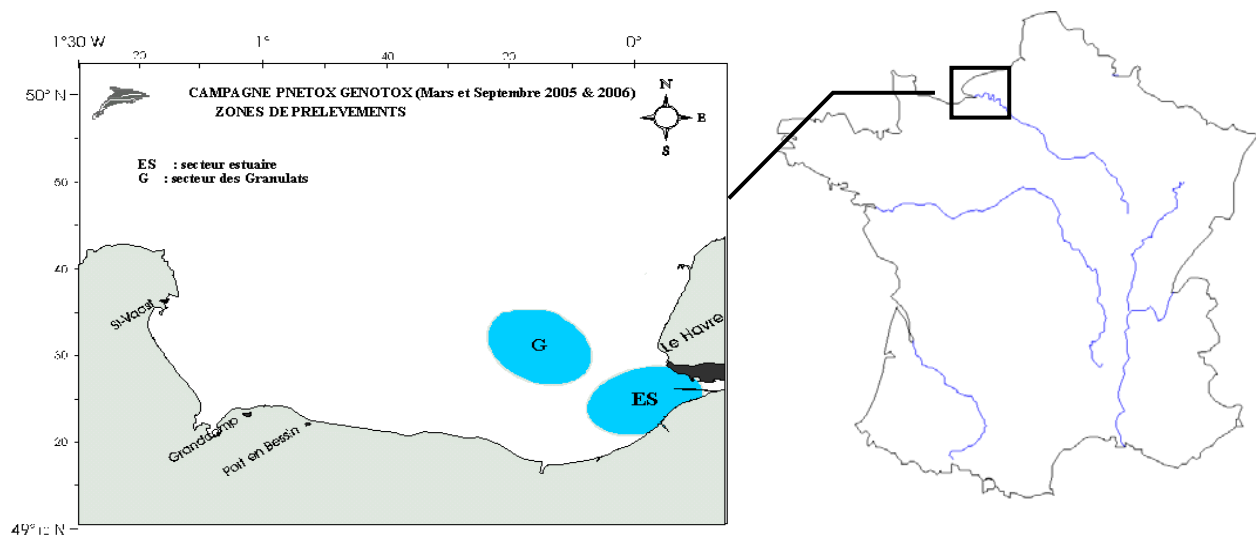


Figure 18: Zones d'échantillonnages des campagnes effectuées dans le cadre du programme PNETOX GENOTOX.

Les traits avaient déjà été identifiés dans les deux zones lors de précédentes campagnes de surveillance réalisées dans le cadre d'un programme financé par l'Ifremer et l'Agence de l'Eau Seine-Normandie. Les moyens nautiques sont fournis par l'Ifremer (Navire océanographique Gwendrez).

Pour chaque sexe, deux classes de taille ont été sélectionnées correspondant pour la première à des individus juvéniles et pour la seconde à des individus adultes. Pour chaque poisson, la bile, le foie, les muscles et une petite quantité de sang sont prélevés. Les biles, les morceaux de foie réservés pour les analyses des métabolites de HAP, de la 8-oxodG, des adduits à l'ADN et de l'activité EROD ainsi que les prélèvements sanguins sont stockés individuellement à -180°C dans l'azote liquide. Les muscles et les foies sont stockés en lots ($n = 10$) à -20°C dans des congélateurs à bord du navire.

2.4.2 La Baie de Guanabara au Brésil : Collaboration avec PETROBRAS

Objet de la collaboration

Cette collaboration résulte des échanges scientifiques antérieurs qui se sont tenus entre H. Budzinski et F. Meniconi. Petrobras est une entreprise brésilienne de recherche, d'extraction, de raffinage, de transport et de vente de pétrole.

Au sein de cette compagnie multinationale pétrolière, une cellule environnementale a vu le jour. Des chercheurs travaillent sur l'évaluation et la surveillance de la contamination de la zone géographique située autour de Rio de Janeiro, la Baie de Guanabara. En particulier, les programmes de recherche déployés visent à étudier l'impact des implantations pétrolières de Petrobras dans cette zone fortement anthropisée. Ainsi les contaminations en divers polluants organiques dont les HAP font l'objet d'un monitoring au sein des différents compartiments abiotiques et biotiques. Dans le cadre de collaborations scientifiques sur l'étude des HAP, l'analyse des métabolites de HAP s'est montrée être une ouverture intéressante. Ainsi des échantillons de bile de poissons collectés dans cette baie ont été analysés au sein du LPTC afin d'obtenir une première évaluation de la faisabilité de l'analyse sur des échantillons de très petites tailles (poissons tropicaux).

Contexte et sites d'échantillonnage

En portugais, « Baía da Guanabara » est une baie océanique située au sud-est du Brésil dans l'état de Rio de Janeiro. Elle est bordée sur sa partie sud-ouest, par la ville de Rio de Janeiro et sur sa partie sud-est par la ville de Niterói. Cinq autres municipalités entourent les autres côtes. En termes d'étendue, la Baie de Guanabara occupe la seconde place au Brésil avec 412 km², et un périmètre de 143 km. Considérée comme l'un des endroits les plus beaux au monde par les touristes (forêts tropicales luxuriantes, des plages de sable fin, un arrière-pays constitué des hautes montagnes de Serra do Mar), cette baie souffre malheureusement de l'urbanisation, de la déforestation intensive et de la pollution chronique de ses eaux par les effluents industriels et domestiques, les décharges à ciel ouvert, les déversements de produits pétroliers ... Son écosystème, qui fut extrêmement riche et diversifié dans le passé, souffre énormément de ces dégradations et en particulier, la mangrove, connue pour être rare et très fragile.

Une prise de conscience est aujourd'hui engagée et la première industrie du pays, PETROBRAS, a pris part dans un plan d'urgence mis en place en 1991 après la marée noire (en avril 1990), provoquée par une rupture d'un pipeline à l'intérieur de la baie et entraînant ainsi un déversement massif dans cet écosystème déjà fragilisé. Le « Guanabara Bay Emergency Plan » consiste à tenter de résoudre les problèmes liés aux déversements de produits ou de sous-produits pétroliers dans la baie.

A l'heure actuelle, très peu d'études documentent la contamination en HAP de cette baie et les effets sur les organismes [402-406]. Il semble donc nécessaire de faire un état des lieux de l'exposition des poissons aux HAP. C'est dans ce contexte que des campagnes de prélèvement d'eaux, de sédiments et d'organismes ont été effectuées depuis 1998. Concernant la collaboration avec le LPTC, seuls des échantillons biologiques (biles de poissons) provenant des campagnes de 2006 ont été analysés. Les campagnes ont été menées sous la direction de F. Meniconi (PETROBRAS). Un suivi sur trois mois (février, mars et avril 2006) dans la baie a été effectué. Au cours de ces campagnes, différentes espèces de poissons (Figure 19) ont été prélevées et ceci sur quatre sites, d'impact anthropique et industriels différents (Figure 19).

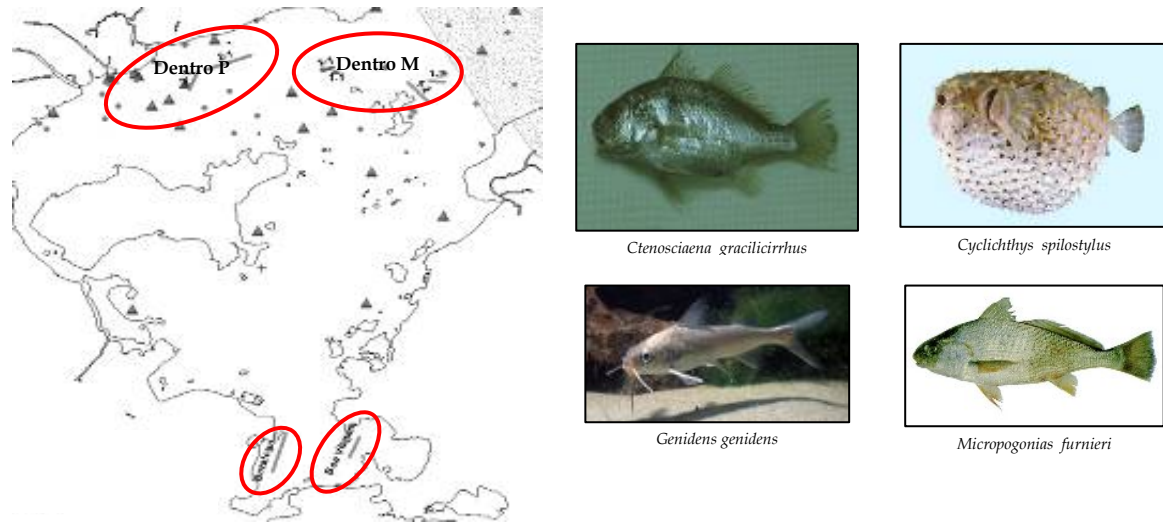


Figure 19: Sites d'échantillonnage et espèces de poissons échantillonnés, en février, mars et avril 2006.

Les différents sites retenus pour l'échantillonnage sont les suivants :

- le site de Dentro situé proche de la mangrove (Dentro M). Ceci correspond donc à des eaux saumâtres, en théorie moins impactées par les implantations pétrolières et humaines.
- le site de Dentro situé proche de la raffinerie Petrobras (Dentro P). Il est en outre proche de Rio de Janeiro et se situe au fond de la vallée également urbanisée. Ce site est donc en théorie fortement impacté.
- le site de Boa Viagem situé à la sortie sud-est de la baie. Cette zone est moins urbanisée et industrialisée que le reste du littoral. De forts courants la traversent et les eaux y sont perpétuellement renouvelées.
- le site de Botafogo situé proche à la sortie sud-ouest de la baie. Cette zone semble contaminée. En effet, elle est fortement anthropisée et industrialisée. En outre, elle constitue le chenal de sortie de navires rentrés dans la baie. Néanmoins les eaux y sont fortement oxygénées et en mouvement.

Le Tableau 21 présente les échantillonnages effectués pour les trois campagnes de 2006.

Tableau 21: Echantillonnage effectué pour 2006.

Espèces	Dentro M	Dentro P	Botafago	Boa Viagem
<i>Genidens genidens</i>	Février, Mars, Avril 2006	-	-	-
<i>Micropogonias furnieri</i>	-	Mars 2006	-	Avril 2006
<i>Cyclichthys spinosus</i>	-	Mars 2006	-	Avril 2006
<i>Ctenosciana gracilicirrhus</i>	-	-	Avril 2006	-

2.4.3 Programme MEDICIS-MERLUMED

Objectif général

Rattaché au projet de recherche intégré Medicis (<http://www.ifremer.fr/medicis/>, le 08/10/08), l'objectif principal de ce programme est de construire un modèle prédictif de la contamination et la décontamination d'une espèce représentative de la Méditerranée nord occidentale, le merlu, soumise à un apport chronique de contaminants. Pour ce faire, la contamination chimique dans le réseau trophique doit être connue. L'action de MERLUMED se situe donc à deux niveaux; d'une part dans la détermination et le suivi de la contamination chimique dans les différents compartiments du réseau trophique du merlu et d'autre part dans l'identification des processus clés (alimentation, croissance, reproduction) qui agissent sur le devenir (assimilation, élimination) des contaminants.

Ce programme, rattaché à différents programmes nationaux (PNEC, ECCO) est pluridisciplinaires (techniques de pêche, réseau trophique, contaminants, paramètres biologiques) et multi-organismes (CNRS, IFREMER).

Modèle d'étude

Le merlu (*Merluccius merluccius*) est un poisson à forte valeur économique et qui bénéficie d'une large distribution dans le Golfe du Lion. En outre cette espèce à la fois benthique et pélagique est un organisme bien étudié dans l'Atlantique en raison, notamment, de son niveau trophique élevé. Des comparaisons peuvent ainsi être faites entre les différentes zones géographiques.



Figure 20 : Le merlu *Merluccius merluccius*

Sites et plan d'échantillonnage

Le Rhône joue un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes et du cycle du carbone dans le golfe du Lion en apportant nutriments et matière organique d'origine terrestre sous forme dissoute et particulaire. Mais il véhicule également différents types de contaminants (polluants organiques, métaux lourds, et radionucléides) qui proviennent des activités anthropiques. La matière organique particulaire (MOP) sédimente en majeure partie sur le plateau continental où elle influence fortement la composition et l'abondance des communautés benthiques situées à la base des réseaux trophiques marins.

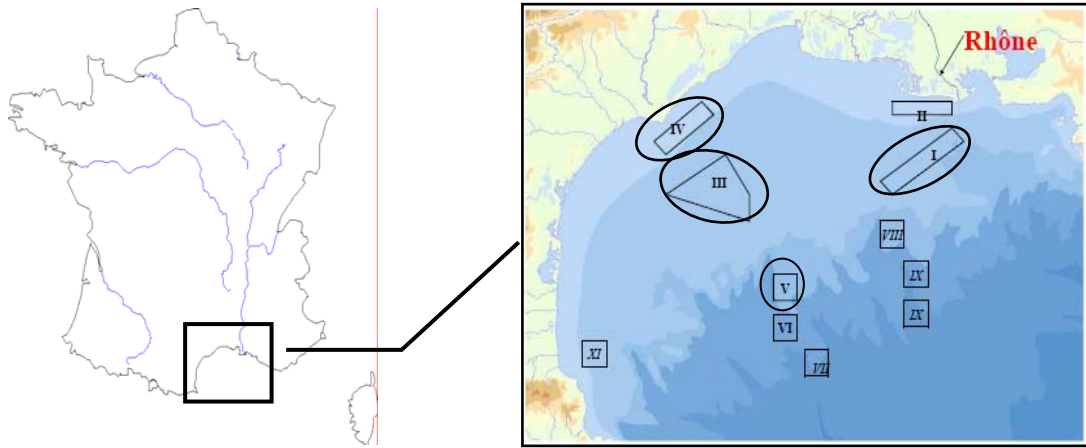


Figure 21: Zones d'échantillonnages des campagnes effectuées dans le cadre du programme MERLUMED. Seules les zones entourées (I, III, IV, V) ont été étudiées au cours de cette thèse.

Des captures de merlus et de ses proies ont été réalisées à l'aide d'un chalut lors d'opérations de pêche réalisées dans 4 stations du golfe du Lion (I, III, IV et V). Deux d'entre elles se situaient à proximité de l'embouchure du Rhône (I et IV) et les deux autres dans la partie centrale du golfe (III et V). Dans les deux sites, deux sondes ont été prospectées, l'une entre 30 et 50 m et l'autre entre 80 et 100 m.

Des merlus de taille supérieure à 25 cm ont été disséqués. Sur chaque individu, ont été opérés des prélèvements de muscle, foie, bile, gonade, otolithes, et réalisé des mensurations (longueur totale) et des pesées individuelles (poids total, poids éviscérés, poids éviscéré sans tête, poids du foie, poids des gonades, poids du muscle prélevé). Des petits merlus ont été également prélevés. Une partie d'entre eux a été mesurée et des prélèvements ont été réalisés pour l'étude du réseau trophique et des contaminants organiques, métaux et radionucléides. Les prélèvements de muscle, foie et gonade sont utilisés pour l'étude des contaminants organiques et métaux.

3 Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les protocoles de dosage des HAP dans les eaux et les tissus biologiques suivent ceux développés dans le laboratoire au cours de travaux précédents [10, 407, 408]. Ils consistent en une succession d'étapes de préparation des échantillons avant une injection en GC/MS (Figure 22). Les premières étapes du protocole sont communes aux différentes matrices.

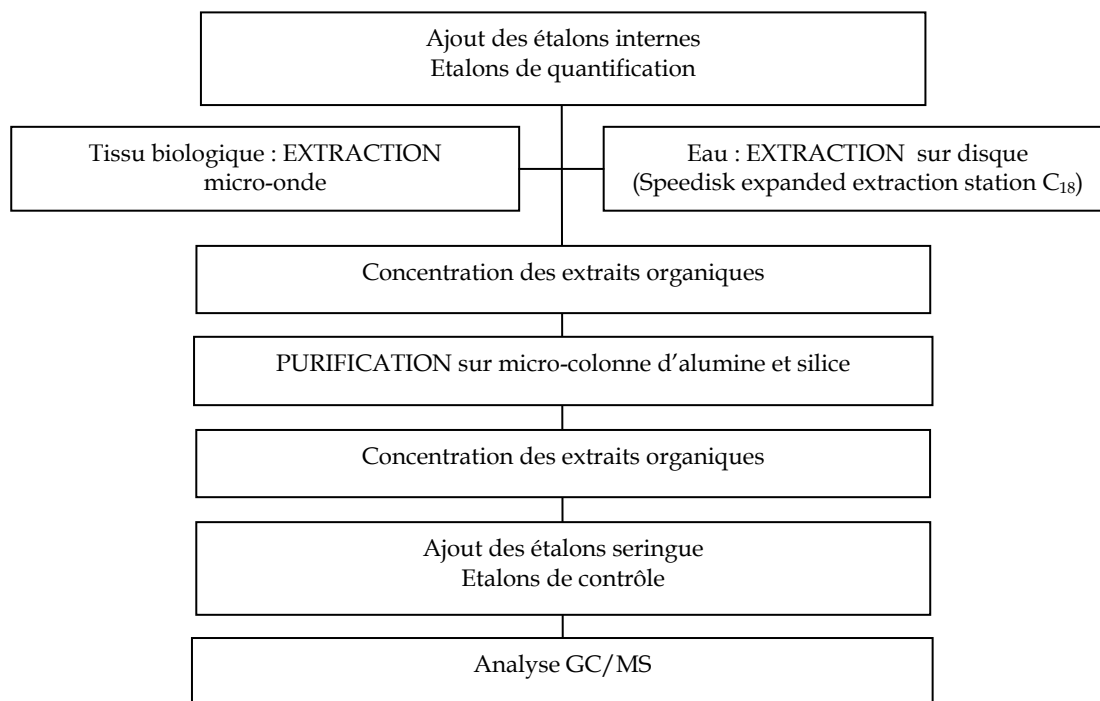


Figure 22: Protocole de dosage des HAP dans les eaux et les matrices biologiques.

3.1 Préparation des échantillons

Les tissus biologiques utilisés (foie et muscles) subissent une première étape de lyophilisation afin de les déshydrater (lyophilisation RP2V, CIRP, Argenteuil, France). Ils sont ensuite broyés au mortier pour les foies et au broyeur électrique pour les muscles.

3.1.1 Introduction des étalons internes

Les étalons internes choisis sont des HAP perdeutérés (Tableau 22), choisis en raison de leurs propriétés physico-chimiques, proches de celles des HAP natifs [407]. Le volume des étalons internes est contrôlé par gravimétrie de manière à avoir la meilleure précision quant à la quantité d'étalon introduite. Les solutions d'étalons internes sont préparées dans de l'isooctane. En outre, afin de contrôler le rendement des étalons internes, deux étalons dits de contrôle (par comparaison aux étalons de quantification) sont ajoutés juste avant l'analyse. Il s'agit du pyrène-d10 et du benzo[b]fluoranthène-d12.

Tableau 22: Liste des composés aromatiques étudiés, de leurs étalons internes de quantification et des rapports masse sur charge (m/z) utilisés pour leur détection en GC/MS.

Composé	m/z	Etalon interne	m/z
Naphtalène	128	Naphtalène-d8	136
2-méthylnaphtalène	142	Naphtalène	136
1-méthylnaphtalène	142	Naphtalène	136
Acénaphtylène	152	Naphtalène	136
Acénaphène	154	Naphtalène	136
Fluorène	166	Naphtalène	136
Phénanthrène	178	Phénanthrène-d10	188
Anthracène	178	Phénanthrène	188
3-méthylphénanthrène	192	Phénanthrène	188
2-méthylphénanthrène	192	Phénanthrène	188
9+4--méthylphénanthrène	192	Phénanthrène	188
1-méthylphénanthrène	192	Phénanthrène	188
2-méthylanthracène	192	Phénanthrène	188
Fluoranthène	202	Fluoranthène-d10	212
Pyrène	202	Fluoranthène-d10	212
Chrysène + Triphénylène	228	Chrysène-d12	240
Benz(a)anthracène	228	Chrysène-d12	240
Benzo(fluoranthènes)	252	Benzo(e)pyrène-d12	264
Benzo(e)pyrène	252	Benzo(e)pyrène-d12	264
Benzo(a)pyrène	252	Benzo(a)pyrène-d12	264
Pérylène	252	Benzo(e)pyrène-d12	264
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276	Benzo(g,h,i)pérylène-d12	288
Benzo(g,h,i)pérylène	276	Benzo(g,h,i)pérylène-d12	288
Dibenz(a,h)anthracène + dibenz(a,c)anthracène	278	Benzo(g,h,i)pérylène-d12	288

3.1.2 Extraction

Extraction des HAP dissous dans l'eau

Le principe repose sur l'extraction sur phase solide (SPE). Les HAP dissous dans l'eau sont retenus sur un disque greffé de molécules apolaires de type octadécyle (Speedisk expanded extraction station C₁₈, Baker, Atlantic Labo, Floirac, France). Le disque est d'abord conditionné par 60 ml de dichlorométhane (Ultra Resi-analysed, Atlantic Labo, Floirac, France) puis par 60 ml de méthanol (Suprasolv, VWR, Strasbourg, France), 10 ml d'acétate d'éthyle Multisolvent Scharlau (ICS Nationale, Belin Beliet, France), 10 ml de méthanol et enfin 10 ml d'eau ultra-pure MilliQ (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Après percolation de l'échantillon, le disque est séché sous vide durant 5 minutes. Les HAP sont élués par du dichlorométhane (2 x 5 ml), un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 50/50, v/v (3 x 3 ml) et à nouveau du dichlorométhane (3 x 5 ml). Enfin l'extrait est séché par filtration sur Na₂SO₄ anhydre (Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France).

Extraction micro-ondes des matrices solides

Les HAP contenus dans les tissus biologiques sont extraits par application d'un champ micro-ondes en présence de dichlorométhane (40 ml) [409, 410, 411]. L'extracteur micro-ondes (Prolabo, Fontenay-sous-bois, France) est programmé pour produire un champ d'ondes de puissance de 30 W pendant 10 min. Les HAP sont ainsi transférés de la matrice au solvant et l'extrait organique est définitivement séparé de la matrice par filtration sur coton de verre (VWR International, Strasbourg, France).

3.1.3 Concentration

Les extraits organiques obtenus sont ensuite concentrés au RapidVap® puis sous flux d'azote de manière à obtenir un volume final d'environ 300 µl.

3.1.4 Purification par chromatographie en phase liquide

La purification met en œuvre des micro-colonnes ouvertes d'alumine et de silice [412]. Deux étapes sont nécessaires ; la première utilisant l'alumine et la seconde, la silice. L'alumine (aluminium oxide 150 basic type T, VWR, Strasbourg, France) est introduite dans une micro-colonne de verre puis conditionnée par 4 ml de dichlorométhane. L'échantillon (300 µl) est ensuite déposé en tête de colonne et élué à l'aide de dichlorométhane (3 x 4 ml). Les HAP sont alors récupérés dans l'éluat et reconcentrés sous flux d'azote. Puis après remplacement du dichlorométhane par de l'isooctane, une seconde purification utilisant la silice est menée. La silice (Silica gel 60, VWR International, Strasbourg, France) est conditionnée par du n-pentane (4 ml) et l'extrait reconcentré est déposé en tête de colonne. Les hydrocarbures saturés, interférant avec les HAP en GC/MS [413], sont éliminés par rinçage au n-pentane (2 ml). Les HAP à doser sont ensuite élués avec un mélange de n-pentane/dichlorométhane (65/35, v/v ; 3 x 4 ml). Finalement, l'extrait recueilli est reconcentré sous flux d'azote jusqu'à obtenir une quantité équivalente à 100 µl.

3.2 Analyse par couplage GC/MS

Après la reconcentration, les étalons perdeutérés de contrôle du rendement de dosage des étalons internes sont ajoutés par gravimétrie. Les extraits sont alors analysés par GC/MS afin de doser les HAP. Les conditions d'analyse GC/MS sont données en Annexe 4.

3.2.1 Méthode de quantification

La méthode de quantification retenue est celle de l'étalonnage interne.

Dans cette méthode, on compare individuellement chacun des pics à évaluer au pic d'une substance étalon E, convenablement choisie, introduite en proportion connue dans le mélange à analyser en début de protocole (Figure 16). Il convient évidemment que le pic étalon ne soit confondu avec aucun des pics du chromatogramme.

On peut écrire : $m_e = K_e \cdot A_e$

Soit $m_i / m_e = (K_i / K_e) \times (A_i / A_e)$

On définit alors : $K_{i/e} = K_i / K_e$

On calculera donc la réponse de chaque soluté concerné par rapport à l'étalon. La méthode est générale. Elle est précise et reproductible.

Elle suppose néanmoins le choix d'un étalon qui, outre la nécessité de ne pas interférer avec les autres solutés, doit donner un pic de valeur de rétention proche de celle du pic à mesurer. L'étalon doit avoir également une aire approximativement égale à celle du pic du soluté, et enfin sa réponse doit se situer dans la zone de linéarité du détecteur utilisé. Ainsi, les étalons doivent avoir des propriétés physico-chimiques proches des composés à doser afin de compenser au mieux les pertes absolues intervenant au cours des différentes étapes de préparation des échantillons. De plus, ces composés doivent être chimiquement stables et ne pas être naturellement présents dans les échantillons à analyser. Les homologues deutérés des HAP remplissent tous ces critères et ont donc été utilisés (Tableau 22) dans les protocoles d'analyse des HAP. Par ailleurs, il faut noter que pour obtenir la meilleure quantification, un HAP deutéré doit être utilisé pour chaque classe d'aromaticité [20, 414].

Enfin, puisque la réponse du soluté par rapport à son étalon interne est extrêmement dépendante de la qualité du système chromatographique mais aussi de celle du système de détection par spectrométrie de masse, il est nécessaire d'injecter un mélange constitué d'une solution de composés non deutérés en concentrations connues et de la solution d'étalons internes utilisée. Cette injection doit être effectuée avant et après chaque série d'analyse d'environ 10 échantillons.

3.2.2 Validation des analyses

Afin de valider les analyses réalisées, un blanc de manipulation est effectué à chaque série d'analyse afin de tenir compte d'éventuelles contaminations lors du protocole. De plus les étalons internes (appelés étalons seringue ou étalons de contrôle) ajoutés en fin de protocole permettent de vérifier le rendement de récupération des étalons internes (appelés étalons de quantification) ajoutés en début de manipulation.

4 Dosage des métabolites de HAP mono-hydroxylés

Les composés présentés au début de ce chapitre ont été obtenus chez différents fournisseurs mais exclusivement sous forme cristalline. Le Tableau 23 résume les provenances des composés natifs et deutérés utilisés.

Tableau 23: Récapitulatif des composés utilisés

Composé	Fournisseur	Abréviation
1-hydroxynaphtalène	Lancaster	1-OHN
2-hydroxynaphtalène	Lancaster	2-OHN
2-hydroxybiphényle	Sigma Aldrich	2-OHBi
9-hydroxyfluorène	Sigma Aldrich	9-OHFe
1-hydroxyphénanthrène	Promochem	1-OHPhe
2-hydroxyphénanthrène	Promochem	2-OHPhe
3-hydroxyphénanthrène	Promochem	3-OHPhe
4-hydroxyphénanthrène	Promochem	4-OHPhe
9-hydroxyphénanthrène	Promochem	9-OHPhe
1-hydroxypyrene	Sigma Aldrich	1-OHP
1-hydroxypyrene d9	Cambridge Isotope Laboratories	1-OHP d9
1-hydroxychrysène	Promochem	1-OHC
3-hydroxybenzo(a)pyrène	Promochem	3-OHBaP
Pyrene d10	Cambridge Isotope Laboratories	Pyr d10

4.1 Protocoles de préparation des échantillons

4.1.1 Dosage total des formes libres et conjuguées : Protocole n°1 (Publication n°1)

Le protocole de dosage de la totalité des formes libres des métabolites de HAP dans la bile a adapté du protocole développé par O. Mazéas [245]. Durant ces travaux, il a été optimisé et validé sur différents fluides biologiques (bile, plasma, urine). La Figure 23 présente de manière schématique, la procédure générale mise en œuvre.

Le schéma général d'analyse est identique pour tous les types d'échantillons, seule la quantité d'étalon interne ajoutée en début de protocole change. Pour chaque série d'analyse, un échantillon dit « blanc » est mis en œuvre et analysé parallèlement aux échantillons à doser, afin d'estimer les contaminations pouvant survenir au cours du protocole.

Ajout des étalons internes et déconjugaison enzymatique

Après décongélation à température ambiante, les échantillons individuels sont supplémentés avec une solution d'étalon interne de 1-hydroxypyrenol-d9 (1-OHPd9). La solution mère d'étalon interne est préparée dans du méthanol et une solution fille diluée dans un tampon acétate de sodium (pH 5,0 ; 10⁻² M) est utilisée pour l'étalonnage interne. Les échantillons sont alors dilués dans 2 ml d'eau acidifiée à pH 5,0 avec de l'acide acétique. Les quantités exactes sont déterminées par gravimétrie.

Les métabolites de HAP étant présents essentiellement sous leurs formes conjuguées dans les fluides biologiques, les échantillons doivent tout d'abord subir une étape de déconjugaison qui a pour but de tous les transformer en métabolites libres. Des enzymes sont ajoutés à l'échantillon afin de convertir les métabolites conjugués en métabolites de HAP

hydroxylés. 30 μl d'un mélange enzymatique (enzymes issues du suc digestif de *Helix pomatia*, activité arylsulfatase $\leq 75\ 000$ unités. ml^{-1} et activité β -glucuronidase $\geq 100\ 000$ unités. ml^{-1} , Sigma Aldrich, France) ainsi que 30 μl d'antioxydant, le β -mercaptoéthanol (Sigma Aldrich, France) sont ajoutés. Les échantillons sont alors placés dans un incubateur à 37,5°C durant 18 heures [81, 201, 211, 214]. Après déconjugaison, les échantillons (matrices + enzymes + tampon) sont centrifugés (5 min, 5 000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$, 20°C) et les surnageants sont déposés sur les cartouches utilisées pour l'extraction des composés.

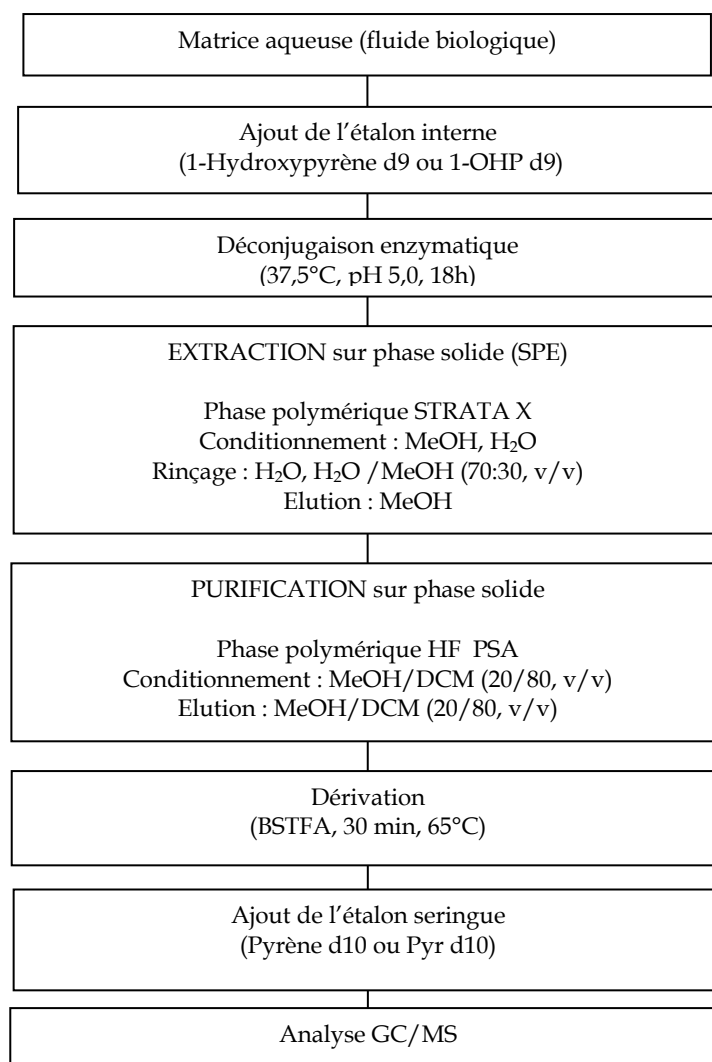


Figure 23: Protocole de dosage des métabolites totaux (libres + conjugués) dans les fluides biologiques

Extraction sur phase solide des métabolites de HAP

Une étape d'extraction sur phase solide est mise en œuvre après la centrifugation. Différentes cartouches SPE ont été testées. Le protocole retenu met en œuvre une phase polymérique (Strata X, 200 mg, 3cc, Phenomenex, Le Pecq, France), au préalable conditionnée par passage successif de 2 ml de méthanol et 4 ml d'eau acidifiée à pH 5 avec de l'acide acétique. Les surnageants sont déposés sur la cartouche. Les métabolites sont retenus sur la phase et la matrice est éliminée. La cartouche est alors rincée premièrement avec 2 ml d'eau (qualité Milli-Q, pH 6), puis avec 2 ml d'un mélange d'eau acidifiée (pH 5) et de méthanol (70/30, v/v). La phase stationnaire est ensuite séchée durant 45 min sous pression. Enfin les composés sont élués avec 5 ml de méthanol et évaporés à sec (40°C sous flux d'azote).

Purification sur phase solide

Après évaporation sous flux d'azote, les extraits sont repris dans 1 ml de mélange de dichlorométhane/méthanol (80 / 20, v/v) et déposés en tête de colonne sur une cartouche à phase polymérique HF PSA (500 mg, 3 cc, Varian, France), conditionnée au préalable par 4 ml du mélange dichlorométhane/méthanol (80 / 20, v/v).

Après le dépôt, l'éluat est directement récupéré et la cartouche est rincée avec 5 ml du mélange dichlorométhane/méthanol (80 / 20, v/v). Les métabolites hydroxylés sont élués alors que les composés plus polaires sont retenus sur la phase. L'extrait obtenu est ensuite évaporé à sec sous flux d'azote, repris dans 50 µl de dichlorométhane et transféré dans des flacons d'injection GC/MS.

A NOTER :

Le protocole a été développé pour un dosage des métabolites par GC/MS. Le solvant, dans lequel les extraits finaux sont repris et dans lequel ils sont injectés, est du *dichlorométhane*, compatible avec une analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Dans le cas d'une analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC/MS), le solvant d'injection et dans lequel les extraits sont repris, est du *méthanol*. Ce solvant est un solvant de choix pour les analyses en phase liquide et est proscrit dans le cas d'une analyse en phase gazeuse.

4.1.2 Fractionnement formes libres / formes conjuguées : Protocole n°2

Un second protocole (Figure 25) a été développé au cours de ces travaux. Il conduit au dosage combiné des métabolites sous leurs formes conjuguées et sous leurs formes libres dans les fluides biologiques. Une spéciation est alors possible au sein de l'échantillon. Les prises d'essai et les quantités d'étalons interne et seringue sont identiques à celles utilisées dans le protocole de dosage total précédemment décrit. Les procédures de préparation des échantillons telles que l'extraction sur cartouche Strata X, la déconjugaison enzymatique et la purification sur cartouche HF PSA, sont également identiques. L'étape-clé qui diffère et sur laquelle repose le fractionnement entre les formes libres et conjuguées, est l'étape de fractionnement sur cartouche de type Oasis MAX (60 mg, 3cc, Varian, France) qui possède une phase co-polymérique m-divinylbenzène et N-vinylpyrrolidone greffée avec des groupements d'amines quaternaires (Figure 24). Elle permet de fractionner via différentes éluations les formes conjuguées aux sulfates, de celles conjuguées au glutathion ou à l'acide glucuronique.

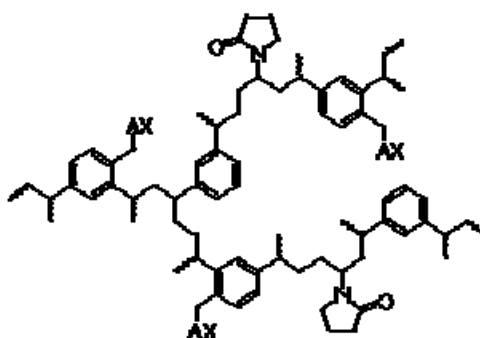


Figure 24: Phase co-polymérique de la cartouche SPE Oasis MAX (Waters) Où AX = $N^+(CH_3)_2C_4H_9 Cl^-$.

Le pH des échantillons est en premier lieu ajusté à 5,0 à l'aide d'une solution d'eau Milli-Q acidifiée avec de l'acide acétique. Une première extraction est nécessaire sur

cartouche Strata X (200 mg, 3 cc, Phenomenex, Le Pecq, France). Les cartouches sont conditionnées par passage de 2 ml de méthanol et de 2 ml d'eau Milli-Q, avant dépôt des échantillons et rinçage à l'eau Milli-Q (1,5 ml). L'élution des composés est effectuée par passage de 2 ml de méthanol.

Le fractionnement entre les formes libres et les différentes formes conjuguées des métabolites a lieu au moyen d'une cartouche polymérique greffée de groupement d'amines quaternaires (OASIS MAX, 60 mg, 3cc, Waters, St Quentin le Fallavier, France). Le conditionnement s'effectue par passage successif de méthanol (1,5 ml), d'eau Milli-Q (1,5 ml), d'acide acétique à 3 % dans de l'eau Milli-Q (4 ml) et enfin d'eau Milli-Q (4 ml) et de méthanol (1,5 ml). Les extraits sont déposés en tête de cartouches et les fractions sont séparées par différents éluions.

La première fraction (F1), contenant les formes libres, est éluee avec 2 ml de méthanol. Les extraits sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote et repris dans 1 ml d'un mélange de dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). Ils sont alors purifiés par passage sur cartouches polymériques HF PSA (500 mg, 3 cc, Varian, St Quentin le Fallavier, France) conditionnées au préalable par 4 ml du mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). L'élution s'effectue par passage de 5 ml de mélange de dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). L'éluat est évaporé à sec sous flux d'azote, repris dans 50 µl de dichlorométhane et transféré dans les flacons d'injection.

La seconde fraction (F2), contenant les formes conjuguées glucuronidées, est éluee avec 2,5 ml d'acide formique à 3,4 % dans du méthanol. L'étalon interne (1-OHPd9) est alors ajouté, puis les échantillons sont évaporés à sec, repris dans 2 ml d'eau Milli-Q acidifiée pour subir une déconjugaison enzymatique (Chapitre II, § 4.1.1.). L'extrait obtenu est alors en phase aqueuse. Il faut donc l'extraire par passage sur une cartouche polymérique Strata X (200 mg, 3cc, Phenomenex, Le Pecq, France) et ainsi passer en milieu organique, condition nécessaire pour la purification sur HF PSA. Le protocole est identique à celui utilisé pour le dosage total des formes libres et conjugués (Chapitre II, § 4.1.1.). L'élution s'effectue par passage de 5 ml de mélange de dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). L'éluat est évaporé à sec sous flux d'azote, repris dans 50 µl de dichlorométhane et transféré dans les flacons d'injection.

La troisième et dernière fraction (F3), contenant les formes conjuguées sulfatées, est éluee avec 4 ml de NaOH à 1M ajusté à pH 5,0 par de l'acide acétique. L'étalon interne (1-OHPd9) est alors ajouté, puis les échantillons sont évaporés à sec, repris dans 2 ml d'eau Milli-Q acidifiée pour subir une déconjugaison enzymatique (Chapitre II, § 4.1.1.). L'extrait obtenu est alors en phase aqueuse. Il faut donc l'extraire par passage sur une cartouche polymérique Strata X (200 mg, 3cc, Phenomenex, Le Pecq, France) et ainsi passer en milieu organique, condition nécessaire pour la purification sur HF PSA. Le protocole est identique à celui utilisé pour le dosage total des formes libres et conjugués (Chapitre II, § 4.1.1.). L'élution s'effectue par passage de 5 ml de mélange de dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). L'éluat est évaporé à sec sous flux d'azote, repris dans 50 µl de dichlorométhane et transféré dans les flacons d'injection.

A NOTER :

La remarque est identique que dans le cas du protocole de dosage des métabolites totaux (Chapitre II, § 4.1.1). Le solvant d'injection varie selon le type d'analyse chromatographique effectuée en suivant (en phase gazeuse ou en phase liquide). Le dichlorométhane est utilisé dans le cas d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse et le méthanol est choisi dans le cas d'une analyse en phase liquide.

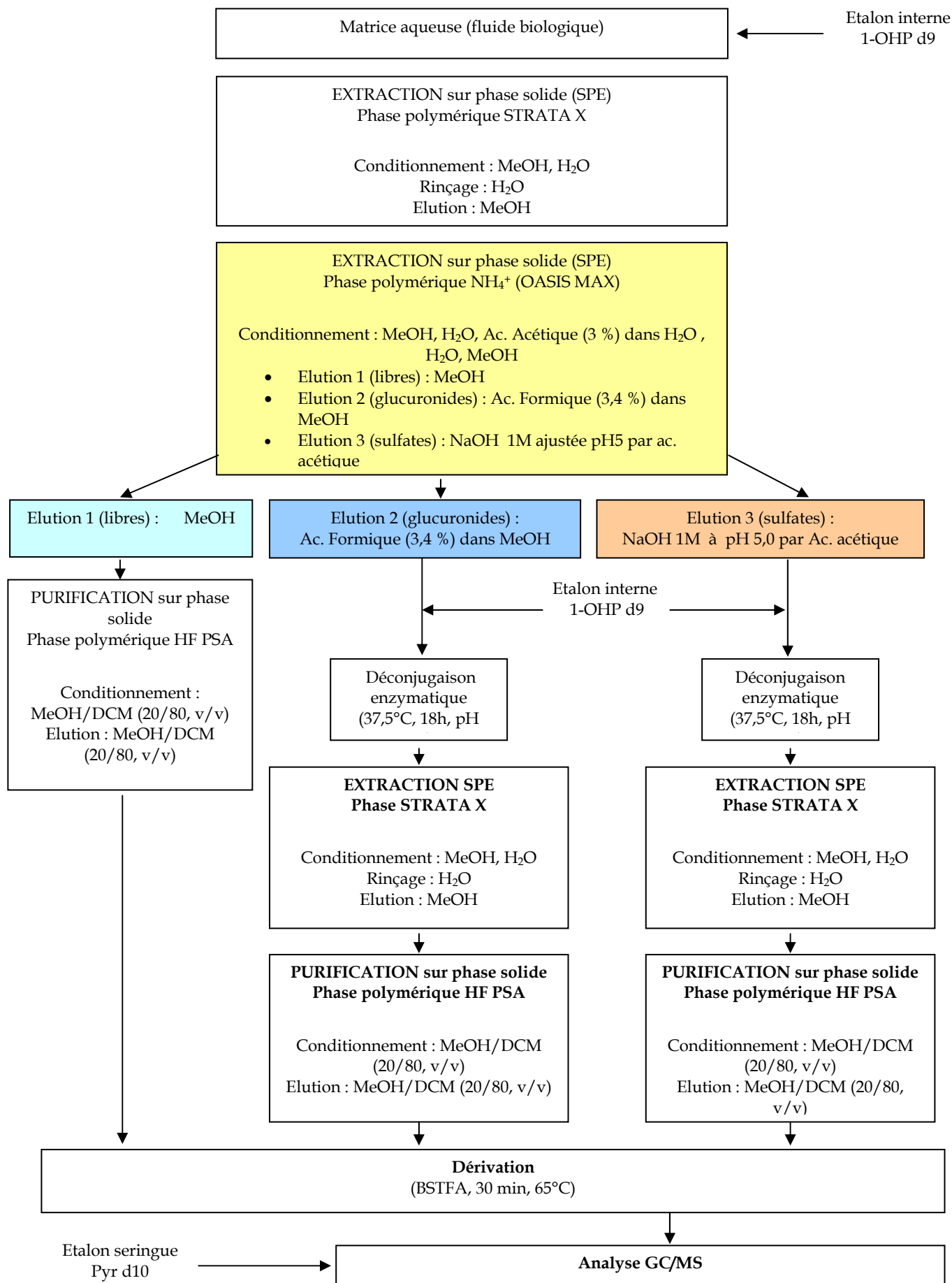


Figure 25: Protocole de dosage combiné des différentes formes des métabolites (conjugués et libres).

4.2 Analyse et Détection des métabolites de HAP (Publications n°1, 2 et 3)

Les axes de développement analytique suivis durant ces travaux de recherche ont été définis en fonction des acquisitions technologiques du laboratoire. Trois technologies ont été mises en œuvre :

- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple (GC/MS),
- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS),
- la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS)

4.2.1 Détection par GC/MS (Publication n°1)

Le principe

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse permet la séparation et la détection des composés ainsi que leur identification grâce aux spectres de fragmentation. En effet, après avoir été séparés par chromatographie en phase gazeuse, les composés sont introduits directement dans la source du spectromètre de masse où ils sont ionisés, dans notre cas, par impact électronique. L'ion moléculaire ainsi obtenu est ensuite plus ou moins fragmenté en fonction de sa stabilité. Les ions obtenus sont séparés d'après leurs rapports masse sur charge (m/z) et détectés en proportion de leur nombre (abondance). On obtient ainsi le spectre de masse de chaque composé présent dans le mélange de départ.

Dans le cas des analyses quantitatives de composés préalablement identifiés, le mode SIM (single ion monitoring) est privilégié. Il permet de ne détecter que certains ions particuliers. Ainsi il engendre une meilleure sensibilité que le mode qui effectue en continu un balayage des ions (le mode SCAN)

La dérivation

Comme il a été montré dans la synthèse bibliographique (Chapitre I, § 3.1.2), les métabolites de HAP ne sont pas des candidats idéaux pour une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC/MS) en raison de leur très faible volatilité. Ainsi l'ajout d'un agent dérivant va rendre possible l'analyse en GC/MS, en modifiant la fonctionnalité de la molécule.

Ainsi, préalablement à leur injection, les extraits subissent une étape de dérivation afin d'améliorer la séparation et la détection des composés. Le protocole conventionnel développé au laboratoire utilise comme agent de dérivation le N,O-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA, pureté > 98,5%) obtenu chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). 30 μ l de cet agent de silylation sont ajoutés à l'extrait reconcentré et mis à incuber à 65°C pendant 30 minutes.

La dérivation est un procédé qui va entraîner un conditionnement spécifique de la colonne chromatographique et un encrassement particulier du détecteur. Ainsi pour éviter tout excès de ce composé, la quantité de BSTFA introduite dans l'extrait devrait être dans les proportions stœchiométriques (1: 1) avec les groupements hydroxylés. Or les quantités sont trop infimes pour pouvoir être mesurées avec précision. De plus, il existe dans l'extrait d'autres molécules susceptibles de réagir avec le dérivant qui vont donc consommer de manière non contrôlée une partie du produit de dérivation. Le BSTFA est donc introduit en

excès par rapport aux métabolites présents. Il induit donc un encrassement dans le temps du détecteur et de la colonne.

Les conditions d'analyse

Comme pour les HAP, un composé deutéré est ensuite ajouté afin de déterminer le rendement de dosage de l'étalon interne (le 1-OHPd9). Ce composé ajouté en fin de protocole est appelé « étalon seringue » ou « étalon de contrôle ». Ici, il s'agit du pyrène d10 (Pyr d10).

Les analyses ont été réalisées avec un chromatographe Agilent Technologies 6890, équipé d'une colonne capillaire HP5-MS Agilent Technologies dont la phase est constituée à 5% de diphenyl- et 95% de diméthyl-polysiloxane et couplé à un spectromètre de masse Agilent Technologies 5973. Les métabolites sont séparés suivant un gradient de température allant de 70 à 290°C, avec une rampe de 15°C.min⁻¹. Les conditions d'analyse (paramètres de la séparation et de la détection) sont détaillées dans l'Annexe 5.

Le chromatogramme obtenu après extraction d'ion (analyse en mode SIM) pour le mélange des métabolites est représenté sur la Figure 26. Les composés sont généralement détectés sous la forme HAP-O-Si(CH₃)₃⁺ à la valeur m/z = « masse moléculaire + 72 », à l'exception du 1-hydroxynaphtalène, du 2-hydroxybiphényle et du 9-hydroxyfluorène. L'ion [HAP-H]⁺ détecté pour le 9-hydroxyfluorène correspond à la molécule ayant perdue une molécule d'H₂O. Pour le 1-hydroxynaphtalène, la perte d'un groupement CH₃ provenant de la silylation Si(CH₃)₃ semble être la plus probable explication à l'ion majoritaire formé. Pour le 2-hydroxybiphényle, l'ion majoritaire formé correspond à l'ion HAP-O-Si(CH₃)₂⁺. Les principaux ions des spectres de masse obtenus avec et sans dérivation, ainsi que leurs abondances relatives sont présentés dans le Tableau 24.

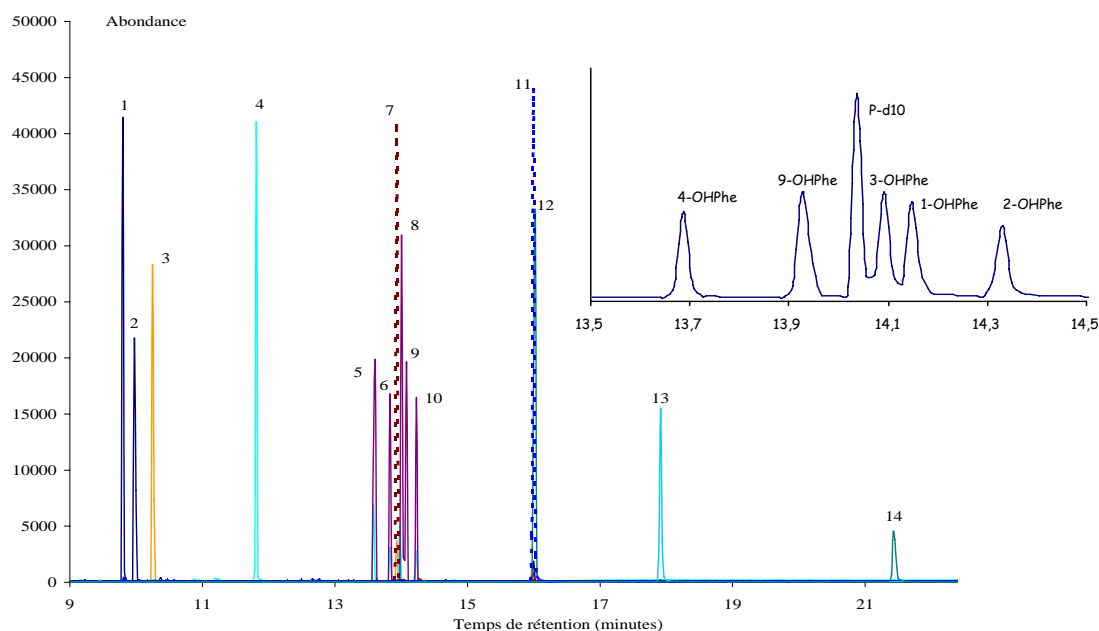


Figure 26: Chromatogramme obtenu en GC/MS par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés après dérivation. (1) 1-OHN, (2) 2-OHN, (3) 2-OHBi, (4) 9-OHFe, (5) 4-OHPhe, (6) 9-OHPhe, (7) Pyr d10, (8) 3-OHPhe, (9) 1-OHPhe, (10) 2-OHPhe, (11) 1-OHP d9, (12) 1-OHP, (13) 1-OHC, (14) 3-OHBaP.

Tableau 24: Principaux ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par GC/MS avec et sans dérivation. Le nombre entre parenthèse est l'abondance de chaque ion par rapport au premier fixé à 100 %.

Composés	M (g.mol ⁻¹)	m/z sans dérivation	m/z avec dérivation
1-OHN	144	144 (100), 115 (85)	201(100), 216 (90)
2-OHN	144	144 (100), 115 (60)	216 (100), 201 (65)
2-OHBi	170	170 (100), 169 (75), 141 (32)	211 (100), 227 (60), 242 (40)
9-OHFe	182	181 (100), 182 (77), 152 (38)	165 (100), 254 (25), 73 (25), 180 (10)
OHPhe (5 isomères)	194	194 (100), 165 (100)	266 (100), 251 (63)
1-OHP	218	218 (100), 189 (77)	290 (100), 275 (25), 291 (20)
1-OHP <i>d9</i>	227	227 (100)	299 (100)
1-OHC	244	244 (100), 215 (75)	316 (100), 301 (70), 285 (15)
3-OHBaP	268	268 (100), 239 (68)	340 (100), 341 (30)
<i>Pyr d10</i>	212	212 (100)	212 (100)

Tous les composés présentent une réponse linéaire sur une gamme du pg au ng injecté (1 µl injecté). Cet intervalle couvre la gamme des concentrations observées dans les échantillons environnementaux (Tableau 25).

Tableau 25: Linéarité des composés étudiés analysés en GC/MS (n=6). Les quantités injectées sont fixées à 1 µl.

Analytes	m/z	Gamme de concentrations	Régression linéaire	R ²	RSD (%)
1-OHN	201	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 23838x - 26571	0,9893	5,6
2-OHN	216	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 14942x - 16013	0,9918	5,3
2-OHBi	211	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 22817x - 23468	0,9913	4,6
9-OHFe	165	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 26284x - 31325	0,9878	4,5
4-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 12151x - 13319	0,9858	4,5
9-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 12916x - 14529	0,9891	4,3
3-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 15309x - 18395	0,9829	4,6
1-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 30562x - 34723	0,9935	3,9
2-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 17012x - 20177	0,9864	3,9
1-OHP	290	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 22224x - 25699	0,9978	3,7
1-OHP <i>d9</i>	299	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 24142x - 26655	0,9955	3,5
1-OHC	316	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 4679,7x - 5469,7	0,9843	6,1
3-OHBaP	340	7 ng.g ⁻¹ – 40 µg.g ⁻¹	y = 3266,5x - 4258,8	0,9255	10,5
<i>Pyr d10</i>	212	3 ng.g ⁻¹ – 30 µg.g ⁻¹	y = 25253x - 26139	0,9821	5,6

Le choix d'étudier la linéarité de la méthode sur une large gamme de concentrations justifie l'obtention de coefficients de corrélation de la régression linéaire (R^2) un peu plus faibles que sur des gammes de linéarité plus restreintes. Néanmoins, ce choix se justifiait par la taille de la gamme des concentrations en métabolites mesurés dans l'environnement. Afin de pouvoir valider notre méthode sur toutes les gammes de concentrations en OHHAP mesurées dans les organismes, nous avons conservé ces résultats.

Le protocole de quantification a été validé au moyen de solutions étalons contenant les métabolites natifs et le métabolite deutéré (1-OHP d_9) en quantités connues. La quantification a été vérifiée pour des quantités injectées variant de 3 pg à 30 ng (sauf pour le 3-OHBaP, gamme de 7 pg à 40 ng). Cet intervalle a été ainsi choisi car il couvre la gamme des concentrations observées dans les échantillons environnementaux (Tableau 26). Les limites de détection instrumentales sont présentées dans le Tableau 27. Les limites de détection du protocole global sont présentées dans le paragraphe suivant.

Tableau 26: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique ($n = 3$, moyenne \pm écartype).

Composés	3 pg (7 pg pour 3-OHBaP)	30 pg (70 pg pour 3-OHBaP)	0.3 ng (0,7 ng pour 3-OHBaP)	3 ng (7 ng pour 3-OHBaP)	30 ng (40 ng pour 3-OHBaP)
1-OHN	106 \pm 6	105 \pm 6	97 \pm 5	109 \pm 9	96 \pm 7
2-OHN	101 \pm 10	100 \pm 7	92 \pm 7	103 \pm 9	92 \pm 6
2-OHBi	98 \pm 8	98 \pm 9	90 \pm 6	100 \pm 6	91 \pm 8
9-OHFe	96 \pm 9	96 \pm 9	88 \pm 5	98 \pm 5	90 \pm 9
4-OHPhe	103 \pm 12	106 \pm 9	97 \pm 7	108 \pm 6	99 \pm 8
9-OHPhe	98 \pm 9	100 \pm 8	92 \pm 8	103 \pm 5	94 \pm 5
3-OHPhe	105 \pm 11	108 \pm 11	99 \pm 8	110 \pm 5	101 \pm 5
1-OHPhe	106 \pm 10	109 \pm 9	100 \pm 5	109 \pm 8	102 \pm 7
2-OHPhe	105 \pm 8	108 \pm 7	99 \pm 5	108 \pm 5	101 \pm 6
1-OHP	100 \pm 4	103 \pm 2	94 \pm 1	102 \pm 1	96 \pm 3
1-OHC	99 \pm 6	101 \pm 5	93 \pm 5	101 \pm 8	95 \pm 8
3-OHBaP	95 \pm 10	97 \pm 9	90 \pm 9	92 \pm 11	91 \pm 11
1-OHP d_9	105 \pm 4	108 \pm 3	99 \pm 1	101 \pm 1	101 \pm 2

Tableau 27: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (1 μ l injecté) et calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LDI	Composés	LDI
1-OHN	0,2	1-OHPhe	0,1
2-OHN	0,3	2-OHPhe	0,2
2-OHBi	0,2	1-OHP	0,3
9-OHFe	0,1	1-OHC	2,5
4-OHPhe	0,3	3-OHBaP	8,1
9-OHPhe	0,4	1-OHP d_9	0,5
3-OHPhe	0,2	<i>Pyr d10</i>	0,3

4.2.2 Détection par GC-MS/MS (Publication n°2)

Le second axe de ces travaux a été orienté vers une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS). Menés conjointement avec Justyna Sekula, étudiante étrangère en thèse au LPTC (Echange dans le cadre du programme Marie Curie), ces travaux ont pour but d'établir un protocole de dosage des métabolites plus spécifique et plus sensible que celui utilisant la GC/MS, permettant ainsi de diminuer les limites de détection et les quantités de matrice utilisées. Les développements effectués ainsi que la validation de l'analyse par GC-MS/MS ont fait l'objet d'une publication soumise à « *Journal of Chromatography B* » (Publication n°2).

Le principe

Les spectromètres de masse en tandem sont conçus de la manière suivante : une première étape consistant à sélectionner un ion stable particulier issu de la source d'ions (appelé « parent » ou « précurseur ») et une seconde qui représente l'analyse des ions issus de sa décomposition (ions « fils » ou « produits »). Dans l'intermédiaire se situe la phase d'activation de l'ion précurseur qui conduit à son excitation (*i.e.* l'augmentation de son énergie interne) et à sa fragmentation. La Figure 27 résume le principe de fonctionnement de la spectrométrie de masse en tandem.

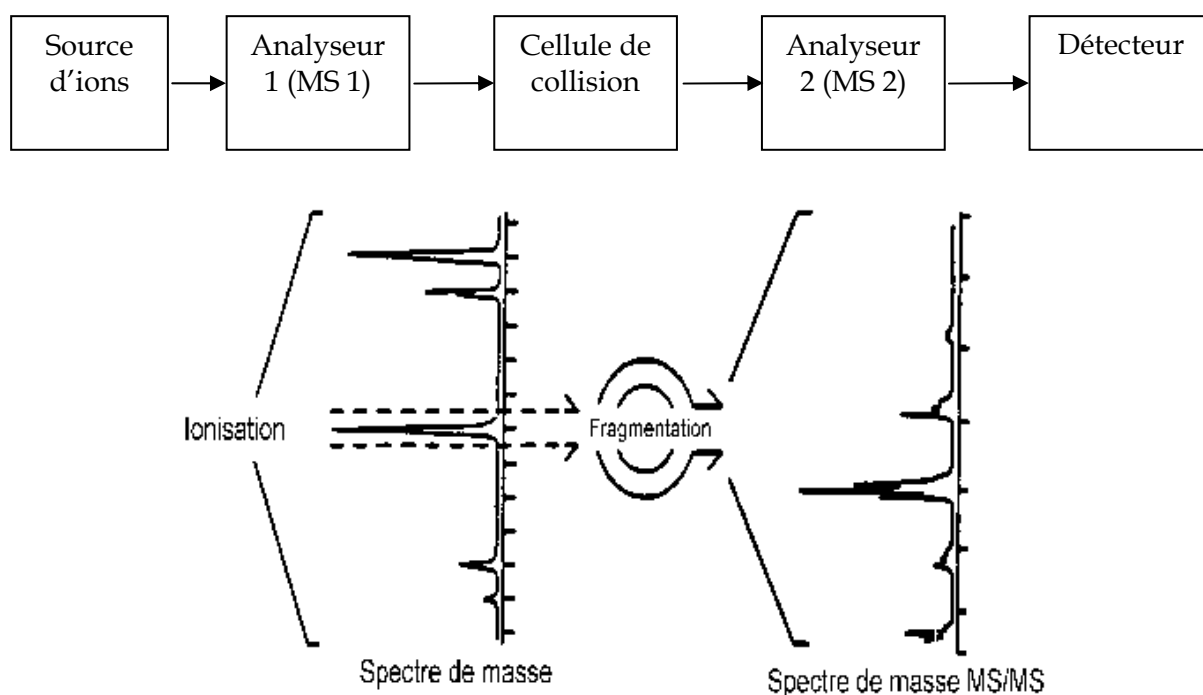


Figure 27: Principe de fonctionnement de la spectrométrie de masse en tandem

Les principaux avantages de cette technologie sont la précision et la reproductibilité des analyses quantitatives de composés présents à l'état de traces. La sensibilité, la sélectivité et la gamme dynamique de l'appareil sont parfaitement adaptées aux analyses environnementales, toxicologiques, agroalimentaires et toutes les analyses de traces, notamment dans les matrices complexes [415-423].

Comme pour l'analyse en GC/MS, différents modes d'acquisition sont possibles :

- Balayage complet pour la confirmation de la masse (SCAN)
- Détection sélective des ions pour le suivi d'un ou plusieurs composés (SRM, Single Reaction Monitoring)
- Balayage des ions produits pour des élucidations structurales
- Balayage des ions précurseurs pour rechercher des classes spécifiques de composés à l'aide de fragments communs
- Perte de neutre constante pour rechercher des classes spécifiques de composés
- Suivi des chromatogrammes en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) pour la quantification sélective des composés à l'état de traces.

Au cours de ces travaux, les développements analytiques ont été effectués sur un spectromètre de masse dont le principe de fonctionnement repose sur l'utilisation de deux analyseurs de type quadripolaire (MS1 et MS2). L'utilisation de deux analyseurs quadripolaires fournit des données de meilleure qualité pour un grand nombre d'applications :

- Sélectivité élevée pour réduire, voire éliminer les interférences dues à la matrice
- Sensibilité élevée, avec limites de quantification basses, pour les composés à l'état de traces
- Précision quantitative due à une excellente reproductibilité, stabilité, large gamme dynamique et à la possibilité de quantifier de manière exacte les composés en faible concentration.

Comme pour l'analyse par GC/MS le spectromètre de masse en tandem opère, dans le cas de cette étude, en mode d'impact électronique (EI) à 70 eV.

La dérivation

De manière similaire à la détection par GC/MS, il est nécessaire de dériver les métabolites de HAP pour pouvoir les détecter en GC-MS/MS. Néanmoins, dans le cas du spectromètre de masse en tandem, l'encrassement du système s'est avéré plus important que dans le cas du GC/MS. Le protocole de dérivation a donc été modifié par rapport à celui présenté dans le paragraphe précédent. 30 µl de N,O-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA, pureté > 98,5%, Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France) sont ajoutés à l'extrait reconcentré et mis à incuber à 65°C pendant 30 minutes.

Afin de minimiser l'impact du BSTFA dans le spectromètre de masse en tandem, 50 µl d'isooctane sont ajoutés à l'extrait dérivé et le BSTFA est évaporé sous flux d'azote. L'isooctane est un solvant moins volatil que le dichlorométhane. Il est ainsi ajouté à l'extrait afin que sous l'évaporation, le BSTFA s'évapore mais que les molécules de HAP hydroxylés les plus volatiles soient piégées dans l'extrait.

Les conditions d'analyse

Le principe du double-étalonnage interne n'a pas été mis en place dans le cas de l'analyse par GC-MS/MS. L'utilisation du pyrène d10 s'est montrée impossible du fait de la difficulté de décomposition de l'ion parent en ions fils stables. Le pyrène d10 est une molécule très stable. La formation d'ion parents est possible mais le passage dans la cellule de collision et la décomposition en ions fils nécessitent de grandes énergies de collision. L'application de telles énergies résulte en la fragmentation trop importante des ions parents et donc il est impossible d'obtenir des transitions spécifiques et sensibles pour le pyrène d10.

Les développements et les analyses ont été effectués au laboratoire sur un chromatographe Waters G1540N, équipé d'une colonne capillaire HP5-MS Ageilent Technologies et couplé à un spectromètre de masse Quattro Micro (Waters, UK). Les métabolites sont séparés selon un gradient de température de 70°C à 310°C, avec une rampe de température de 10°C par minute. Les conditions d'analyse et de détection sont détaillées dans l'Annexe 6.

Au cours de ces travaux, les développements et optimisations des méthodes d'analyses ont été uniquement menés pour 5 molécules hydroxylées : le 2-OHN, le 1-OHPhe, le 1-OHP, le 1-OHC et le 3-OHBaP. Ces 5 molécules sont représentatives de la famille des métabolites mono-hydroxylés. Elles sont plus ou moins aromatiques et donc plus ou moins volatiles. Les analyses sont effectuées en mode MRM (multiple reactions monitoring). Les transitions des ions « parents » aux ions « fils » ont été déterminées et optimisées. Le choix des produits de fragmentations pour chaque analyte et les énergies de collision associées ainsi que tous les autres paramètres instrumentaux à déterminer, ont été obtenus en travaillant avec des solutions de composés étalons aux concentrations allant de 7 à 10 µg.g⁻¹.

La Figure 28 présente les chromatogrammes pour chaque ion acquis dans le mode MRM. Les transitions obtenues ainsi que les conditions MRM pour l'analyse de composés dérivés sont résumées dans le Tableau 28.

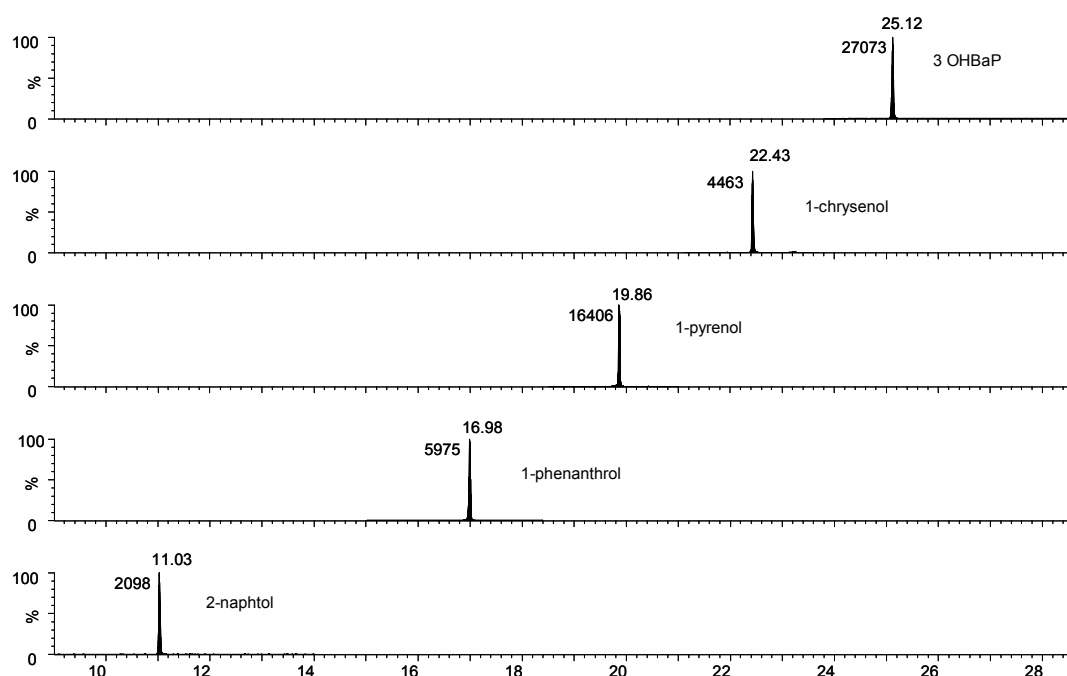


Figure 28: Chromatogramme obtenu en GC-MS/MS par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés après dérivation. 2-OHN, 1-OHPhe, 1-OHP d9, 1-OHP, 1-OHC, 3-OHBaP.

Tableau 28: Conditions MRM (transitions et énergie de collision) obtenues pour les métabolites hydroxylés dérivés.

Analytes	Transition 1 (m/z)	Energie de collision T1 (eV)	Transition 2 (m/z)	Energie de collision T2 (eV)	Ion de quantification	Ion de qualification	Concentration injectée [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
2-OHN	216-201	8	216-73	20	73	201	6,87
1-OHPhe	266-251	10	266-73	22	73	259	6,62
1-OHP	290-275	10	290-73	22	73	275	6,63
1-OHC	316-301	10	316-73	20	73	301	9,53
3-OHBaP	340-325	16	340-73	28	73	325	7,74

Tous les composés présentent une réponse linéaire sur les gammes des concentrations testées et variables selon les composés (1 μl injecté). Le Tableau 29 présente les domaines de linéarité ainsi que les performances obtenues pour chaque composé dans les conditions d'analyse optimisées.

Tableau 29: Linéarité des composés étudiés analysés en GC-MS/MS (n=6)

Analytes	Transition (m/z)	Gamme de concentrations [$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$]	Régression linéaire	R ²	RSD (%)
2-OHN	216-201	0,1 - 441	$y = 49x - 10$	0,9999	4,3
1-OHPhe	266-251	0,2 - 440	$y = 102x - 103$	0,9986	3,9
1-OHP	290-275	0,2 - 502	$y = 100x - 714$	0,9910	5,0
1-OHC	316-301	0,4 - 490	$y = 17x - 126$	0,9903	3,6
3-OHBaP	340-325	1,7 - 1850	$y = 17x - 460$	0,9903	5,9

Le protocole de quantification a été validé au moyen de solutions étalons contenant les métabolites natifs et le métabolite deutéré (1-OHP d9) en quantités connues (Tableau 30). La répétabilité (intra-jour) ainsi que la reproductibilité (inter-jour) ont été mesurées pour des quantités injectées de l'ordre de 13 à 42 ng (Tableau 31).

Les limites de détection instrumentales sont présentées dans le Tableau 32.

Tableau 30: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique (n =6, moyenne \pm écartype).

Composés	Pourcentage de la quantité théorique	Quantité injectée (ng)
2-OHN	103 \pm 9	9
1-OHPhe	100 \pm 3	12
1-OHP	97 \pm 1	6
1-OHC	100 \pm 8	4
3-OHBaP	97 \pm 14	11

Tableau 31: Précision de la méthode : Répétabilité et reproductibilité obtenues (n = 6)

Analytes	Quantités injectées (ng)	Répétabilité RSD %	Reproductibilité RSD %
2-OHN	13	11	11
1-OHPhe	16	9	10
1-OHP	16	11	13
1-OHC	16	8	14
3-OHBaP	42	10	11

Tableau 32: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (1 µl injecté) et calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LDI
2-OHN	0,1
1-OHPhe	0,1
1-OHP	0,3
1-OHC	0,2
3-OHBaP	2,8

Si on compare ces limites de détection obtenues en GC-MS/MS avec celles obtenues en GC/MS pour les mêmes composés, on constate qu'une différence significative en termes de performance et de limites de détection existe entre ces deux techniques pour les composés de plus haut poids moléculaires (1-OHC et 3-OHBaP). Ces composés ont des chemins de fragmentations complexes qui génèrent un plus grand nombre d'ions et donc une plus faible quantité d'ion majoritaire. Ceci nécessite donc une spécificité plus importante lors de leur détection. Ainsi le choix de la spectrométrie de masse en tandem est judicieux afin d'obtenir des transitions spécifiques à chaque composé et ainsi de pouvoir abaisser les limites de détection en diminuant également le bruit de fond de la matrice.

Ces gains en sensibilité et en spécificité sont des atouts dans la recherche des métabolites dans les matrices environnementales complexes dans lesquelles les teneurs en composé recherché sont parfois très proches des limites de détection des outils analytiques. Ces avantages analytiques sont d'autant plus importants qu'ils concernent des molécules très importantes dans le suivi environnemental de la contamination en HAP : le 1-pyrénol, considéré comme marqueur d'exposition et le 3-OHBaP, considéré comme responsable en partie des dommages génotoxiques chez les organismes exposés.

4.2.3 Analyse par UPLC-MS/MS

L'inconvénient majeur des techniques d'analyse des métabolites par chromatographie en phase gazeuse est l'utilisation de produit de dérivation, nécessaire à la volatilisation des composés. Comme noté dans les paragraphes précédents, l'utilisation du BSTFA entraîne un encrassement de l'appareillage non négligeable qui induit un surcoût en termes de temps de nettoyage des appareillages, mais aussi en termes d'usure prématurée des colonnes chromatographiques et également un surplus de temps de préparation des échantillons. En effet, à la fin de l'étape de purification, l'extrait à analyser est dissous dans un solvant polaire (Méthanol). Il faut donc pourvoir le transférer dans un solvant apolaire afin de l'injecter en chromatographie en phase gazeuse. Cette étape est source possible de perte de composés. Enfin, il faut donc dériver l'échantillon en ajoutant un surplus de BSTFA et attendre 30

minutes durant la réaction de dérivation. Toutes ces étapes sont donc consommatrices de temps et sources d'erreur. Dans un souci de rentabilité et dans le cadre d'analyses en routine d'un très grand nombre d'échantillons, le choix de s'orienter vers la chromatographie en phase liquide était judicieux.

Des travaux précédents [424] avaient montré néanmoins que la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) donnait des rendements inférieurs ainsi que de moins bonnes performances analytiques par rapport à l'utilisation de la GC/MS avec dérivation.

Cependant, des avancées technologiques significatives ont été réalisées récemment dans le domaine des phases stationnaires et l'optimisation des systèmes chromatographiques. Mises en commun, ces innovations contribuent à une amélioration croissante des performances analytiques. Ainsi Waters Corporation a récemment développé une nouvelle technologie, la chromatographie liquide ultra-performante (UPLC), permettant d'allier toutes les qualités de la chromatographie en phase liquide, tout en diminuant ses inconvénients. La technologie UPLC respecte les principes de la chromatographie liquide classique tout en améliorant la résolution, la vitesse et la sensibilité des analyses.

Ainsi, suite à l'acquisition de cette technologie au sein du LPTC, les travaux se sont naturellement orientés vers le transfert technologique de la méthode HPLC/MS vers l'UPLC-MS/MS afin de pallier aux inconvénients des techniques de chromatographie en phase gazeuse et afin d'améliorer davantage les performances analytiques des outils de quantification des métabolites de HAP.

Principe de l'UPLC-MS/MS

L'UPLC est une technologie développée par WATERS Corporation qui s'appuie sur les principes de la chromatographie en phase liquide mais à laquelle s'ajoutent des innovations en termes de sensibilité, de résolution chromatographique et de vitesse d'analyse. L'utilisation de colonnes, capables de résister à de très grandes pressions de fonctionnement, est une des clés de cette innovation technologique. Ces colonnes contiennent des phases stationnaires composées de petites particules de 1,7 μm de diamètre (entre 3 et 5 μm pour l'HPLC classique).

A l'heure actuelle, trois types de colonnes de type BEH (Bridged Ethyl-siloxane/silica Hybrid) sont commercialisés :

- ACQUITY UPLC BEH C₈ et C₁₈ (greffons de chaînes linéaires d'alcane),
- ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ (greffons de groupements apolaires),
- ACQUITY UPLC BEH Phenyl (greffons de groupements phényle).

Dans le cas de l'analyse des métabolites de HAP, la colonne ACQUITY UPLC BEH C₁₈ a été préférée du fait du caractère très polaire des métabolites primaires à faiblement polaire des composés hydroxylés.

Concernant le spectromètre de masse en tandem, la technologie du double quadripôle a également été utilisée (Chapitre II, § IV.2.2). Utilisée en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse, elle avait démontré le gain substantiel acquis en termes de limites de détection, de sensibilité et de spécificité. C'est pourquoi lors des développements analytiques en chromatographie en phase liquide, ce type de détection a été conservé afin d'optimiser davantage les outils de quantification.

Le transfert de la méthodologie HPLC/MS existante au laboratoire [424] s'est donc déroulé en deux temps :

- 1) Le transfert de l'HPLC vers l'UPLC : optimisation des solvants, du gradient d'éluion, des températures ...
- 2) Le transfert de la MS simple à la MS/MS : choix dans le mode d'ionisation entre la technologie APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) et l'ESI (Electrospray Ionization), recherche des transitions (parents → fils), optimisation des conditions MRM (énergies de collision, tension de cône, tension du capillaire).

Choix du mode d'ionisation

La méthode d'analyse des OH-HAP par HPLC/MS, déjà développée au laboratoire, utilisait le mode d'ionisation par électrospray (ESI). En effet, les limites de détection atteintes en mode d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) étaient dix fois supérieures à celles obtenues avec le mode ESI.

De plus, dans la littérature, on observe que l'analyse des métabolites de HAP par HPLC-MS/MS et HPLC/MS utilise plus fréquemment le mode d'ionisation ESI en particulier lorsque les concentrations en métabolites sont faibles. Néanmoins les deux modes d'ionisation sont possibles [253, 280, 425, 426, 427]

Le mode d'ionisation a été examiné dans les deux modes positif et négatif. Cependant, les métabolites mono-hydroxylés choisis dans cette étude ne produisent des signaux qu'uniquement dans le mode négatif. En effet, le groupement hydroxyle de ces molécules a tendance à perdre un hydrogène du groupement phényle et donc à générer des ions $[M-H]^-$. Les ions fils sont issus des fragmentations des ions parents. Dans le cas des métabolites mono-hydroxylés étudiés, la fragmentation résulte de la perte d'un groupement -CO et donc de la recombinaison de la structure moléculaire.

Conditions d'analyse

Les développements et les analyses ont été effectués au laboratoire sur un chromatographe Waters ACQUITY UPLC system (Milford, MA, USA), équipé d'une colonne ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1,7 μ m ; 2,1 mm x 150 mm) et couplé à un spectromètre de masse en tandem Quattro Premier™ (Micromass Ltd, Manchester, UK). Le système HPLC-MS/MS est contrôlé par l'application MassLynx™ 4.0 et QuanLynx™ 4.0.

Les paramètres utilisés pour la séparation des métabolites et leur détection sont détaillés dans l'Annexe 7. Au cours de ces travaux, les développements et optimisations des méthodes d'analyses ont été uniquement menés pour 5 molécules hydroxylées : le 2-OHN, le 1-OHPhe, le 1-OHP, le 1-OHC et le 3-OHBaP.

Le chromatogramme du mélange de métabolites obtenu après extraction d'ions en mode MRM est représenté sur la Figure 29. Les principaux ions des spectres de masse obtenus en ESI négatif sont présentés dans le Tableau 33.

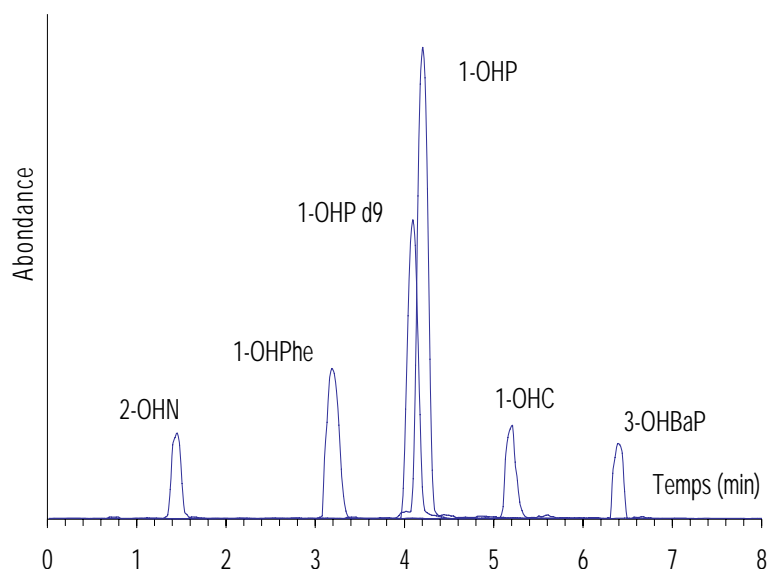


Figure 29: Chromatogramme obtenu en UPLC-ESI-MS/MS (débit de 0,45 ml.min⁻¹) par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés. 2-OHN, 1-OHPhe, 1-OHP d9, 1-OHP, 1-OHC, 3-OHBaP.

Tableau 33: Principaux ions (m/z) et conditions MRM (transitions, tension de cône et énergie de collision) obtenus pour les métabolites hydroxylés.

Analytes	Ion parents		Ion fils (m/z)		Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)	Dwell time (ms)
	(m/z)						
2-OHN	143	[M-H] ⁻	115	32	40	32	50
1-OHPhe	193	[M-H] ⁻	165	30	50	30	50
1-OHP	217	[M-H] ⁻	189	30	60	30	50
1-OHC	243	[M-H] ⁻	215	32	60	32	50
3-OHBaP	267	[M-H] ⁻	239	40	60	40	50

Tous les composés présentent une réponse linéaire sur les gammes des concentrations testées et variables selon les composés (10 µl injectés). Les solutions étalons ont été préparées dans de l'acétonitrile. Le Tableau 34 présente les domaines de linéarité ainsi que les performances obtenues pour chaque composé dans les conditions d'analyse optimisées.

Tableau 34: Linéarité des composés étudiés analysés en UPLC-MS/MS (n=3)

Analytes	Transition (m/z)	Gamme de concentrations	Régression linéaire	R ²	RSD (%)
2-OHN	143 - 115	1 ng.g ⁻¹ - 8 µg.g ⁻¹	y = 1,46x + 0,024	0,9961	2,3
1-OHPhe	193 - 165	1 ng.g ⁻¹ - 8 µg.g ⁻¹	y = 144,45x - 2,99	0,9990	2,4
1-OHP	218 - 189	1 ng.g ⁻¹ - 9 µg.g ⁻¹	y = 358,03x + 21,36	0,9987	1,3
1-OHC	243 - 215	1 ng.g ⁻¹ - 8 µg.g ⁻¹	y = 50,87x + 2,87	0,9982	2,9
3-OHBaP	267 - 239	2 ng.g ⁻¹ - 13 µg.g ⁻¹	y = 12,70x +	0,9954	2,4

1,41

Le protocole de quantification a été validé au moyen de solutions étalons contenant les métabolites natifs et le métabolite deutéré (1-OHP d9) en quantités connues. La quantification a été vérifiée pour des quantités injectées variant de 1 pg à 30 ng. Cet intervalle a été ainsi choisi car il couvre la gamme des concentrations observées dans les échantillons environnementaux (Tableau 35). Les limites de détection instrumentales sont présentées dans le Tableau 36. Les limites de détection du protocole global sont présentées dans le paragraphe suivant.

Tableau 35: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée (10 µl injectés). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique (n = 3, moyenne ± écartype).

Composés	1 pg	10 pg	0,1 ng	10 ng	30 ng
2-OHN	101 ± 10	97 ± 7	100 ± 7	96 ± 5	101 ± 10
1-OHPhe	94 ± 9	95 ± 9	96 ± 3	94 ± 4	96 ± 6
1-OHP	97 ± 7	104 ± 2	99 ± 4	98 ± 3	100 ± 5
1-OHC	93 ± 6	94 ± 7	92 ± 7	92 ± 8	96 ± 7
3-OHBaP	95 ± 8	101 ± 7	98 ± 5	98 ± 8	97 ± 7

Tableau 36: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (10 µl injectés) et calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LDI en pg (10 µl injectés)
2-OHN	0,1
1-OHPhe	0,1
1-OHP	0,1
1-OHC	0,1
3-OHBaP	0,4

Tableau 37: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés, calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3, selon les différentes méthodologies GC/MS, GC-MS/MS et UPLC-MS/MS.

Composés	GC-MS :	GC-MS/MS :	UPLC-MS/MS :
	LDI en pg (1 µl injecté)	LDI en pg (1 µl injecté)	LDI en pg (10 µl injectés)
2-OHN	0,3	0,1	0,1
1-OHPhe	0,1	0,1	0,1
1-OHP	0,3	0,3	0,1
1-OHC	2,5	0,2	0,1
3-OHBaP	8,1	2,8	0,4

Si on compare ces résultats à ceux obtenus en GC/MS et en GC-MS/MS, on note que le gain en sensibilité devient notable pour les composés de plus haut poids moléculaires (1-OHC et 3-OHBaP) (Tableau 37). Comme précédemment discuté (Chapitre II, § IV.2.2), ces gains en sensibilité et en spécificité sont essentiels à l'analyse environnementale

d'échantillons complexes. Les avantages de la spectrométrie de masse en tandem sont donc couplés à l'utilisation de la chromatographie en phase liquide qui ne nécessite pas de dérivation, ni de préparation d'échantillons trop laborieuse.

Les avantages de la chromatographie en phase liquide ultra-rapide (UPLC) permettent de diminuer les temps d'analyse de manière très significative. Avec l'UPLC moins de 10 minutes sont nécessaires pour analyser tous les composés recherchés alors que 40 minutes étaient nécessaires en HPLC conventionnelle. La technologie UPLC permet également l'obtention de pics chromatographiques mieux résolus et plus fins qu'en HPLC conventionnelle, augmentant ainsi la sensibilité de la méthode analytique.

4.3 Validation des procédures d'extraction et de quantification

Les procédures de déconjugaison, d'extraction, de purification et de quantification ont été validées au moyen de différents types d'échantillons (eau, bile, plasma, urine) dans lesquels une quantité connue de métabolites de HAP a été introduite (après détermination préalable des teneurs initiales en analytes dans les échantillons naturels). Néanmoins à l'heure actuelle, il ne nous a pas été possible d'obtenir des matrices de référence certifiées par le Bureau Communautaire de Référence (BCR) de l'Union Européenne.

4.3.1 Les rendements d'extraction/purification : dosage des métabolites totaux (protocole n°1)

Afin de proposer une validation des procédures de préparation des échantillons, les rendements d'extraction/purification ont été déterminés pour des échantillons d'eaux, de biles et de plasma supplémentés en métabolites de HAP. Le protocole utilisé dans ces validations de préparation des échantillons mettait en œuvre une analyse des métabolites de HAP par GC/MS. Les résultats pour les différentes matrices sont présentés dans les Tableaux 38, 39 et 40.

De manière à pouvoir comparer les différentes techniques analytiques, seules les données inhérentes aux 5 métabolites étudiés dans les trois méthodologies analytiques sont ici présentées. L'ensemble des données obtenues dans le cadre de l'optimisation et de la validation de l'analyse par GC/MS est traité dans la Publication n°1.

Tableau 38: Rendement moyen du dosage total des métabolites de HAP dans des eaux supplémentées, à différentes concentrations (moyenne \pm écartype, n = 3)

	15 ng.g ⁻¹	1,5 ng.g ⁻¹	150 pg.g ⁻¹	15 pg.g ⁻¹
2-OHN	91 \pm 8	88 \pm 7	88 \pm 8	74 \pm 10
1-OHPhe	95 \pm 7	96 \pm 7	92 \pm 9	83 \pm 8
1-OHP	90 \pm 3	90 \pm 5	87 \pm 8	78 \pm 7
1-OHC	89 \pm 6	89 \pm 8	86 \pm 8	77 \pm 9
3-OHBaP	86 \pm 8	86 \pm 9	78 \pm 8	74 \pm 10

Tableau 39: Rendement moyen du dosage total des métabolites de HAP dans des biles supplémentées, à différentes concentrations (moyenne \pm écartype, n = 3)

	15 ng.g ⁻¹	1,5 ng.g ⁻¹	150 pg.g ⁻¹	15 pg.g ⁻¹
2-OHN	90 \pm 7	75 \pm 9	81 \pm 10	68 \pm 8
1-OHPhe	94 \pm 8	81 \pm 6	85 \pm 8	76 \pm 9
1-OHP	89 \pm 2	76 \pm 5	80 \pm 6	72 \pm 8
1-OHC	88 \pm 6	75 \pm 9	79 \pm 6	71 \pm 8
3-OHBaP	85 \pm 9	72 \pm 10	72 \pm 9	68 \pm 11

Tableau 40: Rendement moyen du dosage total des métabolites de HAP dans des plasmas supplémentés, à différentes concentrations (moyenne \pm écartype, n = 3)

	50 ng.g ⁻¹	5 ng.g ⁻¹	500 pg.g ⁻¹
2-OHN	98 \pm 5	93 \pm 8	88 \pm 13
1-OHPhe	99 \pm 2	98 \pm 8	104 \pm 6
1-OHP	96 \pm 2	82 \pm 7	86 \pm 3
1-OHC	77 \pm 5	74 \pm 8	69 \pm 4
3-OHBaP	71 \pm 6	69 \pm 7	65 \pm 9

4.3.2 Validation du protocole de fractionnement des métabolites conjugués (protocole n°2)

Afin de valider le protocole de fractionnement des métabolites conjugués, il est nécessaire de connaître la quantité exacte de chaque composé initialement présent dans l'échantillon à doser. Deux techniques sont alors possibles. La première, et la plus juste, est de supplémenter, comme il a été fait précédemment, l'échantillon avec des composés commerciaux et de déterminer le rendement du protocole de dosage. La seconde option est de déterminer, d'une part, les teneurs en composés selon une méthodologie validée et d'autre part, selon la méthodologie à valider. La différence entre les résultats obtenus permet de conclure sur la validité du protocole à valider. Cependant dans cette seconde option, les résultats sont soumis à de plus grandes variabilités humaines et analytiques et à de plus grandes sources d'erreur.

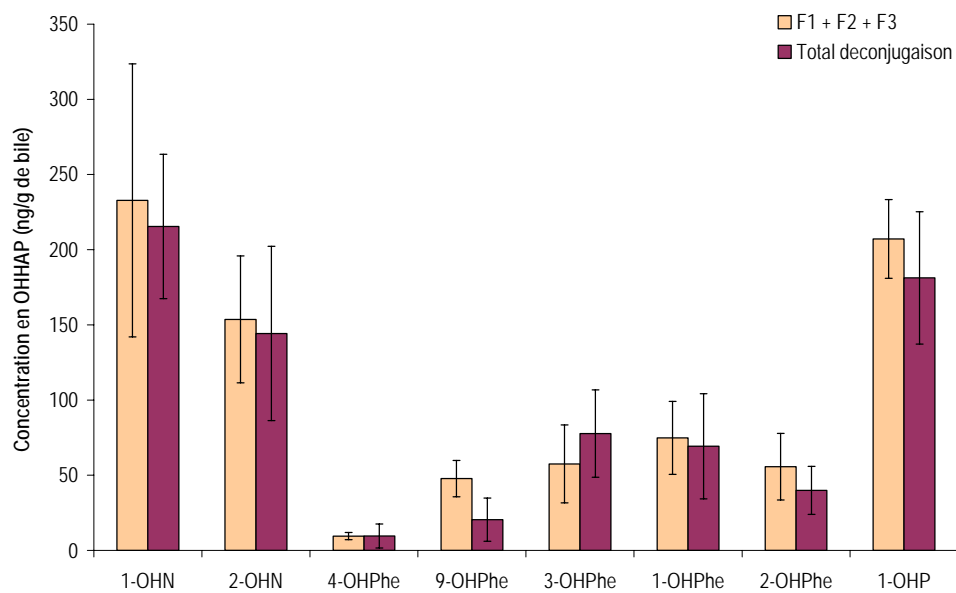
En outre, pour l'étude des métabolites conjugués, il n'existe à l'heure actuelle, qu'un seul métabolite conjugué disponible commercialement, le 1-OHP-glucuronide. Ainsi, pour déterminer la part de chaque métabolite dans les différentes fractions (libre, sulfate, glucuronidé), il est impossible d'utiliser la technique de la supplémentation de l'échantillon.

Pour valider le protocole de fractionnement des métabolites biliaries, des échantillons de biles naturelles (merlus pêchés en Méditerranée) ont donc été dosés selon les deux protocoles.

Les résultats de dosage obtenus avec les deux protocoles (déconjugaison totale et fractionnement) ont ainsi été comparés (Tableau 41 et Figures 30, 31 et 32). L'analyse par GC/MS a été utilisée pour le dosage des extraits finaux pour les deux protocoles.

Tableau 41: Teneurs en métabolites biliaires (ng.g⁻¹ de bile) obtenues lors du dosage de bile de merlu selon les protocoles 1 (avec et sans déconjugaison) et 2. Moyenne ± écartype, n = 3.

Composé	Protocole n°1	Protocole n°1 sans déconjugaison		Protocole n°2		
	Dosage total	Dosage des composés libres	Fraction 1 composés libres	Fraction 2 conjugués glucuronidés	Fraction 3 conjugués sulfatés	Somme des 3 fractions totalité des métabolites
1-OHN	215,5 ± 48,0	20,0 ± 5,1	36,1 ± 7,1	181,7 ± 13,0	15,0 ± 11,0	232,8 ± 90,8
2-OHN	144,3 ± 58,0	15,0 ± 6,0	13,0 ± 1,0	96,5 ± 14,5	44,1 ± 17,4	153,6 ± 42,2
4-OHPhe	9,6 ± 8,0	0,9 ± 0,4	0,7 ± 0,1	5,6 ± 0,4	3,2 ± 0,4	9,5 ± 2,4
9-OHPhe	20,4 ± 14,4	0,9 ± 0,2	2,3 ± 0,6	20,0 ± 9,2	25,5 ± 14,8	47,8 ± 12,1
3-OHPhe	77,7 ± 29,1	0,6 ± 0,3	2,1 ± 0,7	6,4 ± 2,0	49,0 ± 3,2	57,5 ± 25,9
1-OHPhe	138,9 ± 35,0	6,1 ± 4,4	5,1 ± 3,3	17,7 ± 2,4	52,0 ± 3,8	74,8 ± 24,3
2-OHPhe	39,9 ± 16,0	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,4	43,6 ± 0,3	10,5 ± 9,0	55,7 ± 22,1
1-OHP	272,2 ± 44,0	41,4 ± 11,6	28,5 ± 17,9	157,5 ± 22,0	21,1 ± 14,0	207,2 ± 76,7

Figure 30: Comparaison entre la somme des métabolites obtenus dans les différentes fractions (F1+ F2 + F3) (protocole n°2) et le dosage des métabolites totaux (protocole n°1). Concentrations exprimées en ng.g⁻¹ de bile. Moyenne ± écartype, n = 3.

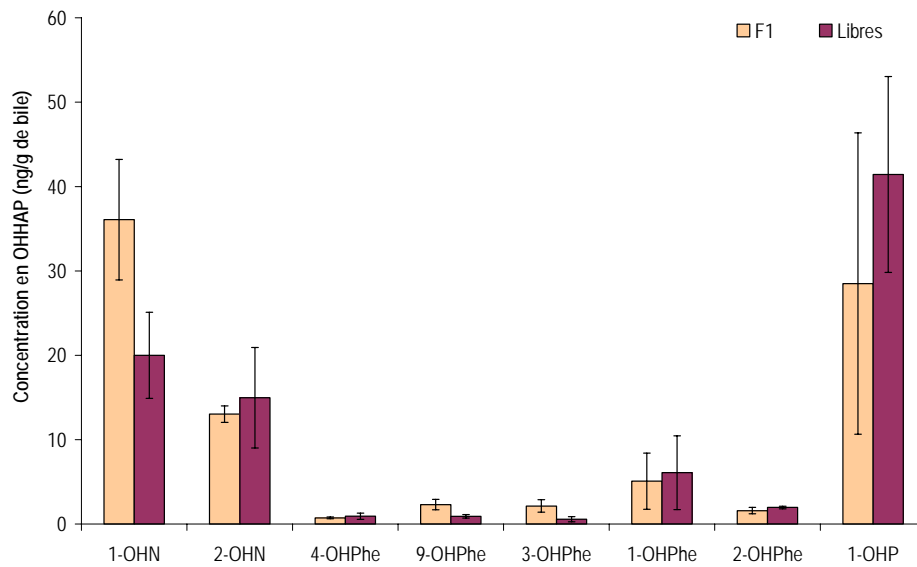


Figure 31: Comparaison entre les résultats obtenus pour les métabolites de la fraction libre (F1) (protocole n°2) et le dosage des métabolites libre (protocole n°1 sans la déconjugaison enzymatique). Concentrations exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de bile. Moyenne \pm écartype, $n = 3$.

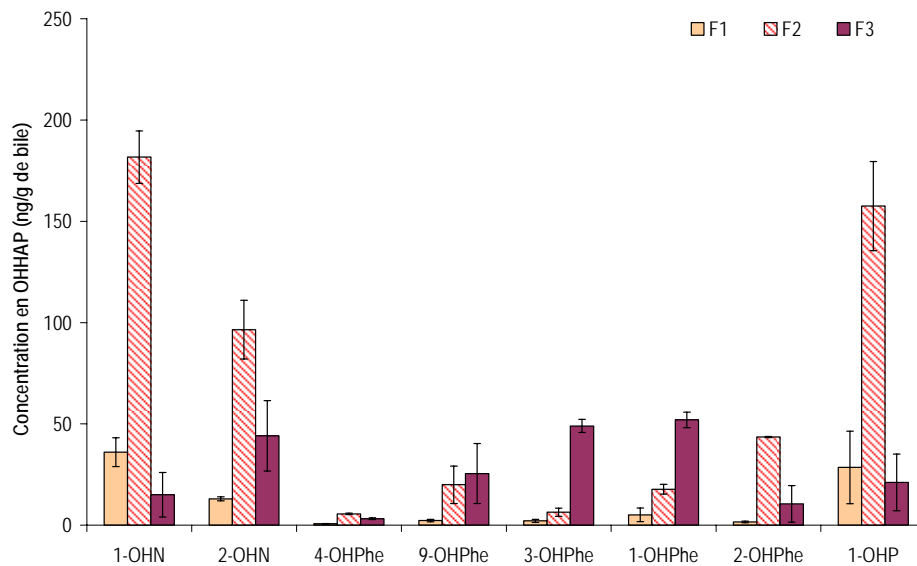


Figure 32 : Concentrations en métabolites obtenues dans les différentes fractions selon le protocole n°2. F1 : fraction libre, F2 : fraction des glucuronides, F3 : fraction des sulfates. Concentrations exprimées en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de bile. Moyenne \pm écartype, $n = 3$.

Concernant la spéciation des différentes formes des métabolites, on observe que les formes conjuguées sont majoritaires pour tous les métabolites recherchés. En pourcentage relatif à la totalité des métabolites dosés, on obtient les résultats suivants (Tableau 42).

Tableau 42: Distribution relative des différentes formes des métabolites dans la bile de merlu (100 % représentant la somme des métabolites détectés, toute forme confondue)

Composés	% de la forme libre (F1)	% de la forme glucuronide (F2)	% de la forme sulfate (F3)
1-OHN	15	78	6
2-OHN	8	63	29
4-OHPhe	8	59	34
9-OHPhe	5	42	53
3-OHPhe	4	11	85
1-OHPhe	7	24	70
2-OHPhe	3	78	19
1-OHP	14	76	10

On remarque que pour les métabolites isomères du phénanthrène, la fraction des conjugués sulfates est plus importante que celle des composés glucuronides. Pour les métabolites du pyrène et du naphthalène, cette distribution est inversée. Ces résultats sont en correspondance avec ceux que l'on peut trouver dans la littérature (Chapitre I, § 2.2.2).

Si on prend l'exemple du naphthalène, les conjugués glucuronides dans la bile sont largement majoritaires par rapport aux sulfates [81, 259, 337]. Les conjugués sulfatés des HAP sont d'une manière générale moins abondamment produits que les glucuronides chez différentes espèces de poissons [81, 428, 429]. Il a été également constaté sur des HAP phénoliques que les conjugués sulfatés étaient majoritairement éliminés via l'urine [430] alors que les glucuronides l'étaient principalement par la bile [430]. Dans cette dernière étude où douze espèces de poisson sont exposées au 1-hydroxynaphthalène, entre 77 et 93% des métabolites biliaires sont conjugués à l'acide glucuronique et entre 4 et 12% aux sulfates. Toutes ces données bibliographiques sont en accord avec les résultats obtenus dans cette étude.

Ces travaux de recherche portant sur la spéciation des métabolites ont ouvert de nouvelles perspectives sur l'étude des phénomènes de biodisponibilité et de biotransformation des HAP chez les organismes supérieurs. En revanche, l'outil analytique développé n'a pas été utilisé en routine sur des programmes de surveillance car il était consommateur de temps et de moyens. C'est pourquoi ces recherches doivent être poursuivies dans ce sens et la méthodologie doit être optimisée afin d'obtenir une méthode analytique rapide et performante, nécessaire à la compréhension du devenir des HAP chez les poissons exposés.

4.3.3 Limites de détection

Les limites de détection ont été établies dans les matrices aqueuses et dans la bile. Pour chaque méthode de séparation et d'analyse (GC-MS, GC-MS/MS et UPLC-MS/MS), ces limites sont calculées selon le rapport « signal / bruit = 3 ». Elles sont présentées dans les Tableaux 43, 44 et 45.

Les prises d'essai sont de 3 ml pour les eaux supplémentées et de 100 µl pour la bile.

Tableau 43: Limites de détection (LOD) selon la méthodologie utilisant la GC/MS pour différentes matrices. LOD exprimées en ng.l⁻¹ d'eau et ng.g⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LOD - EAU (ng.l ⁻¹)	LOD - BILE (ng.g ⁻¹)
2-OHN	1,6	3,9
1-OHPhe	0,4	0,9
1-OHP	0,6	0,1
1-OHC	4,5	6,6
3-OHBaP	13,6	20,6

Tableau 44: Limites de détection (LOD) selon la méthodologie utilisant la GC-MS/MS pour la matrice biliaire. LOD exprimées en ng.g⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LOD - EAU (ng.l ⁻¹)	LOD - BILE (ng.g ⁻¹)
2-OHN	0,2	0,7
1-OHPhe	0,1	0,5
1-OHP	0,7	0,3
1-OHC	0,6	1,4
3-OHBaP	4,9	8,5

Tableau 45: Limites de détection (LOD) selon la méthodologie utilisant l'UPLC-MS/MS pour différentes matrices. LOD exprimées en ng.l⁻¹ d'eau et ng.g⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LOD - EAU (ng.l ⁻¹)	LOD - BILE (ng.g ⁻¹)
2-OHN	0,03	0,10
1-OHPhe	0,01	0,03
1-OHP	0,01	0,02
1-OHC	0,01	0,03
3-OHBaP	0,02	0,10

Ces LOD ont été déterminées pour un certain type de matrice. Pour les matrices aqueuses, il s'agit d'eau Milli-Q fortifiée en métabolites, via une solution de métabolites dissous dans de l'éthanol. Pour les biles, des biles de truites ont été utilisées comme matrice

de référence. Après vérification de l'absence de métabolites dans la matrice initiale, elle a été supplémentée en métabolites via une solution de métabolites dissous dans de l'éthanol.

Néanmoins, la variabilité « naturelle » de la composition des matrices biologiques (bile) et en particulier la nature et la quantité des protéines et des lipides les composant, entraîne une forte variabilité des limites de détection entre deux échantillons (peut atteindre 25% pour le 3-OHBP). Ceci est dû principalement aux fluctuations importantes du bruit de fond et des interférences matricielles. Il convient donc de calculer les LOD pour chaque série d'analyse et parfois pour chaque type d'échantillon, en particulier lorsqu'on s'intéresse à différentes espèces animales. De plus des variabilités sur les machines peuvent également influencer la détermination des limites de détection. Un encrassement du système provoquera des interférences matricielles visibles par une augmentation du bruit de fond et donc par une augmentation des limites de détection établies par la méthode du rapport Signal/Bruit.

Après comparaison avec les LOD recueillies dans la littérature, on constate que les performances obtenues avec les protocoles développés au cours de cette thèse sont globalement plus sensibles, quels que soient les modes de séparation et de détection considérés.

Avec une méthodologie utilisant la GC/MS et la dilution isotopique, Smith *et al.* [431, 432] ont montré, sur des échantillons d'urine, des LOD comprises entre 1 et 16 ng.l⁻¹ d'urine pour les métabolites mono-hydroxylés du phénanthrène. Dans les travaux de recherche ici présentés, la LOD obtenue sur des échantillons de bile pour le 1-hydroxyphénanthrène est de 0,9 ng.g⁻¹ de bile avec la méthode GC/MS. Jongeneelen *et al.* [433] ont mis en œuvre une méthode GC/MS pour laquelle la LOD du 1-hydroxypyrene était 170 pg.g⁻¹ de bile. Dans la méthode présentée dans ces travaux de recherche (Publication n°1), la limite de détection du 1-hydroxypyrene est calculée à 100 pg.g⁻¹ de bile.

Enfin, Romanoff *et al.* [434] ont développé une méthodologie utilisant la GC/HRMS combinée à la dilution isotopique pour quantifier les métabolites de HAP dans l'urine. Les LOD obtenues avec la spectrométrie haute résolution étaient comprises entre 2 et 10 ng.l⁻¹ d'urine. Pour la matrice aqueuse, les LOD obtenues avec le protocole GC/MS (Tableau 43) sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en GC/HRMS. En revanche pour la matrice biliaire, les limites de détection restent inférieures à celles obtenues en GC/HRMS. Les différences sont d'autant plus importantes que les composés ont un plus haut poids moléculaire (1-OHC et 3-OHBP). Pour le 1-OHPhe et le 1-OHP, les différences sont de l'ordre de 5 et 8 fois plus importantes en GC/MS par rapport à la GC/HRMS, respectivement. Néanmoins, il faut tenir compte dans ces comparaisons des différences matricielles (urine et bile) qui peuvent beaucoup influencer la détermination des LODs.

Si on considère les autres méthodologies développées au cours de cette thèse (protocoles utilisant GC-MS/MS et UPLC-MS/MS), très peu de comparaisons sont possibles avec la littérature. En effet, à l'heure actuelle, aucun travail n'a présenté une analyse des métabolites de HAP dans la bile par GC-MS/MS ou par UPLC-MS/MS. Seuls des travaux utilisant la méthodologie par HPLC-MS/MS peuvent être recensés. Xu *et al.* [425] ont proposé une méthode LC-MS/MS pour laquelle les limites de détection instrumentales pour le 2-hydroxynaphtalène, le 1-hydroxyphénanthrène, le 1-hydroxypyrene et le 3-hydroxybenzo(a)pyrene étaient de 1,1, 0,8, 0,1 et 0,1 pg injectés (10 µl injectés), respectivement. Si on compare ces valeurs à celles obtenues pour les protocoles utilisant la GC-MS/MS et l'UPLC-MS/MS, on note que les valeurs sont globalement similaires à celles obtenues en UPLC-MS/MS mais supérieures à celles obtenues en GC-MS/MS. Néanmoins,

la comparaison ne peut pas être étendue aux limites de détection du protocole global car l'influence matricielle de la bile ne peut pas être extrapolée à partir de valeurs instrumentales uniquement. Pigni *et al.* [426] ont montré sur des échantillons d'urine une LOD pour le 1-hydroxypyrene de 0,01 ng.l⁻¹ d'urine en HPLC-MS/MS. Dans cette étude, l'importance de l'étalonnage interne a été démontrée lors de l'application de cette méthodologie pour le dosage d'échantillons complexes tels que l'urine. L'influence de la matrice dans les interférences matricielles et donc dans le dosage des métabolites a été prouvée.

Une seule étude, à l'heure actuelle, rapporte le développement d'une méthode d'analyse par UPLC/MS pour la quantification des métabolites du BaP dans la bile de poissons [435]. Les LOD des métabolites du BaP sont données pour inférieures à 10 ng.g⁻¹ de bile. Si on compare ces données avec celles obtenues par le protocole UPLC-MS/MS développé au cours de cette thèse, on se rend compte qu'un facteur 100 à 500 sépare les LOD des deux protocoles. La spécificité et la sensibilité de la spectrométrie de masse en tandem ainsi que l'optimisation de la séparation par chromatographie en phase liquide ultra-performante sont ainsi démontrées.

5 Dosage des métabolites de HAP primaires par UPLC-MS/MS (Publication n° 4)

Le dosage de ces métabolites plus réactifs (Tableau 15) et moins stables que les composés mono-hydroxylés (dits métabolites primaires) a été développé à partir du protocole de dosage des métabolites totaux, validé au laboratoire (Chapitre II, § 4.1.1). Seule la méthode d'analyse a différé et la technologie UPLC-MS/MS a été mise en œuvre.

5.1 La séparation et l'analyse des métabolites primaires (Publication n°4)

Dans un premier temps, le développement s'est porté sur la détection de ces composés en spectrométrie de masse en tandem. Les deux techniques d'ionisation (ESI et APCI) ont été testées dans les deux modes. Des tests préliminaires ont rapidement montré que la sensibilité de la méthode APCI était nettement plus faible que celle de la méthode ESI (environ 4 fois plus faible). Dès lors, l'optimisation des paramètres d'ionisation a été conduite uniquement pour l'ESI. Un plan expérimental a permis d'obtenir la meilleure combinaison pour les facteurs suivants : pression de nébulisation, température et débit de gaz desséchant, différence de potentiel appliquée au capillaire, différence de potentiel utilisée pour la fragmentation des ions parents, énergie appliquée à la cellule de collision, vitesse du gaz de collision. L'optimisation de ces paramètres a permis l'obtention d'un signal maximal avec une fragmentation minimale pour la plupart des analytes.

La quasi-totalité des métabolites a été analysée en mode positif (ions $[M+H]^+$) à l'exception des métabolites mono-hydroxylés, le 9-OHBaP et le 3-OHFluo, analysés en mode négatif (ions $[M-H]^-$). L'Annexe 8 résume les paramètres d'analyse optimisés.

Un compromis a dû être fait afin de pouvoir doser la totalité des composés en une seule analyse. En effet, les métabolites de type diol, dione et époxyde sont analysés en mode positif. Or l'unique étalon interne disponible pour les métabolites de HAP est le 1-OHPd9 pour lequel l'optimisation de l'ionisation donne une analyse en mode négatif. Par ailleurs, afin d'ioniser les métabolites primaires en mode positif, un acide organique doit être ajouté à la phase mobile. Or, l'ajout de cet acide, même à faible quantité dans la phase mobile, entraîne une moins bonne détection en mode négatif car il augmente légèrement le bruit de fond. Le compromis a donc été fait quant à la composition de la phase mobile supplémentée en acide organique et la détection un peu moins bonne de l'étalon interne en mode négatif.

L'acquisition des données par le spectromètre de masse se fait donc simultanément en mode positif et en mode négatif. La phase mobile a été supplémentée avec de l'acide acétique à 0,1%. La sensibilité se trouve donc être un peu moins bonne pour les composés analysés en mode négatif mais très suffisante pour une analyse quantitative de composés présents à l'état d'ultra-trace dans les matrices naturelles. La Figure 33 présente un chromatogramme obtenu en UPLC-MS/MS pour un mélange étalons de métabolites de type diole, dione et époxyde.

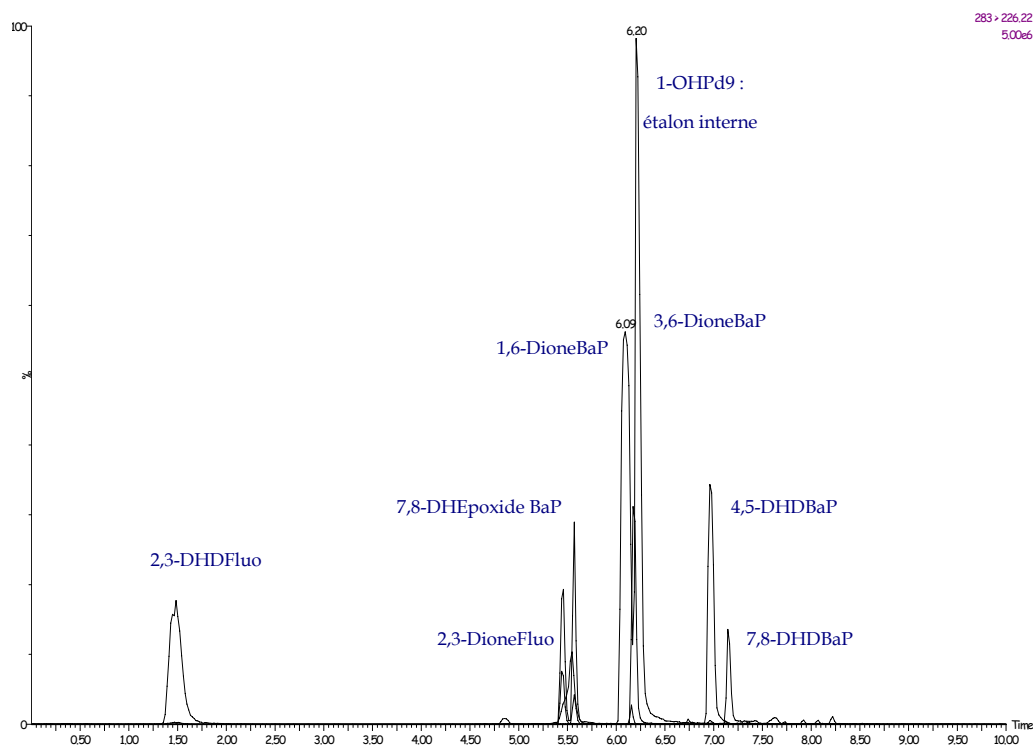


Figure 33 : Chromatogramme d'un mélange étalon de métabolites primaires obtenu UPLC-MS/MS (temps exprimé en minutes)

Les principaux ions des spectres de masse obtenus en ESI positif et négatif ainsi que les paramètres MRM sont présentés dans le Tableau 46.

Tableau 46: Principaux ions (m/z) et conditions MRM (transitions, tension de cône et énergie de collision) obtenus pour les métabolites hydroxylés.

Analytes	Ion parents (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)	Dwell time (ms)
4,5-DHDBaP	268	239	60	40	50
7,8-DHDBaP	268	239	60	40	50
7,8-DHEpoxideBaP	268	239	60	40	50
1,6-dioneBaP	283	226	60	42	50
3,6-dioneBaP	283	226	60	42	50
9-OHBaP	267	239	60	40	50
2,3-DHDFluo	218	189	60	38	50
2,3-dioneFluo	233	176	60	40	50
3-OHFluo	217	189	60	30	50

Tous les composés présentent une réponse linéaire sur les gammes des concentrations testées et variables selon les composés (10 μ l injectés). Les solutions étalons ont été préparées dans de l'acétonitrile. Le Tableau 47 présente les domaines de linéarité ainsi que les performances obtenues pour chaque composé dans les conditions d'analyse optimisées.

Tableau 47: Linéarité des composés étudiés analysés en UPLC-MS/MS (n=3)

Analytes	Transition (m/z)	Gamme de concentrations	Régression linéaire	R ²	RSD (%)
4,5-DHDBaP	268 - 239	8 ng.g ⁻¹ - 34 µg.g ⁻¹	y = 712,9x + 33,9	0,9983	4
7,8-DHDBaP	268 - 239	8 ng.g ⁻¹ - 34 µg.g ⁻¹	y = 689,9x + 47,5	0,9976	4
7,8-DHepoxideBaP	268 - 239	8 ng.g ⁻¹ - 30 µg.g ⁻¹	y = 210,9x + 5,7	0,9942	11
1,6-dioneBaP	283 - 226	8 ng.g ⁻¹ - 33 µg.g ⁻¹	y = 262,9x + 12,6	0,9971	10
3,6-dioneBaP	283 - 226	8 ng.g ⁻¹ - 33 µg.g ⁻¹	y = 282,3x + 9,4	0,9975	9
9-OHBaP	267 - 239	8 ng.g ⁻¹ - 32 µg.g ⁻¹	y = 908,6x + 1,4	0,9995	5
2,3-DHDFluo	218 - 189	17 ng.g ⁻¹ - 70 µg.g ⁻¹	y = 1185,9x + 83,8	0,9980	4
2,3-dioneFluo	233 - 176	11 ng.g ⁻¹ - 44 µg.g ⁻¹	y = 297,6x + 19,9	0,9994	5
3-OHFluo	217 - 189	12 ng.g ⁻¹ - 48 µg.g ⁻¹	y = 1921,4x + 18,9	0,9996	5

Le protocole de quantification a été validé au moyen de solutions étalons contenant les métabolites natifs et le métabolite deutéré (1-OHP d9) en quantités connues. La quantification a été vérifiée pour des quantités injectées variant de 10 pg à 10 ng (Tableau 48). Les limites de détection instrumentales sont présentées dans le Tableau 49.

Tableau 48: Quantification des métabolites de HAP en fonction de la quantité injectée (10 µl injectés). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité théorique (n = 3, moyenne ± écartype).

Composés	10 pg	0,1 ng	10 ng
4,5-DHDBaP	90 ± 8	86 ± 8	91 ± 9
7,8-DHDBaP	86 ± 8	85 ± 9	89 ± 8
7,8-DHepoxideBaP	61 ± 6	63 ± 6	66 ± 6
1,6-dioneBaP	75 ± 7	73 ± 7	77 ± 7
3,6-dioneBaP	75 ± 7	74 ± 9	75 ± 9
9-OHBaP	89 ± 8	91 ± 9	95 ± 9
2,3-DHDFluo	82 ± 8	84 ± 8	89 ± 8
2,3-dioneFluo	78 ± 7	78 ± 7	82 ± 8
3-OHFluo	88 ± 8	91 ± 9	95 ± 9

Tableau 49: Limites de détection instrumentales (LDI) exprimées en pg injectés (10 µl injectés) et en pg.µl⁻¹. LDI calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LDI (pg)	LDI (pg.µl ⁻¹)
4,5-DHDBaP	15,0	1,5
7,8-DHDBaP	16,8	1,7
7,8-DHepoxideBaP	21,4	2,1
1,6-dioneBaP	11,7	1,2
3,6-dioneBaP	16,9	1,7
9-OHBaP	1,0	0,1
2,3-DHDFluo	11,2	1,1
2,3-dioneFluo	24,2	2,4
3-OHFluo	0,6	0,1

A l'heure actuelle, aucune étude ne rapporte l'utilisation de l'UPLC-MS/MS pour l'analyse des métabolites primaires de HAP. Quelques études mettant en œuvre l'HPLC/F [436], la LC/MS [437] et une seule utilisant l'UPLC/MS [435] ont été publiées. Des études ont été menées en LC-Q-TOFMS [438] pour l'identification des métabolites polaires du benzo(a)pyrène, mais elles ne présentaient pas d'application sur des échantillons naturels (urine, bile, plasma). Seules des identifications des composés ont été présentées.

Si on compare les limites de détection instrumentales obtenues dans ces travaux de thèse (Publication n°4) avec la littérature, on note qu'elles sont comparables à celles rapportées dans les autres études. Ainsi en LC-APCI-MS, Koeber *et al.* [437] ont montré des limites de détection pour des métabolites polaires du BaP comprises entre 2 et 25 pg injectés (10 µl injectés) soit entre 0,2 et 2,5 pg.µl⁻¹. Wang *et al.* [438] ont utilisé la technique LC-Q-TOFMS pour identifier les métabolites polaires du BaP et ont montré des limites de détection comprises entre 40 et 60 pg (10 µl injectés), soit entre 4 et 6 pg.µl⁻¹. Enfin, Zhu *et al.* [435] présente des limites de détection en UPLC/MS inférieures à 10 pg.µl⁻¹. Ces limites restent très supérieures à celles obtenues en UPLC-MS/MS au cours de ces travaux de recherche.

5.2 Préparation des échantillons

Dans ce développement analytique, le protocole de préparation des échantillons optimisé et validé pour le dosage total des métabolites de HAP a été utilisé intégralement. Aucun nouveau développement n'a été mis en œuvre.

Les métabolites réactifs ici considérés sont des métabolites primaires, très vite produits par l'organisme suite à une exposition aux HAP. En revanche, ils sont également très vite métabolisés et associés aux molécules endogènes ou transformés en molécules plus stables (comme les métabolites mono-hydroxylés). C'est pourquoi, dans les organismes vivants, il est très difficile de pouvoir doser ces molécules dans la bile ou dans les différents organes de détoxification. Ils sont présents principalement dans les cellules hépatiques, cellules de métabolisation de l'organisme.

Des études précédentes [113, 124, 125, 315, 319, 321, 439, 440] ont pu mettre en évidence certains de ces métabolites primaires et les doser dans le cas d'exposition *in vitro* en laboratoire sur des microsomes hépatiques. En revanche, les méthodologies employées utilisent principalement une analyse par HPLC/F. Très peu d'études s'attachent à déterminer quantitativement ces composés et la technique alors employée est l'HPLC/MS.

Le mode de traitement de l'échantillon micrososome est identique à un échantillon biliaire à l'exception de l'étape de déconjugaison (métabolites de phase I non conjugués). En effet, ces molécules sont des métabolites primaires, non conjugués. L'étape de déconjugaison est ainsi supprimée du protocole. Un protocole simplifié est donc mis en œuvre pour cette analyse (Figure 34). Les différentes étapes sont présentées précédemment dans le Chapitre II (§ 4.1.1.).

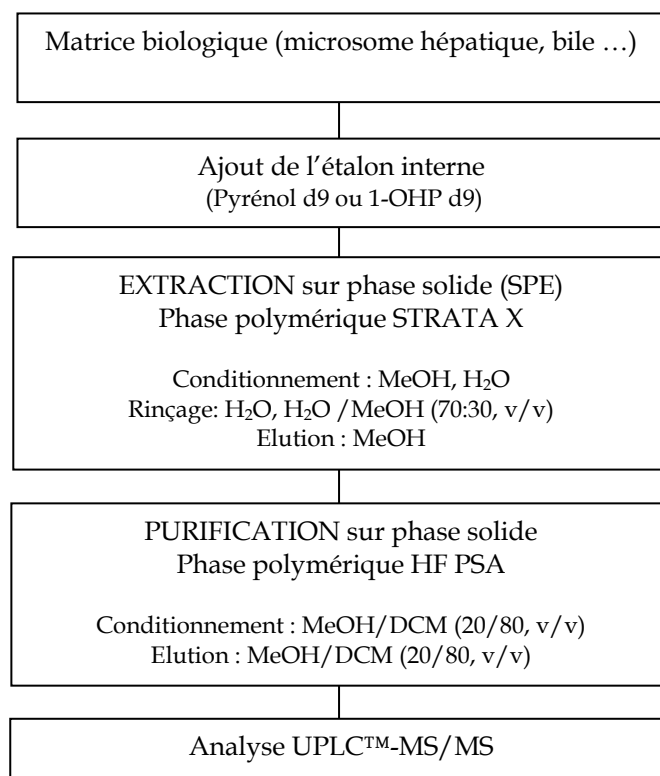


Figure 34: Protocole simplifié de dosage (sans déconjugaison) des métabolites primaires dans les fluides biologiques (micrososome, bile ...) par UPLC-MS/MS.

5.3 Validation de la méthode de dosage et limites de détection

Des dosages sur des biles supplémentées en métabolites à 3 niveaux de concentrations et immédiatement analysés selon le protocole simplifié, ont permis de valider le protocole de dosage de ces composés dans une matrice biologique. Les rendements du dosage ont été déterminés et les résultats sont présentés dans le Tableau 50.

Tableau 50: Rendement moyen du dosage des métabolites primaires de HAP dans des biles supplémentées, à différentes concentrations (moyenne \pm écartype, n = 3)

Composés	10 ng.g ⁻¹	100 ng.g ⁻¹	1 µg.g ⁻¹
4,5-DHDBaP	75 \pm 10	78 \pm 9	79 \pm 8
7,8-DHDBaP	71 \pm 11	70 \pm 10	75 \pm 8
7,8-DHepoxideBaP	43 \pm 9	40 \pm 9	45 \pm 7
1,6-dioneBaP	65 \pm 10	64 \pm 9	69 \pm 9

3,6-dioneBaP	69 ± 11	70 ± 10	65 ± 10
9-OHBaP	77 ± 7	76 ± 6	77 ± 6
2,3-DHDFluo	71 ± 11	68 ± 9	75 ± 10
2,3-dioneFluo	64 ± 11	64 ± 9	70 ± 9
3-OHFluo	87 ± 9	84 ± 7	88 ± 6

Les limites de détection ont été établies dans la bile. Elles sont calculées selon le rapport « signal / bruit = 3 ». Elles sont présentées dans le Tableau 51. La prise d'essai est de 0,1 g de bile.

Tableau 51: Limites de détection (LOD) dans la matrice biliaire, exprimées en ng.g⁻¹ de bile. LOD calculées pour un rapport signal / bruit (S/N) = 3.

Composés	LOD (ng.g ⁻¹)
4,5-DHDBaP	0,15
7,8-DHDBaP	0,20
7,8-DHepoxideBaP	0,50
1,6-dioneBaP	0,30
3,6-dioneBaP	0,30
9-OHBaP	0,03
2,3-DHDFluo	0,26
2,3-dioneFluo	0,36
3-OHFluo	0,01

Au regard de la littérature, très peu d'études rapportent des mesures de métabolites polaires de HAP dans une matrice biologiques. Il existe donc très peu de points de comparaison possibles. Une étude réalisée en HPLC/F sur des échantillons de plasma et d'urine de rat a permis le dosage des métabolites polaires du BaP (mono-hydroxyBaP et diols). Dans cette étude, Won *et al.* [436] présentent des limites de détection comprises entre 0,04 et 0,1 ng.ml⁻¹ dans l'urine et 0,2 et 0,4 ng.ml⁻¹ dans le plasma.

En revanche aucune étude ne présente des résultats de dosage de ces métabolites dans la bile. Les résultats présentés dans ces travaux de recherche sont donc innovants et justifiés par l'absence de données dans la littérature.

Une expérimentation en laboratoire sur des microsomes hépatiques de limandes et de soles exposés directement à des HAP a permis de valider sur des échantillons naturels la méthodologie développée au laboratoire (Publications n° 4). En revanche des tests de dosage effectués sur des biles de poissons, échantillonnés en milieu naturel, n'ont pas permis de détecter et de doser ces composés. Une oxydation de l'échantillon, une absence des métabolites primaires dans la bile ou une dégradation des composés durant le stockage à -80°C pourraient expliquer l'absence de signaux obtenus au cours de l'analyse.

CHAPITRE III : EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE

Ce chapitre présente les résultats obtenus au cours des expérimentations en laboratoire sur des turbots juvéniles exposés aux HAP au cours de ces travaux de thèse.

Ces expérimentations consistant à exposer des poissons aux HAP en laboratoire ont été réalisées afin d'étudier le comportement de ces contaminants dans un milieu simplifié et de mieux comprendre leur devenir dans les organismes marins et en particulier les processus de biotransformation et de génotoxicité.

1 Expérimentations préliminaires

1.1 Expérimentation de mai 2005

Les résultats bruts de cette première expérimentation préliminaire sont présentés en Annexe 9.

1.1.1 Analyses chimiques

Teneurs en HAP dans les muscles de turbots juvéniles

Concernant le devenir des différents HAP dans l'organisme, les turbots échantillonnés ne présentent aucune bioaccumulation significative dans les muscles, au cours de l'exposition (Figure 39). On note la forte présence des HAP dans les tissus dès 12 heures après l'exposition. Cependant, les concentrations commencent à décroître au bout de 24 heures malgré les apports journaliers de HAP dans la phase dissoute durant les 5 premiers jours d'expérimentation. La diminution des concentrations en HAP dans les muscles permet en fin de période de dépuraction un retour à des taux de contamination équivalents à ceux des individus du groupe contrôle. On peut donc penser que les niveaux de contamination choisis pour cette expérimentation n'ont pas été suffisants pour permettre une accumulation dans les réserves lipidiques.

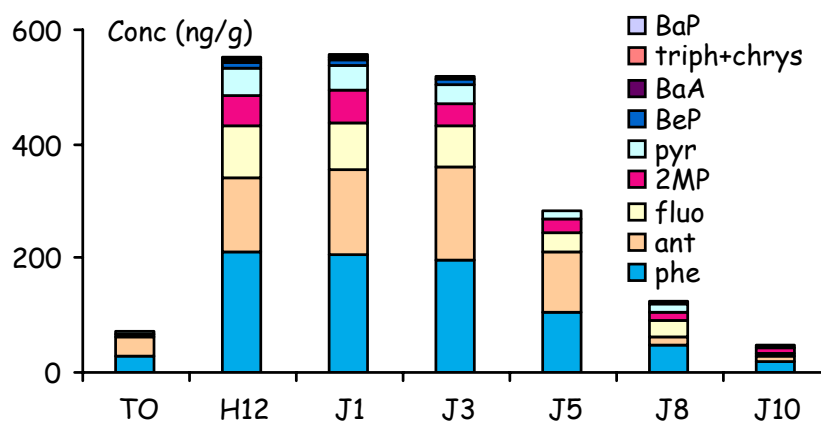


Figure 35: Concentrations en HAP dans les muscles des turbots exposés à un mélange de HAP (ng.g⁻¹ de poids sec)

La bioconcentration des HAP dans les muscles peut être évaluée par le calcul du facteur de bioconcentration (BCF). Il représente le rapport entre la concentration mesurée dans les organismes et celle mesurée dans l'eau et est exprimé en l.g⁻¹. Dans les muscles, les BCF des HAP parents de plus haut poids moléculaires (BaP, BeP, BaA, Chrys) calculés au temps J1, varient de 0,01 à 0,15 l.g⁻¹ et celui des composés de plus faible poids moléculaires de 3,6 à 23,3 l.g⁻¹. Après 24h d'exposition (temps où l'accumulation dans les muscles est la plus importante), une bonne corrélation (R² de 93 %) (Figure 36) est obtenue entre le facteur de bioconcentration des molécules de HAP et leur caractère lipophile (exprimé par la valeur du log Kow).

Cependant, cette proportionnalité entre la lipophilie des HAP et la bioconcentration dans les muscles n'est plus vérifiée en cours d'expérimentation du fait de la diminution observée des concentrations en HAP dans les muscles. Ainsi à la fin de la période de contamination (J5), ces deux propriétés ne sont plus corrélées. Ceci traduit l'insuffisance du seul concept de bioaccumulation pour expliquer la complexité du devenir des HAP chez les poissons. A l'évidence, les phénomènes de biotransformation jouent un rôle important dans le cycle des HAP chez les organismes aquatiques.

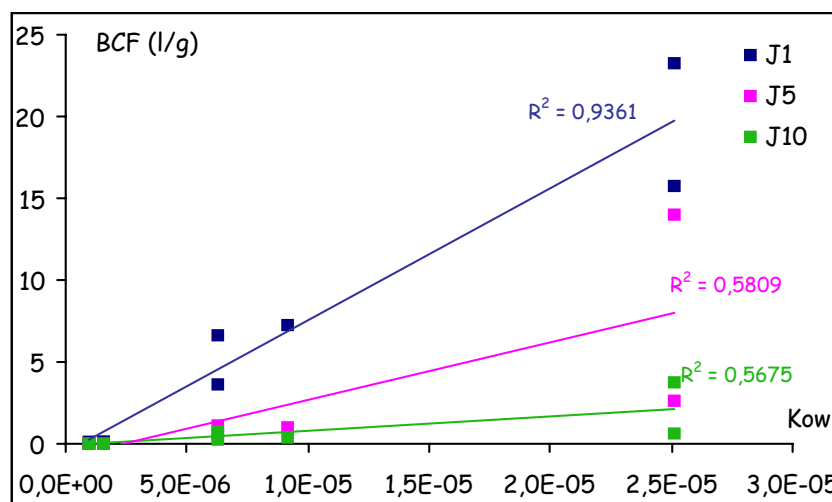


Figure 36: Influence de la lipophilie sur la bioconcentration des HAP dans les tissus musculaires

Teneurs en métabolites de HAP dans la bile des turbots juvéniles

Les métabolites recherchés ont tous pu être détectés à chacun des temps de prélèvement. Ceci s'explique d'une part par la concentration relativement importante en HAP introduits dans le milieu à chaque exposition et d'autre part par la sensibilité et la spécificité de la méthode développée pour le dosage des métabolites. Alors que le 3-OHBaP est connu pour être un métabolite difficilement détectable car présent en très faible concentration et au rendement d'extraction plus faible que les autres composés, l'évolution de sa concentration dans la bile a pu être suivie au cours du temps. On peut donc conclure que les démarches expérimentales et analytiques mises en œuvre au cours de cette expérimentation sont suffisantes pour mettre en évidence une exposition des turbots à tous les composés étudiés. On notera que les concentrations en métabolites dans les individus de contrôle vont de 1 à 16 ng.g⁻¹ pour les métabolites étudiés (hydroxyphénanthrènes, 1-hydroxychrysène, 1-hydroxypyrene et 3-hydroxy-BaP). La mesure des HAP hydroxylés dans la bile des turbots échantillonnés a permis de montrer deux tendances concernant la production de métabolites (Figure 37) :

- une augmentation durant l'exposition suivie d'une baisse des concentrations en métabolites durant la dépuración (cas du 1-OHP, du 1-OHC et du 3-OHBaP)
- une augmentation durant l'exposition, non suivie d'une diminution des concentrations durant la dépuración (cas des métabolites du phénanthrène).

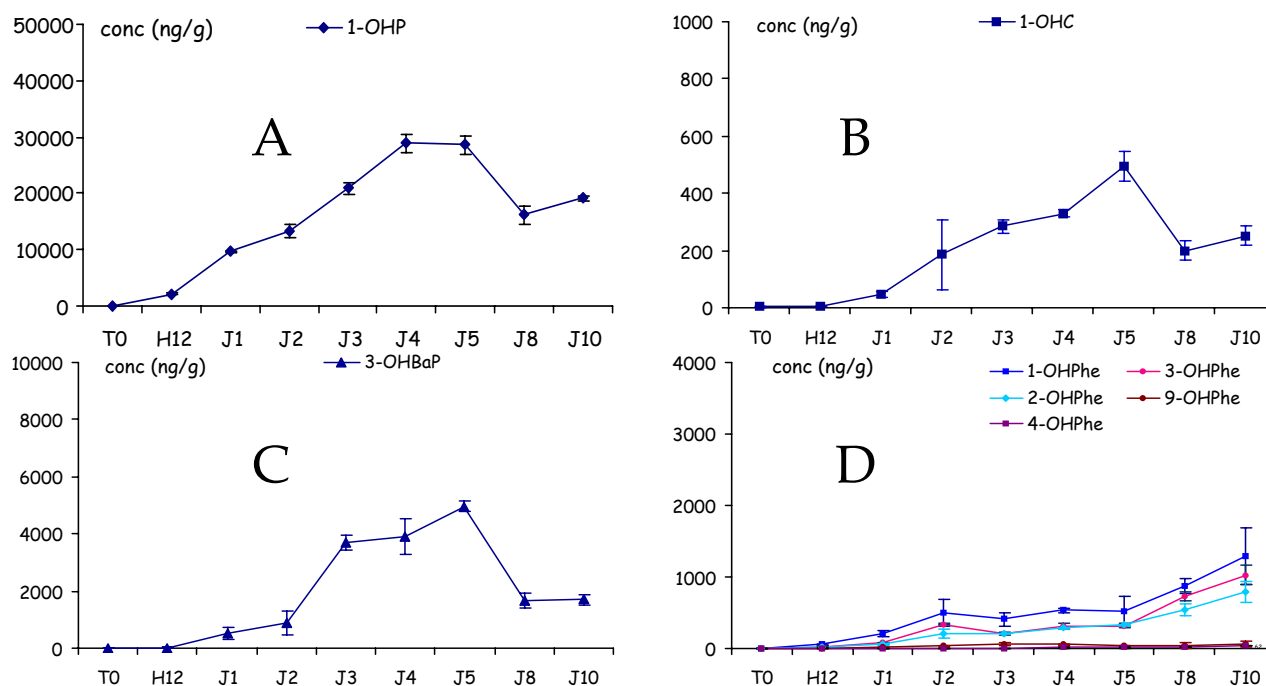


Figure 37: Concentrations en métabolites biliaries ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de bile) mesurées chez les turbots exposés à un mélange de HAP (analyses effectuées en triplicat)

Suivi du 1-hydroxypyréno (1-OHP)

La mesure du 1-OHP dans la bile permet de mettre clairement en évidence l'exposition au pyrène. Comme il avait été observé chez la sole [91] ou chez le flet *Platichthys flesus* [325], la biotransformation du pyrène en 1-OHP est pour ainsi dire exclusive, puisque aucun autre métabolite monohydroxylé n'est détecté dans la bile.

Après seulement 12 heures d'exposition (H12), une forte augmentation de la concentration biliaire est visible (figure 41A). Cette augmentation est d'un facteur 200 entre T0 et H12 (16 et $3110 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivement, moyenne des teneurs mesurées chez les mâles et chez les femelles). On note que cette augmentation est quasiment linéaire jusqu'aux derniers jours de contamination (linéarité entre T0 et J4). Ceci s'explique par l'apport journalier et à concentration constante de pyrène dans le milieu et par la quasi-totale disparition de celui-ci de la phase dissoute. Comme on ne le détecte pas lors du suivi de la bioaccumulation dans les muscles, on suppose une complète métabolisation de ce composé dans la bile.

Un ralentissement de la métabolisation du pyrène entre J4 et J5 est observé. Il peut s'expliquer par l'absence d'excrétion de la bile vers les intestins en raison du jeûne des poissons (dilution possible de la bile).

Au cours de la décontamination, la diminution de la concentration est incontestable, traduisant l'arrêt de l'apport du pyrène ainsi que l'élimination de la bile (poissons nourris à J5 et J6). Le niveau atteint après décontamination reste, cependant, très élevé. La concentration atteinte après 5 jours de décontamination (à J10, $16\,434 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) est équivalente à celle atteinte entre J2 et J3 ($12\,378$ et $20\,774 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivement) et reste bien supérieure à la concentration des contrôles ($16 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$). Au total, la concentration en 1-OHP a augmenté d'un facteur 1000 dans la bile entre T0 (contrôle) et J10 (respectivement 16 et $16\,434 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) alors que la concentration en pyrène dissous montre une augmentation maximale mesurée d'un facteur 354 après 50 minutes. Ces observations montrent la sensibilité du suivi du métabolite

du pyrène (1-OHP) produits chez les organismes aquatiques comme marqueur de contamination de la phase dissoute par un mélange de HAP.

Suivi des autres métabolites

En ce qui concerne les autres métabolites suivis, on note une différence dans l'évolution des concentrations. Deux cas s'opposent :

- le premier correspondant à une évolution similaire à celle du 1-OHP : augmentation des concentrations durant la contamination et diminution au cours de la décontamination ; c'est le cas des métabolites du chrysène et du benzo(a)pyrène.
- le second correspondant à une augmentation continue des concentrations au cours de la contamination et de la décontamination ; c'est le cas des hydroxyphénanthrènes.

En ce qui concerne la biotransformation du chrysène, la présence d'un seul composé hydroxylé, le 1-hydroxychrysène (1-OHC), a été mise en évidence dans la bile du turbot. Comme pour le 1-OHP, une augmentation est constatée durant la période de contamination avec une croissance d'un facteur 140 entre T0 et J5 (Figure 37B). Cependant, on constate que cette augmentation est bien moins rapide et bien moins importante que celle observée avec le 1-OHP. Au bout de 12 heures, les concentrations n'ont augmenté que d'un facteur 3 (3 et 9 ng/g respectivement) alors que pour le 1-OHP, cette augmentation est déjà d'un facteur 200. Pourtant, la concentration de ces deux HAP dans la phase dissoute est équivalente et aucune bioaccumulation n'a été observée quel que soit le composé. La différence de niveau de concentration pourrait être expliquée par l'existence de processus de biotransformation plus complexes pour le chrysène, qui produirait un profil métabolique plus riche. La formation de métabolites dihydrodiols y serait majoritaire. Des études chez la morue [205] ont montré la prédominance du 1,2-dihydrodiol dans la bile après déconjugaison. Par ailleurs, après 10 jours d'expérimentation, les concentrations en métabolites restent très supérieures au niveau initial avec un facteur 66 entre T0 (contrôle, 3 ng.g⁻¹) et J10 (198 ng.g⁻¹).

Concernant l'exposition au benzo(a)pyrène, là encore, le profil des concentrations en métabolite (Figure 37C) est identique à celui du 1-OHP. Une augmentation d'un facteur 19 entre T0 (contrôle, 2 ng.g⁻¹) et H12 (38 ng.g⁻¹) et d'un facteur 2 252 entre T0 et J5 (4 504 ng.g⁻¹) est observée. Cependant, les concentrations mesurées restent inférieures à celles observées pour le 1-OHP, supposant une biotransformation plus complexe du BaP conduisant à la formation d'autres métabolites. À la fin de l'expérimentation, le niveau de contamination reste là encore supérieur au niveau de départ avec un facteur 622 entre T0 et J10 (1244 ng.g⁻¹).

Pour les 5 hydroxyphénanthrènes recherchés, les profils d'évolution des concentrations (Figure 37D) diffèrent de ceux observés pour le 1-OHP, le 1-OHC et le 3-OHBaP. Les teneurs en métabolites mesurées sont inférieures à celles observées pour le pyrène (facteur 80 à H12, facteur 40 à J5 et facteur 10 à J10). Pourtant, l'exposition au phénanthrène dans la phase dissoute est plus importante que celle du pyrène. On peut donc en déduire, tout comme pour les autres HAP étudiés, que les voies de métabolisation du phénanthrène sont plus complexes que celles du pyrène. Des études ont montré que les principaux produits de biotransformation du phénanthrène dans la bile des poissons sont les dihydrodiols [125, 264].

Concernant l'évolution globale des concentrations en métabolites des hydroxyphénanthrènes, elle diffère de celle des métabolites du pyrène, du chrysène et du BaP. On note une augmentation des teneurs en métabolites qui n'est pas suivie d'une diminution au cours de la période de décontamination, hormis pour les isomères 4 et 9-

hydroxyphénanthrène, pour lesquels les concentrations n'évoluent pas au cours du temps. Ce phénomène est difficilement explicable. Déjà observé lors de travaux chez la sole *Solea solea* [424], il avait été expliqué par un possible apport de phénanthrène par les eaux de pluie et les eaux de décontamination (eaux de marais). Lors de ces études, les expériences avaient été faites à l'extérieur et l'eau des bassins n'avait pas été changée entre la période de contamination et celle de décontamination. Dans le cas de notre étude, aucun apport extérieur de phénanthrène n'a été possible. Néanmoins, un relargage de phénanthrène adsorbé sur les parois de l'aquarium au cours du temps ne peut être exclu. Par ailleurs, il a été montré que ce composé pouvait s'accumuler de manière non négligeable dans les tissus et notamment dans le foie [94, 127]. Bien que le dosage du phénanthrène dans les muscles ne laisse pas supposer une bioaccumulation significative de ce composé, l'accumulation dans le foie pourrait entraîner une re-mobilisation de ce composé au cours du temps, expliquant ainsi une augmentation des teneurs en métabolites produits.

D'autre part on peut remarquer que les isomères 3, 1 et 2 sont prédominants par rapport aux isomères 4 et 9. La prédominance de ces isomères avait déjà été observée au cours d'études précédentes dans la bile de poisson [264]. Entre T0 (1 ng.g⁻¹ pour l'isomère 3) et H12 (22 ng.g⁻¹, moyenne des teneurs mesurées chez les mâles et chez les femelles), l'augmentation des concentrations est plus lente (facteur 22) que pour les métabolites du chrysène (facteur 140) mais équivalente à celle du BaP (facteur 19).

A la fin de la période de décontamination les niveaux ont augmenté d'un facteur 1000, 214, 200 et 60 pour les isomères 3-, 1-, 2- et 9-hydroxyphénanthrène, respectivement. L'isomère 4 n'ayant pas pu être détecté à T0, le calcul du facteur d'augmentation relative des teneurs à J10 est impossible.

A la vue de ces résultats, le 1-hydroxypyrene s'avère être un bon indicateur d'exposition aux HAP en raison du mécanisme de biotransformation simple et rapide du pyrène (12 heures suffisent pour observer la contamination) et de son excrétion rapide dans la vésicule biliaire. Les écarts types obtenus lors du calcul des teneurs moyennes en 1-OHP sont faibles, entre 3 et 9 % seulement (n=3).

Influence du sexe sur le devenir des HAP chez les poissons

Au cours de cette expérimentation, aucune différence significative de biotransformation des HAP entre les mâles et les femelles n'a été observée. Cependant, compte tenu du jeune âge des poissons, il est possible que des erreurs soient survenues lors du sexage des poissons. En outre, l'influence du sexe sur la biotransformation ne semble effective que lorsque les poissons ont atteint leur maturité sexuelle [372, 373]. Ces résultats nécessiteraient donc d'être confirmés.

1.1.2 Analyse biologique : Mesures des cassures de brins de l'ADN par le test des comètes

Les données brutes ont été mathématiquement transformées (racine carrée) de manière à normaliser la distribution des paramètres mesurés. Les données ont ensuite été analysées grâce à la réalisation d'une Analyse de la Variance (ANOVA, modèle mixte) (Statistica Soft. 6.0). Les facteurs « Individus » (5 modalités) et « Temps » (2 modalités) ont été considérés comme des facteurs aléatoires. Le facteur « Traitement » (2 modalités) a été considéré comme un facteur fixe.

Les résultats de cette analyse montrent l'existence de différences significatives entre individus dans le niveau de cassures de brins de l'ADN de turbot ($p < 0,01$). Cette variabilité

inter-individuelle peut être attribuée à l'existence de différences individuelles dans (1) les niveaux d'activité des enzymes impliquées dans l'activation et la détoxification des composés pro-génotoxiques, (2) les contenus en défenses pro-oxydantes et (3) les niveaux d'activités des systèmes de réparation de l'ADN. Cette variabilité biologique est donc le résultat de l'expression du polymorphisme génétique. A noter qu'avec le test des comètes, il a été démontré chez la limande que la variabilité inter-cellulaire était plus importante que la variabilité inter-individuelle [148]. Les cellules issues d'une même population d'érythrocytes présentent généralement des niveaux de cassures hétérogènes du fait de différences dans les processus d'activation, de détoxification et de réparation mais également de différences dans le cycle cellulaire.

Malgré l'absorption et la biotransformation des HAP (détection de métabolites de HAP dans la bile), aucun effet toxique génotoxique du mélange n'est mis en évidence chez le turbot pour la durée et la concentration d'exposition testées ceci quel que soit le paramètre comète mesuré (OTM, % ADN queue) ($p > 0,05$) (Figure 38). Au cours de cette expérimentation, le niveau d'exposition des turbots n'a donc pas été suffisant pour l'induction significative de dommage à l'ADN.

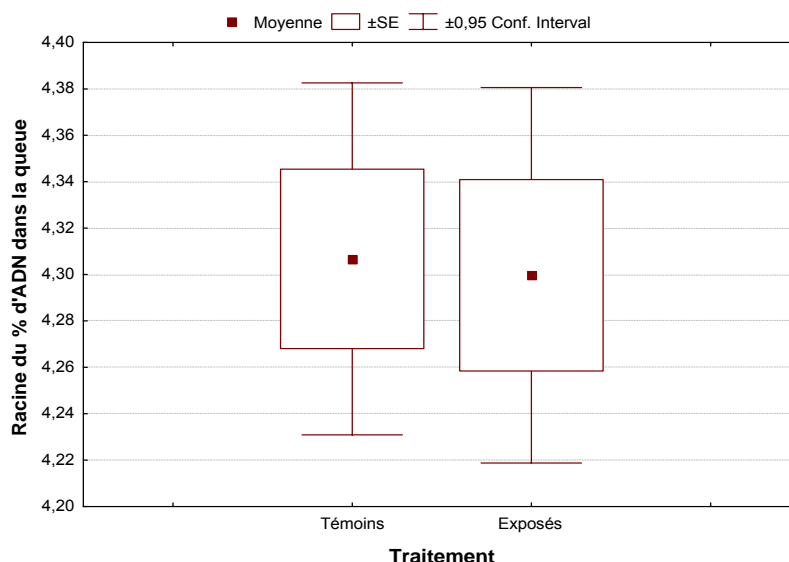


Figure 38: Absence d'effet génotoxique chez le turbot après exposition au mélange de HAP dans les conditions d'expérimentation

1.2 Expérimentation de janvier 2006

Les résultats bruts de cette expérimentation sont présentés en Annexe 10.

1.2.1 Analyse chimique : Teneurs en métabolites de HAP dans la bile de turbots juvéniles

Durant la seconde expérimentation de janvier 2006, aucune mesure de bioaccumulation n'a été effectuée. En effet, cette expérience avait pour but de déterminer une concentration minimum d'exposition en HAP parents pour laquelle il était possible d'induire un niveau détectable de dommages à l'ADN.

Les biles des turbots exposés ont été prélevées aux temps T0, T3 et T7, soit après 7 jours de contamination par voie dissoute à un mélange de 7 HAP standards. Les résultats sont présentés dans la Figure 39.

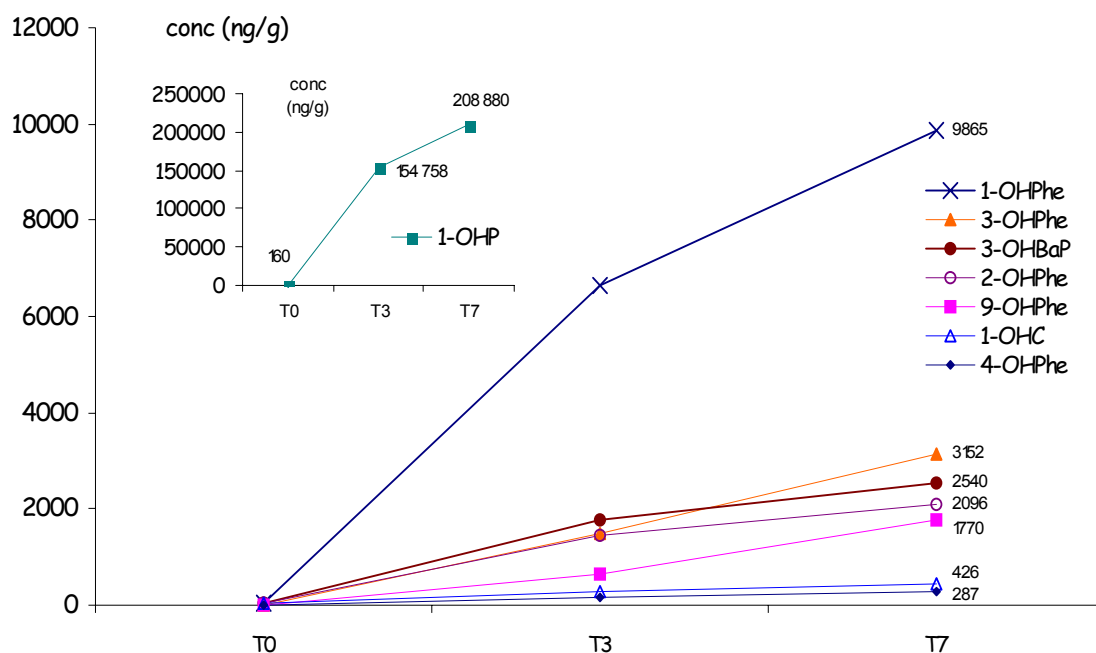


Figure 39: Evolution de la concentration en métabolites de HAP (ng.g^{-1} de bile) dans la bile de turbots juvéniles exposés à un mélange de 7 HAPs.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'exposition des poissons aux différents HAP. Pour chaque HAP introduit dans le système par voie dissoute, des métabolites hydroxylés sont détectés. Néanmoins, on observe des différences dans les cinétiques de biotransformation.

De même que lors de la première expérimentation en laboratoire, les 5 isomères de l'hydroxyphénanthrène sont détectés mais dans des proportions différentes. Les isomères 1- et 3-OHPhe sont majoritaires, puis les isomères 2-, 9- et enfin le 4-OHPhe. Par ailleurs, on note également des différences dans les cinétiques de production de métabolites entre T0 et T3 et entre T3 et T7. Entre T0 et T3, l'isomère 1-OHPhe montre une cinétique plus rapide ($91 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) que celle des autres isomères ($20, 19, 2$ et $9 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour les isomères 3-OHPhe, 2-OHPhe, 4-OHPhe et 9-OHPhe, respectivement). Entre T3 et T7, on observe un ralentissement des vitesses de formation pour les isomères 1-, 3- et 2-OHPhe ($34, 17$ et $7 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivement) et le nombre de métabolites produits diminue. Pour les autres isomères, on remarque que la vitesse de production des métabolites reste constante ($1 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour le 4-OHPhe) voire même augmente légèrement ($12 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pour le 9-OHPhe.

Pour les autres HAP, les résultats montrent une importante différence entre la production de 1-OHP, et les autres quantités de métabolites produits pour tous les autres HAP. Entre T0 et T3, la vitesse de production des métabolites est très élevée ($2147 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) puis entre T3 et T7, elle diminue très fortement ($564 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Ces concentrations sont très élevées du fait des fortes concentrations en HAP dans la phase dissoute.

Concernant les métabolites du B[a]P, seul le 3-OHBaP a été quantifié. Un autre métabolite est également détecté dans des proportions non négligeables mais en l'absence de standards il n'a pas été possible de l'identifier et de le quantifier avec précision. Bien que les

concentrations initiales en HAP parents aient été similaires, les quantités en 3-OHBaP sont plus faibles que celles en 1-OHP et en 1- et 3-OHPhe. Ceci s'explique par les différents phénomènes d'absorption et d'adsorption de ce composé dans le système expérimental qui sont plus importants pour le BaP que pour les autres HAP du fait de son caractère lipophile plus important. Malgré cette hydrophobicité plus importante, les concentrations en BaP sont suffisantes pour conduire l'expérimentation et sont plus représentatives d'une contamination de l'environnement. En outre, les concentrations mesurées sont non négligeables et témoignent d'une activité métabolique pour ce composé. Concernant les vitesses de formation du 3-OHBaP, on note une différence entre les temps T0 et T3 (24 ng.g⁻¹.h⁻¹) et entre les temps T3 et T7 (8 ng.g⁻¹.h⁻¹). Ceci peut être dû à un ralentissement de l'activité de métabolisation de l'organisme et/ou à des modifications dans les voies de métabolisation.

Enfin pour l'exposition au chrysène, on note que les concentrations en 1-hydroxychrysène obtenues sont moins élevées que celles de tous les autres métabolites détectés. Les vitesses de formation sont faibles et différentes entre T0 et T3 (4 ng.g⁻¹.h⁻¹) et entre T3 et T7 (1 ng.g⁻¹.h⁻¹). Notre méthode analytique permet de détecter d'autres métabolites hydroxylés du chrysène mais pour lesquels nous ne disposons d'aucun standard.

En conclusion, ces résultats nous permettent de corroborer les résultats obtenus au cours de la première expérimentation et ainsi de mettre en évidence la simplicité du schéma de biotransformation du pyrène et la rapidité de son excrétion dans la vésicule biliaire. Par ailleurs, la formation également rapide et en quantité suffisamment importante des métabolites du phénanthrène et en particulier des isomères 1- et 3-OHPhe, nous permettent également de proposer ces molécules comme indicateur général d'exposition aux HAP. La possibilité de combiner les deux indicateurs (1-OHP et les OHPhe) pourrait s'avérer intéressante pour une différenciation des sources de HAP. Le phénanthrène est majoritairement présent dans les pollutions de type pétrogéniques alors que le pyrène est présent en quantité importante dans tous les types de pollutions (pétrogéniques et pyrolytiques).

1.2.2 Analyse biologique : Mesures des cassures de brins de l'ADN par le test des comètes

Pour le groupe témoin, la réalisation d'une ANOVA (facteur aléatoire : individu, facteur fixe : temps d'expérimentation) a permis de confirmer une variabilité inter-individuelle dans les niveaux de dommage à l'ADN ($p < 0,001$) et une diminution significative du nombre de dommage avec le temps d'expérimentation ($p < 0,05$), témoignant ainsi de la qualité des conditions d'expérimentation en aquariums.

L'ensemble des données obtenues a par la suite été normalisé par transformation mathématique et analysé grâce à la réalisation d'une ANOVA (facteurs : « individus », « temps », « traitement »). Les résultats de cette analyse montrent un effet significatif de chacun des trois facteurs étudiés ($p < 0,001$).

Une augmentation significative du nombre de cassures de brins de l'ADN est notamment observée après exposition au mélange de HAP confirmant ainsi la génotoxicité de ces composés chez le turbot pour les conditions d'exposition testées (Figure 40).

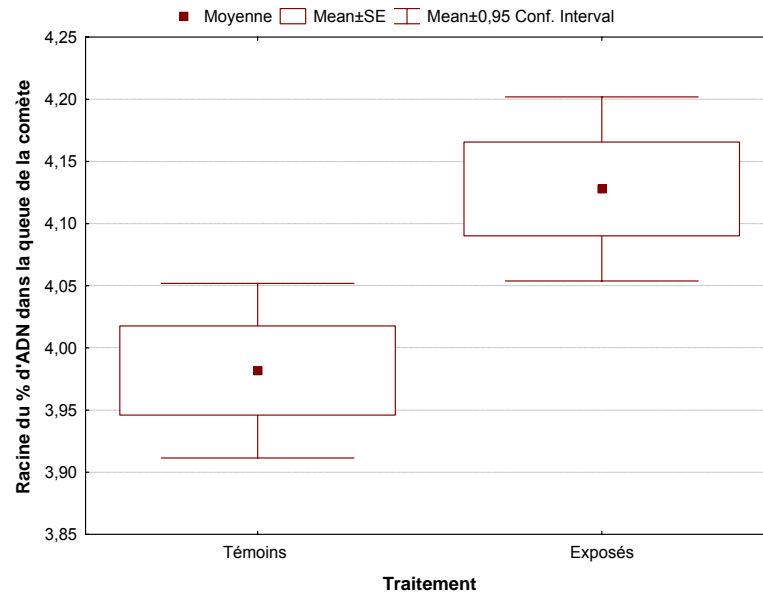


Figure 40: Effet génotoxique de l'exposition chez le turbot au cours de l'expérimentation préliminaire de Janvier 2006

De manière à compléter ce résultat, l'interaction entre les facteurs « temps » et « traitement » a été testée dans un second temps. Le résultat obtenu a montré que l'interaction entre ces deux facteurs était hautement significative ($p < 0,001$) et que sa prise en compte annulait l'effet du facteur « traitement ». Ce résultat montre que le taux de dommage à l'ADN évolue différemment au cours du temps en fonction du groupe expérimental (Figure 41). Pour le groupe témoin, la réalisation d'un test a posteriori (test de Tukey) montre une diminution significative et continue du niveau de dommage à l'ADN au cours du temps ($T_0 < T_3 < T_7$, $p < 0,001$). Pour le groupe exposé, le nombre de dommage à l'ADN tend à augmenter entre T_0 et T_3 mais cette hausse n'est pas significative ($p > 0,05$) et est suivie d'une baisse significative à T_7 ($p < 0,001$).

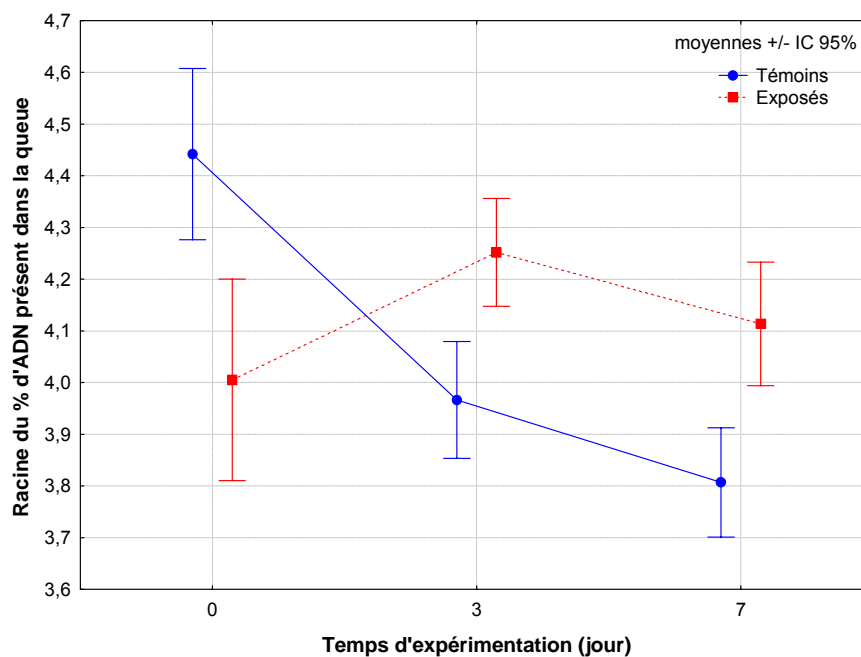


Figure 41: Interaction significative des facteurs « temps » et « traitement » sur le niveau de dommage à l'ADN des érythrocytes de turbot.

2 Expérimentation multi-sources (Publication n°7)

Les résultats de cette étude sont présentés dans la Publication n°7. Les données brutes afférentes sont résumées dans l'Annexe 11.

Une étude multi-marqueurs couplant les données chimiques et biologiques a été envisagée. Les variations de la réponse des différents biomarqueurs ont été mesurées en laboratoire sur les turbots exposés aux HAP selon différentes voies de contamination (sédimentaire, dissoute, éluviat de pétrole). Les marqueurs étudiés (HAP parents dans les tissus, métabolites biliaires, activité EROD, cassures de brins à l'ADN) correspondent ux différents niveaux de réponse de l'organisme face à une contamination en HAP.

En laboratoire, les résultats ont montré que les niveaux de métabolites quantifiés dans la bile des poissons corrélaient avec les niveaux de contamination du milieu, même si des différences de nature et de quantité de métabolites formés existaient. Une rapide production de métabolites était également observable quelques soient les niveaux d'exposition du milieu, et en particulier pour le 1-hydroxypyrene (1-OHP), métabolite majoritaire du pyrene. Ces observations corroborent l'hypothèse que les métabolites de HAP et en particulier le 1-OHP peuvent être utilisés comme biomarqueur d'exposition précoce aux HAP, même à faible dose de contamination. A l'inverse aucune bioaccumulation dans les tissus n'a été démontrée au cours de l'exposition. Ainsi la seule caractérisation chimique des HAP parents dans les muscles et le foie n'est pas suffisante pour démontrer une exposition de l'organisme. D'autres marqueurs doivent être utilisés conjointement.

Concernant les biomarqueurs biologiques, l'analyse des cassures de brins de l'ADN a montré un effet significatif du temps d'expérimentation et de l'exposition aux HAP. Les taux de cassures pour les limandes des différents groupes d'exposition sont différents de celles du groupe de témoins. En revanche, après 4 jours de contamination, on ne peut pas faire de différence entre les effets des 3 modalités d'exposition : sédimentaire, dissoute et éluviat de pétrole. Concernant l'activité EROD, seul le groupe exposé au mélange de HAP dissous présente une activité EROD moyenne significativement différente de celle du groupe témoin. Le groupe exposé au sédiment montre également une induction significative de l'activité EROD au 3^{ème} jour d'exposition. Enfin pour le dosage de la base oxydée 8-oxodG, les résultats sont similaires à ceux de l'activité EROD avec des groupes exposés au mélange de HAP dissous et au sédiment qui présentent une augmentation significative du taux de 8-oxodG montrant ainsi la génotoxicité des HAP pour deux modes de contamination différents.

CHAPITRE IV : LE MILIEU NATUREL

L'application des protocoles issus des développements analytiques lors d'études de terrain a permis d'évaluer l'exposition des organismes aux HAP dans le milieu naturel et de valider l'utilisation des métabolites de HAP biliaires comme outil de diagnostic précoce d'une contamination en HAP.

Ce chapitre regroupe quatre études montrant l'application du dosage des métabolites de HAP. Ces travaux ont donné lieu à deux publications. La diversité des espèces de poissons ainsi que celle des zones géographiques étudiées permettent de documenter davantage les phénomènes de biodisponibilité, de bioaccumulation et de biotransformation des HAP chez les organismes aquatiques. L'utilisation combinée de différents biomarqueurs au cours de ces études conduit également à une meilleure compréhension de la relation entre l'exposition aux HAP subie par les organismes et les effets génotoxiques de ces composés observés sur les poissons. Ces suivis environnementaux effectués sur différents sites permettent de définir des valeurs indicatives en métabolites justifiant d'une exposition à court terme en HAP. Ils valident ainsi les métabolites de HAP comme biomarqueurs d'exposition précoce aux HAP chez les poissons.

Dans la première publication, la biosurveillance de l'environnement marin a été envisagée par une approche multi-biomarqueurs couplant les données biologiques et chimiques, chez une espèce de poisson benthique, la limande (*Limanda limanda*). L'étude a été menée en Estuaire de Seine sur deux années consécutives. La mesure des niveaux de métabolites a permis de confirmer la présence de HAP dans les zones étudiées et leur biodisponibilité pour les organismes vivants. Associée aux indications données par les biomarqueurs biologiques (EROD, cassures de brins), une cartographie spatiale et temporelle de la zone étudiée a pu être mise en place.

La seconde publication porte sur la mesure des métabolites de HAP dans une zone fortement polluée mais faiblement étudiée : la Baie de Guanabara au Brésil. Les niveaux en métabolites mesurés ont permis, pour la première fois, de témoigner de la présence de HAP dans les différentes zones étudiées. L'étude de la distribution relative des métabolites de HAP a également permis la discrimination des sources de HAP. Ainsi des valeurs de référence pour le rapport entre les teneurs en 1-OHP et en métabolites du phénanthrène ont pu être définies, permettant la discrimination entre les origines pétrogéniques et pyrolytiques de la contamination en HAP entre les sites étudiés.

Enfin un paragraphe est consacré à une étude en milieu naturel qui n'a pas donnée lieu à l'heure actuelle à une publication soumise. Elle porte sur l'étude de la contamination en HAP des merlus (*Merluccius merluccius*) de Méditerranée. Les niveaux en métabolites de HAP ont été mesurés sur des poissons échantillonnés sur différentes zones côtières et hauturières afin de déterminer l'impact des HAP sur ces organismes, à grande valeur économiquement. Au cours de cette étude, une attention particulière a été portée sur l'étude des métabolites conjugués de HAP et de leur répartition dans la quantité totale de métabolites produits.

1 Exposition et Effets chez la limande (*Limanda limanda*) de Baie de Seine (Publication n°8)

Cette étude de terrain avait pour but de confronter les profils obtenus dans le cas d'une exposition chimique diffuse de population de limandes (âge et sexe) au sein d'un des estuaires les plus contaminés d'Europe par les HAP et de valider les méthodes obtenues en laboratoire sur les juvéniles de turbots (Publication n°7) pour la surveillance et l'évaluation du risque chimique. Sur la base des recommandations méthodologiques de la Commission d'Oslo-Paris (JAMP), une sélection de biomarqueurs a été définie pour cette étude : les adduits à l'ADN, l'activité enzymatique EROD et les métabolites de HAP. Une surveillance intégrée chimie et biologie a été initiée sur deux années consécutives, suivant une démarche de cartographie spatiale et temporelle des effets de la contamination en HAP chez une espèce de référence des programmes de surveillance de la Mer du Nord, la limande et dans un estuaire à forte pression anthropique et économique, l'estuaire de Seine.

Les niveaux en métabolites ont permis de confirmer la présence de HAP dans les zones étudiées et leur biodisponibilité pour les organismes vivants. Grâce à l'analyse des métabolites biliaires, des différences dans les niveaux de contamination chimique ont été observées avec la période et le site d'échantillonnage. Au cours de cette étude, l'influence de facteurs biotiques (âge, sexe) et abiotiques (site, saison d'échantillonnage) sur le niveau de cassures de brins de l'ADN de limande a été mise en évidence. Les effets de l'âge et du sexe de la limande ainsi que leur interaction significative semblent indiquer l'influence d'autres facteurs physiologiques tels que vraisemblablement le cycle de reproduction de la limande.

Grâce aux données chimiques obtenues sur les deux années consécutives, des niveaux de base en métabolites biliaires ont pu être définis pour les deux sites d'études. Associés aux indications données par les biomarqueurs biologiques, une cartographie spatiale et temporelle de la zone étudiée a pu être mise en place. C'est sur la base de ces travaux qu'un programme européen (ICON) mené conjointement par l'ICES (International Conference on Environmental Systems) et par l'OSPAR a vu le jour en 2008. Il a pour but d'évaluer l'état de santé des écosystèmes de la mer du Nord face aux contaminants anthropogéniques en considérant les effets biologiques, dans le cadre d'une approche intégrée.

L'ensemble des données brutes de cette étude sont présentées dans l'Annexe 12.

2 Etude préliminaire de la contamination en HAP dans la Baie de Guanabara (Brésil) via la détermination des métabolites biliaires (Publication n°9)

Une étude préliminaire a été menée dans la Baie de Guanabara (Brésil) sur différentes espèces de poissons collectés sur des sites aux typologies et impacts anthropiques différents. Les teneurs en métabolites mesurées sont très supérieures à celles communément mesurées dans les poissons échantillonnés le long des côtes françaises. Les différences mesurées pour les niveaux de métabolites totaux, compris entre 15 et 76 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de bile, ont permis la discrimination des sites étudiés face à une contamination en HAP des organismes. L'étude de la distribution des métabolites individuels par rapport à la somme des métabolites totaux a montré une forte prédominance du métabolite du pyrène (1-OHP) et des métabolites du phénanthrène (OHPhe) mais en des proportions différentes selon les sites. L'utilisation du rapport de valeurs des concentrations en 1-OHP et OHPhe a permis d'établir une discrimination des origines de la contamination (pétrogénique et pyrolytique) pour les sites étudiés.

Cette étude est la première qui met en œuvre l'utilisation des métabolites biliaires de HAP chez les poissons de la Baie de Guanabara dans le suivi environnemental de la contamination en HAP.

L'ensemble des données brutes de cette étude sont présentées dans l'Annexe 13.

3 Etude des métabolites de HAP chez les merlus (*Merluccius merluccius*) de Méditerranée.

3.1 Introduction

La présence de contaminants organiques dans l'environnement marin pose la question importante de leur devenir dans les réseaux trophiques et, finalement, celle de l'exposition des consommateurs finaux, y compris l'homme, à de telles substances potentiellement toxiques. Dans le projet MERLUMED, il s'agit de comprendre le transfert et la bioaccumulation des contaminants dans le merlu (*Merluccius merluccius*) du golfe du Lion en Méditerranée Nord Occidentale et dans les espèces principales de son réseau trophique. Le merlu a été choisi comme modèle d'étude car il est un poisson à forte valeur économique et qui bénéficie d'une large distribution dans le Golfe du Lion. Cette espèce, à la fois benthique et pélagique, est un organisme très étudié dans l'Atlantique en raison, notamment, de son niveau trophique élevé.

Comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes », des merlus ont été échantillonnés dans quatre sites du Golfe du Lion. Deux sites se situaient à proximité de l'embouchure du Rhône et deux autres dans la partie centrale du Golfe du Lion, aux profondeurs plus importantes.

Les résultats présentés ci-après concernent les dosages des métabolites de HAP effectués dans la bile des individus étudiés. L'objectif principal de cette étude était de documenter les teneurs en métabolites chez cette espèce et sur ces zones géographiques, suspectées d'être contaminées en HAP du fait des activités anthropiques.

3.2 Campagne de mai 2005

Le Tableau 52 présente les concentrations en métabolites mesurées dans la bile des merlus provenant du Golfe de Lion. Les résultats correspondent à des mesures en triplicats sur des échantillons préparés en individuel.

Les teneurs en métabolites mesurées dans la bile de merlu de Méditerranée se sont révélées être relativement constantes d'un site à l'autre. En effet, la somme des métabolites mesurée varie entre 86 et 116 ng.g⁻¹ de bile. Aucune discrimination n'a pu être faite tant par la quantité que par distribution des métabolites d'un site à l'autre. Dans les quatre cas, une forte prédominance des métabolites du phénanthrène est observée (entre 30 et 48%) alors que la contribution du 1-OHP à l'ensemble reste faible (entre 7 et 11%). Ces résultats orientent les conclusions vers une contamination majoritairement d'origine pétrogénique et dans une moindre mesure d'origine pyrolytique. En revanche la présence de métabolites du benzo(a)pyrène est une empreinte d'une contamination pyrolytique. Mais les quantités détectées sont infimes.

C'est pourquoi ces résultats semblent supposer une origine diverse de la contamination (pyrolytique et pétrogénique) avec une légère prédominance pour une contamination d'origine pétrogénique.

Tableau 52: Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de merlus échantillonnés dans le Golfe du Lion au cours des campagnes MERLUMED 3 en mai 2005. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de bile (n=3). Stations I et III : à proximité de l'embouchure du Rhône. Stations IV et V : partie centrale du Golfe. nd : non détectés (< LOD, publication n°1)

Composés	Station I	Station III	Station IV	Station V
	Moyenne ± Ecartype	Moyenne ± Ecartype	Moyenne ± Ecartype	Moyenne ± Ecartype
1-OHN	11,4 ± 1,7	9,9 ± 2,1	17,5 ± 2,3	11,4 ± 1,1
2-OHN	4,3 ± 1,2	4,7 ± 1,2	2,4 ± 1,4	2,6 ± 0,6
2-OHBi	17,2 ± 0,5	15,8 ± 6,4	17,9 ± 0,9	14,7 ± 6,8
9-OHFe	1,8 ± 1,5	13,6 ± 7,4	5,4 ± 3,4	10,6 ± 6,1
4-OHPhe	1,8 ± 1,5	2,2 ± 1,6	2,6 ± 1,6	2,5 ± 0,5
9-OHPhe	19,9 ± 3,4	16,8 ± 7,7	19,8 ± 6,4	26,2 ± 11,0
3-OHPhe	3,0 ± 0,3	3,3 ± 2,2	1,6 ± 1,1	1,4 ± 1,0
1-OHPhe	5,5 ± 1,4	9,0 ± 4,2	12,1 ± 2,8	7,7 ± 5,1
2-OHPhe	4,4 ± 0,5	5,4 ± 3,2	5,9 ± 1,0	3,7 ± 1,8
1-OHP	12,7 ± 9,1	12,0 ± 2,9	8,5 ± 2,0	5,6 ± 0,4
1-OHC	11,3 ± 9,0	13,0 ± 8,5	nd	nd
3-OHBaP	15,5 ± 6,5	nd	2,9 ± 5,0	nd
Somme OHPhe	34,6 ± 5,0	36,6 ± 15,7	41,9 ± 4,5	41,5 ± 15,3
Somme OHHAP	108,8 ± 26,1	105,7 ± 24,6	96,4 ± 1,0	86,4 ± 20,1

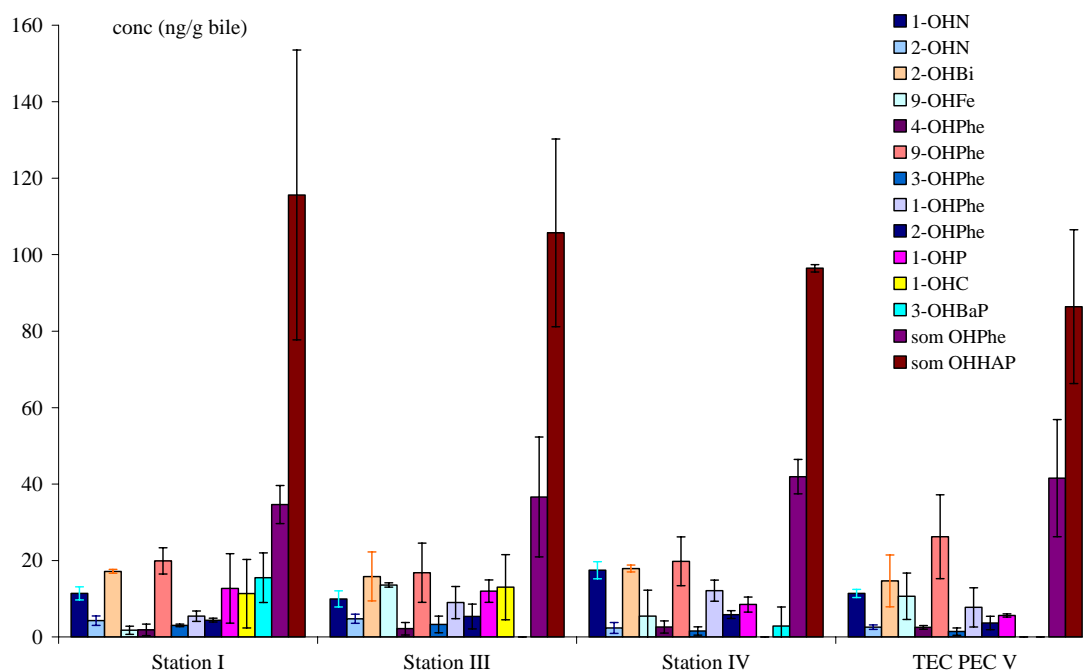


Figure 42: Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de merlus (ng.g^{-1} de bile) échantillonnés en mai 2005 dans le Golfe du Lion sur les Station I (à proximité de l'embouchure du Rhône), Station III et IV (partie centrale du Golfe) et Station V (dans les plus hauts fonds) (moyenne, $n=3$).

Les concentrations en métabolites mesurées chez les merlus ont été comparées à celles obtenues chez les limandes de l'Estuaire de Seine en 2005 et en 2006 (Publication n°8). La somme des métabolites mesurée dans la bile de merlus semble être inférieure à celle trouvée dans les biles de limandes prélevées dans l'estuaire de Seine, quel que soit le site, l'année, l'âge ou le sexe des poissons considérés.

Plus particulièrement, les teneurs en 1-OHP trouvées en Méditerranée (entre 6 et 13 ng.g^{-1}) sont légèrement inférieures à celles trouvées dans les biles de limandes du site Granulats de Baie de Seine en 2005 (entre 21 et 34 ng.g^{-1}) et très inférieures à celles trouvées dans les bile de limandes de l'estuaire de Seine sur le site ES en 2005 (entre 88 et 90 ng.g^{-1}), connu pour être plus impacté.

Cependant, il faut rester très prudent dans les comparaisons et les conclusions sur les niveaux de métabolites entre deux espèces aux comportements alimentaires et aux modes de vie très différents.

3.3 Spéciation des métabolites de HAP biliaires

Cette étude avait également pour but de valider le développement méthodologique présenté dans le Chapitre II, § 4.1.2. Ce développement analytique a permis de mettre au point un protocole de préparation des échantillons de bile conduisant au fractionnement des métabolites de HAP conjugués.

Les échantillons de bile de merlus ont été soumis aux deux protocoles de préparation des échantillons : le protocole n°1 (Chapitre II, § 4.1.1) qui permet le dosage de métabolites totaux de HAP après avoir subi une déconjugaison enzymatique et le protocole n°2 qui permet de fractionner les métabolites conjugués en trois fractions analysées individuellement

(F1, F2 et F3) correspondant aux métabolites libres (F1), aux glucuronides (F2) et aux sulfates (F3). Les résultats sont présentés dans les Tableaux 41 et 42 et dans les Figures 30, 31 et 32.

On note que les formes conjuguées sont majoritaires (entre 84% et 97%) quel que soit le métabolite considéré. De plus, les formes glucuronides sont globalement prépondérantes par rapport aux formes sulfates, à l'exception des métabolites du phénanthrène. Cette majorité varie selon les composés (entre 78 et 11% de glucuronides et entre 6 et 85% de sulfates). Tous ces résultats sont en accord avec la littérature (Chapitre I, §2.2.2.).

Cette étude a permis de valider le protocole d'analyse développé pour étudier le fractionnement des métabolites biliaires. Les résultats sont très prometteurs pour une utilisation dans des études de biotransformation et de lien entre exposition et génotoxicité.

Ce protocole de fractionnement est une première étape dans le développement d'une méthodologie d'analyse utilisant l'extraction SPE pour séparer les différentes formes de métabolites conjugués. Des études précédentes ont mesuré les fractions des différentes formes de conjugués en HPLC/F mais aucune en GC/MS. Ce protocole reste à être optimisé mais il représente une avancée de taille dans l'étude des métabolites de HAP biliaires et plus généralement, dans l'étude des phénomènes de biotransformation.

3.4 Conclusions

Cette étude a permis d'obtenir une première documentation des teneurs en métabolites de HAP présents dans les merlus de Méditerranée. Avec ces données aucune discrimination du niveau d'exposition aux HAPs entre les sites n'a pu être effectuée. En revanche, une origine pétrogénique des HAP semble être majoritaire.

Ces conclusions ne sont que fondées sur une seule campagne de prélèvement. Afin de mieux documenter les résultats et de poursuivre dans la connaissance du degré d'exposition de ces organismes aux HAP, il faut s'intéresser à davantage de campagnes permettant ainsi de documenter l'influence de la période d'échantillonnage (liée à la période de reproduction), du sexe ou de l'âge des poissons. Il faut également mettre en relation ces données sur les métabolites de HAP aux autres données chimiques telles que la teneur en HAP dans les tissus, dans les eaux et les sédiments prélevés sur les sites d'échantillonnage.

CHAPITRE V : SYNTHÈSE

Le but de ce chapitre est de récapituler les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et d'en présenter une synthèse.

L'objet initial de ces travaux était, d'une part l'étude des phénomènes de biodisponibilité, de bioaccumulation et de biotransformation des HAP chez les poissons marins et d'autre part, la proposition de nouveaux outils de biosurveillance dans le cadre de pollutions par les hydrocarbures en milieu marin.

Tout d'abord, il s'agissait de développer des outils analytiques sensibles et spécifiques pour l'analyse des métabolites de HAP mono-hydroxylés dans différents fluides biologiques.

Par la suite, afin de démontrer l'applicabilité de ses méthodes d'analyse des métabolites de HAP chez des organismes marins exposés, deux approches ont été mises en œuvre. Une approche expérimentale, portant sur l'étude de la biodisponibilité et de la biotransformation des HAP chez le turbot (*Scophthalmus maximus*) a été menée en mésocosmes en laboratoire. Complétée par l'étude des effets génotoxiques induits par l'exposition aux HAP, ce volet expérimental a servi à la mise en place d'outils de biosurveillance. L'analyse des métabolites de HAP et leur définition comme biomarqueurs d'exposition aux HAP a été le moteur des développements et travaux initiés au cours de cette thèse.

Ces outils, une fois développés et validés, ont été appliqués à différentes études de suivi environnemental des organismes exposés à une contamination en HAP. Intégrée à des programmes aux objectifs variés, l'analyse des métabolites de HAP a permis de dresser des états des lieux de la contamination en HAP des organismes marins ciblés dans des écosystèmes variés et de relier les effets génotoxiques observés aux niveaux d'exposition en HAP mesurés.

1 Mise au point d'une méthode de dosage des métabolites de HAP dans les fluides biologiques

La plupart des études réalisées sur les métabolites de HAP mettent en œuvre un dosage semi-quantitatif global de ces composés. Les protocoles mis au point lors de ces travaux permettent de réaliser des dosages quantitatifs des métabolites individuellement. Les études ont été orientées vers trois méthodologies analytiques aux avantages et inconvénients différents : la GC/MS, la GC-MS/MS et l'UPLC-MS/MS.

Les développements analytiques présentés dans cette thèse ont permis de mettre au point des méthodologies analytiques sensibles et spécifiques. L'absence ou la rareté de travaux utilisant ces techniques pour l'analyse des métabolites de HAP biliaries justifient et appuient les développements mis en œuvre au cours de cette thèse. Ces méthodes d'analyse des métabolites ont été appliquées avec succès lors de travaux en laboratoire et d'études de terrain.

Quatre publications portant sur les développements analytiques réalisés dans le cadre de cette thèse pour l'étude des métabolites d'hydrocarbures aromatiques polycycliques biliaries dans les organismes aquatiques, ainsi que l'application de ces protocoles de dosage aux matrices environnementales, ont été soumises. Les optimisations et la validation du protocole de préparation des échantillons suivi d'une analyse par GC/MS fait l'objet d'une première publication. L'utilisation de la GC-MS/MS puis de l'UPLC-MS/MS afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de l'analyse, a conduit à l'écriture des publications n°2 et 3, respectivement. Enfin une méthode d'analyse des métabolites primaires réactifs en UPLC-MS/MS est présentée dans la publication n°4.

Par ailleurs, deux autres publications scientifiques écrites sur la base de ces travaux de thèse ont également fait l'objet d'une attention particulière. La première correspond à un état de l'art concernant l'analyse des métabolites de HAP biliaries chez les poissons et leur utilisation comme outil de diagnostic d'une exposition aux HAP de ces organismes (Publication n°5). Ce travail de bibliographie et de synthèse est nécessaire pour définir les axes et les stratégies de développement analytique à mettre en œuvre. La seconde publication est une note d'application, concise et technique traitant de l'analyse de métabolites de HAP en UPLC-MS/MS. Soumise pour une publication au sein de Waters Corporation, elle apparaît sous la forme d'une note technique (Publication n°6).

2 Expérimentations en laboratoire (Publication n°7)

Afin d'élucider le comportement des contaminants dans l'environnement aquatique et d'évaluer l'exposition des organismes aquatiques, les marqueurs de bioaccumulation (en particulier les mesures des concentrations tissulaires en HAP) sont fréquemment utilisés chez les poissons. Or il est impossible de prédire le devenir des contaminants par des simples modèles de partition. Lorsque l'évaluation du risque environnemental est effectuée au seul moyen des facteurs de bioconcentration et de bioaccumulation, la démarche est insuffisante et peut être complètement faussée par d'autres processus comme la biotransformation et d'autres phénomènes de dégradation. C'est pourquoi la complexité des phénomènes de

bioaccumulation/biotransformation doit être prise en compte ce qui sous-entend l'évaluation du processus global de bioaccumulation, incluant la toxicocinétique, le métabolisme et les facteurs de bioconcentration et de bioaccumulation dans les tissus.

Au cours des expérimentations en laboratoire, les mesures de bioaccumulation dans les tissus n'ont pas permis de relier l'exposition aux effets biologiques observés. Des niveaux d'exposition ont été investis, via différentes voies d'exposition (dissous, sédimentaire et éluatriat de pétrole). Chacune d'elles engendrait une biodisponibilité différente des HAP vis-à-vis de l'organisme. Des teneurs et des profils différents en HAP n'ont pas permis de conclure sur les liens entre biodisponibilité et bioaccumulation des HAP dans les muscles et les foies des poissons.

Concernant l'analyse des métabolites de HAP, le volet expérimental de cette étude a permis de montrer que les niveaux de métabolites quantifiés dans la bile des poissons corrélaient avec les niveaux de contamination du milieu, même si des différences de nature et de quantité de métabolites formés existaient. Une rapide production de métabolites était également observable pour tous les niveaux d'exposition du milieu, en particulier pour le 1-hydroxypyrene (1-OHP), métabolite majoritaire du pyrene. Ces observations corroborent l'hypothèse que les métabolites de HAP et en particulier le 1-OHP peuvent être utilisés comme biomarqueur d'exposition précoce aux HAP, même à faible dose de contamination. L'utilisation des métabolites du phénanthrène semble être également un bon indicateur d'exposition des organismes aux HAP. Un rapport liant ces deux paramètres reste à définir afin de pouvoir déterminer l'origine d'une contamination en HAP.

La mesure de l'activité EROD et des métabolites de HAP présentent de nombreux avantages comme outils d'évaluation d'une exposition aux HAP. On peut ainsi citer la fiabilité et la facilité des analyses, la sensibilité de la réponse face à une contamination en HAP, les niveaux de bases de l'EROD connus dans la littérature et les informations mécanistiques apportées par ces mesures. En revanche, l'EROD peut être influencée par divers facteurs intrinsèques et extrinsèques. Néanmoins les liens entre l'EROD et les métabolites de HAP sont connus et directs puisque l'activation du CYP450 engendre la formation de métabolites de HAP. C'est pourquoi, la mesure des métabolites de HAP est essentielle afin de relier HAP assimilés par l'organisme et effets génotoxiques. Mais elle doit se faire conjointement avec la mesure de l'activité EROD. Ainsi cela permet de faire le trait d'union entre les HAP assimilés par l'organisme (mesures chimiques) et les réponses génotoxiques (mesures biologiques) associées à l'activation du CYP450 et à la production des métabolites. Dans notre étude, aucune corrélation significative n'a été clairement établie entre l'activité EROD et les métabolites majoritaires, le 1-OHP et les OHPhé. Van Schanke *et al.* [220] a montré que la corrélation entre ces deux biomarqueurs n'était effective que si on s'intéressait aux métabolites primaires des HAP (dihydrodiols) et en particulier à ceux du BaP, connu pour son pouvoir génotoxique. Dans notre étude, nous ne nous intéressons qu'aux métabolites secondaires, excrétables par l'organisme et pas responsables directement de l'activation du CYP450.

Les métabolites peuvent apporter des informations supplémentaires si on s'intéresse à certaines classes de métabolites, les métabolites de phase I, réactifs. Ces métabolites primaires (diols, diols-époxyde, dihydrodiols) sont directement responsables des dommages à l'ADN. Néanmoins, il reste des développements méthodologiques à effectuer afin d'analyser ces métabolites, selon une méthodologie rapide et fiable permettant l'intégration à un programme de surveillance. Une partie des travaux de développements analytiques effectués au cours de cette thèse s'est portée sur l'étude des ces métabolites primaires et leur dosage par UPLC-MS/MS (Publication n°4). Même si des optimisations restent à faire, cette méthode d'analyse très sensible et innovante a ouvert la voie à de nouvelles perspectives d'études en offrant un outil analytique performant.

3 Etudes en milieu naturel (Publications n°8 et 9)

Les conclusions empiriques obtenues au cours des expérimentations en laboratoire ont pu être vérifiées au cours des études de terrain. Trois études menées sur des zones géographiques différentes ont été réalisées au cours de cette thèse.

Le principal résultat est que, quel que soit l'organisme ou la zone géographique considéré, les métabolites majoritaires quantifiés dans la bile des limandes sont le 1-OHP et les métabolites du phénanthrène. Les niveaux en métabolites biliaires mesurés ont permis de confirmer la présence de HAP dans les zones étudiées et leur biodisponibilité pour les organismes vivants.

Concernant l'étude en Estuaire de Seine (Publication n°8), des mesures de bioaccumulation dans les tissus ont complété l'étude des métabolites de HAP. Après exposition, ces composés ont été absorbés par l'organisme, bioaccumulés dans ses différents tissus (foie, muscle), puis biotransformés et stockés dans la bile. Les résultats obtenus ont montré des niveaux de contamination en HAP plus élevés dans la zone de l'estuaire de la Seine par rapport à la zone centrale de la Baie de Seine. Du fait de la biotransformation, les concentrations en HAP dans les muscles sont proches de la limite de quantification dans les limandes des deux zones et ne permettent pas de différencier les niveaux d'exposition. Cependant, grâce à l'analyse des métabolites biliaires, des différences dans les niveaux de contamination chimique ont été observées avec la période et le site d'échantillonnage. Néanmoins, aucune différence selon l'âge ou le sexe de la limande dans les niveaux ou dans le profil de contamination n'a pu être établi avec certitude.

Issus de la biotransformation des HAP, les teneurs en métabolites mesurées chez les limandes de l'Estuaire de Seine ont montré une corrélation avec les altérations à l'ADN mesurés par le test des comètes. Ce niveau cellulaire de l'information mécanistique permet ainsi d'accéder à l'effet génotoxique et de relier ainsi l'exposition à la génotoxicité.

En revanche, le marqueur biologique étudié (test des comètes) n'est pas spécifique des polluants chimiques, et en particulier des HAP. Les cassures de brins de l'ADN peuvent résulter de la production endogène d'espèces réactives de l'oxygène : cette production d'oxyradicaux fait notamment partie intégrante de la réponse immunitaire à une infection bactérienne. De la même façon, il a été démontré que le métabolisme des oestrogènes pouvait également conduire à la formation endogène d'adduits à l'ADN. Malgré ce manque de spécificité, des corrélations ont été observées *in situ* entre le niveau de cassures de brins de l'ADN et le niveau de certains des métabolites biliaires de HAP. Ces corrélations semblent donc indiquer un rôle pour la contamination chimique du milieu notamment par les HAP dans les effets génotoxiques mesurés chez la limande.

Au cours de cette étude *in situ* en Estuaire de Seine, l'influence de facteurs biotiques (age, sexe) et abiotiques (site et saison d'échantillonnage) sur le niveau de cassures de brins de l'ADN de limande a été mis en évidence. Les effets de l'âge et du sexe de la limande ainsi que leur interaction significative semblent indiquer l'influence d'autres facteurs physiologiques tels que vraisemblablement le cycle de reproduction de la limande. La ponte peut en effet constituer chez les limandes femelles un moyen indirect d'éliminer une partie des polluants chimiques absorbés au cours de son existence. La connaissance de l'influence de ces facteurs permettra d'améliorer la stratégie d'échantillonnage à adopter pour les études de biosurveillance.

Afin d'évaluer l'exposition aux HAP des poissons de la Baie de Guanabara au Brésil, une première étude basée sur la mesure des métabolites de HAP dans la bile a été mise en œuvre sur quelques sites plus ou moins soumis à la pression anthropique (Publication n°9). Compte-tenu du caractère préliminaire de cette étude, les échantillonnages n'ont pas été nombreux et aucune mesure du niveau de HAP dans le milieu n'a été faite en parallèle pour étudier la bioaccumulation des contaminants chez les organismes ciblés.

Néanmoins, les teneurs en métabolites mesurées sur tous les sites considérés se sont trouvées être en quantités très supérieures à celles généralement mesurées chez les poissons évoluant le long des côtes françaises (hors épisodes exceptionnels de marées noires ou d'accidents pétroliers). Une discrimination des sites et des niveaux d'exposition des organismes aux HAP a pu être effectuée par la mesure des métabolites.

Des différences spatiales dans les concentrations en 1-OHP et en métabolites du phénanthrène ont pu être mises en évidence. Les différences spatiales en métabolites concourent avec les différences d'origines des HAP dans la Baie. L'étude du rapport entre le 1-OHP et les métabolites du phénanthrène permet de proposer un indice de caractérisation de l'origine des HAP. Deux valeurs pour ce rapport ont pu être définies. La première, $OHPhe/1-OHP > 2$, tend vers une origine pétrogénique de la contamination en HAP alors qu'un rapport correspondant à $OHPhe/1-OHP < 1$, tend plutôt vers une origine pyrolytique. Ces indices d'origine de sources des HAP ne sont qu'une première approche et doivent être documentés par de plus amples données et suivis environnementaux dans cette zone géographique et sur ces espèces, en particulier. Néanmoins, ces conclusions ouvrent la voie à de nouveaux suivis environnementaux dans la Baie de Guanabara pour lesquels les stratégies de biosurveillance et d'échantillonnage devront tenir compte de ces indices d'origines de sources et des niveaux importants en métabolites biliaires mesurés.

Enfin, une étude menée dans le Golfe du Lion au large de Marseille a permis l'évaluation de l'exposition aux HAP de merlus au moyen de l'analyse des métabolites de HAP biliaires. Le but principal de cette étude était de valider une méthodologie d'analyse des métabolites conjugués sur des échantillons naturels, disponibles en quantités suffisantes et pour lesquels le niveau de métabolites supposés serait relativement élevé. Ainsi une campagne d'échantillonnage, faisant partie intégrante d'un long programme de biosurveillance des merlus en Méditerranée, a été considérée. Les résultats obtenus au demeurant, compte tenu du faible nombre d'échantillons, n'ont pas fait l'objet d'une publication.

Néanmoins, ils se sont révélés être très intéressants pour les travaux de cette thèse. En effet, l'analyse des métabolites de HAP conjugués a pu être validée. Ce protocole est le premier protocole de fractionnement des conjugués au moyen d'une extraction SPE. L'analyse par GC/MS des fractions obtenues (métabolites libres, glucuronides et sulfates) permet d'ouvrir les portes à de nouvelles perspectives d'études tant du point de vue analytique que du point de vue mécanistique et de la compréhension plus globale des processus de biotransformation.

Concernant l'étude de la contamination en HAP des merlus de Méditerranée, les résultats obtenus pour l'analyse des métabolites biliaires se sont avérés être un peu surprenants. En effet, les niveaux en métabolites mesurés sont très inférieurs à ceux escomptés compte tenu de la pression anthropique exercée sur cette partie de la Méditerranée. L'embouchure du Rhône et son panache dans la mer sont connus pour être impactés par les polluants organiques, et plus particulièrement par les HAP. Les teneurs en HAP totaux comprises entre 1 ng.g^{-1} et $20,8 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ ont été rencontrées dans les sédiments de

la Méditerranée occidentale¹. Dans les zones portuaires, les concentrations sont fréquemment supérieures au $\mu\text{g.g}^{-1}$. Dans la plupart des cas, la contamination est attribuée à une origine pyrolytique.

Dans cette campagne, les teneurs en métabolites totaux mesurées sont comprises entre 86 et 109 ng.g^{-1} . Comparées aux limandes de Baie de Seine, ces valeurs sont très inférieures. La différence entre les espèces étudiées peut expliquer en partie la différence de niveaux de concentrations en métabolites ; chaque espèce ayant un métabolisme différent qualitativement et quantitativement.

De plus, la prédominance des métabolites du phénanthrène, laissant supposer une origine pétrogénique de la contamination, contredit les origines majoritairement pyrolytiques des HAP sédimentaires. De manière à pouvoir réellement conclure sur ces résultats, les questions en suspens devront être approfondies par des études supplémentaires, intégrant un plus grand nombre d'échantillons.

¹ <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/dragages/drag-c3311.htm>, le 15/10/08

CONCLUSION GENERALE

Le but de cette thèse, fondée principalement sur la méthodologie analytique, était de mettre au point un outil de biosurveillance des organismes marins, en particulier des poissons, exposés aux HAP. La possibilité d'utiliser cet outil, basé sur les produits de biotransformation des HAP, dans l'étude de la relation entre l'exposition des organismes et la génotoxicité de HAP a été étudiée afin de répondre à l'objectif de cette thèse.

Dans un premier temps, les travaux ont donc porté sur le développement de procédures permettant l'analyse quantitative des métabolites biliaries. Une sélection de métabolites mono-hydroxylés ont été choisis pour cette étude en raison de la représentativité des HAP parents correspondants. Trois méthodologies aux performances analytiques différentes ont été développées : GC/MS, GC-MS/MS et UPLC-MS/MS. Toutes se sont montrées adaptées au dosage des métabolites dans la bile de poisson. L'optimisation des procédures analytiques, associant extraction sur phase solide et analyse par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple ou en tandem, a permis d'obtenir des limites de détection compatibles avec les exigences requises pour l'analyse des métabolites biliaries, quelle que soit la méthodologie considérée.

Des études en laboratoire ont ensuite permis d'évaluer l'applicabilité de l'outil analytique développé et son utilité dans la compréhension des phénomènes de biodisponibilité et de biotransformation des HAP chez le turbot (*Scophthalmus maximus*). Associé à l'étude des effets génotoxiques, l'étude des métabolites de HAP, niveau cellulaire de l'information mécanistique, permet d'accéder à l'effet génotoxique et de relier ainsi l'exposition à la génotoxicité. L'utilisation conjointe des compétences des chimistes et biologistes a été la force majeure de ces travaux de recherche permettant ainsi la compréhension globale des mécanismes de biotransformation et de génotoxicité des HAP chez les poissons.

Appliqués lors d'études de terrain, les outils de dosage des métabolites de HAP ont permis l'évaluation de l'exposition des organismes aux HAP dans le milieu naturel. Le potentiel particulier de certains métabolites comme le 1-hydroxypyrene et les métabolites du phénanthrène a ainsi été mis en évidence. Utilisés comme biomarqueurs d'exposition potentiels des poissons aux HAP dans le milieu naturel, des précautions sont néanmoins à prendre afin de comparer les niveaux de métabolites en fonction de l'âge et du sexe des poissons. Corrélée à la mesure des dommages à l'ADN induits par l'exposition aux HAP, la mesure des métabolites de HAP s'avère être un bon outil de biosurveillance et de compréhension du lien existant entre l'exposition et la génotoxicité.

Cette étude a permis de cibler les marqueurs chimiques et biologiques les plus appropriés pour la surveillance environnementale. Les différents biomarqueurs proposés ont été retenus et validés par les études en laboratoire et les campagnes en estuaire de Seine.

Le point fort de cette étude est l'intégration des données chimiques et biologiques, en particulier au niveau de l'analyse de l'EROD et des métabolites de HAP. Cette approche n'a pas été souvent étudiée. Ainsi c'est via la détermination conjointe des HAP parents, des métabolites de HAP, de l'activité EROD et des dommages à l'ADN, que la relation entre exposition et génotoxicité peut être établie. Cette approche permet de suivre le devenir des HAP depuis la mesure dans le milieu jusqu'aux effets sur l'organisme.

Néanmoins, les résultats de ces travaux laissent encore des questions en suspens. Afin d'y répondre, il faudrait étoffer le volet en laboratoire par des expérimentations plus longues afin de saturer la capacité métabolique des organismes et d'observer les effets de cette saturation. Du point de vue de la surveillance environnementale, de nouvelles campagnes sur plusieurs saisons devraient renforcer les données existantes afin de conforter ou non les résultats obtenus sur deux années, et en particulier « les niveaux de base » obtenus au cours des campagnes en estuaire de Seine et en Méditerranée occidentale sur des sites régionaux.

D'un point de vue méthodologique, il serait intéressant d'orienter les développements vers l'analyse des métabolites dans les matrices solides (foie, muscle, poisson entier). La distribution dans les organes des composés pendant les processus de biotransformation pourrait ainsi être suivie et des informations supplémentaires pourraient ainsi être obtenues sur les aspects mécanistiques des phénomènes.

Les développements analytiques initiés au cours de ces travaux de thèse concernant l'étude des métabolites primaires et des métabolites conjugués de HAP doivent être poursuivis. En effet, les métabolites primaires peuvent apporter des informations supplémentaires car ils sont directement responsables des dommages à l'ADN. Les développements méthodologiques doivent donc être poursuivis en UPLC et en particulier en UPLC-MS/MS. Cette étude des métabolites primaires pourrait ainsi être étendue aux métabolites d'un plus grand nombre de HAP, aux processus de métabolisation complexes (benzofluoranthène, benzoanthracène ...).

Les développements analytiques portant sur l'analyse des métabolites conjugués doivent également être poursuivis. En effet ces composés peuvent permettre d'établir un lien entre exposition et biodisponibilité car ils peuvent être les traceurs de la fraction disponible et toxique des métabolites de HAP au niveau cellulaire. Les développements analytiques doivent se focaliser en premier lieu sur la préparation des échantillons et la bonne séparation des différentes fractions (sulphate, glucuronide et libre) au moyen des systèmes d'extraction solide-liquide (cartouches SPE). D'autre part, une optimisation des méthodes d'analyse (séparation et détection) de ces composés, et en particulier une analyse en UPLC-MS/MS, permettrait de s'affranchir d'une préparation de l'échantillon coûteuse en temps et en rendement d'extraction. Sans déconjugaison préalable, les métabolites conjugués pourraient être séparés directement par chromatographie en phase liquide.

Toutes ces perspectives de développement d'outils analytiques sont prometteuses et les méthodologies investies doivent être optimisées et validées pour une utilisation dans des études en milieu contrôlé et naturel.

L'expérience acquise lors de l'étude de suivi environnemental en estuaire de Seine a été valorisée sous forme de transfert méthodologique dans le cadre du programme de surveillance de la zone Manche Mer du Nord mené par OSPAR. Les données recueillies pendant deux ans ont été compilées sur une matrice et seront transmises sur la base de données internationale gérée par le CIEM. Les variations spatiales et temporelles des concentrations en HAP dans les muscles et foies et les biomarqueurs EROD, métabolites HAP, et comète ont été interprétées et utilisées pour la rédaction d'une proposition de biosurveillance en estuaire de Seine [441]. Cette proposition intègre les recommandations du JAMP (2007) concernant la stratégie d'échantillonnage et les méthodes d'analyses pour conduire un suivi des effets biologiques sur les côtes françaises sur une espèce de référence : la limande. Cette étude propose également des « niveaux de base » pour chacun des biomarqueurs. Ces niveaux de base seront utilisés par OSPAR pour la validation et l'interprétation régionale des biomarqueurs dans la rédaction du rapport de qualité de la mer du Nord qui sera publié en 2010.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. McElroy, A. E., Farrington, J. W., Teal, J. M., and Varanasi, U., *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Pp 1-40. 1989, Boca Raton: CRC Press.
2. Neff, J. M., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. 1979, London: Applied Science Publishers Ltd. 262.
3. Cossa, D., Meybeck, M., Idlafkih, Z., and Bombled, B., *Etude Pilote Des Apports En Contaminants Par La Seine. Rapport Ifremer, Agence De L'eau Seine-Normandie Et Ministère De L'environnement*, in Nantes, R. Int. DEL, Editor. 1994.
4. La Rocca, C., Conti, L., Crebelli, R., Crochi, B., Lacovella, N., Rodriguez, F., Turriobaldassarri, L., and Di Domenico, A. 1996. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **33**: p. 236-245.
5. Botello, A. V., Villanueva, F. S., and Diaz, G. G. 1997. *Rev. Sea. Environ. Contam. Toxicol.* **153**: p. 91-118.
6. Lipiatou, E., Tolosa, I., Simo, R., Bouloubassi, I., Dachs, J., Marti, S., Sicre, M. A., Bayona, J. M., Grimalt, J. O., Saliot, A., and Albaige?s, J. 1997. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **44**(3-4): p. 881-905.
7. White, K. L. 1986. *Envir. Carcino. Revs* **C4**: p. 163-202.
8. Belkin, S., Stieber, M., Tiehm, A., Frimmel, F. H., Abeliovich, A., Ulitzur, S., and Werner, P. 1994. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* **9**: p. 303-309.
9. Ashley, J. F. T. and Baker, J. E. 1999. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**: p. 838-849.
10. Baumard, P., *Biogéochimie Des Composés Aromatiques Dans L'environnement Marin*, in *Chemistry*. 1997, Université Bordeaux I: Bordeaux.
11. Devier, M. H., *Etude Intégrée Sur L'impact Des Différentes Classes De Contaminants (Composés Organostanniques, Métaux, Hap, Pcb) Sur Les Moules ; Bioaccumulation Et Réponses Biochimiques.* , in *Chemistry*. 2003, Université Bordeaux I: Bordeaux. p. 344 pp.
12. Fernandes, M. B., Sicre, M. A., Boireau, A., and Tronczynski, J. 1997. *Marine Pollution Bulletin* **34**(11): p. 857-867.
13. Long, E. R., MacDonald, D. D., Smith, S. L., and Calder, F. D. 1995. *Environmental management* **19**: p. 81-97.
14. McCready, S., Slee, D. J., Birch, G. F., and Taylor, S. E. 2000. *Mar. Poll. Bull.* **40**: p. 999-1006.
15. Altenburger, R. and Schmitt-Jansen, M., *Chapter 5: Predicting Toxic Effects of Contaminants in Ecosystems Using Single Species Investigations from Trace Metals and Other Contaminants in the Environment.* ,ed. 6, V. 2003.

16. Varanasi, U., Chan, S. L., McLeod, W. D., Stein, J. E., Brown, D. W., Burrows, D. G., Tilbury, K. L., Landahl, J. T., Wigren, C. A., Hom, T., and Pierce, S. M., *Noaa Technical Memorandum: Survey of Subsistence Fish and Shellfish for Exposure to Oil Spilled from the Exxon Valdez : First Year, 1989.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1990.
17. Varanasi, U. and Stein, J. E. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 93-100.
18. OSPAR, *Jamp: Guidelines for Contaminant-Specific Biological Effect Monitoring.*, Commission, O.O.a.P., Editor. 2005: London, UK.
19. Ribeiro C.A. 2005. *Aquatic Toxicology* **74**: p. 53-69.
20. Baumard, P., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1998. *Marine Pollution Bulletin* **36**(8): p. 577-586.
21. Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., and Bellocq, J. 1998. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **47**(1): p. 77-90.
22. Burgeot T, Bocquené G, His E, Vincent F, Geffard O, Beiras R, Goraguer H, and Galgani F, *Microplate Method for Measurement of Ethoxyresorufin-O-Deethylase (Erod) in Fish. In: Biomarkers in Marine Organisms; a Practical Approach*, ed. Elsevier. 2001.
23. Abarnou, A., Loizeau, V., Cugier, P., Le Guellec, A. M., and Ménesguen, A. *Modélisation De La Bioaccumulation: L'exemple Des Pcb Dans Le Réseau Trophique Du Bar En Estuaire De Seine.* in *Modelisation en écologie, Actes Colloque PNETOX*. 2000. Paris.
24. Mille, G., El Jammal, T., Doumenq, P., and Bertrand, J. C. 1992. *The Science of The Total Environment* **113**(3): p. 209-228.
25. Youngblood, W. W. and Blummer, M. 1975. *Geochim. Cosmchim. Acta* **39**: p. 1303-1314.
26. Alberty R.A. and I., O. 1986. *J. Chem. Phys.* **84**(2): p. 917-920.
27. Soclo, H. H., *Etude De La Distribution Des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Dans Les Sédiments Récents. Identification Des Sources.*, in *Sciences Chimiques*. 1986, Université Bordeaux1: Bordeaux. p. 158 pp.
28. Raoux, C. Y., *Modélisation Des Mécanismes De Contamination Par Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (Hap) Des Sédiments Marins Côtiers De Méditerranée: Conséquences Sur La Biodisponibilité Des Hap Dans Le Milieu Marin.*, in *Thèse de Doctorat*. 1991, Université Bordeaux 1: Bordeaux. p. 136 pp.
29. Sicre, M. A., Marty, J. C., Saliot, A., Aparicio, X., Grimalt, J., and Albaigès, J. 1987. *Atmospheric Environment* **21**: p. 2247-2259.
30. Lee, C., Gagosian, R. B., and Farrington, J. W. 1977. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**: p. 985-992.
31. Garrigues, P., Budzinski, H., Manitz, M. P., and Wise, S. 1995. *Polycycl. Aromat. Compd.* **7**: p. 275-284.
32. Garrigues, P. and Ewald, M. 1987. *Chemosphere* **16**(2-3): p. 485-494.

33. Parlanti, E., Belin, C., Texier, H., Ewald, M., and Lamotte, M. 1997 *Interpretation of the Fluorescence Signature of the Marine and Continental Waters in the Gironde and Seine Estuaries*, in *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and in Environmental Protection*, Drozd, J., et al., Editors. p. 603-609.
34. Broyelle, I., *Contribution À L'étude De La Biochimie De La Matière Organique En Milieu Estuarien: Cas Des Deltas Du Rhône Et De La Léna.*, in *Thèse de l'Université de Paris 6*. 1997: Paris. p. 256 pp.
35. Venkatesan, M. O. 1988. *Marine Chemistry* **25**(1): p. 1-27.
36. Laflamme, R. E. and Hites, R. A. 1978. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**(3): p. 289-303.
37. Baumard, P., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1998. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(5): p. 765-776.
38. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H., and Hansen, P. D. 1999. *Marine Environmental Research* **47**(1): p. 17-47.
39. McElroy, A. E. and Sisson, J. D. 1989. *Marine Environmental Research* **28**(1-4): p. 265-269.
40. De Kruif, C. G., *Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds - Vol 2*. Kluwer Acad. Publishers, ed. W., K. 1988, Dordrecht, Les Pays Bas.
41. INERIS, *Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (Haps). Evaluation De La Relation Dose-Réponse Pour Des Effets Cancérogènes: Approches Substance Par Substance Et Approche Par Mélange - Evaluation De La Relation Dose-Réponse Pour Des Effets Non Cancérogènes: Valeurs Toxiques De Référence. Rapport Final (Doornaert B. Et Pichard A.)*. 2003.
42. ADEME, *Agence De L'environnement Et De La Maitrise De L'énergie. Fiche N°4, Conception Ademe/ Irh Environnement, Contrat N°275008*. 1995.
43. Karcher, W., Ellison, S., Ewald, M., Garrigues, P., Gevers, E., and Jacob, J., *Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds - Including Data on Physico-Chemical Properties, Occurrence and Biological Activity*. Vol. 2. 1988, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 864.
44. Govers, H. C., Ruepert, C., and Aiking, H. 1984. *Chemosphere* **13**: p. 227-236.
45. James, M. O. 1989 *Biotransformation and Disposition of Pah in Aquatic Invertebrates*, P 69-92, in *Metabolism Fo Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Varanasi, U., Editor CRC Press: Boca Raton. p. 341.
46. Meador, J. P., Stein, J. E., Reichert, W. L., and Varanasi, U. 1995. *Reviews of environmental contamination and toxicology* **143**: p. 79-165.
47. Meador, M. R., Brown, L. R., and Short, T. 2003. *Ecological Indicators* **3**(2): p. 81-92.
48. McElroy, A. E., Farrington, J. W., and Teal, J. M. 1990. *Environ Sci Technol* **24**: p. 1648-1655.
49. Rice, C. A., Myers, M. S., Willis, M. L., French, B. L., and Casillas, E. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 527-533.

50. Kukkonen, J. and Landrum, P. F. 1996. *Chemosphere* **32**(6): p. 1063-1076.
51. Kukkonen, J. V. K., Landrum, P. F., Mitra, S., Gossiaux, D. C., Gunnarsson, J., and Weston, D. 2003. *Environmental Science and Technology* **37**(20): p. 4656-4663.
52. Landrum, P. F., Eadie, B. J., and Faust, W. R. 1991. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**(1): p. 35-46.
53. Landrum, P. F. and Faust, W. R. *Effect of Variation in Sediment Composition on the Uptake Rate Coefficient for Selected Pcb and Pah Congeners by the Amphipod, Diporeia Sp.* in ASTM Special Technical Publication. 1991. San Francisco, CA, USA: Publ by ASTM.
54. Landrum, P. F., Gossiaux, D. C., and Kukkonen, J. 1997. *Chemical Speciation and Bioavailability* **9**(2): p. 43-55.
55. Landrum, P. F., Lotufo, G. R., Gossiaux, D. C., Gedeon, M. L., and Lee, J. H. 2003. *Chemosphere* **51**(6): p. 481-489.
56. Notar, M., Leskovs?ek, H., and Faganeli, J. 2001. *Marine Pollution Bulletin* **42**(1): p. 36-44.
57. Conrad, A. U., Comber, S. D., and Simkiss, K. 2002. *Chemosphere* **49**(5): p. 447-454.
58. Harkey, G. A., Van Hoof, P. L., and Landrum, P. F. 1995. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**(9): p. 1551-1560.
59. Raoux, C., Boyona, J. M., Miquel, J. C., Teyssie, J. L., Fowler, S. W., and Albaiges, J. 1999. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **48**(5): p. 605-616.
60. Dachs, J., Bayona, J. M., Raoux, C., and Albaiges, J. 1997. *Environmental Science and Technology* **31**(3): p. 682-688.
61. Buhler, D. R. and Williams, D. E. 1989 *Enzymes Involved in Metabolism of Pah by Fishes and Other Aquatic Animal: Oxidatives Enzymes (or Phase I Enzymes).* in *Metabolism of Pah in the Aquatic Environment*, Varanasi, U., Editor CRC: Boca Raton, FL, USA. p. 151-184.
62. Stegeman, J. J. and Lech, J. J. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 101-109.
63. MacDonald R W, Barrie LA, Bidleman TF, Diamond ML, Gregor DJ, Semkin RG, Strachan WMJ, Li YF, Wania F, Alae M, Alexeeva LB, Backus SM, Bailey, R., Bewers, J., Gobeil, C., Halsall, C. J., Harner, T., Hoff, J. T., Jantunen, L. M. M., Lockhart, W. L., Mackay, D., Muir, D. C. G., Pudykiewicz, J., Reimer, K. J., Smith, J. N., Stern, G. A., Schroeder, W. H., Wagemann, R., and Yunker, M. B. 2000. *Science of the Total Environment* **254**(2-3): p. 93-234.
64. van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): p. 57-149.
65. Hellou, J. and Leonard, J. 2004. *Polycyclic Aromatic Compounds* **24**(4-5): p. 697-712.
66. Law, R. J., Kelly, C. A., Graham, K. L., Woodhead, R. J., Dyrinda, P. E. J., and Dyrinda, E. A. *Hydrocarbons and Pah in Fish and Shellfish from Southwest Wales Following the Sea Empress Oil Spill in 1996.* in *2005 International Oil Spill Conference, IOSC 2005.* 2005. Miami Beach, FL.

67. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J. F., Burgeot, T., Michel, X., and Bellocq, J. 1999. *Marine Environmental Research* **47**(5): p. 415-439.
68. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T., and Bellocq, J. 1998. *Marine Pollution Bulletin* **36**(12): p. 951-960.
69. Nakata, H., Sakai, Y., Miyawaki, T., and Takemura, A. 2003. *Environmental science & technology* **37**(16): p. 3513-3521.
70. Lotufo, G. R. and Landrum, P. F. 2002. *Aquatic Toxicology* **58**(3-4): p. 137-149.
71. Baussant, T., Sanni, S., Skadsheim, A., Jonsson, G., Børseth, J. F., and Gaudebert, B. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(6): p. 1185-1195.
72. Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., and Børseth, J. F. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(6): p. 1175-1184.
73. Keith, L. H. and Telliard, W. A. 1979. *Environ Sci Technol* **13**: p. 416-423.
74. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Vol 32*. 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
75. Landahl, J. T., McCain, B. B., Myers, M. S., Rhodes, L. D., and Brown, D. W. 1990. *Environmental health perspectives* **89**: p. 195-203.
76. PSWQAT. 2000.
77. Gmur, D. J. and Varanasi, U. 1982. *Carcinogenesis* **3**(12): p. 1397-1403.
78. Hellou, J., Leonard, J., Meade, J., Sharpe, S., Banoub, J. H., Papiernik, S., Eglington, L., and Whelan, J. 1999. *Polycyclic Aromatic Compounds* **14/15**: p. 221-230.
79. Krahn, M. M., Brown, D. W., Collier, T. K., Firedman, A. J., Jenkins, R. G., and Malins, D. C. 1980. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2**(4): p. 233-246.
80. Krahn, M. M. and Malins, D. C. 1982. *Journal of Chromatography A* **248**(1): p. 99-107.
81. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1981. *Aquatic Toxicology* **1**(1): p. 49-67.
82. Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W. L., and Le Eberhart, B. T. 1986. *Cancer Research* **46**(8): p. 3817-3824.
83. Yu, Y., Wade, T. L., Fang, J., McDonald, S., and Brooks, J. M. 1995. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **29**(2): p. 241-246.
84. Steward, A. R., Kandaswami, C., Chidambaram, S., Ziper, C., Rutkowski, J. P., and Sikka, H. C. 1990. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**: p. 1503-1512.
85. Van der Weiden, M. E. J., Hanegraaf, F. H. M., Eggens, M. L., Celander, M., Seinen, W., and Van den Berg, M. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(5): p. 797-802.
86. Celander, M., Naf, C., Broman, D., and Forlin, L. 1994. *Aquatic Toxicology* **29**(3-4): p. 183-196.

87. Inzunza, B., Orrego, R., Penalosa, M., Gavilan, J. F., and Barra, R. 2006. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(2): p. 242-251.
88. Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., and Reis-Henriques, M. A. 2006. *Marine Environmental Research* **61**(3): p. 326-338.
89. Ortiz-Delgado, J. B. and Sarasquete, C. 2004. *Journal of Molecular Histology* **35**(1): p. 29-45.
90. Gorbi, S. and Regoli, F. 2004. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): p. 511-515.
91. Budzinski, H., Maze?as, O., Tronczynski, J., De?saunay, Y., Bocquene, G., and Claireaux, G. 2004. *Aquatic Living Resources* **17**(3 SPEC. ISS.): p. 329-334.
92. Stephensen, E., Adolfsson-Erici, M., Celander, M., Hulander, M., Parkkonen, J., Hegelund, T., Sturve, J., Hasselberg, L., Bengtsson, M., and Förlin, L. 2003. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* **22**(12): p. 2926-2931.
93. Jewett, S. C., Dean, T. A., Woodin, B. R., Hoberg, M. K., and Stegeman, J. J. 2002. *Marine Environmental Research* **54**(1): p. 21-48.
94. Hawkins, S. A., Billiard, S. M., Tabash, S. P., Brown, R. S., and Hodson, P. V. 2002. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(9): p. 1845-1853.
95. Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., and Andersen, O. K. 2000. *Aquatic Toxicology* **51**(2): p. 241-258.
96. Collier, T. K., Anulacion, B. F., Stein, J. E., Goksoyr, A., and Varanasi, U. 1995. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**(1): p. 143-152.
97. Collier, T. K., Anulacion, B. F., Goksoyr, A., Grunwald, C., Wirgin, I., and Varanasi, U. 1995. *Marine Environmental Research* **39**(1): p. 348-348.
98. Livingstone, D. R. 1998. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **120**(1): p. 43-49.
99. Lee, J. H. and Landrum, P. F. 2006. *Environmental Science and Technology* **40**(4): p. 1350-1357.
100. Rewitz, K. F., Styrrishave, B., Løbner-Olesen, A., and Andersen, O. 2006. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **143**(4): p. 363-381.
101. Fragoso, N. M., Hodson, P. V., and Zambon, S. 2006. *Environmental Monitoring and Assessment* **116**(1-3): p. 481-511.
102. Li, B., Bisgaard, H. C., and Forbes, V. E. 2004. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**(2): p. 510-517.
103. Sparagano, O., Sage, T., Fossi, M. C., Lari, L., Child, P., Savva, D., Depledge, M., Bamber, S., and Walker, C. 1999. *Biomarkers* **4**(3): p. 203-213.
104. Vasquez, M., Heffernan, L. M., Zinn, R. R., Mayeaux, M. H., and Winston, G. W. 1996. *FASEB Journal* **10**(6).

105. Harvey, R. G., Dai, Q., Ran, C., Lim, K., Blair, I., and Penning, T. M. 2005. *Polycyclic Aromatic Compounds* **25**(5): p. 371-391.
106. Harvey, R. G., Dai, Q., Ran, C., and Penning, T. M. 2004. *Journal of Organic Chemistry* **69**(6): p. 2024-2032.
107. Penning, T. M., Palackal, N. T., Blair, I. A., and Harvey, R. G. 2002. *Polycyclic Aromatic Compounds* **22**(3-4): p. 791-800.
108. Harvey, R. G., Penning, T. M., Jarabak, J., and Zhang, F. J. 1999. *Polycyclic Aromatic Compounds* **16**(1-4): p. 13-20.
109. Bucheli, T. D. and Fent, K. 1995. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **25**: p. 201-268.
110. Narbonne, J. F., Garrigues, P., Ribera, D., Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., Salaun, J. P., and Lafaurie, M. 1991. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **100**(1-2): p. 37-42.
111. Stroomberg, G. J., Zappey, H., Steen, R. J. C. A., van Gestel, C. A. M., Ariese, F., Velthorst, N. H., and van Straalen, N. M. 2004. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **138**(2): p. 129-137.
112. Stephensen, E., Adolfsson-erici, M., and Forlin, L. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1): p. 395-396.
113. Willett, K. L., Gardinali, P. R., Lienesch, L. A., and Di Giulio, R. T. 2000. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **58**(1): p. 68-76.
114. Willett, K., Rogers, J., and Di Giulio, R. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1): p. 67-68.
115. Van der Oost, R., Van Gestel, L., Worst, D., Hanraads, M., Satumalay, K., Van Schooten, F. J., Heida, H., and Vermeulen, N. P. E. 1994. *Chemosphere* **29**(4): p. 801-817.
116. Van Der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., and Vermeulen, N. P. E. 1996. *Aquatic Toxicology* **36**(3-4): p. 189-222.
117. Van Lipzig, M. M. H., Vermeulen, N. P. E., Gusinu, R., Legler, J., Frank, H., Seidel, A., and Meerman, J. H. N. 2005. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**(1): p. 41-55.
118. Van Der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A., and Vermeulen, N. P. E. 1991. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **100**(1-2): p. 43-47.
119. Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., and Sylvestre, S. 2002. *Organic Geochemistry* **33**(4): p. 489-515.
120. Van Der Oost, R., Vindimian, E., Van Den Brink, P. J., Satumalay, K., Heida, H., and Vermeulen, N. P. E. 1997. *Aquatic Toxicology* **39**(1): p. 45-75.
121. Varanasi, U., Collier, T. K., Williams, D. E., and Buhler, D. R. 1986. *Biochemical Pharmacology* **35**(17): p. 2967-2971.
122. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1980. *Biochemical Pharmacology* **29**(5): p. 753-761.

123. Varanasi, U., Reichert, W. L., and Stein, J. E. 1989. *Cancer Research* **49**(5): p. 1171-1177.
124. Yuan, Z.-X., Honey, S. A., Kumar, S., and Sikka, H. C. 1999. *Aquatic Toxicology* **45**(1): p. 1-8.
125. Pangrekar, J., Kole, P. L., Honey, S. A., Kumar, S., and Sikka, H. C. 2003. *Aquatic Toxicology* **64**(4): p. 407-418.
126. Kleinow, K. M., James, M. O., Tong, Z., and Venugopalan, C. S. 1998. *Environmental Health Perspectives* **106**(3): p. 155-166.
127. Leonard, J. D. and Hellou, J. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): p. 618-623.
128. Varanasi, U., Stein, J. E., and Hom, T. 1981. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **103**(2): p. 780-787.
129. Hellou, J., Banoub, J. H., and Payne, J. F. 1986. *Chemosphere* **15**(6): p. 787-793.
130. Pritchard, J. B. and Renfro, J. L. 1984. *Interactions of Xenobiotics with Teleost Renal Function.*, in *Aquatic Toxicology*, LJ, W., Editor Raven Press: New York. p. 51.
131. Johnson, L., Casillas, E., Sol, S., Collier, T., Stein, J., and Varanasi, U. 1993. *Marine Environmental Research* **35**(1): p. 165-170.
132. Johnson, L. L., Landahl, J. T., Kubin, L. A., Horness, B. H., Myers, M. S., Collier, T. K., and Stein, J. E. 1998. *Journal of Sea Research* **39**(1): p. 125-137.
133. Johnson, L. L., Stein, J. E., Collier, T. K., Casillas, E., and Varanasi, U. 1994. *The Science of the Total Environment* **141**(1): p. 241-260.
134. Johnson, L. L., Collier, T. K., and Stein, J. E. 2002. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **12**(5): p. 517-538.
135. Arkoosh, M., Casillas, E., Clemons, E., Huffman, P., Kagley, A., Collier, T., and Stein, J. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 470-471.
136. Myers, M. S., French, B. L., Reichert, W. L., Willis, M. L., Anulacion, B. F., Collier, T. K., and Stein, J. E. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 197-202.
137. Arkoosh, M. R., Clemons, E., Huffman, P., Sanborn, H. R., Casillas, E., and Stein, J. E. 1996. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(7): p. 1154-1162.
138. Stein, J. E., Reichert, W. L., Nishimoto, M., and Varanasi, U. *32p-Postlabeling of DNA: A Sensitive Method for Assessing Environmentally Induced Genotoxicity*. 1989. Seattle, WA, USA: Publ by IEEE.
139. Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L. L., Rhodes, L. D., Collier, T. K., Stein, J. E., McCain, B. B., and Varanasi, U. 1991. *Marine Environmental Research* **31**(2): p. 99-122.
140. Reynaud, S. and Deschaux, P. 2006. *Aquatic Toxicology* **77**(2): p. 229-238.
141. Wang, X., Mu, J., Wang, S., Lin, J., and Hong, H. 2006. *Aquatic Ecosystem Health and Management* **9**(1): p. 49-53.

142. Lyons, B. P., Stewart, C., and Kirby, M. F. 1999. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **446**(1): p. 111-119.
143. Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., and Nishimura, S. 1987. *Nature* **327**(1): p. 77-79.
144. Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L. A. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**(1): p. 166-172.
145. Akcha, F., Burgeot, T., Budzinski, H., Pfohl-Leszkowicz, A., and Narbonne, J. F. 2000. *Marine Ecology Progress Series* **205**: p. 195-206.
146. Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., and Narbonne, J. F. 2000. *Aquatic Toxicology* **49**(4): p. 269-287.
147. Malins, D. C., Anderson, K. M., Stegeman, J. J., Jaruga, P., Green, V. M., Gilman, N. K., and Dizdaroglu, M. 2006. *Environmental Health Perspectives* **114**(6): p. 823-829.
148. Akcha, F., Vincent Hubert, F., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2003. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **534**(1-2): p. 21-32.
149. Dunn, B. P., Black, J. J., and Maccubbin, A. 1987. *Cancer Res* **47**(24_Part_1): p. 6543-6548.
150. Varanasi, U., Reichert, W. L., Le Eberhart, B. T., and Stein, J. E. 1989. *Chemico-Biological Interactions* **69**(2-3): p. 203-216.
151. Akcha, F., Leday, G., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2004. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **552**(1-2): p. 197-207.
152. Phillips, D. H., Schoket, B., Hewer, A., and Grover, P. L. 1990. *IARC scientific publications*(104): p. 223-229.
153. Hall, M. and Grover, P. L. 1988. *Chemico-Biological Interactions* **64**(3): p. 281-296.
154. Camus, A. M., Pyerin, W. G., and Grover, P. L. 1980. *Chemico-Biological Interactions* **32**(3): p. 257-265.
155. Ahokas J T and Pelkonen O. 1984. *Marine Environmental Research* **14**(1-4): p. 59-69.
156. Varanasi, U., Stein, J., Nishimoto, M., Reichert, W., and Collier, T. 1987. *Environ Health Perspective* **71**: p. 155-170.
157. Sikka, H. C., Steward, A. R., Kandaswami, C., Rutkowski, J. P., Zaleski, J., Kumar, S., Earley, K., and Gupta, R. C. 1991. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **100**(1-2): p. 25-28.
158. Frenzilli, G., Scarcelli, V., Barga, I. D., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., and Sturve, J. 2004. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **552**(1-2): p. 187-195.
159. Brown, J. S. and Steinert, S. A. 2004. *Ecological Indicators* **3**(4): p. 263-274.
160. Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., and Monks, T. J. 2000. *Chemical Research in Toxicology* **13**(3): p. 135-160.

161. Memisoglu, A. and Samson, L. 2000. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **451**(1-2): p. 39-51.
162. IPCS. *Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. in *International Programme on Chemical Safety*. 1998. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
163. Oris, J. T. and Giesy Jr, J. P. 1987. *Chemosphere* **16**(7): p. 1395-1404.
164. Kennedy, C. J. and Farrell, A. P. 2005. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **323**(1): p. 43-56.
165. Haakkinen, J., Vehniäinen, E., and Oikari, A. 2004. *Aquatic Toxicology* **66**(4): p. 393-404.
166. Vehniäinen, E. R., Haakkinen, J., and Oikari, A. 2003. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(12): p. 2995-3000.
167. Luckenbach, T., Ferling, H., Gernhofer, M., Köhler, H. R., Negele, R. D., Pfefferle, E., and Triebkorn, R. 2003. *Aquatic Toxicology* **65**(1): p. 39-54.
168. Wernersson, A. S. 2003. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **54**(3): p. 355-365.
169. Wertheimer, A. C., Heintz, R. A., Thedinga, J. F., Maselko, J. M., Celewycz, A., Bradshaw, R. F., and Rice, S. D. 1999. *Exxon Valdez Oil Spill Restoration Project Final Report*(REPORT98076).
170. Spehar, R. L., Poucher, S., Brooke, L. T., Hansen, D. J., Champlin, D., and Cox, D. A. 1999. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**(4): p. 496-502.
171. Holladay, S. D., Hart, L. J., Smith, S. A., Besteman, E. G., Deyab, A., Gogal, R. M., Hrubec, T., and Ahmed, S. A. 1996. *Fundamental and Applied Toxicology* **30**(1): p. 342.
172. Sved, D. W. and Roberts Jr, M. H. 1995. *Water Research* **29**(4): p. 1169-1177.
173. McCloskey, J. T. and Oris, J. T. 1993. *Aquatic Toxicology* **24**(3-4): p. 207-218.
174. Roberts Jr, M. H., Hargis Jr, W. J., Strobel, C. J., and De Lisle, P. F. 1989. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **42**(1): p. 142-149.
175. US-EPA, *Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. *Epa/600/R-93/089*, in *Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office*. 1993, Environmental Protection Agency: Cincinnati, Ohio, USA.
176. Kalberlah F, Frijus-Plessen N, and Hassauer M. 1995. *Atlasten-Spektrum* **5**: p. 231-237.
177. Nisbet ICT and LaGoy PK. 1992. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **16**: p. 290-300.
178. Baars AJ, *Update of the Human Health-Based Maximum Permissible Risk (Mpr) for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, n°7059A00., R.-C.a.r., Editor. 2000, National Institute of Public Health and the Environment: Bilthoven, the Netherlands.
179. McCauley DJ, DeGraeve GM, and Linton TK. 2000. *Environmental Science & Policy* **3**: p. 133-144.

180. Long ER, MacDonald DD, Severn CG, and Hong CB. 2000. *Environmental Toxicological Chemistry* **19**(10): p. 2598-2601.
181. Long ER and Morgan LG, *Potential for Biological Effects of Sediment-Sorbed Contaminants Tested in the National Status and Trends Program.*, in *National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA/TM/NOS/OMA-52.*, Editor. 1990: Springfield, USA. p. 232p.
182. Di Toro DM, Mahony JD, Hansen DJ, Scott KJ, Carlson AR, and Ankley GT. 1992. *Environ Sci Technol* **26**: p. 96-101.
183. Di Toro DM, Zarba CS, Hansen DJ, Berry WJ, Swartz RC, Cowan CE, Pavlou SP, Allen HE, Thomas NA, and Paquin PR. 1991. *Environ Toxicol Chem.* **10**: p. 1541-1583.
184. Long ER, Field LJ, and MacDonald DD. 1998. *Environmental Toxicological Chemistry* **17**(4): p. 714-727.
185. Chapman PM, Wang F, Janssen C, Persoone G, and Allen HE. 1998. *Canadian Journal of fish Aquatic Science* **55**: p. 2212-2243.
186. Miller BS, Pine DJ, and Redshaw CJ. 2000. *Marine Pollution Bulletin* **40**: p. 22-34.
187. Woodhead RJ, Law R, and Matthiessen J. 1999. *Marine Pollution Bulletin* **38**(9): p. 773-790.
188. Krahn, M. M., Burrows, D. G., MacLeod, W. D., and Malins, D. 1987. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**(5): p. 511-522.
189. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Racine, R. N. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(5): p. 707-715.
190. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 225-228.
191. Gourlay, C., Miege, C., Garric, J., Tusseau-Vuillemin, M.-H., and Mouchel, J.-M. 2002. *Polycyclic Aromatic Compounds* **22**: p. 501-516.
192. Weeks, S., Gilles, S., Dobson, R., Senne, S., and D'Silva, A. P. 1990. *Analytical chemistry* **62**(14): p. 1472-1477.
193. Ariese, F., Gooijer, C., Velthorst, N. H., and Hofstraat, J. W. 1990. *Analytica Chimica Acta* **232**: p. 245-251.
194. Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Hoornweg, G. P., Gooijer, C., Velthorst, N. H., and Hofstraat, J. W. 1993. *Anal. Chem.* **65**(8): p. 1100-1106.
195. Kozin, I., Gooijer, C., Velthorst, N. H., Hellou, J., and Zitko, V. 1996. *Chemosphere* **33**(8): p. 1435-1447.
196. Kozin, I. S., Gooijer, C., and Velthorst, N. H. 1996. *Analytica Chimica Acta* **333**(3): p. 193-204.
197. Kuijt, J., Garcia-Ruiz, C., Stroomberg, G. J., Marina, M. L., Ariese, F., Brinkman, U. A. T., and Gooijer, C. 2001. *Journal of Chromatography A* **907**(1-2): p. 291-299.

198. Smith, C. J., Grainger, J., and Patterson, D. G. 1998. *Journal of Chromatography A* **803**(1): p. 241-247.
199. Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A., Toriba, A., and Hayakawa, K. 2000. *Analyst* **125**: p. 1555-1559.
200. Krahn, M. M., Moore, L. K., and McLeod, W. D., *Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1986 : Metabolites of Aromatic Compounds in Fish Bile.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1986, NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-102.
201. Krahn, M. M., Myers, M. S., Burrows, D. G., and Malins, D. C. 1984. *Xenobiotica* **14**(8): p. 633-646.
202. Krahn, M. M., Rhodes, L. D., Myers, M. S., Moore, L. K., MacLeod, W. D., and Malins, D. C. 1986. *Archives of environmental contamination and toxicology* **15**(1): p. 61-67.
203. Steward, A. R., Zaleski, J., and Sikka, H. C. 1990. *Chemico-Biological Interactions* **74**(1-2): p. 119-138.
204. Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W. L., and Andersen, O. K. 2001. *Marine Environmental Research* **52**(3): p. 213-229.
205. Jonsson, G., Sundt, R. C., Aas, E., and Beyer, J. 2004. *Chemosphere* **56**(1): p. 81-90.
206. McDonald, S. J., Kennicutt II, M. C., and Brooks, J. M. 1992. *Marine Pollution Bulletin* **25**(9-12): p. 313-317.
207. Gagnon, M. M. and Holdway, D. A. 2000. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **38**(1): p. 70-77.
208. Jonsson, G., Beyer, J., Wells, D., and Ariese, F. 2003. *J. Environ. Monit.* **5**: p. 513-520.
209. Deshpande, A. D. 1989. *Archives of environmental contamination and toxicology* **18**(6): p. 900-907.
210. Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N. H., and Hofstraat, J. W. 1993. *Aquatic Toxicology* **26**(3-4): p. 273-286.
211. Escartin, E. and Porte, C. 1999. *Environ Sci Technol* **33**: p. 2710-2714.
212. Escartin, E. and Porte, C. 1999. *Eviron. Sci. Technol.* **33**: p. 406-409.
213. Upshall, C., Payne, J. F., and Hellou, J. 1993. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**: p. 2105-2112.
214. Solbakken, J. E., Palmork, K. H., Neppelberg, T., and Scheline, R. R. 1980. *acta pharmacol. et toxicol.* **46**: p. 127-132.
215. Stein, J. E., Hom, T., and Varanasi, U. 1984. *Marine Environmental Research* **13**(2): p. 97-119.
216. Hellou, J. and Payne, J. F. 1987. *Environmental Toxicology and Chemistry* **6**: p. 857-862.

217. Law, F. C. P., Meng, J. X., He, Y. T., and Chui, Y. C. 1994. *Xenobiotica* **24**(3): p. 221-229.
218. Lee, R. F. 1989. *Marine Environmental Research* **28**(1-4): p. 93-97.
219. Ariese, F., Beyer, J., and Wells, D., *Preparation and Certification of Fish Bile Reference Materials for Exposure Monitoring of Pahs in the Aquatic Environment, 2nd Progress Report, W-00/07, R., Editor. 2000, Institute for Environmental Studies/IVM: Amsterdam, the Netherlands.*
220. Schanke, A. v., Holtz, F., der Meer, J. v., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., den Berg, M. v., and Everaarts, J. M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): p. 1641-1647.
221. Richardson, D. M., Davies, I. M., Moffat, C. F., Pollard, P., and Stag, R. M. 2001. *J Environ Monit* **3**(6): p. 610-615.
222. Ruddock, P. J., Bird, D. J., and McCalley, D. V. 2002. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**(2): p. 97-105.
223. Ruddock, P. J., Bird, D. J., McEvoy, J., and Peters, L. D. 2003. *The Science of The Total Environment* **301**(1-3): p. 105-117.
224. Jonsson, G., Taban, I. C., Jorgensen, K. B., and Sundt, R. C. 2004. *Chemosphere* **54**(8): p. 1085-1097.
225. EPA Method 3545, *Pressurized Fluid Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste. July 1995, US EPA: Washington, DC.*
226. Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J. U., and Goksoyr, A. 1996. *Aquatic Toxicology* **36**(1-2): p. 75-98.
227. Fillmann, G., Watson, G. M., Francioni, E., Readman, J. W., and Depledge, M. H. 2002. *Marine Environmental Research* **54**(3-5): p. 823-828.
228. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 2000. *Biomarkers* **5**(1): p. 9-23.
229. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Torsella, J. A. 1996. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **35**(1): p. 16-23.
230. Van der Oost, R., Van Schooten, F.-J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K., and Vermeulen, N. P. E. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(6): p. 859-870.
231. Paine, M. D., Chapman, P. M., Allard, P. J., Murdoch, M. H., and Minifie, D. 1996. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(11): p. 2003-2018.
232. Eggens, M. L., Opperhuizen, A., and Boon, J. P. 1996. *Chemosphere* **33**(8): p. 1579-1596.
233. Barra, R., Sanchez-Hernandez, J. C., Orrego, R., Parra, O., and Gavilan, J. F. 2001. *Chemosphere* **45**(4-5): p. 439-444.
234. Aas, E. and Klungsoyr, J. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 229-232.
235. Ahmad, I., Pacheco, M., and Santos, M. A. 2004. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**(3): p. 290-302.

236. Gagnon, M. M. and Holdway, D. A. 2002. *Marine Pollution Bulletin* **44**(3): p. 230-237.
237. Beyer, J., Aas, E., Borgenvik, H. K., and Ravn, P. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 233-236.
238. Santana Rodriguez, J. J. and Miller, J. N. 1998. *Analyst* **123**(11).
239. Ferrari, S., Mandel, F., and Berset, J. D. 2002. *Chemosphere* **47**(2): p. 173-182.
240. Elovaara, E., Mikkola, J., Makela, M., Paldanius, B., and Priha, E. 2006. *Toxicology Letters* **162**: p. 158-163.
241. Vuontisjärvi, H., Keinänen, M., Vuorinen, P. J., and Peltonen, K. 2004. *Polycycl. Aromat. Compd.* **24**: p. 333-342.
242. Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., and Forlin, L. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1): p. 439-439.
243. Seubert, J. M. and Kennedy, C. J. 2000. *Archives of environmental contamination and toxicology* **38**(3): p. 342-349.
244. Hellou, J. and Payne, J. F. 1986. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology* **84**(2): p. 257-261.
245. Mazéas, O. and Budzinski, H. 2005. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**(6): p. 985-990.
246. Krahn, M. M., Burrows, D. G., Ylitalo, G. M., Brown, D. W., Wigren, C. A., Collier, T. K., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1992. *Environ Sci Technol* **26**: p. 116-126.
247. Krahn, M. M., Ylitalo, G. M., Buzitis, J., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1993. *Journal of Chromatography A* **642**(1-2): p. 15-32.
248. Porte, C., Escartín, E., Garcí?a de la Parra, L. M., Biosca, X., and Albaige?s, J. 2002. *Marine Ecology Progress Series* **235**: p. 205-216.
249. Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., Andre, F., and Rychen, G. 2005. *Journal of analytical toxicology* **29**(3): p. 175-181.
250. Maisonnette, C., Simon, P., Hennion, M. C., and Pichon, V. 2006. *Journal of Chromatography A* **1120**(1): p. 185-193.
251. Munoz-Olivas, R. 2004. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **23**(3): p. 203-216.
252. Romanoff, L. C., Li, Z., Young, K. J., Blakely Iii, N. C., Patterson, J. D. G., and Sandau, C. D. 2006. *Journal of Chromatography B* **835**(1-2): p. 47-54.
253. Van de Wiele, T. R., Peru, K. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D., and Headley, J. V. 2004. *Journal of Chromatography B* **806**(2): p. 245-253.
254. Simpson, C. D., Cullen, W. R., He, T. Y. T., Ikonomou, M., and Reimer, K. J. 2002. *Chemosphere* **49**(3): p. 315-322.

255. Clonfero, E., Jongeneelen, F., Zordan, M., and Levis, A. G. 1990. *IARC scientific publications*(104): p. 215-222.
256. Jongeneelen, F. J., Bos, R. P., and Anzion, R. B. M. 1986. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* **12**(2): p. 137-143.
257. Siwin?ska, E., Mielzyn?ska, D., Bubak, A., and Smolik, E. 1999. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **445**(2): p. 147-153.
258. Li, K., Woodward, L. A., Karu, A. E., and Li, Q. X. 2000. *Analytica Chimica Acta* **419**(1): p. 1-8.
259. Varanasi, U., Uhler, M., and Stranahan, S. I. 1978. *Toxicology and Applied Pharmacology* **44**(2): p. 277-289.
260. Hyötyläinen, T. and Oikari, A. 1999. *Ecotoxicology and environmental safety* **44**(3): p. 253-258.
261. Ahokas, J. T., Pelkonen, O., and Karki, N. T. 1977. *Cancer Research* **37**(10): p. 3737-3743.
262. Ahokas, J. T., Saarni, H., Nebert, D. W., and Pelkonen, O. 1979. *Chemico-Biological Interactions* **25**(1): p. 103-111.
263. Egaas, E. and Varanasi, U. 1982. *Biochemical Pharmacology* **31**(4): p. 561-566.
264. Goksoyr, A., Solbakken, J. E., and Klungsoyr, J. 1986. *Chemico-Biological Interactions* **60**(3): p. 247-263.
265. Fernandes, D., Potrykus, J., Morsiani, C., Raldua, D., Lavado, R., and Porte, C. 2002. *Environmental Research* **90**(2): p. 169-178.
266. Stroomberg, G. J., Reuther, C., Kozin, I., van Brummelen, T. C., van Gestel, C. A. M., Gooijer, C., and Cofino, W. P. 1996. *Chemosphere* **33**(10): p. 1905-1914.
267. Christensen, M., Andersen, O., and Banta, G. T. 2002. *Aquatic Toxicology* **58**(1-2): p. 15-25.
268. Kolok, A. S., Huckins, J. N., Petty, J. D., and Oris, J. T. 1996. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(10): p. 1752-1759.
269. Siwinska, E., Mielzynska, D., Bubak, A., and Smolik, E. 1999. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **445**(2): p. 147-153.
270. Lee, C.-K., Cho, S.-H., Kang, J.-W., Lee, S.-J., Ju, Y.-S., Sung, J., Strickland, P. T., and Kang, D. 1999. *Toxicology Letters* **108**(2-3): p. 209-215.
271. Andreoli, R., Manini, P., Bergamaschi, E., Mutti, A., Franchini, I., and Niessen, W. M. A. 1999. *Journal of Chromatography A* **847**(1): p. 9-17.
272. Gündel, J. and Angerer, J. 2000. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **738**(1): p. 47-55.
273. Gmeiner, G., Krassnig, C., Schmid, E., and Tausch, H. 1998. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **705**(1): p. 132-138.

274. Gmeiner, G., Gartner, P., Krassnig, C., and Tausch, H. 2002. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **766**(2): p. 209-218.
275. Jacob, J. and Grimmer, G. 1988. *Review of Analytical Chemistry* **9**: p. 49-89.
276. Evershed, R. P. 1993 *Advances in Silylation*, in *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Blau, K. and Halket, J., Editors John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK. p. 51-108.
277. Day, B. W., Naylor, S., Gan, L. S., Sahali, Y., Nguyen, T. T., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. 1991. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **562**(1): p. 563-571.
278. Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A., and Guglielmetti, G. 2004. *Biodegradation* **15**(2): p. 79-85.
279. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1996. *Journal of Chromatography A* **731**(1-2): p. 75-84.
280. Fan, R., Dong, Y., Zhang, W., Wang, Y., Yu, Z., Sheng, G., and Fu, J. 2006. *Journal of Chromatography B* **836**(1-2): p. 92-97.
281. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1994. *Journal of Chromatography A* **683**(1): p. 9-19.
282. Oehme, M., Berger, U., Brombacher, S., Kuhn, F., and Kolliker, S. 2002. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**(5): p. 322-331.
283. Ramakrishna, N. V. S., Vishwottam, K. N., Puran, S., Manoj, S., Santosh, M., Wishu, S., Koteswara, M., Chidambara, J., Gopinadh, B., and Sumatha, B. 2004. *Journal of Chromatography B* **805**(1): p. 13-20.
284. Pommier, F. and Frigola, R. 2003. *Journal of Chromatography B* **784**(2): p. 301-313.
285. Constanzer, M. L., Chavez, C. M., and Matuszewski, B. K. 1997. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15**(7): p. 1001-1008.
286. Le Dù - Lacoste M, Wessel N, Augagneur S, Le Menach K, Pardon P, Akcha F, and Budzinski H. Submitted. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*.
287. Le Dù - Lacoste M and Budzinski H. Submitted. *Anal Bioanal Chem*.
288. Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y., and Ren, Y. 2007. *Journal of Chromatography A* **1142**(2): p. 194-198.
289. Yu, K., Di, L., Kerns, E., Li, S. Q., Alden, P., and Plumb, R. S. 2007. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**(6): p. 893-902.
290. Wang, X., Zhao, T., Gao, X., Dan, M., Zhou, M., and Jia, W. 2007. *Analytica Chimica Acta* **594**(2): p. 265-273.
291. Wang, J., Pang, X., Ge, F., and Ma, Z. 2007. *Toxicol* **49**(8): p. 1120-1128.
292. Stephanson, N., Helander, A., and Beck, O. 2007. *Journal of Mass Spectrometry* **42**(7): p. 940-949.

293. Pedraglio, S., Rozio, M. G., Misiano, P., Reali, V., Dondio, G., and Bigogno, C. 2007. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **44**(3 SPEC. ISS.): p. 665-673.
294. Liu, M., Li, Y., Chou, G., Cheng, X., Zhang, M., and Wang, Z. 2007. *Journal of Chromatography A* **1157**(1-2): p. 51-55.
295. Kaufmann, A. 2007. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**(13): p. 2003-2013.
296. Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., and Guwy, A. J. 2007. *Journal of Chromatography A* **1161**(1-2): p. 132-145.
297. Hsieh, Y., Duncan, C. J. G., Lee, S., and Liu, M. 2007. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **44**(2): p. 492-497.
298. Richardson, D. M., Gubbins, M. J., Davies, I. M., Moffat, C. F., and Pollard, P. M. 2004. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **17**(2): p. 79-85.
299. Dennerly, P. A. 2004. *Antioxidants and Redox Signaling* **6**(1): p. 147-153.
300. Wolkers, J., Jørgensen, E. H., Nijmeijer, S. M., and Witkamp, R. F. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 117-120.
301. Jørgensen, E. H., Burkow, I. C., Foshaug, H., Killie, B., and Ingebrigtsen, K. 1997. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **118**(3): p. 311-318.
302. van den Hurk, P. 2006. *Aquatic Toxicology* **77**(2): p. 202-209.
303. Schober, W., Luch, A., Soballa, V. J., Raab, G., Stegeman, J. J., Doehmer, J., Jacob, J., and Seidel, A. 2006. *Chemico-Biological Interactions* **161**(1): p. 37-48.
304. Jacob, J., Schmoldt, A., and Grimmer, G. 1982. *Archives of Toxicology* **51**(3): p. 255-265.
305. Jacob, J., Schmoldt, A., and Grimmer, G. 1982. *Toxicology* **25**(4): p. 333-343.
306. Jacob, J., Grimmer, G., Raab, G., and Schmoldt, A. 1982. *Xenobiotica* **12**(1): p. 45-53.
307. Jacob, J., Schmoldt, A., and Grimmer, G. 1981. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **362**(8): p. 1021-1030.
308. Grimmer, G., Jacob, J., Naujack, K. W., and Dettbarn, G. 1981. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie Labor und Betriebsverfahren* **309**(1): p. 13-19.
309. Schmoldt, A., Jacob, J., and Grimmer, G. 1981. *Cancer Letters* **13**(3): p. 249-257.
310. Jacob, J., Schmoldt, A., and Grimmer, G. 1981. *Carcinogenesis* **2**(5): p. 395-401.
311. Jacob, J., Grimmer, G., and Schmoldt, A. 1981. *Cancer Letters* **14**(2): p. 175-185.
312. Schmoldt, A., Jacob, J., and Grimmer, G. 1981. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **99**(3).
313. Schmoldt, A., Jacob, J., Rossbach, R., and Grimmer, G. 1981. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **316**(Suppl.): p. 68.

314. Thakker, D. R., Yagi, H., and Sayer, J. M. 1984. *Journal of Biological Chemistry* **259**(18): p. 11249-11256.
315. Walker, S. A., Whitten, L. B., Seals, G. B., Lee, W. E., Archibong, A. E., and Ramesh, A. 2006. *Food and Chemical Toxicology* **44**(3): p. 380-387.
316. Shen, Y. M., Troxel, A. B., Vedantam, S., Penning, T. M., and Field, J. 2006. *Chemical Research in Toxicology* **19**(11): p. 1441-1450.
317. Harrigan, J. A., Vezina, C. M., McGarrigle, B. P., Ersing, N., Box, H. C., Maccubbin, A. E., and Olson, J. R. 2004. *Toxicological Sciences* **77**(2): p. 307-314.
318. Dam, E., Styrisshave, B., Rewitz, K. F., and Andersen, O. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(3): p. 290-297.
319. Miranda, C. L., Chung, W. G., Wang-Buhler, J. L., Musafia-Jeknic, T., Baird, W. M., and Buhler, D. R. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(2): p. 101-108.
320. Mdegela, R., Myburgh, J., Correia, D., Braathen, M., Ejobi, F., Botha, C., Sandvik, M., and Skaare, J. U. 2006. *Ecotoxicology* **15**(1): p. 51-59.
321. Platt, K. L. and Grupe, S. 2005. *Chemical Research in Toxicology* **18**(4): p. 700-710.
322. Willett, K., Steinberg, M., Thomsen, J., Narasimhan, T. R., Safe, S., McDonald, S., Beatty, K., and Kennicutt, M. C. 1995. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **112**(1): p. 93-103.
323. Willett, K. L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., and Di Giulio, R. T. 2001. *Toxicology and Applied Pharmacology* **177**(3): p. 264-271.
324. Winter, M. J., Verweij, F., Garofalo, E., Ceradini, S., McKenzie, D. J., Williams, M. A., Taylor, E. W., Butler, P. J., van der Oost, R., and Kevin Chipman, J. 2005. *Aquatic Toxicology* **73**(4): p. 394-405.
325. Luthé, G., Stroomberg, G. J., Ariese, F., Brinkman, U. A. T., and van Straalen, N. M. 2002. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **12**(4): p. 221-229.
326. Solbakken, J. E. and Palmork, K. H. 1981. *Comparative Biochemistry And Physiology. C: Comparative Pharmacology* **70**(1): p. 21-26.
327. Solbakken, J. E., Palmork, K. H., Neppelberg, T., and Scheline, R. R. 1979. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **23**(1-2): p. 100-103.
328. Solbakken, J. E., Palmork, K. H., and Ingebrigtsen, K. 1984. *Marine Environmental Research* **14**(1-4): p. 446-447.
329. Solbakken, J. E. and Palmork, K. H. 1980. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **25**(6): p. 902-908.
330. Solbakken, J. E., Knap, A. H., and Palmork, K. H. 1982. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **28**(3): p. 285-289.
331. Solbakken, J. E., Ingebrigtsen, K., and Palmork, K. H. 1984. *Marine Biology* **83**(3): p. 239-246.

332. Goksoyr, A., Klungsoyr, J., and Solbakken, J. E. 1985. *Marine Environmental Research* **17**(2-4): p. 87-90.
333. Swain, L. and Melius, P. 1984. *Comparative Biochemistry And Physiology. C, Comparative Pharmacology And Toxicology* **79**(1): p. 151-158.
334. Malins, D. C. 1980. *Environ Sci Technol* **14**(1): p. 32-37.
335. Malins, D. C. and Hodgins, H. O. 1981. *Environ Sci Technol (Feature)* **15**(11): p. 1273-1280.
336. Statham, C., Melancon, M. J., and Lech, J. J. 1976. *Nature* **193**: p. 680-681.
337. Collier, T. K., Thomas, L. C., and Donald C. Malins. 1978. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **61**(1): p. 23-28.
338. Varanasi, U., Stein, J. E., Nishimoto, M., and Hom, T. *Benzo(a)Pyrene Metabolites in Liver, Muscle, Gonads and Bile of Adult English Sole (Parophrys Vetulus)*. in *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, International Symposium*. 1983. Columbus, OH, USA: Battelle Press.
339. Niimi, A. J. and Palazzo, V. 1986. *Water Research* **20**(4): p. 503-507.
340. Billiard, S. M., Bols, N. C., and Hodson, P. V. 2004. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**(3): p. 292-299.
341. Billiard, S. M., Hahn, M. E., Franks, D. G., Peterson, R. E., Bols, N. C., and Hodson, P. V. 2002. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **133**(1): p. 55-68.
342. Behrens, A., Schirmer, K., Bols, N. C., and Segner, H. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): p. 632-643.
343. Whyte, J. J., Karrow, N. A., Boermans, H. J., Dixon, D. G., and Bols, N. C. 2000. *Polycyclic Aromatic Compounds* **18**(1): p. 71-98.
344. Billiard, S. M., Hodson, P. V., and Bols, N. C. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 308-309.
345. Schirmer, K., Dixon, D. G., Greenberg, B. M., and Bols, N. C. 1998. *Toxicology* **127**(1-3): p. 129-141.
346. Basu, N., Billiard, S., Fragoso, N., Omoike, A., Tabash, S., Brown, S., and Hodson, P. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(6): p. 1244-1251.
347. Shailaja, M. S. and D'Silva, C. 2003. *Chemosphere* **53**(8): p. 835-841.
348. Karrow, N. A., Boermans, H. J., Dixon, D. G., Hontella, A., Solomon, K. R., Whyte, J. J., and Bols, N. C. 1999. *Aquatic Toxicology* **45**(4): p. 223-239.
349. Goksoyr, A., Husoy, A. M., Larsen, H. E., Klungsoyr, J., Wilhelmsen, S., Maage, A., Brevik, E. M., Andersson, T., Celander, M., Pesonen, M., and Forlin, L. 1991. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **21**(4): p. 486-496.

350. Krahn, M. M., Kittle, J. L. J., and MacLeod, J. W. D. 1986. *Marine Environmental Research* **20**(4): p. 291-298.
351. Stroomberg, G. J., de Knecht, J. A., Ariese, F., Van Gestel, C. A. M., and Velhorst, N. H. 1999. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(10): p. 2217-2224.
352. Eickhoff, C. V., Gobas, F., and Law, F. 2003. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(1): p. 59-66.
353. Neff, J. M. 1985 *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, in *Fundamentals of Aquatic Toxicology, Methods and Applications*, Pp. 416-454, Rand, G.M. and Petrocelli, S.R., Editors Hemisphere: New York. p. 666
354. Law, R. J., Dawes, V. J., Woodhead, R. J., and Matthiessen, P. 1997. *Marine Pollution Bulletin* **34**(5): p. 306-322.
355. Wenzel-Hartung, R., Brune, H., Grimmer, G., Germann, P., Timm, J., and Wosniok, W. 1990. *Experimental Pathology* **40**(4): p. 221-227.
356. Harvey, R. G. 1996. *Polycyclic Aromatic Compounds* **9**(1-4): p. 1-23.
357. Afshar, C. E., Carrell, C. J., Carrell, H. L., Harvey, R. G., Kiselyov, A. S., Amin, S., and Glusker, J. P. 1996. *Carcinogenesis* **17**(11): p. 2507-2511.
358. Kiselyov, A. S., Lee, H., and Harvey, R. G. 1995. *Journal of Organic Chemistry* **60**(19): p. 6123-6128.
359. Tang, X. Q. and Harvey, R. G. 1995. *Tetrahedron Letters* **36**(34): p. 6037-6038.
360. Glatt, H., Wameling, C., Elsberg, S., Thomas, H., Marquardt, H., Hewer, A., Phillips, D. H., Oesch, F., and Seidel, A. 1993. *Carcinogenesis* **14**(1): p. 11-19.
361. Grimmer, G., Brune, H., Dettbarn, G., Naujack, K. W., Mohr, U., and Wenzel-Hartung, R. 1988. *Cancer Letters* **43**(3): p. 173-177.
362. Pangrekar, J., Kandaswami, C., Kole, P., Kumar, S., and Sikka, H. C. 1995. *Marine Environmental Research* **39**(1-4): p. 51-55.
363. Nishimoto, M. and Varanasi, U. 1985. *Biochemical Pharmacology* **34**(2): p. 263-268.
364. Varanasi, U., Reichert, W. L., Stein, J. E., Brown, D. W., and Sanborn, H. R. 1985. *Eviron. Sci. Technol.* **19**: p. 836-841.
365. Varanasi, U., Nishimoto, M., and Stein, J. E. 1984. *Federation Proceedings* **43**(6).
366. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1981. *Aquatic Toxicology* **1**: p. 49-67.
367. Collier T. K., Anulacion B. F., Stein J. E., Goksøyr A., and Varanasi U. 1995. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**(1): p. 143-152.
368. Krahn, M. M., Collier, T. K., and Malins, D. C. 1982. *Journal of Chromatography A* **236**(2): p. 429-440.

369. Krahn, M. M., Schnell, J. V., Uyeda, M. Y., and MacLeod, J. W. D. 1981. *Analytical Biochemistry* **113**(1): p. 27-33.
370. Mannervik, B. 1985. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **57**: p. 357-417.
371. Varanasi, U., Eberhart, B. T., Nishimoto, M., and Reichert, W. 1985. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **VOL. 26**.
372. Spies, R. B., Stegeman, J. J., Hinton, D. E., Woodin, B., Smolowitz, R., Okihiro, M., and Shea, D. 1996. *Aquatic Toxicology* **34**(3): p. 195-219.
373. Eggens, M. L., Vethaak, A. D., Leaverz, M. J., Jean Horbach, G. J. M., Boon, J. P., and Seinen, W. 1996. *Chemosphere* **32**(7): p. 1357-1380.
374. Mazéas, O., Budzinski, H., and Tronczynski, J. Submitted. *Marine Pollution Bulletin*.
375. Jimenez, B. D., Cirimo, C. P., and McCarthy, J. F. 1987. *Aquatic Toxicology* **10**(1): p. 41-57.
376. Collier, T. K. and Varanasi, U. 1991. *Archives of environmental contamination and toxicology* **20**(4): p. 462-473.
377. James, M. O., Kleinow, K. M., Zhang, Y., Zheng, R., Wang, L., and Faux, L. R. 2004. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): p. 343-346.
378. Padros, J. and Pelletier, E. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 347-351.
379. Shailaja, M. S., Rajamanickam, R., and Wahidulla, S. 2006. *Environmental Pollution* **143**(1): p. 174-177.
380. Eickhoff, C. V., He, S. X., Gobas, F. A. P. C., and Law, F. C. P. 2003. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(1): p. 50-58.
381. Troisi, G. M., Bexton, S., and Robinson, I. 2006. *Environmental Science and Technology* **40**(24): p. 7938-7943.
382. Leadly, T. A., Arcand-Hoy, L. D., Haffner, G. D., and Metcalfe, C. D. 1999. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(4): p. 750-755.
383. Van Der Oost, R., Iero, A., Satumalay, K., and Vermeulen, N. P. E. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 431-432.
384. Stein, J. E., Hom, T., Casillas, E., Friedman, A., and Varanasi, U. 1987. *Marine Environmental Research* **22**(2): p. 123-149.
385. Britvic, S., Lucic, D., and Kurelec, B. 1993. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**: p. 765-773.
386. Roy, L. A., Steinert, S., Bay, S. M., Greenstein, D., Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Leifer, I., and Schlenk, D. 2003. *Aquatic Toxicology* **65**(2): p. 159-169.
387. Vethaak, A. D., Jol, J. G., Meijboom, A., Eggens, M. L., Rheinallt, T., Wester, P. W., van de Zande, T., Bergman, A., Dankers, N., and Ariese et, a. 1996. *Environmental Health Perspectives* **104**(11): p. 1218-1229.

388. Vyskocil A, Drolet D, Viau C, Brodeur J, Tardif R, Gérin M, Baril M, Truchon G, and Lapointe G. 2004. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **18**(3): p. 235-242.
389. Zhao ZH, Quan WY, and Tian DH. 1992. *J. Environ. Sci. Health* **27**(7): p. 1949-1966.
390. Kanoh T, Fukuda M, Onozuka H, Kinouchi T, and Ohnishi Y. 1993. *Environmental Research* **62**(2): p. 230-241.
391. Jongeneelen FJ. 2001. *Ann. occup. Hyg.* **45**(1): p. 3-13.
392. Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gaviln, J. F., and Barra, R. 2005. *Chemosphere* **61**(2): p. 192-199.
393. Cormier, S. M., Lin, E. L. C., Fulk, F., and Subramanian, B. 2000. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(4(2)): p. 1120-1126.
394. Albaigés, J., *Environmental Analytical Chemistry of Pcb's*. Current Topics in Environmental and Toxicological Chemistry, ed. Hutzinger, O. and Albaigés, J. Vol. 16. 1993, Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers. 409.
395. Porte C and Albaigés J. 1993. *The Science of the Total Environment*: p. 171-176.
396. Pastor, D., Boix, J., Fernandez, V., and Albaigés, J. 1996. *Marine Pollution Bulletin* **32**: p. 257-262.
397. Burgeot T, Bocquené G, Porte C, Dimeet J, Santelle RM, Garcia de la Parra LM, Pfohl-Leszkwicz A, Raoux C, and Galgani F. 1996. *Mar Ecol. Prog. Ser* **131**: p. 125-141.
398. Porte C., Biosca X., Solé M., and J., A. 2001. *Environmental Pollution* **112**: p. 261-268.
399. Burgeot T and Galgani F, eds. *Application De L'erod Chez Les Poissons Marins Dans Un Programme Pluridisciplinaire De Surveillance De La Mer Du Nord. Utilisation Des Biomarqueurs Pour La Surveillance De La Qualité De L'environnement,*, ed. Lagadic, T.C., J.C. Amiard et F. Ramade. 1998, Tec & Doc Lavoisier: Paris. 24.
400. Geffard O., Geffard A., His E, and H., B. 2003. *Marine Pollution Bulletin* **46**(4): p. 481-490.
401. Tronczynski, J., Munsch, C., and Moisan, C. 1999. *Fascicule Seine-Aval* **12**.
402. Azevedo, L. A., Bruning, I. M. R. D. A., and Moreira, I. 2004. *Marine Pollution Bulletin* **49**: p. 1109-1126.
403. Meniconi, M. F. G., Massone, C. G., and Scofield, A. D. L. *Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Guanabara Bay, Brazil*. in *Proceedings of the 26th Arctic and Marine Oil Spill Program (AMOP)*. 2003.
404. Gabardo, I. T., Meniconi, M. F. G., Falcao, L. V., Vital, N. A. A., and Pereira, R. C. L. *Hydrocarbon and Ecotoxicity in Seawater and Sediment Samples of Guanabara Bay after the Oil Spill in January 2000*. in *2001 International Oil Spill Conference*. 2001.
405. FEEMA, *Qualidade De Agua Da Baia De Guanabara*. , in *Programa de Despoluição da Baia de Guanabara - Programas Ambientais Complementares*. 1998.

406. Kjerfve, B., Ribeiro, C. H. A., Dias, G. T. M., Filippo, A. M., and Quaresma, V. D. S. 1997. *Continental Shelf Research*. **17**(13): p. 1609-1643.
407. Baumard, P. and Budzinski, H. 1997. *Analisis* **25**: p. 246-252.
408. Baumard, P., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1997. *Fresenius J Anal Chem* **359**(6): p. 502-509.
409. Budzinski, H., Garrigues, P., Connan, J., Devillers, J., Domine, D., Radke, M., and Oudin, J. L. 1995. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**(10): p. 2043-2056.
410. Budzinski, H., Letellier, M., Garrigues, P., and Le Ménach, K. 1999. *J. Chromatogr. A* **837**(1-2): p. 187-200.
411. Letellier, M., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1999. *LC-GC Europe* **12**(4): p. 222-225.
412. Mazeas, L. and Budzinski, H. 2002. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **82**(3): p. 157-173.
413. Huynh CK and Vu Duc T. 1984. *J. High Resol. Chromatogr. and Chromatogr. Communication* **7**: p. 270-273.
414. Baumard, P., *Biogéochimie Des Composés Aromatiques Dans L'environnement Marin*. 1997.
415. Fatta, D., Achilleos, A., Nikolaou, A., and MERIC, S. 2007. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**(6): p. 515-533.
416. Fine, D. D., Breidenbach, G. P., Price, T. L., and Hutchins, S. R. 2003. *Journal of Chromatography A* **1017**(1-2): p. 167-185.
417. Gaillard, Y., Vayssette, F., Balland, A., and Pepin, G. 1999. *Journal of Chromatography B* **735**: p. 189-205.
418. Impens, S., De Wasch, K., Cornelis, M., and De Brabander, H. F. 2002. *Journal of Chromatography A* **970**(1-2): p. 235-247.
419. Kelly, C. 2000. *Journal of Chromatography A* **872**: p. 309-314.
420. Louter, A. J. H., Van Doornmalen, J., Vreuls, J. J., and Brinkman, U. A. T. 1996. *Journal of High Resolution Chromatography* **19**(12): p. 679-685.
421. Metcalfe, Koenig, B. G., Bennie, D. T., Servos M. , Ternes T. A. , and Hirsch R. 2003. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(12): p. 2872-2880.
422. Rosen, R. 2007. *Current Opinion in Biotechnology* **18**(3): p. 246-251.
423. Rossi, S.-A., Johnson, J. V., and Yost, R. A. 1994. *Biological Mass Spectrometry* **23**(3): p. 131-139.
424. Mazéas O, *Evaluation De L'exposition Des Organismes Aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (Hap) Dans Le Milieu Marin Par Le Dosage Des Métabolites De Hap.*, in *Chemistry*. 2005, Université Bordeaux 1: Bordeaux. p. 456 pp.

425. Xu, X., Zhang, J., Zhang, L., Liu, W., and Weisel, C. P. 2004. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **18**: p. 2299-2308.
426. Pigni, D., Cialdella, A. M., Faranda, P., and Tranfo, G. 2006. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **20**: p. 1013-1018.
427. Holm A, Molander P, Lundanes E, Øvrebø S, and Greibrokk T. 2003. *Journal of Chromatography B* **794**(1): p. 175-183.
428. Morrison H, Young P, and Georges S. 1985. *Biochem. Pharmacology* **34**.
429. Plakunov I, Smolarek TA, Fisher DL, Wiley JC, and Baird WM. 1987. *Carcinogenesis* **8**.
430. Layiwola PJ, Linnecar DFC, and Knights B. 1983. *Xenobiotica* **13**.
431. Smith, C. J., Huang, W., Walcott, C. J., Turner, W., Grainger, J., and Patterson, D. G. 2002. *Anal. Bioanal.Chem* **372**: p. 216-220.
432. Smith, C. J., Walcott, C. J., Huang, W., Maggio, V., Grainger, J., and Patterson, J., Donald G. 2002. *Journal of Chromatography B* **778**(1-2): p. 157-164.
433. Jongeneelen, F. J. and R.B.M. Anzion, P. T. J. S., R.P. Bos, P.Th. Henderson, E.H. Nijenhuis, S.J. Veenstra, R.M.E. Brouns and A. Winkes Editor. 1997. *The Science of the Total Environment* **199**: p. 141-149.
434. Romanoff L.C, Li Z, Young K.J, Blakely N.C, Patterson Jr D.G, and Sandau C.D. 2006. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **835**(1-2): p. 47-54.
435. Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., and Willett, K. 2008. *Journal of chromatography B* **863**(1): p. 141-149.
436. Won L, Shin H.S, Hong J.E, Pyo H, and Kim Y. 2003.
437. Koeber R, R., N., and Bayona J.M. 1997. *Fresenius J Anal Chem* **359**: p. 267-273.
438. Wang, J. J., Frazer, D. G., Law, B., and Lewis, D. M. 2003. *Analyst* **128**(7): p. 864-870.
439. Aina, R., Palin, L., and Citterio, S. 2006. *Chemosphere* **65**(4): p. 666-673.
440. Jewell C.S.E., Mayeaux M.H., and G.W., W. 1997. *Comparative Biochemistry and Physiology* **118C**(3): p. 369-374.
441. Burgeot T., Akcha F., Minier C., Cachot J., and Budzinski H., *Position Française Sur Le Développement De Bioessais Et Biomarqueurs En Biosurveillance (Ospar)*, in R.INT.DCN-BE-EX/2006.11/Nantes. 2006. p. 10.
442. Millemann RE, Birge WJ, Black JA, Cushman RM, Daniels KL, Franco PJ, Giddings JM, MacCarthy JF, and Steward AJ. 1984. *Transactions of the American Fisheries Society* **113**: p. 73-85.
443. De Graeve GM, Elder RG, Woods DC, and Bergman HL. 1982. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* **11**: p. 487-490.

-
444. Rice SD and Thomas RE. 1989. *Comparative Biochemistry and Physiology* **94**: p. 289-293.
445. Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, and High Tower GM. 1974. *Pollution and Physiology of marine organisms*: p. 285-310.
446. Holcombe GW, Phipps GL, and Fiandt JT. 1983. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **7**: p. 400-409.
447. Black, M. C. and McCarthy, J. F. 1988. *Environmental Toxicology and Chemistry* **7**: p. 593-600.
448. Hall AT and Oris JT. 1991. *Aquatic Toxicology* **19**(3): p. 249-264.
449. Hoofman RJ and Evers-de Ruyter A, *Early Stage Tests with Brachydanio Rerio and Several Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using an Intermittent Flow-through System.*, in TNO Institute of Environmental Sciences. 1992b: Delft.
450. Hoofman RJ and Evers-de Ruyter A, *Investigations into Aquatic Toxicity of Phenanthrene (Cover-Report for Reproduction Tests with the Waterflea Daphnia Magna and an Early Life Stage Test with the Zebra Fish Brachydanio Rerio)*, in TNO Institute of Environmental Sciences. 1992a: Delft, The Netherlands.
451. Hannah JB, Hose JE, Landolt ML, Miller BS, Felton SP, and Iwaoka WT. 1982. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* **11**: p. 727-734.

PUBLICATIONS

Publication n°1**Selective detection of monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in fish bile using solid-phase extraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry (SPE-GC/MS).**

Marie Le Dû-Lacoste and H el ene Budzinski*

ISM-LPTC, UMR 5255 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 cours de la Lib eration, 33405
TALENCE, FRANCE

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitously present in the environment and associated with a variety of adverse health effects on aquatic organisms. Monohydroxylated PAHs (OH-PAH), metabolites of PAH, have been employed as biomarkers for fish exposure assessment of PAH. This manuscript describes an analytical procedure for the determination of 12 PAH metabolites in fish bile by solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). After deconjugation, samples were extracted and concentrated using STRATA X cartridges. Purification processes and sample storage conditions have been optimized. For most of the compounds monitored, recoveries were in the range of 73 to 99%, and the variability was below 15% for the complete procedure. The developed method was successfully applied to the monitoring of biliary PAH metabolites in the Seine estuary.

Keywords: PAH metabolites, fish bile, SPE, GC/MS

Submitted to Analytical Bioanalytical Chemistry

1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of hydrophobic organic compounds that are ubiquitous pollutants derived from pyrogenic and petrogenic sources. PAHs have been shown to be toxic to marine life [1-3]. Certain PAHs (e.g. benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene) are metabolically activated in vertebrates to form carcinogens [4-11]. Levels of PAHs in the marine environment have been monitored in many areas from the time that these compounds were recognized as a serious environmental concern [12]. Furthermore, the feasibility of measuring tissue concentrations of PAHs in marine species to monitor for exposure depends on rates of uptake, biotransformation, and excretion. Although the ability of invertebrates to take up and eliminate PAHs has been well documented [13, 14], biotransformation rates in invertebrates are highly species dependent. However, biotransformation processes are considered to be low in many invertebrates [13]. In contrast, fish and other marine vertebrates rapidly biotransform PAHs to form epoxy and hydroxyl derivatives during phase I metabolism. Subsequently, during phase II metabolism, the phase I metabolites are converted into highly water-soluble conjugates (e.g., glucuronides or sulfates) that accumulate in the bile [15-17]. Therefore, measuring PAH metabolites in bile provides a means for determining exposure [18-26].

Analysis for metabolites in fish bile has been used to monitor for PAH exposure in a number of studies [27-30]. The complex nature of PAH metabolites in bile of fish exposed to oil or other environmental pollution makes analysis challenging. As a result, selecting the best analytical method will depend upon the questions that need to be answered. The concentration of PAH metabolites is usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs). Several analytical techniques have been used to estimate FACs in fish bile, such as high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence (HPLC/F) [23, 31-39], synchronous fluorescence spectrometry (SFS) [40, 41] or fixed fluorescence (FF) [42]. A limited degree of compound specificity has been achieved by optimization of fluorescence wavelength pairs for analysis of naphthalene-, phenanthrene-, pyrene- and benzo(a)pyrene-like metabolites [43-45]. These screening methods have been successfully used in a large number of PAH monitoring studies [23-26, 46-53]. FF and SFS methods are both very rapid; because the preparation is simple (i.e. only dilution) and the fluorescence analysis takes just a few minutes per sample. Field studies have shown that FF and SFS normally are sufficiently sensitive to discriminate between control and impacted sites and that interference from non-PAH compounds are limited [45]. However fluorescence spectroscopy is known to be highly sensitive for PAH analysis at trace levels, its use seems to be limited when applied to complex mixtures of fluorescent aromatic compounds [54]. This limitation becomes evident when compounds have similar structures such as isomeric metabolites, PAH parent compounds and its metabolites. They do not provide sufficient information on the fingerprint of the contamination. Moreover in order to link the activity and the structure of a compound and to understand the PAHs biotransformation processes, more specific and more sensible analytical tools have been developed.

High performance liquid chromatography coupled to fluorescence (HPLC/F) still remains the most frequently used methodology in the laboratories, also for quantitative analysis. Indeed, it allows to target a compound with a couple of wavelengths, via an external standard calibration method [32-34, 35, 55, 56, 57]. However since the 80's, the mass spectrometric detection (MS) allowed considerable progresses in terms of sensitivity and specificity for the PAH metabolites analysis, especially in complex biological matrices. Separation by HPLC or gas chromatography (GC) prior to mass spectrometry (MS) detection are the most frequently used methods for identification and quantification of individual metabolites [58-64]. Few studies deal with quantitative determination of specific metabolites [33, 65-69].

These separation and detection techniques which are very sensible even in biological tissues have to be compulsory associated with preliminary sample preparation techniques. Indeed the complexity of biological samples (e.g. multiple interference sources) and the common need to concentrate the sample for a sufficient detection level made essential the implementation of sample preparation protocol. These protocols often compromise several steps: from the extraction to the separation and the detection of selected compounds.

Table 1 presents an overview of limits of detection obtained with several analytical techniques commonly used for PAH metabolites analysis. GC/MS technique coupled to efficient sample preparation proves to be sufficient in terms of sensitivity and selectivity, especially for complex chromatograms. With the help of derivatization, the sensitivity for larger PAH metabolites is enhanced [70].

Major studies dealing with HPLC analysis of hydrolyzed bile for individual quantification describe simple sample preparation without any extraction step involved [34, 71, 72]. One of principal aim of extraction is usually to transfer hydroxylated PAH into a volatile organic solvent compatible with gas chromatography analysis [27]. Liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) are the two major techniques currently reported. Liquid-liquid extraction is the most widely used technique to extract PAH metabolites. [60, 73, 74]

Solid phase extraction (SPE) offers different advantages compared to liquid-liquid extraction such as automation, reduced analytical time, smaller amount of solvent. SPE was widely developed for the study of PAH metabolites, and especially of pyrene metabolites, in human urine [75-79]. However, only few studies have reported the application of this technique to the marine environment. McElroy *et al.* [80] and Simpson *et al.* [81] developed a method using octadecyle (C_{18}) disks to quantify pyrene or benzo(a)anthracene metabolites in water from laboratory experiments. Law *et al.* [82] as well as Mazéas and Budzinski [83] used a chromatographic extraction step (C_{18} -sorbent SPE cartridge) to separate hydrolyzed PAH metabolites from the bile matrice. Very few studies reported the use of polymeric sorbents. In one of the very first studies published on PAH metabolites in fish, Statham *et al.* used a polymeric XAD-2 phase to extract naphthalene and methylnaphthalene metabolites from trout biles [84].

Most of the techniques used for extraction can also be used for purification and clean up. The major aims of this step are to remove most of protein and lipid contents and in a general way to remove most of the impurities that are responsible of the complex structure of bile samples. Natural matrices and especially biological ones are complex mixtures made of constituents, which can interfere with compounds of interest and affect analytical systems. However, only a few marine studies report the use of such a step for the analysis of PAH metabolites. One of the strategies is to fraction the sample by HPLC in order to isolate the different kind of constituents (e.g. lipids, proteins, metabolites, pigments).

However mass spectrometric detection methods are more quantitative than fluorescence methodologies, there is still a need to develop a straightforward method that can monitor exposure to different PAH at very low level with a stronger sensitivity and specificity, without instrumental change or investment. The driving force of new analytical developments has to enhance methodological performances by the way of sample preparation and especially throughout the extraction and purification of PAH metabolites from biological matrices. This works presents a sensitive and efficient solid-phase extraction (SPE)-based protocol for the quantitative determination of individual PAH metabolites in biological fluids. A previous work [70] based on a SPE-based GC/MS methodology already improved the detection limits and the applicability of GC/MS analysis for PAH metabolites. However limits of detection and recoveries obtained for BaP metabolites were not satisfying. This is one of key points in PAH metabolites quantification: BaP metabolites because their role in carcinogens formation [85-87].

The present protocol was focused on the improvement of sensitivity for mono-hydroxylated PAH metabolites detection. Their developed chemical structure is presented in Figure 1. The studied metabolites are known to be some of the major products of biotransformation in fish, which are present in their free form or more commonly conjugated with endogenous molecules [3, 73, 82, 88]. Such compounds are extensively excreted into the bile. Potential metabolites of priority PAH listed by the US-EPA (United States Environmental Protection Agency) have been chosen for their interest in environmental surveys [89]. Thus, the developed methodology was finally applied to fish bile samples to evaluate the applicability of this method to natural samples.

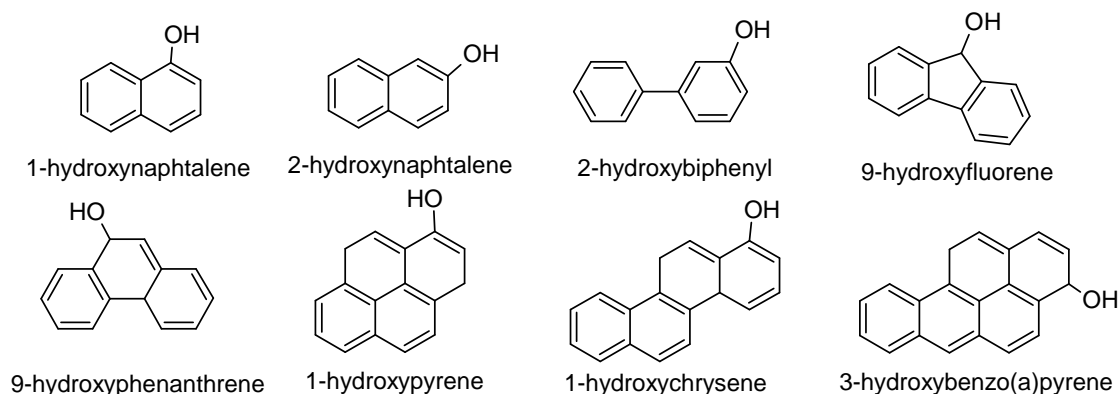


Figure 1: The studied hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (OH-PAH)

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals, solvents and reagents

1-hydroxynaphthalene (1-OHN) and 2-hydroxynaphthalene (2-OHN) were purchased from Lancaster (Bischeim, France); 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and 9-hydroxyphenanthrene (9-OHPhe), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d₉ (1-OHPd₉) and pyrene-d₁₀ (Pd₁₀) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Ste Foy La Grande, France). All the standards were of analytical grade (purity > 98%). Stock standard solutions were prepared, on the one hand in dichloromethane (DCM) (stored at -20°C) and on the other hand in methanol (MeOH) (stored at 4°C). All the solvents used were of analytical grade. Dichloromethane was provided by Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Methanol Supersolv was provided by Merck and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) was obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) and β -glucuronidase-aryl-sulfatase mixture from *Helix pomatia* (100,000 and 7,500 units/ml respectively) were provided by Sigma Aldrich (St Quentin Falavier, France). Trifluoroacetic acid (Reagent grade, purity > 99%) was obtained from Fischer chemicals (Fischer Scientific Labo, Elancourt, France). 2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

Table 1: Overview of limits of detection of PAH metabolites according to various analytical methodologies. Instrumental: only instrumental limits of detection are investigated.

References	Analytical methods	Compounds	Sensitivity
[90]	FF	1OHP	500 ng 1OHP-eq/ml of bile
[34]	GC/MS	1-OHP	6 pg injected (instrumental)
[33]	GC/MS	OHC isomers	50-120 ng.g ⁻¹ bile
[91]	GC/MS (SPME)	1-OHP	1.6 ng.l ⁻¹ of urine
[91]	GC/MS (SPME)	1-OHC	1.68 ng.l ⁻¹ of urine
[41]	HPLC/F	1-OHP	20.2 ng.g ⁻¹ of bile
[41]	HPLC/F	3-OHBaP	41.5 ng.g ⁻¹ of bile
[34]	HPLC/F	1-OHP	6 pg injected (instrumental)
[34]	HPLC/F	3-OHBaP	3 ng injected (instrumental)
[55]	HPLC/F	OHC	5-60 ng.g ⁻¹ of bile
[92]	LC-APCI-MS	OHPAH	0.3-50 µg.ml ⁻¹ (instrumental)
[93]	LC-APCI-MS	BaP Metabolites	0.002-0.2 ng injected (instrumental)
[78]	LC/MS	OHPAH	0.36-14.09 µg.l ⁻¹ of gastrointestinal fluid
[78]	LC/MS	1-OHP	0.6 µg.l ⁻¹ of gastrointestinal fluid
[94]	LC-MS/MS	OHPAH	0.1-5 pg injected (instrumental)
[95]	LC-MS/MS	1-OHP	0.01 ng.l ⁻¹ of urine
[95]	LC-ESI-MS/MS	1OHP	0.5 ng.l ⁻¹ of urine
[96]	LC-QTOFMS	BaP metabolites	40-60 pg injected (instrumental)
[97]	UPLC-ESI-MS	BaP metabolites	< 0.01 ng.µl ⁻¹ (instrumental)

First the extraction step was optimized. Three polymeric sorbents and two C₁₈ silica-based ones were compared to the control C₁₈ silica-based sorbent. The control sorbent was BakerBond Elut C₁₈ (3 cc, 500 mg) from J.T Baker provided by Atlantic Labo (Eysines, France) which originally was used to perform extraction on a vacuum manifold [83]. The two other C₁₈ silica-based sorbent were C₁₈-S and C₁₈-U Interchrom (3 cc, 200 mg) provided by Interchim (Montluçon, France). The three polymeric sorbents used were Oasis HLB (3 cc, 60 mg) from Waters (St Quentin Falavier, France), STRATA-X (3 cc, 200 mg) and STRATA-XC (3 cc, 200 mg) both from Phenomenex (Le Pecq, France).

With an aim to optimize the purification step three different sorbents have been tested. Two silica-based sorbents, Bond Elut-PSA and HF Bond Elut-PSA (3 cc, 500 mg) from Varian and provided by Atlantic Labo (Eysines, France) were investigated. They have been compared with the control silica-based cartridge Supelclean LC-NH₂ (3 cc, 500 mg) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) [83].

2.2 Optimisation of the Solid-Phase Extraction protocol

2.2.1 Solvolysis and enzymatic hydrolysis

In order to perform recovery tests, spiked samples were used since no certified matrice was available at that time. Spiked bile was prepared to mimic natural liquid sample. It consisted of a mixture of hydroxylated PAHs prepared in methanol added to 100 µl of non contaminated trout bile (obtained from the fishing farm "Ferme aquacole Le Moulin de la Cassadote", Biganos, France) and diluted in acidified water (deionized water at pH 5.0 with acetic acid). The internal standard (1-hydroxypyrene-d9) was added to the bile samples. Then a deconjugaison step was needed because of the predominance of the conjugate forms of metabolites in bile [3, 73, 82, 88]. Conjugated metabolites are not readily analysed by GC/MS, because of both their low volatility and their high polarity. In this work the possible use of chemical solvolysis prior the enzymatic deconjugaison has been investigated. The samples have been evaporated to dryness under nitrogen stream. Then they have been resolubilised in 600 µl of a mixture of methanol, tetrahydrofuran and trifluoroacetic acid (20/80/1 respectively, v/v). An incubation time was needed at 45°C during 30 minutes. After the completion of the solvolysis 240 µl of sodium carbonate (0.2 M) was added to neutralise the acidic attack. Finally all the solvents were evaporated under nitrogen stream prior the addition of enzymes (β-glucuronidase/arylsulfatase, 20 µl) and of the antioxidant (2-mercaptoethanol, 20 µl). After dilution in acidified water (2 ml, pH 5.0) the samples were further incubated at 55°C for 4 hours. By comparison to solvolysis, classical enzymatic deconjugaison has been used. After dilution in acidified water (2 ml, pH 5.0), 20 µl of enzymes (β-glucuronidase/arylsulfatase) and 20 µl of antioxidant (2-mercaptoethanol) were added to the samples, prior to be incubated at 37.5°C for 18 hours. Glass vials were used for the deconjugaison step to avoid adsorption phenomena on inner surfaces. After the completion of deconjugaison, samples, containing only unconjugated metabolites were ultrasonicated, centrifugated (10 min, 5,000 rpm, 20°C) and extracted using SPE cartridges.

2.2.2 Solid-Phase Extraction on polymeric sorbent

With the aim of improving the selective extraction of PAH metabolites from the bile samples different types of cartridges with different functionalities and compositions have been compared with Bond Elut® C₁₈, which is a silica-based C₁₈ sorbent used in our reference method [83]. Three polymeric sorbents (Oasis HLB, STRATA-X and STRATA-XC) were tested according to each manufacturers recommended method by loading spiked samples and calculating recovery of each metabolite. Moreover two other silica-based C₁₈ sorbents, Interchrom® C₁₈-S, C₁₈-U, have been investigated to test the influence of surface chemistry

variables of sorbents such as the end-capping, the particle size and the surface area. All sorbents were compared using the same conditioning, washing and eluting protocols.

After centrifugation, extraction of the analytes was performed using 200 mg STRATA X cartridges (flow rate $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) previously conditioned with 2 mL of methanol and $2 \times 2 \text{ mL}$ of acidified water pH 5.0 ($3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). The cartridges were washed with 2 mL of acidified water pH 5.0 and then dried under vacuum during 45 min (5 bars) to evaporate solvents. The metabolites were then eluted with $2 \times 2.5 \text{ mL}$ of methanol and the extracts were evaporated at 50°C under nitrogen stream. The residues were resuspended in 1 mL of a mixture of dichloromethane/methanol (80/20, v/v) prior to purification.

2.2.3 Purification on silica-based sorbent

The purification step aims to remove the most part of interfering compounds prior the GC/MS analysis. The major problems come from the lipid and protein contents of bile samples. This step was investigated by examining several different factors: type of sorbent, sorbent volume and elution solvent/volume.

Two polymeric-based cartridges (PSA and HF-PSA) were tested and compared with a silica-based cartridge (SupelClean) LC-NH₂ used as a reference. They were tested according to the conventional method used in the laboratory [83] by loading spiked samples and calculating recovery for each metabolite.

Extracts in mixture of dichloromethane/methanol (80/20, v/v) were finally cleaned using silica-based 500 mg HF PSA cartridges conditioned with 2 mL of dichloromethane/methanol (80/20, v/v). The extracts were eluted through the cartridges and the analytes passed unretained through the sorbent. The eluates were directly collected and the cartridges were further rinsed with $2 \times 2 \text{ mL}$ of the solvent mixture. The final extracts were taken to dryness at 50°C under nitrogen stream and resuspended in 50 μl of dichloromethane prior to silylation (final volume of 80 μl).

2.3 Analysis and quantification of the target metabolites by GC/MS

Because of their low volatility PAH metabolites have to be derivatized in order to be analyzed by GC/MS. 30 μl of the silylation reagent (BSTFA) were added to the extracts. The derivatization step was completed after keeping the solutions 30 min in an oven at 65°C . After adding pyrene-d₁₀, standard solution prepared in dichloromethane, for recovery control, analysis of the derivatized metabolites contained in the SPE extracts were achieved using an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies. The separation was performed on an Agilent Technologies HP5-MS capillary column (length: 30 m; internal diameter: 250 μm ; stationary phase thickness: 0.25 μm ; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethyl-siloxane), with the following oven parameters: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ from 180°C to 290°C (1 min) at $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The injection volume was set at 1 μl (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min)), while the injector temperature was set at 250°C and the interface temperature at 280°C . The purge flow was set at 60 ml/min during 1.5 min and helium 6.0 (Linde, Bassens, France) was used as the carrier gas (constant flow: $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Acquisition was performed in selected ion monitoring mode (SIM), with 1.53 scan/s and a dwell time of 50 ms for each ion. The source temperature was 150°C and the electron multiplier voltage 2,000 V.

The compounds were quantified in SIM mode using the following ions: 1-hydroxynaphthalene ($m/z=201$), 2-hydroxynaphthalene ($m/z=216$), 2-hydroxybiphenyl ($m/z=211$), 9-hydroxyfluorene ($m/z=165$), 9-hydroxyphenanthrene and isomers ($m/z=266$), 1-hydroxypyrene ($m/z=290$), 1-hydroxychrysene ($m/z=316$) 3-hydroxybenzo(a)pyrene

($m/z=340$) and 1-hydroxypyrene-d9 ($m/z=299$), pyrene-d10 ($m/z=212$). Generally the ions selected for quantification and identification purposes were the molecular ions M^+ [83].

A mixture of the standard metabolites, 1-hydroxypyrene-d9, and pyrene-d10 in dichloromethane was injected, after derivatization, at the beginning and at the end of each sequence for the determination of response factors. For each series of analyses, a manipulation blank was performed with samples to control potential contamination.

2.4 *Natural samples*

Dab (*Limanda limanda*) were collected in September 2006 by trawling at two sites in Seine Estuary mouth (France): Seine Estuary (ES) and Granulats (G) (Figure 2). Location ES is the mouth of the estuary impacted by important industrial and transport activities whereas the (G) site is a located, considering as a less impacted area.

At each site, female and male dab of two size classes (14–18 and 22–26 cm) were collected from several trawl nets ($4 < n < 12$, standard haul duration of 20 min) for biliary PAH metabolites measurement. These fish were considered, respectively, as juveniles (≤ 2 -year-old) and adults (≈ 2.5 to < 4 -year-old). Fish were kept alive on board in a fish well and were dissected once back to the dock. Gall bladders were stored at -80°C .

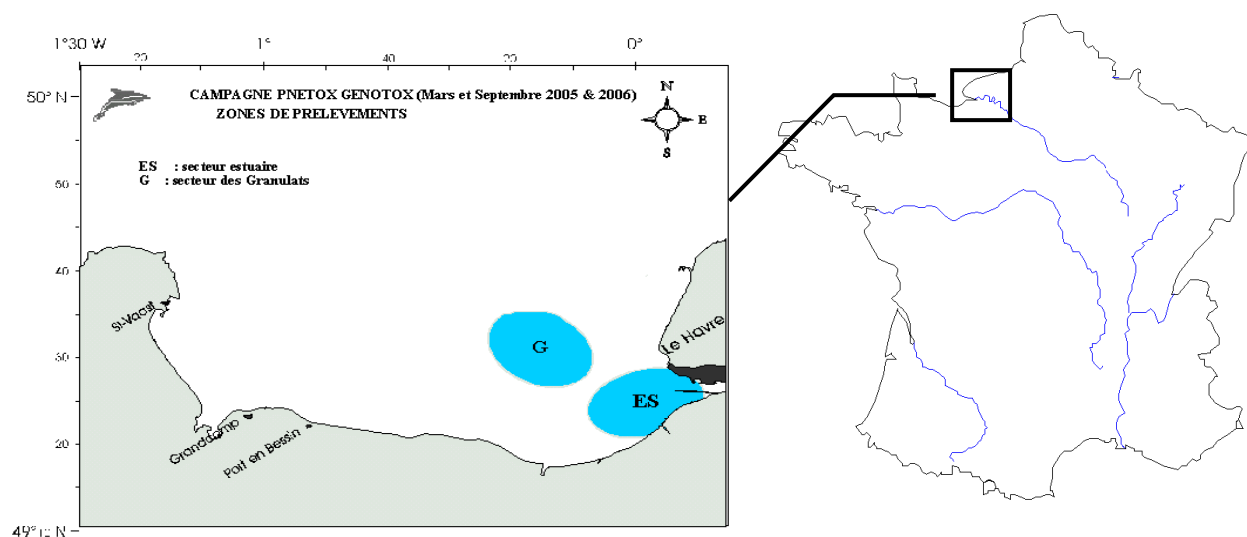


Figure 2: Sampling sites for dab (*Limanda limanda*) during September 2006 in the Seine Estuary mouth, France.

3 Results and discussion

3.1 Validation of GC/MS analysis

3.1.1 Mass spectrometry conditions

Hydroxylated metabolites were derivatized before GC/MS injection by adding 30 μl of BSTFA and incubating at 65°C for 30 min. No interferences from the derivatization step were observed at m/z values of the selected ions used for each compound. The mass spectrum of each compound after derivatization was characterized in full scan mode and selected ion monitoring mode was used for all quantitative measurements (Table 2).

Table 2: GC/MS data (molecular weight (M) and monitored masses for the studied metabolites)

Compounds	M (g/mol)	m/z with derivatization	Ions
1-OHN	144	201	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_2]^+$
2-OHN	144	216	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
2-OHBi	170	211	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_2]^+$
9-OHFe	182	165	$[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$
4-OHPhe	194	266	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
9-OHPhe	194	266	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
3-OHPhe	194	266	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
1-OHPhe	194	266	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
2-OHPhe	194	266	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
1-OHP	218	290	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
1-OHP <i>d9</i>	227	299	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
1-OHC	244	316	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
3-OHBaP	268	340	$[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$
<i>Pyr d10</i>	212	212	<i>No derivatized</i>

3.1.2 Linearity and limits of detection

Linearity was tested with standard mixtures in dichloromethane at different levels of concentrations between 3 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of injected solution. Correlation coefficient ranged between 0.9255 (for 3-OHBaP) and 0.9978 (for 1-OHP) with relative standard deviation (RSD) ranging from 3.5 % to 10.5 % for 6 consecutive injections. Analytical limits of detection (Table 3), expressed in injected pg were obtained for a signal-to-noise ratio of 3.

Table 3: Linearity and Instrumental Detection Limit (IDL) expressed in pg injected (1 μ l injected, solvent: dichloromethane)

Analytes	m/z	Range of concentrations	Linearity	R ²	RSD (%)	IDL
1-OHN	201	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 23838x - 765	0.9893	5.6	0.17
2-OHN	216	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 14942x - 601	0.9918	5.3	0.28
2-OHBi	211	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 22817x - 234	0.9913	4.6	0.20
9-OHFe	165	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 26284x - 313	0.9878	4.5	0.12
4-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 12151x - 133	0.9858	4.5	0.27
9-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 12916x - 145	0.9891	4.3	0.43
3-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 15309x - 183	0.9829	4.6	0.22
1-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 30562x - 347	0.9935	3.9	0.11
2-OHPhe	266	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 17012x - 201	0.9864	3.9	0.22
1-OHP	290	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 22224x - 256	0.9978	3.7	0.28
1-OHP d9	299	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 24142x - 266	0.9955	3.5	0.54
1-OHC	316	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 4679x - 550	0.9843	6.1	2.51
3-OHBaP	340	7 ng.g ⁻¹ – 40 μ g.g ⁻¹	y = 3266x - 4259	0.9255	10.5	8.08
<i>Pyr d10</i>	212	3 ng.g ⁻¹ – 30 μ g.g ⁻¹	y = 25253x - 261	0.9821	5.6	0.27

3.1.3 Quantification

Five calibration solutions were prepared by mixing the internal standard used for quantification (1-hydroxypyrene-d9) and the metabolites of interest. The different solutions were gravimetrically controlled during the preparation. These calibration solutions were injected to calculate response factors of each compound in reference to the internal standard compound. These response factors were then applied to other independent solutions in order to validate the quantitative approach. 6 replicates have been implemented and results are shown in Table 4. The mean recovery ranged between 90 % for 9-OHFe and 110 % for 3-OHPhe with RSD between 1 and 11 %. This allowed the use of 1-hydroxypyrene-d9 as internal standard for the quantification of the 12 studied metabolites.

Table 4: Mean recoveries for the standard solutions of metabolites at different levels (n =6, mean \pm standard deviation).

Compound	3 pg injected (7 pg for 3-OHBaP)	30 pg injected (70 pg for 3-OHBaP)	0.3 ng injected (0,7 ng for 3-OHBaP)	3 ng injected (7 ng for 3-OHBaP)	30 ng injected (40 ng for 3-OHBaP)
1-OHN	106 \pm 6	105 \pm 6	97 \pm 5	109 \pm 9	96 \pm 7
2-OHN	101 \pm 10	100 \pm 7	92 \pm 7	103 \pm 9	92 \pm 6
2-OHBi	98 \pm 8	98 \pm 9	90 \pm 6	100 \pm 6	91 \pm 8
9-OHFe	96 \pm 9	96 \pm 9	88 \pm 5	98 \pm 5	90 \pm 9
4-OHPhe	103 \pm 12	106 \pm 9	97 \pm 7	108 \pm 6	99 \pm 8
9-OHPhe	98 \pm 9	100 \pm 8	92 \pm 8	103 \pm 5	94 \pm 5
3-OHPhe	105 \pm 11	108 \pm 11	99 \pm 8	110 \pm 5	101 \pm 5
1-OHPhe	106 \pm 10	109 \pm 9	100 \pm 5	109 \pm 8	102 \pm 7
2-OHPhe	105 \pm 8	108 \pm 7	99 \pm 5	108 \pm 5	101 \pm 6

					<i>Publications</i>
1-OHP	100 ± 4	103 ± 2	94 ± 1	102 ± 1	96 ± 3
1-OHC	99 ± 6	101 ± 5	93 ± 5	101 ± 8	95 ± 8
3-OHBaP	95 ± 10	97 ± 9	90 ± 9	92 ± 11	91 ± 11
1-OHP d9	105 ± 4	108 ± 3	99 ± 1	101 ± 1	101 ± 2

3.2 Optimisation of the sample preparation protocol

3.2.1 Deconjugation

The efficiency of deconjugation was found to be dependant on the time of the incubation (Figure 3) whatever the protocol tested (solvolysis + enzymes or only enzymes). The normalized concentrations were calculated. The 18 hours-concentrations were set to 100 % for each compound. Two sets of experiments were done. The first one considered only the enzymatic deconjugation. The second one dealt with the combined protocol using solvolysis and enzymatic deconjugation (data not shown). For the enzymatic deconjugation only, some compounds (3-OHBaP and 3-OHPhe) showed increasing concentrations up to 24h, and others showed a decrease after 18h (1-OHC, 9-, 1-, 2-, 4-OHPhe). Most compounds reached a maximum at 18h followed by a subsequent and gradual decrease. When considering the use of solvolysis prior to enzymatic deconjugation, most compounds reached a maximum at 8h. But, no compound reached the maximum concentration obtained with the enzymatic deconjugation (between 25% for 4-OHPhe and 82% for 1-OHP). Therefore the enzymatic deconjugation only with an incubation time of 18h was chosen as the optimum protocol.

3.2.2 Solid-phase extraction

In comparison with reversed phase silica based octadecyle adsorbent (C₁₈) widely used for PAH metabolites extraction [83], three polymeric phases were evaluated: Oasis HLB sorbent, STRATA X sorbent, and STRATA XC sorbent.

Recoveries for the six different sorbents are indicated in Table 5. Results showed a lot of variations from one sorbent to another and for one compound to another. Recoveries ranged between 40 and 89% pour 1-OHN; between 50 to 105 % for 9-OHPhe; between 78 and 105% for 1-OHP; between 63 and 99% for 1-OHC and between 20 and 89% for 3-OHBaP. Recoveries obtained for the internal standard 1-OHP-d9, quantified in comparison with pyrene-d10 used as syringe standard, were between 74 and 98%.

C₁₈-U and C₁₈-S cartridges were obviously not appropriate for the extraction of these compounds due to their lower capacity factor. Oasis HLB phase was able to extract satisfactorily most of the compounds with the exception of 3-OHBaP. The results suggested either a too important elution by water during the rinsing step or a too strong absorption on the cartridge phase of this compound to be eluted with the conditions that were used. STRATA X and STRATA XC phase showed acceptable recoveries for all compounds and especially with the STRATA X phase. When compared to C₁₈ Bakerbond which was used in the reference protocol, a gain in recoveries extraction was observed for all compounds and better standard deviations were obtained. Generally speaking relative standard deviations were lower than 15% for the six sorbents tested.

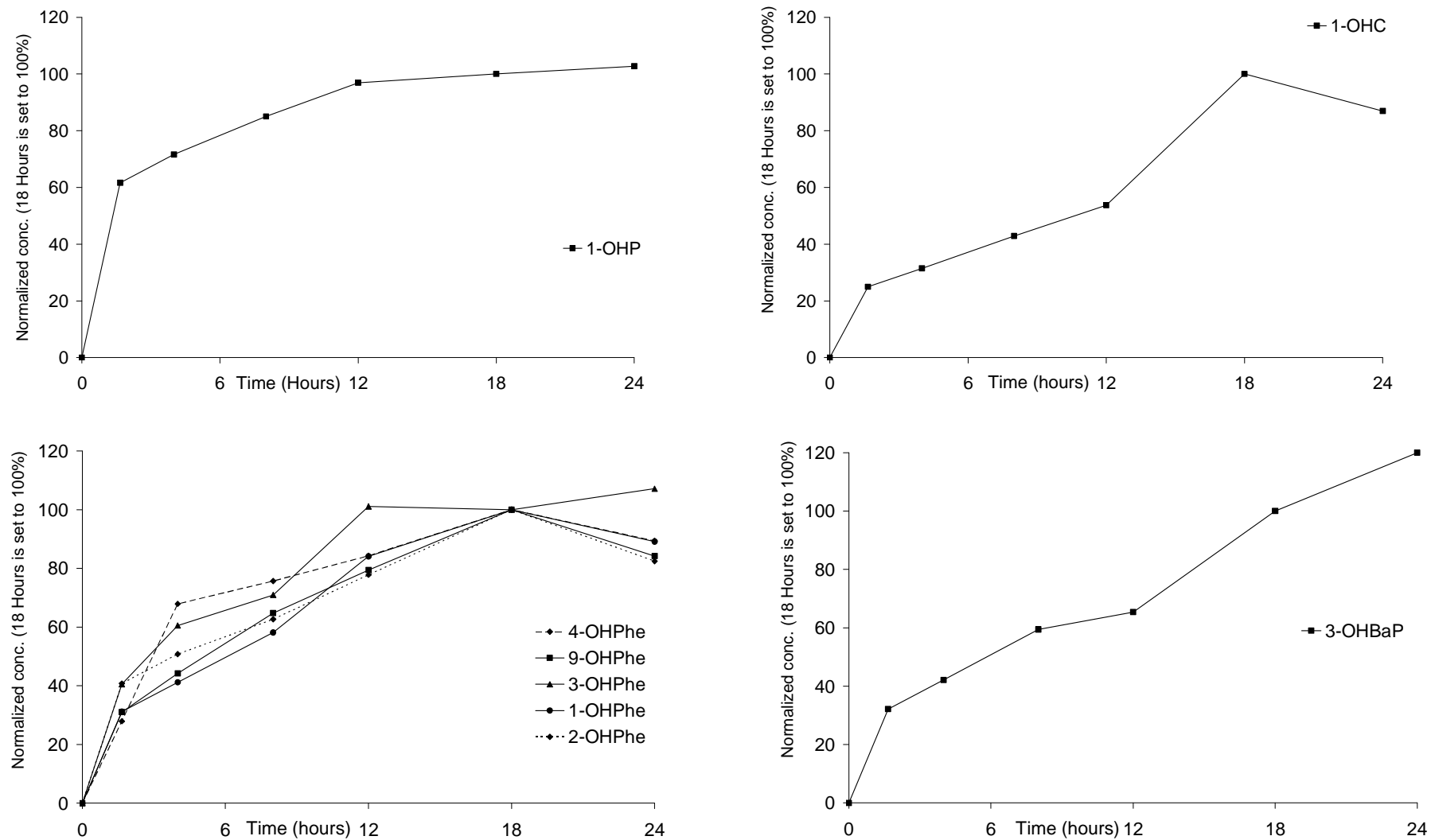


Figure 3: Enzymatic deconjugation time optimization, results are normalized using concentrations at 18 hours as reference value.

Table 5: Comparison of the recovery percentages obtained for the analysis (mean value \pm standard deviation, $n=3$) of bile samples spiked at 10 ng.g^{-1} for each compound and extracted with six different sorbents.

Compounds	C ₁₈ Bakerbond JT Baker	C ₁₈ -S Interchim	C ₁₈ -U Interchim	OASIS HLB Waters	Strata XC Phenomenex	Strata X Phenomenex
1-OHN	78 \pm 8	40 \pm 12	55 \pm 16	72 \pm 10	74 \pm 10	89 \pm 8
9-OHPhe	83 \pm 6	77 \pm 11	69 \pm 8	98 \pm 6	50 \pm 6	105 \pm 4
1-OHP	90 \pm 5	78 \pm 9	79 \pm 9	102 \pm 4	81 \pm 6	105 \pm 3
1-OHC	82 \pm 8	63 \pm 9	71 \pm 10	79 \pm 9	81 \pm 9	99 \pm 8
3-OHBaP	78 \pm 9	57 \pm 15	68 \pm 11	20 \pm 12	75 \pm 12	89 \pm 9
1-OHP-d9	87 \pm 6	75 \pm 9	74 \pm 9	87 \pm 6	94 \pm 6	98 \pm 6

3.2.3 SPE purification

In order to decrease the limits of detection and to insure a better reliability of the determination, clean-up step of natural samples has been optimized. Results are presented in the Table 6. The use of silica-based PSA and HF PSA cartridges decreased significantly the noise and allowed to lower the limits of detection without significant losses of compounds. The Figure 5 presents a chromatogram obtained in natural fish bile sample. Global recoveries concerning solid-phase extraction on C₁₈ Bakerbond cartridge followed by solid-phase purification on LC-NH₂, PSA and HF PSA cartridges ranged from 81% to 105% with RSDs ($n = 3$) from 0 to 10% for all metabolites.

HF-PSA cartridge was chosen as SPE purification cartridge because of the better recoveries obtained compared to other sorbents and because of the reduction of the baseline noise, which was a significant advantage for polymeric sorbent compared to aminopropyl cartridge.

Table 6: Comparison of the recovery percentages obtained for the analysis (mean value \pm standard deviation, $n=3$) of bile samples spiked at 10 ng.g^{-1} for each compound, extracted with a silica-based C₁₈ Bakerbond cartridge and purified with three different sorbents.

Compounds	LC-NH ₂ Supelco	Bond Elut PSA Varian	Bond Elut HF PSA Varian
1-OHN	78 \pm 8	89 \pm 6	105 \pm 4
9-OHPhe	83 \pm 5	90 \pm 4	102 \pm 6
1-OHP	90 \pm 6	90 \pm 2	97 \pm 2
1-OHC	82 \pm 8	88 \pm 6	103 \pm 5
3-OHBaP	78 \pm 10	81 \pm 9	97 \pm 8
1-OHP-d9	87 \pm 6	85 \pm 6	94 \pm 7

3.2.4 Performances of the methodology

The performance of the methodology (extraction with STRATA X and purification by HF-PSA cartridges) was evaluated estimating the recoveries in spiked water and spiked bile samples at different concentration levels (Table 7). They varied from 67 to 96 % for all compounds. RSD were $< 11\%$ in all cases.

Table 7: Mean recoveries for the entire protocol and standard deviations for three replicates at different concentration levels in spiked water and spiked bile samples.

Compounds	15 ng.g ⁻¹		1.5 ng.g ⁻¹		0.15 ng.g ⁻¹		0.015 ng.g ⁻¹	
	Water	Bile	Water	Bile	Water	Bile	Water	Bile
1-OHN	93 ± 9	88 ± 9	82 ± 8	78 ± 9	92 ± 10	77 ± 7	78 ± 9	72 ± 11
2-OHN	91 ± 8	90 ± 7	88 ± 7	75 ± 9	88 ± 8	81 ± 10	74 ± 10	68 ± 8
2-OHBi	86 ± 10	82 ± 9	76 ± 9	72 ± 10	85 ± 9	78 ± 9	74 ± 10	68 ± 11
9-OHFe	84 ± 9	80 ± 8	75 ± 8	71 ± 11	84 ± 5	77 ± 8	73 ± 9	67 ± 10
4OHPhe	93 ± 8	88 ± 6	83 ± 6	78 ± 9	92 ± 5	85 ± 6	80 ± 9	74 ± 9
9-OHPhe	88 ± 6	84 ± 7	79 ± 9	75 ± 6	87 ± 7	80 ± 5	76 ± 7	70 ± 8
3-OHPhe	95 ± 5	90 ± 8	84 ± 6	80 ± 9	94 ± 8	86 ± 8	82 ± 8	75 ± 6
1-OHPhe	95 ± 7	94 ± 8	96 ± 7	81 ± 6	92 ± 9	85 ± 8	83 ± 8	76 ± 9
2-OHPhe	95 ± 6	90 ± 7	84 ± 8	80 ± 9	91 ± 6	84 ± 9	82 ± 6	75 ± 10
1-OHP	90 ± 3	99 ± 2	90 ± 5	96 ± 5	87 ± 8	97 ± 6	78 ± 7	92 ± 8
1-OHC	89 ± 6	88 ± 6	89 ± 8	75 ± 9	86 ± 8	79 ± 6	77 ± 9	71 ± 8
3-OHBaP	86 ± 8	85 ± 9	86 ± 9	72 ± 10	78 ± 8	72 ± 9	74 ± 10	68 ± 11

LODs were quite similar for all compounds (Table 8) ranging from 1 to 21 ng.g⁻¹. By comparison, Jonsson *et al.* [98] gave LODs between 1 and 75 ng injected for the same compounds by GC/MS. Romanoff *et al.* [76] gave LODs between 2 and 10 pg.ml⁻¹ for OH-PAH in urine. The present limits of detection were higher for bile sample. For 1-OHPhe and 1-OHP, differences between GC/MS and GC/HRMS performance were of 5 and 8 times more important, respectively. However one must take into account the matrix differences (urine and bile) which influence the determination of limits of detection. As a result of sample preparation protocol optimization, the present methodology nearly reached analytical performance commonly obtained with high resolution instrument (HRMS). Mazeas and Budzinski [70] already reached instrumental detection limits in the range of 1 injected pg (for 2-OHBi) and 130 injected pg (for 3-OHBaP). The usefulness of sample preparation optimization was thus demonstrated to reach enough sensitivity for its applicability in environmental surveys. However 3-OHBaP recovery and limits of detection were not satisfying. This metabolite of interest could not be quantified in biological fluids of fish collected from the Seine Bay (France).

Table 8: Overall limits of detection (LOD) for OH-PAH in bile (100 μ l) and water (3 ml) matrices. Signal-to-noise ratio is 3:1 for LOD.

Compounds	LOD	
	Water (ng.l ⁻¹)	Bile (ng.g ⁻¹ of bile)
1-OHN	0.9	0.9
2-OHN	1.6	3.9
2-OHBi	0.6	1.4
9-OHFe	0.4	1.1
4OPhe	1.0	2.5
9-OHPhe	1.0	2.5
3-OHPhe	0.9	2.3
1-OHPhe	0.4	0.9
2-OHPhe	0.8	1.9
1-OHP	0.6	1.3
1-OHC	4.5	6.6
3-OHBaP	13.6	20.6

The present protocol pushed forward the optimization of the sample preparation protocol and divided by more than 16 times the instrumental limits of detection of 3-OHBaP allowing a greater applicability of the protocol.

3.3 *Storage parameters*

In order to evaluate the stability of metabolites in biological fluid samples between sampling, extraction and analysis steps, different experiments have been carried out. Trout bile was spiked with a solution of standard in methanol (around 1 μ g.g⁻¹, gravimetrically checked) and stored at 4°C, -20°C and -80°C, in darkness. Samples were characterized each month during 6 months. All results dealing with the storage experiments are presented in Figure 4. The three storages gave widely different results. When stored at 4°C, significant losses were measured for all compounds (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). The recoveries ranged between 58% for 3-OHBaP and 77% for 4-OHPhe and the relative standard deviation (RSD) ranged from 14% and 22%. Such high variability in the recoveries rates at 4°C proved the non-suitability of this storage.

When stored at -20°C and -80°C, results showed no significant losses (measured mean concentrations were statistically the same in both experiments at a probability level of 95 % (Mann-Whitney test)). The recoveries range from 71% for 3-OHBaP and 98% for 4- and 9-OHPhe. The RSD vary between 4% and 14% for the storage at -20°C and between 4% and 10% for the storage at -80°C.

Therefore, it has been chosen to store the bile sample at -80°C just after sampling, particularly when analysis is not performed in the month. Considering the results of the storage study, they can ensure compound conservation and analysis validity over six months storage.

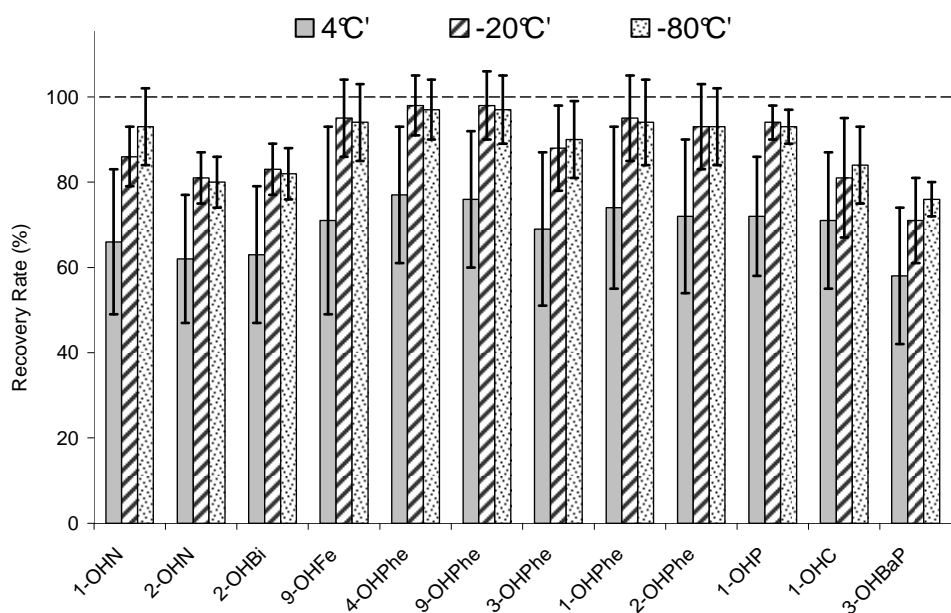


Figure 4: Effect of temperature on storage stability of PAH metabolites in spiked bile after six months. Results are expressed as mean percentage of the initial concentration (standard deviation, n = 6).

3.4 *Application to the Seine Estuary samples*

To assess the exposure of fish to PAH in the Seine estuary and to evaluate the optimized procedure for bile samples, sampling was conducted at different sites of the Seine estuary mouth in September 2006. The sensitivity of the analytical procedure was sufficient to detect most of the studied compounds. The entire protocol was applied to ten bile samples for each group of dabs collected from the Seine Bay (Adult males and females, juvenile males and females). 100 μ l (0.1 g) of bile samples were analyzed. After the sample loading on the STRATA X cartridge, the rinsing step with water and more particularly with water/methanol showed the removal of matrix constituents, which resulted in a clearer extract being obtained and a slower clogging of the GC/MS than with water rinsing alone. However, the obtained extract remained strongly concentrated in bile pigments. The HF PSA purification step with methanol/methylene chloride elution (20:80, v/v) proved to be efficient, ensuring a strongly selective elution of the metabolites with retention of most of the bile pigments in the first millimeters of the phase. The resulting extracts were completely colourless and transparent.

After GC/MS analysis, different metabolites could be detected and quantified in the bile (Figure 6). 1- and 2-hydroxynaphthalene, 2-hydroxybiphenyl, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene were identified. 4-hydroxy and 9-hydroxyphenanthrene isomers were not detected but three other isomers (1-, 2- and 3-hydroxyphenanthrene) could be quantified. 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene were not detected in any sample either. Major metabolites were found to be 1-OHP, the hydroxyphenanthrene isomers (OHPhe) and the 2-OHBi. The average concentrations and standard deviations obtained for the samples are presented in Table 9.

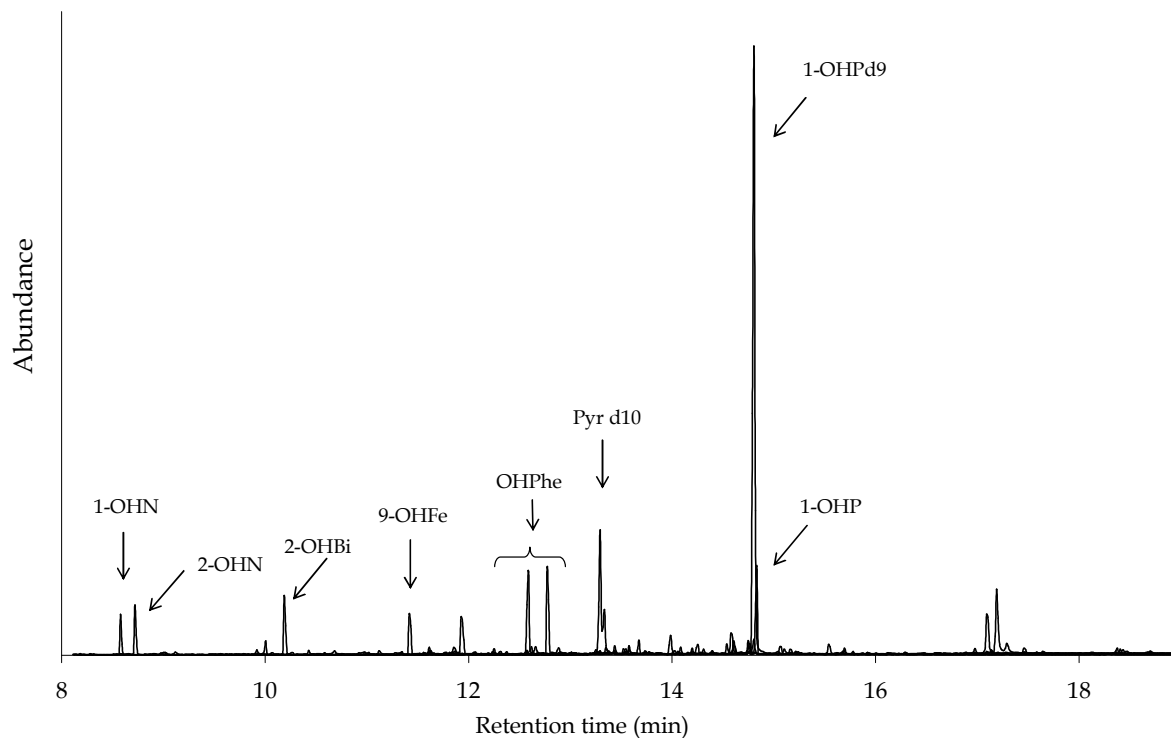


Figure 5: Chromatogram obtained for a fish bile sample analysed by GC/MS in SIM mode.

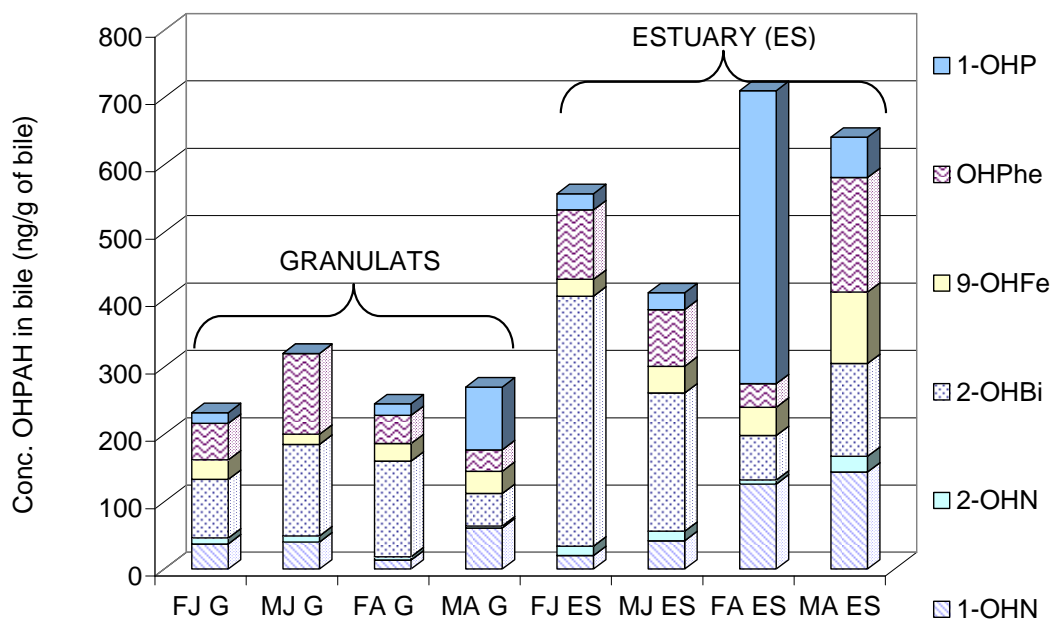


Figure 6: Mean concentrations of the different metabolites detected in the bile of dabs collected from two locations of the Seine Bay (Estuary and Granulats). Concentrations expressed in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile. ES: estuary, G: granulats, F: female, M: male, J: juvenile, A: adult.

The results suggest a stronger exposure to PAHs of dabs for the Seine mouth (Seine Estuary) ($\text{global concentration of } 580 \pm 68 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) than for dabs from Seine Bay (Granulats) ($\text{global concentration of } 267 \pm 33 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$). No significant difference has been found between juveniles and adults (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). This result does not agree with previous studies

[99] in which juvenile soles exhibited higher metabolite concentrations in bile than adults. However one should not forget that only one campaign has been taken into account in this study. More samplings have to be done to ensure conclusions. Indeed, metabolism processes are known to be affected by biotic and abiotic factors [100]. Temperature, sex and sexual maturity are predominant factors in the temporal and spatial variations of PAH biotransformation in fish. In general biotransformation processes and rates are correlated to gonads maturity [11] and thus the cycle of reproduction of dabs has to be taken into account when discussing of PAH metabolites concentrations during September 2006.

4 Conclusions

We have developed and validated an analytical method for the quantitative analysis of 12 OH-PAH metabolites in bile by GC/MS analysis. We have optimized each step in the method which has resulted in a sensitive and precise analytical method that only requires a small bile volume (100 μ l). The major goal of the work was to develop a simple SPE-GC method is by optimizing the extraction process, by maximizing the recovery of the target analytes and minimizing the amount of co-eluted impurities, under conditions which provide efficient and reproducible GC separation and detection. This work has provided a high-throughput, precise and low cost method based on GC/MS detection, which has been proved ideal for analyzing samples for environmental surveys. Preliminary results demonstrated the applicability of the method which was applied to natural fish bile samples. PAH metabolites were quantified in the range of few $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ to more than 100 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, demonstrating the interest to monitor PAH metabolites to assess PAH marine organisms exposure. The develop protocol is simple and robust and should enable more frequent and less expansive environmental surveys.

Acknowledgements: The authors wish to thank the National Program of Ecotoxicology (PNETOX program¹), the French National Research Agency (ANR) and the research team IMOPHYS for research funding. They want also to acknowledge the “Region Aquitaine” and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

¹ <http://www.ecologie.gouv.fr/-PNETOX-.html>, 10/10/08.

Table 9: Mean concentrations of the different metabolites detected in the bile of dabs collected from two locations of the Seine Bay (Estuary and Granulats) standard deviations (n = 10 fish). Concentrations expressed in ng.g⁻¹ of bile. ES: estuary, G: granulats, F: female, M: male, J: juvenile, A: adult. < LOD: below the individual limits of detection (see Table 8)

Compounds (ng.g ⁻¹)	Granulats (G)				Estuary (ES)			
	FJ G	MJ G	FA G	MA G	FJ ES	MJ ES	FA ES	MA ES
1-OHN	37 ± 4	40 ± 4	13 ± 1	61 ± 7	20 ± 6	42 ± 5	126 ± 13	144 ± 6
2-OHN	9 ± 1	9 ± 1	5 ± 1	3 ± 1	14 ± 1	14 ± 5	6 ± 5	23 ± 8
2-OHBi	87 ± 14	136 ± 22	142 ± 23	48 ± 8	371 ± 120	205 ± 33	66 ± 7	138 ± 19
9-OHFe	29 ± 3	15 ± 2	26 ± 3	33 ± 4	25 ± 3	40 ± 7	42 ± 11	106 ± 12
4-OHPhe	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
9-OHPhe	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
3-OHPhe	11 ± 1	16 ± 2	7 ± 1	5 ± 6	17 ± 7	20 ± 8	4 ± 3	38 ± 5
1-OHPhe	24 ± 2	86 ± 9	22 ± 2	18 ± 8	42 ± 21	30 ± 5	20 ± 2	89 ± 8
2-OHPhe	19 ± 2	18 ± 2	13 ± 1	9 ± 7	44 ± 4	34 ± 3	11 ± 5	43 ± 7
1-OHP	16 ± 1	< LOD	17 ± 2	93 ± 9	24 ± 2	25 ± 8	435 ± 68	60 ± 17
1-OHC	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
3-OHBaP	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

References

1. Malins, D. C., McCain, B. B., Myers, M. S., Brown, D. W., Krahn, M. M., Roubal, W. T., Schiewe, M. H., Landahl, J. T., and Chan, S. L. 1987. *Environmental health perspectives* **71**: p. 5-16.
2. Myers, M. S., Landahl, J. T., Krahn, M. M., and McCain, B. B. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 7-15.
3. Varanasi, U. and Stein, J. E. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 93-100.
4. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human*. Vol 32. 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
5. Zhang, W., Xu, D., Zhuang, G., Ding, C., Wang, G., Chang, J., and Ren, G. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **131**(1-3): p. 387-394.
6. Ruchirawat, M., Settachan, D., Navasumrit, P., Tuntawiroon, J., and Autrup, H. 2007. *Toxicology Letters* **168**(3): p. 200-209.
7. Palmqvist, A., Rasmussen, L. J., and Forbes, V. E. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(3): p. 309-319.
8. Inzunza, B., Orrego, R., Penalosa, M., Gavilan, J. F., and Barra, R. 2006. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(2): p. 242-251.
9. Fragoso, N. M., Hodson, P. V., and Zambon, S. 2006. *Environmental Monitoring and Assessment* **116**(1-3): p. 481-511.
10. Aina, R., Palin, L., and Citterio, S. 2006. *Chemosphere* **65**(4): p. 666-673.
11. van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): p. 57-149.
12. Robertson, A. 1998 *Petroleum Hydrocarbons*, in *Amap Assessment Report: Arctic Pollution Issues*, Wilson, S.J., Murray, J.L., and Hungtington, H.P., Editors: Oslo. p. 859
13. James, M. O. 1989 *Biotransformation and Disposition of Pah in Aquatic Invertebrates*, P 69-92, in *Metabolism Fo Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Varanasi, U., Editor CRC Press: Boca Raton. p. 341.
14. Neff, J. M., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. 1979, London: Applied Science Publishers Ltd. 262.
15. Lee, R. F., Sauerheber, R., and Dobbs, G. H. 1972. *Marine Biology* **17**: p. 201-208.
16. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1981. *Aquatic Toxicology* **1**(1): p. 49-67.
17. Varanasi, U., Reichert, W. L., Stein, J. E., Brown, D. W., and Sanborn, H. R. 1985. *Eviron. Sci. Technol.* **19**: p. 836-841.
18. Varanasi, U., Chan, S. L., McLeod, W. D., Stein, J. E., Brown, D. W., Burrows, D. G., Tilbury, K. L., Landahl, J. T., Wigren, C. A., Hom, T., and Pierce, S. M., *Noaa Technical*

- Memorandum: Survey of Subsistence Fish and Shellfish for Exposure to Oil Spilled from the Exxon Valdez : First Year, 1989.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1990.
19. Tuvikene, A. 1995. *Ann. Zool. Fenn.* **32**: p. 295-309.
 20. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T., and Bellocq, J. 1998. *Marine Pollution Bulletin* **36**(12): p. 951-960.
 21. Nakata, H., Sakai, Y., Miyawaki, T., and Takemura, A. 2003. *Environmental science & technology* **37**(16): p. 3513-3521.
 22. Meador, M. R., Brown, L. R., and Short, T. 2003. *Ecological Indicators* **3**(2): p. 81-92.
 23. Kammann, U. 2007. *Environmental Science and Pollution Research* **14**(2): p. 102-108.
 24. Johnson, L. L., Ylitalo, G. M., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Stafford, C., Bolton, J. L., Buzitis, J., Anulacion, B. F., and Collier, T. K. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **124**(1-3): p. 167-194.
 25. Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., and Schiedek, D. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 479-487.
 26. Pikkarainen, A. L. 2006. *Chemosphere* **65**(10): p. 1888-1897.
 27. Krahn, M. M., Burrows, D. G., MacLeod, W. D., and Malins, D. 1987. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**(5): p. 511-522.
 28. Krahn, M. M., Kittle, J., Lewey J., and MacLeod, J., William D. 1986. *Marine Environmental Research* **20**(4): p. 291-298.
 29. McDonald, S. J., Kennicutt II, M. C., Liu, H., and Safe, S. H. 1995. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**: p. 232-240.
 30. Van der Oost, R., Van Schooten, F.-J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K., and Vermeulen, N. P. E. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(6): p. 859-870.
 31. Krahn, M. M., Moore, L. K., and McLeod, W. D., *Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1986 : Metabolites of Aromatic Compounds in Fish Bile.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1986, NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-102.
 32. Vuontisjärvi, H., Keinänen, M., Vuorinen, P. J., and Peltonen, K. 2004. *Polycycl. Aromat. Compd.* **24**: p. 333-342.
 33. Jonsson, G., Taban, I. C., Jorgensen, K. B., and Sundt, R. C. 2004. *Chemosphere* **54**(8): p. 1085-1097.
 34. Jonsson, G., Beyer, J., Wells, D., and Ariese, F. 2003. *J. Environ. Monit.* **5**: p. 513-520.
 35. Ferrari, S., Mandel, F., and Berset, J. D. 2002. *Chemosphere* **47**(2): p. 173-182.
 36. Gündel, J. and Angerer, J. 2000. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **738**(1): p. 47-55.

37. Lee, C.-K., Cho, S.-H., Kang, J.-W., Lee, S.-J., Ju, Y.-S., Sung, J., Strickland, P. T., and Kang, D. 1999. *Toxicology Letters* **108**(2-3): p. 209-215.
38. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1994. *Journal of Chromatography A* **683**(1): p. 9-19.
39. Mastenbroek, J. W. G., Ariese, F., Gooijer, C., Velthorst, N. H., Hofstraat, J. W., and van Zeijl, W. J. M. 1990. *Chemosphere* **21**(3): p. 377-386.
40. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Racine, R. N. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(5): p. 707-715.
41. Ariese, F., Burgers, I., Oudhoff, K., Rutten, T., Stroomberg, G., and Vethaak, D. 1997.
42. Aas, E. and Klungsoyr, J. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 229-232.
43. Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N. H., and Hofstraat, J. W. 1993. *Aquatic Toxicology* **26**(3-4): p. 273-286.
44. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Torsella, J. A. 1996. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **35**(1): p. 16-23.
45. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 2000. *Biomarkers* **5**(1): p. 9-23.
46. Yang, X. and Baumann, P. C. 2006. *Ecological Indicators* **6**(3): p. 567-574.
47. Schiedek, D., Broeg, K., Barsiene, J., Lehtonen, K. K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, H., Vuorinen, P. J., Dedonyte, V., Koehler, A., Balk, L., and Schneider, R. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 387-405.
48. Mdegela, R., Myburgh, J., Correia, D., Braathen, M., Ejobi, F., Botha, C., Sandvik, M., and Skaare, J. U. 2006. *Ecotoxicology* **15**(1): p. 51-59.
49. Martinez-Gomez, C., Campillo, J. A., Benedicto, J., Fernandez, B., Valdes, J., Garcia, I., and Sanchez, F. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(5-7): p. 305-314.
50. Malins, D. C., Anderson, K. M., Stegeman, J. J., Jaruga, P., Green, V. M., Gilman, N. K., and Dizdaroglu, M. 2006. *Environmental Health Perspectives* **114**(6): p. 823-829.
51. Da Silva, D. A. M., Buzitis, J., Krahn, M. M., Bicego, M. C., and Pires-Vanin, A. M. S. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **52**(2): p. 175-183.
52. Barsiene, J., Lehtonen, K. K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Lang, T., Pempkowiak, J., Syvokiene, J., Dedonyte, V., and Rybakovas, A. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **Volume 53**(Issues 8-9): p. Pages 422-436.
53. Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gaviln, J. F., and Barra, R. 2005. *Chemosphere* **61**(2): p. 192-199.
54. Santana Rodriguez, J. J. and Miller, J. N. 1998. *Analyst* **123**(11).
55. Jonsson, G., Sundt, R. C., Aas, E., and Beyer, J. 2004. *Chemosphere* **56**(1): p. 81-90.
56. Elovaara, E., Mikkola, J., Makela, M., Paldanius, B., and Priha, E. 2006. *Toxicology Letters* **162**: p. 158-163.
57. Hellou, J. and Leonard, J. 2004. *Polycyclic Aromatic Compounds* **24**(4-5): p. 697-712.

58. Solbakken, J. E., Palmork, K. H., Neppelberg, T., and Scheline, R. R. 1980. *acta pharmacol. et toxicol.* **46**: p. 127-132.
59. Krahn, M. M., Ylitalo, G. M., Buzitis, J., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1993. *Journal of Chromatography A* **642**(1-2): p. 15-32.
60. Hellou, J. and Payne, J. F. 1987. *Environmental Toxicology and Chemistry* **6**: p. 857-862.
61. Deshpande, A. D. 1988. *Marine Environmental Research* **24**(1): p. 119-120.
62. Deshpande, A. D. 1989. *Archives of environmental contamination and toxicology* **18**(6): p. 900-907.
63. Yu, Y., Wade, T. L., Fang, J., McDonald, S., and Brooks, J. M. 1995. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **29**(2): p. 241-246.
64. Escartin, E. and Porte, C. 1999. *Environ Sci Technol* **33**: p. 2710-2714.
65. Troisi, G. M., Bexton, S., and Robinson, I. 2006. *Environmental Science and Technology* **40**(24): p. 7938-7943.
66. Romanoff, L., Li, Z., Young, K., Blakely, N., Patterson Jr, D., and Sandau, C. 2006. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **835**(1-2): p. 47-54.
67. Luan, T. G., Yu, K. S. H., Zhong, Y., Zhou, H. W., Lan, C. Y., and Tam, N. F. Y. 2006. *Chemosphere* **65**(11): p. 2289-2296.
68. Gmeiner, G., Gartner, P., Krassnig, C., and Tausch, H. 2002. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **766**(2): p. 209-218.
69. Gmeiner, G., Krassnig, C., Schmid, E., and Tausch, H. 1998. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **705**(1): p. 132-138.
70. Mazéas O and Budzinski H. 2005. *Anal. Bioanal.Chem* **383**: p. 985-990.
71. Richardson, D. M., Davies, I. M., Moffat, C. F., Pollard, P., and Stag, R. M. 2001. *J Environ Monit* **3**(6): p. 610-615.
72. Schanke, A. v., Holtz, F., der Meer, J. v., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., den Berg, M. v., and Everaarts, J. M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): p. 1641-1647.
73. Steward, A. R., Kandaswami, C., Chidambaram, S., Ziper, C., Rutkowski, J. P., and Sikka, H. C. 1990. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**: p. 1503-1512.
74. Krahn, M. M., Burrows, D. G., Ylitalo, G. M., Brown, D. W., Wigren, C. A., Collier, T. K., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1992. *Environ Sci Technol* **26**: p. 116-126.
75. Maisonnette, C., Simon, P., Hennion, M. C., and Pichon, V. 2006. *Journal of Chromatography A* **1120**(1): p. 185-193.
76. Romanoff L.C, Li Z, Young K.J, Blakely N.C, Patterson Jr D.G, and Sandau C.D. 2006. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **835**(1-2): p. 47-54.

77. Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., Andre, F., and Rychen, G. 2005. *Journal of analytical toxicology* **29**(3): p. 175-181.
78. Van de Wiele, T. R., Peru, K. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D., and Headley, J. V. 2004. *Journal of Chromatography B* **806**(2): p. 245-253.
79. Munoz-Olivas, R. 2004. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **23**(3): p. 203-216.
80. McElroy, A. E., Farrington, J. W., and Teal, J. M. 1990. *Environ Sci Technol* **24**: p. 1648-1655.
81. Simpson, C. D., Cullen, W. R., He, T. Y. T., Ikonomou, M., and Reimer, K. J. 2002. *Chemosphere* **49**(3): p. 315-322.
82. Law, F. C. P., Meng, J. X., He, Y. T., and Chui, Y. C. 1994. *Xenobiotica* **24**(3): p. 221-229.
83. Mazéas, O. and Budzinski, H. 2005. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**(6): p. 985-990.
84. Statham, C., Melancon, M. J., and Lech, J. J. 1976. *Nature* **193**: p. 680-681.
85. Varanasi, U., Eberhart, B. T., Nishimoto, M., and Reichert, W. 1985. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **VOL. 26**.
86. Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W. L., and Le Eberhart, B. T. 1986. *Cancer Research* **46**(8): p. 3817-3824.
87. Varanasi, U., Reichert, W. L., Le Eberhart, B. T., and Stein, J. E. 1989. *Chemico-Biological Interactions* **69**(2-3): p. 203-216.
88. Leonard, J. D. and J., H. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): p. 618-623.
89. Keith, L. H. and Telliard, W. A. 1979. *Environ Sci Technol* **13**: p. 416-423.
90. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 225-228.
91. Smith, C. J., Walcott, C. J., Huang, W., Maggio, V., Grainger, J., and Patterson, J., Donald G. 2002. *Journal of Chromatography B* **778**(1-2): p. 157-164.
92. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1996. *Journal of Chromatography A* **731**(1-2): p. 75-84.
93. Koeber, R., Niessner, R., and Bayona, J. M. 1997. *Fresenius J Anal Chem* **359**: p. 267-273.
94. Xu, X., Zhang, J., Zhang, L., Liu, W., and Weisel, C. P. 2004. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **18**: p. 2299-2308.
95. Pignini, D., Cialdella, A. M., Faranda, P., and Tranfo, G. 2006. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **20**: p. 1013-1018.
96. Wang, J. J., Frazer, D. G., Law, B., and Lewis, D. M. 2003. *Analyst* **128**(7): p. 864-870.
97. Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., and Willett, K. 2008. *Journal of chromatography B* **863**(1): p. 141-149.

98. Jonsson, G., Beyer, J., Wells, D., and Ariese, F. 2003. *Journal of Environmental Monitoring* **5**: p. 513-520.
99. Budzinski, H., Mazéas, O., Tronczynski, J., Desaunay, Y., Bocquene, G., and Claireaux, G. 2004. *Aquat. Living Resour.* **17**: p. 329-334.
100. Kopecka, J., Lehtonen, K. K., Barsiene, J., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Gercken, J., and Pempkowiak, J. *Marine Pollution Bulletin* **In Press, Corrected Proof**.

Publication n°2**Quantification of biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry with comparison to conventional gas chromatography.**

Justyna Sekula^{1,2}, Marie Le Dû-Lacoste², Karyn Le Menach², Luc Nagels¹, H el ene Budzinski^{2*}

¹ Antwerp University, Chemistry Department, Groenenborgerlaan 171, B-2020 Antwerp, Belgium

² Universite de Bordeaux ISM-LPTC UMR 5255 CNRS, 351 Cours de La Liberation, 33405 Talence, France

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

An analytical procedure for the determination of five polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (2-hydroxynaphthalene, 1-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxypyrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene) in fish bile has been developed. For this purpose the use of gas chromatography coupled with MS/MS detection was examined. The limits of detection for spiked bile samples were less than or equal to 2.8 pg injected for each metabolite. The method demonstrated good recoveries (79-102 %) for all the analytes, excluding 3-hydroxybenzo(a)pyrene (63 %) and good precision (3-11 %). The entire protocol was applied to the analysis of several bile samples from hake fish (*Merluccius merluccius*).

Keywords: PAH metabolites, fish bile, GC-MS/MS, 3-hydroxybenzo(a)pyrene.

Submitted to Journal of Chromatography B

1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of over 100 different chemicals, typically formed during incomplete combustion [1, 2, 3] of materials such as coal [4], oil [5], garbage or other organic substances like tobacco or charbroiled meat [6, 7]. PAHs can also enter the air as releases from volcanoes [8], forest fires [9], and car exhausts. Fires can form fine PAH particles [10, 11]. They bind to ash particles and can move over a long distance through the air [12, 13, 14]. High exposure to PAHs occurs in several industries and occupations: aluminium production, chimney sweeping, iron and steel foundries. As well as in shale oil extraction, wood impregnation, road paving, carbon black production, carbon electrode and calcium carbide production [15]. Many of these compounds are mutagenic [16, 17, 18], and carcinogenic [19, 20, 21] and some have been reported to cause reproductive toxicity in both aquatic [22, 23], and non-aquatic animals [24, 25]. PAHs can enter into the groundwater from ash, tar or creosote that is improperly disposed on landfills. They enter the aquatic environment [26] from a variety of sources, for example, municipal and industrial waste effluents, atmospheric fallout of airborne particles, oil spills and surface runoff from land [27, 28, 29].

Elevated concentrations of PAHs in the air and water can lead to significant environmental effects in both marine and fresh water systems. PAH concentrations are rarely high enough to kill aquatic organisms outright. Physical and biochemical changes often result from prolonged exposure to low levels of these compounds [30]. Once in the aquatic systems, most PAHs are associated with the particulate phase due to their hydrophobic properties giving rise to accumulation in sediments [31, 32, 33]. PAHs present in sediments can be rapidly absorbed by fish via the gills and body surface what have resulted in liver damage and tumors in flatfish (which live on or near the bottom), and affect reproduction [34, 35]. The exposure and contamination of aquatic organisms to PAHs have generally been evaluated by the quantification of bioaccumulated PAHs in tissues.

However, this approach is open to criticism when taking into account the biotransformation abilities of biological organisms such as vertebrates and the toxic properties of such biotransformation products. Monohydroxylated PAHs are known to be some of the major metabolites excreted in the gall bladder, either present in their free form but mainly conjugated with glucuronide, glutathione and sulphate groups [36, 37, 38]. These more soluble conjugated metabolites are formed in the liver, concentrated in the bile and are ultimately excreted [39, 40, 41, 42, 43]. As a consequence, tissue levels of parent PAHs do not usually provide an adequate assessment of the exposure level [44, 45]. In this sense, the aim of this study was to evaluate the impact of PAH metabolites in order to study the exposure and contamination of organisms to PAHs in the marine environment [46, 47, 48]. The presence of PAH metabolites in fish bile has been used as an indicator of exposure to PAH [49, 50].

For this purpose, we considered two chromatographic methods: liquid and gas phase chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS and GC/MS). Several groups have worked on the analysis of OH-PAH using HPLC or gas chromatography (GC) prior to mass spectrometry (MS) detection [51, 52, 53]. Both methods were tested and compared in the past by our group [54] for the detection of selected hydroxyl-metabolites of PAHs. LC/MS provided lower detection limits but only with GC/MS whole sets of compounds were detected. Moreover good separation was only achieved by gas chromatography. LC/MS is to some extent a less mature technique and there are no spectral libraries available for compound identification as there are with GC instruments. However, due to limitations of volatility it is necessary to perform derivatization steps before sample injections to the GC/MS. The sample size used for gas chromatography is usually between 1 and 5 μ l, which was important in this study as we normally have only small amounts of natural samples. It is also necessary to monitor the contamination at very low levels.

An alternative approach for GC/MS is tandem mass spectrometry (MS/MS), where a target compound ion is isolated from matrix and then fragmented to generate very unique spectra. In

GC/MS the sample is usually ionised directly (EI), or indirectly (CI) by an electron beam. The high-energy electrons cause the formation of free radical ions. In fact the electron beam is often energetic enough to cause substantial fragmentation. The fragments are also free radicals, and form the "fingerprint" that is used in confirmation of identity. This fingerprint is compared with library fingerprints; NIST is probably the most widely used library.

There is an obvious need for test procedures that provide unambiguous results in the low concentrations range for PAH metabolites. The selectivity advantage of GC-MS/MS allows an analyst to quantify and identify components on very low levels in the most difficult matrices. GC-MS/MS provides extreme selectivity against matrix interferences through few separation mechanisms: chromatographic separation on GC column with accompanying knowledge of the retention time, isolation of a characteristic ion, fragmentation of the isolated ion to a unique set of product ions which unambiguously identifies the presence or absence of the targets.

To this end, an analytical methodology to quantify PAH metabolites by GC-MS/MS in biological matrices (bile) was developed as coupling GC with MS/MS became a new powerful and very sensitive method. The following compounds (Figure 1) known to be some of the major metabolites produced by fish were chosen: 2-naphtol, 1-phenanthrol, 1-pyrenol, 1-chrysenol and 3-benzo(a)pyrenol .

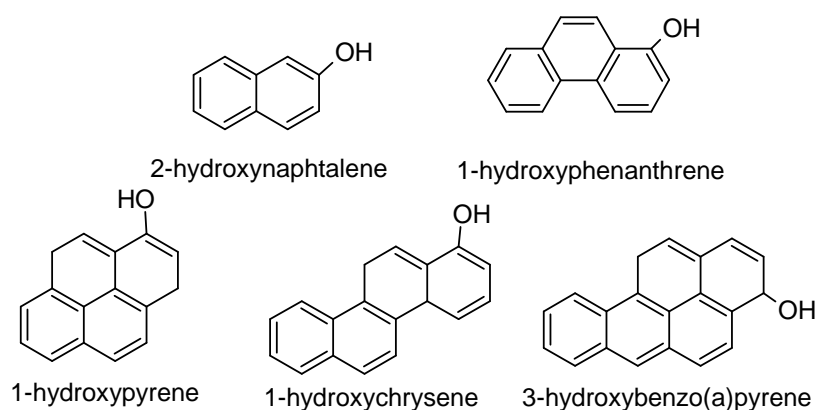


Figure 1: The five studied hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites (OH-PAHs).

2 Materials and Methods

2.1 Chemical and reagents

All reagents and solvents were of analytical or HPLC grade quality (> 98%). 2-hydroxynaphthalene (2-OHN) was purchased from Lancaster (Bisheim, France), 1-hydroxyphenanthrene (1-OHPhe), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) were from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene (1-OHP) was from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France); 1-hydroxypyrene-d₉ (1-OHPd₉) and pyrene-d₁₀ (Pd₁₀) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Ste Foy La Grande, France). Dichloromethane was supplied by Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Methanol Supersolv was provided by Merck, acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) was obtained from ICS (Belin-Beliet, France). β -glucuronidase-aryl-sulfatase mixture from *Helix pomatia* (100,000 and 7,500 units/ml respectively) and sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) were provided by Sigma Aldrich (St Quentin Falavier, France). Trifluoroacetic acid (Reagent grade, purity > 99%) was obtained from Fischer chemicals (Fischer Scientific Labo, Elancourt, France). 2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France).

Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). The cartridges used for solid phase extraction (SPE) were silica-based cartridges, BakerBond Elut C₁₈ (3 ml, 500 mg) from J.T Baker provided by Atlantic Labo (Eysines, France). The purification step was performed on a silica-based cartridge Supelclean LC-NH₂ (3 ml, 500 mg) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France).

Individual stock standard solutions of 2-naphtol, 1-phenanthrol, 1-pyrenol, 1-chrysenol, 3-benzo(a)pyrenol, 1-pyrenol d9 and pyrene d10 at concentrations varying between 6.5 and 9.5 µg.g⁻¹, were prepared in dichloromethane. A second set of stock solutions (for spiking samples) at concentration around 70 µg.g⁻¹, were prepared in methanol. Stock solutions of individual analytes were then combined before being used in further analysis. All the solutions were stored in the freezer.

2.2 Sample preparation

Bile samples were prepared according to the protocol described by Le Dû-Lacoste and Budzinski [55].

The weighted whole bile were thawed and then homogenized in precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid) (100 µl of bile: 2 ml buffer). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d9, 20 µl of mercaptoethanol, used as an antioxidant, and 20 µl of β-glucuronidase and arylsulfatase mixture were added to the samples. They were then placed at 37°C in an oven during 18 hours for hydrolysis. After deconjugation, bile samples were ultrasonicated and centrifuged (10 min, 5 000 rpm, 20°C). Solid-phase Strata X cartridges were preconditioned with 2 ml methanol and 4 ml buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml buffered water and 2 ml water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v) before purification made on solid-phase HF PSA Varian cartridges. Before loading the extracts redissolved in methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the purification cartridges were first preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. Extracts were reduced to dryness under a nitrogen stream, redissolved in 50 µl dichloromethane and 30 µl of a derivatizing agent (BSTFA) were finally added. The derivatization was then completed by incubation at 65°C during 30 min. After derivatization and before GC-MS analysis, a solution of deuterated internal standard (pyrene-d10, 20 µl) was added to the sample for recovery determination. The whole procedure for the sample preparation is shown in Figure 2.

2.3 GC-MS Conditions

The analysis of the PAH metabolites were performed on HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies both purchased from BIOS Analytique (I'Union, France). The separation was performed on an Agilent Technologies HP5-MS capillary (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethyl-siloxane), with the following oven parameters: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min. The injection volume was set at 1 µl (automated Programmed Temperature Vaporization (PTV) pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min)), while the injector temperature was set at 250°C and the interface temperature at 280°C. The purge flow was set at 60 ml/min during 1.5 min and helium 6.0 (Linde, Bassens, France) was used as the carrier gas (constant flow: 1 ml/min). Acquisition was performed in selected ion monitoring mode (SIM), with 1.53 scan/s and a dwell time of 50 ms for each ion. The source temperature was set at

150°C, and the electron multiplier voltage set at 2,000 V. Quantitation ions were as follows: 2-naphthol (216), 1-phenanthrol (266), 1-pyrenol (290), 1-chrysenol (316), 3-benzo(a)pyrenol (340).

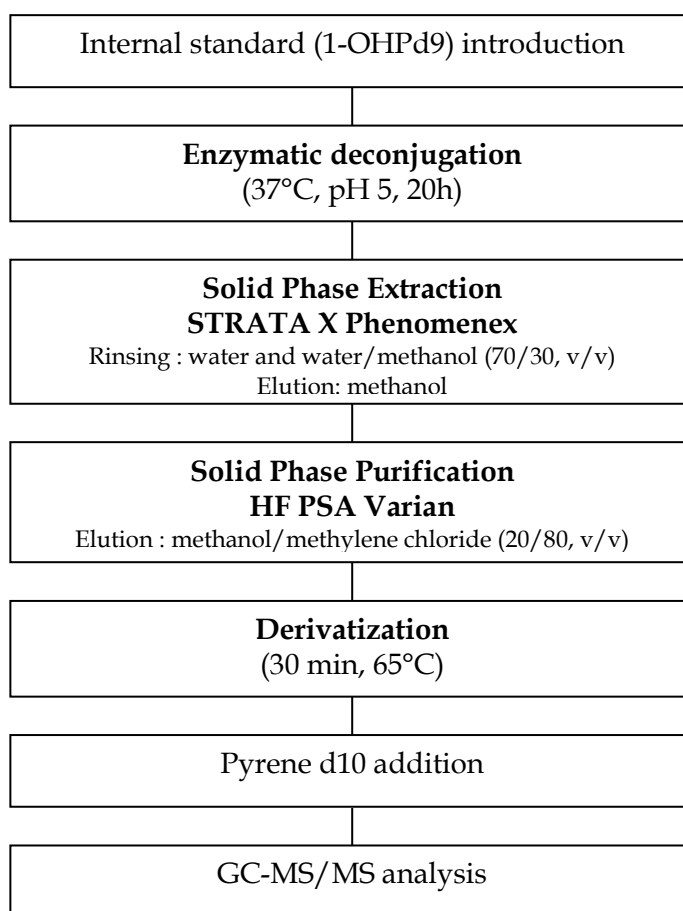


Figure 2: General procedure for PAH metabolites analysis in fish bile samples.

2.4 *GC-MS/MS method*

The analysis was performed with a GC-MS/MS system comprising a GC6890 gas chromatograph Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France) with a RAB051 Waters Micromass® Quattro Micro™ tandem quadrupole mass spectrometer (Manchester, UK) equipped with an electron impact ionization (EI) source. Two autosamplers were employed, the first an Agilent Technologies 7683 Series injector subsequently replaced by a CTC Analytics PAL System. Data acquisition and processing were performed using Mass Lynx software (version 4.0). Chromatographic separation was obtained using an Agilent Technologies HP5-MS capillary column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethyl-siloxane). The sample injection volume was 1 µl. The samples were injected in Splitless and in Programmed Temperature Vaporization (PTV) mode for comparison. PTV mode was chosen for further analysis because of its better reproducibility. The oven temperature was increased from 70°C (held for 1 min.) to 310°C (held for 5 min.) at 10°C/min. The total GC run time was 34 minutes. Helium (6.0 purity; Linde, Bassens, France) was used as a carrier gas at a flow rate of 1.3 ml/min. Argon was used as a collision gas, at collision gas pressure of 3.00×10^{-3} Bar. The tandem quadrupole mass spectrometer was operated in electron impact (EI) mode. The MS/MS detector interface temperature was set at 250°C, the source temperature at 150°C, electron energy at 70 eV and filament current at 200 µA.

The solvent delay time was 9 min. Perfluorotributylamine (heptacosyl) from Waters UK Ltd., Manchester, was used for tuning the mass spectrometer. Mass spectrometry analyses were done in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, measuring the fragmentation products of the molecular ions of each metabolite and internal standard. The choice of fragmentation products for each analyte and the optimization of energy collisions and other instrument parameters were carried out using standard solutions at concentrations of 6.6-9.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in dichloromethane. The multiple reaction monitoring (MRM) conditions for the analytes are given in Tables 1 and 2 for non derivatized and derivatized samples respectively.

The parent ion of OH-HAP presented in Table 2 corresponds to the molecular ion obtained after derivatization ($[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$). These ions deliver daughter ions, which were indicative of the structure of the analyte, being adequate for an accurate identification. In the case of OH-PAHs the major daughter ion corresponded to the loss of a methyl group from the parent ion ($[\text{M} + \text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+ - 15$). The second transition (used for confirmation) corresponds to ion 73 which is obtained as a result of BSTFA fragmentation ($[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$).

Table 1: The multiple reaction monitoring (MRM) conditions for non derivatized analytes. Tested standard solutions at concentrations of 6.6-9.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ were prepared in dichloromethane.

Analytes	Transition (m/z)	Collision energy (eV)	Injected concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
2-naphtol	144-115	18	6.9
1-phenanthrol	194-165	20	6.6
1-pyrenol	218-189	30	6.6
1-chrysenol	244-215	30	9.5
3-benzo(a)pyrenol	268-239	26	7.7

Table 2: The multiple reaction monitoring (MRM) conditions for derivatized analytes. Tested standard solutions at concentrations of 6.6-9.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ were prepared in dichloromethane.

Analytes	Transition 1 (m/z)	Collision energy T1 (eV)	Transition 2 (m/z)	Collision energy T2 (eV)	Quantifying ion	Qualifying ion	Injected concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
2-naphtol	216-201	8	216-73	20	73	201	6.9
1-phenanthrol	266-251	10	266-73	22	73	259	6.6
1-pyrenol	290-275	10	290-73	22	73	275	6.6
1-chrysenol	316-301	10	316-73	20	73	301	9.5
3-benzo(a)pyrenol	340-325	16	340-73	28	73	325	7.7

3 Results and discussion

3.1 Method optimization

First all compounds were characterized individually in Full SCAN mode with electron impact ionization for further identification by retention time and mass spectrum. The suite of compounds was detected with this method. The most intense, highest mass precursor ions were

selected from SCAN spectra for the optimization of ionization energy in daughter scan mode. The ions were subjected to collision energy (CE) voltages from 5 to 45 V.

The next step was the development of the MRM method with one transition (non derivatized samples) and two transitions (derivatized samples) for each analyte. The selection of MS/MS transitions and the acquisition parameters (collision energy, number of transitions per time segment and the number of data points across the peak) were evaluated for best response under electron ionization conditions. Four transitions were programmed into each time segment to optimize the response and a scan rate of 0.2 s data per point was set to collect a minimum of 5 points across a chromatographic peak. The transitions and optimal CE for non derivatized and derivatized analytes are detailed in Tables 1 and 2, respectively.

The derivatization effect on PAH metabolites was also studied. The results obtained before and after derivatization with BSTFA are described in Figure 3. The test results show higher response for derivatized samples. For all compound signal increase was at least by factor 2. Replacement of active hydrogen by a silyle group reduces the polarity of the compound and reduces hydrogen bonding. Compared to their parent compounds, silyle derivatives are more volatile, less polar and more thermally stable. As a result, GC separation is improved and detection is enhanced (Figure 3).

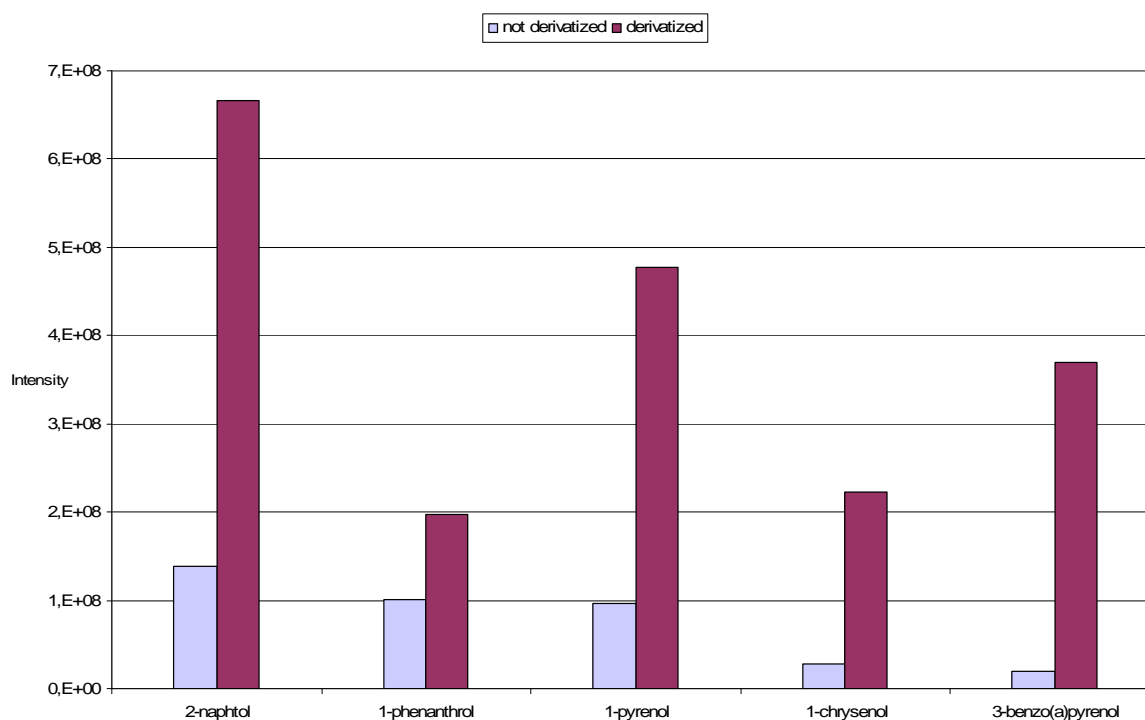


Figure 3: Difference in abundance between five PAH metabolites (2-naphtol, 1-phenanthrol, 1-pyrenol, 1-chrysenol and 3-benzo(a)pyrenol) before and after derivatization with BSTFA.

3.2 *Method validation*

In order to choose between PTV and Splitless injection mode, standard solutions (prepared in dichloromethane) were tested with results summarized in Table 3. The mean recoveries ranged between 92 and 109% for all compounds in Splitless mode and between 99 and 101% in PTV mode, with relative standard deviations from 4 to 10% in Splitless mode, and from 2 to 7% in PTV mode.

Table 3: Recovery (R %) for standard solutions measured in PTV and Splitless mode n=5, 1 µl injected. Tested standard solutions at concentrations between 20 ng.g⁻¹-1.9 µg.g⁻¹ were prepared in dichloromethane.

Analytes	R % Splitless mode	RSD% Splitless mode	R % PTV mode	RSD% PTV mode	Concentration
2-naphtol	98	4	99	3	20 ng.g ⁻¹ -1.4 µg.g ⁻¹
1-phenanthrol	100	4	100	4	30 ng.g ⁻¹ -1.9 µg.g ⁻¹
1-pyrenol	97	5	100	2	30 ng.g ⁻¹ -0.9 µg.g ⁻¹
1-chrysenol	109	6	100	3	30 ng.g ⁻¹ -0.7 µg.g ⁻¹
3- benzo(a)pyrenol	92	10	99	7	70 ng.g ⁻¹ -1.8 µg.g ⁻¹

Then, spiked water samples were prepared to compare the method in both modes. The obtained data are given in Table 4. The mean recoveries ranged between 84 and 112% for all compounds in Splitless mode and between 79 and 99% in PTV mode, with relative standard deviations from 4 to 11% in Splitless mode, and from 2 to 8% in PTV mode. PTV mode, being more precise, was chosen for following tests for spiked bile samples.

Table 4: Recovery (R%) of spiked water samples. n=3, 1 µl injected.

Analytes	R% Splitless mode	RSD %	R% PTV mode	RSD %	Water concentration [µg.g ⁻¹]
2-naphtol	84	4	88	8	0.17
1-phenanthrol	100	7	94	7	0.16
1-pyrenol	92	8	92	3	0.16
1-chrysenol	112	6	99	2	0.16
3- benzo(a)pyrenol	84	11	79	7	0.48

The analytical performance of the GC/MS and GC-MS/MS methods was evaluated by testing the linearity, accuracy, precision and sensitivity. Linearity was tested with standard mixtures in dichloromethane in the range presented in Table 5. Obtained correlation coefficients were higher for GC-MS/MS and ranged between 0.9903 (1-chrysenol; 3-benzo(a)pyrenol) and 0.9999 (2-naphtol). The intra-day and inter-day precisions for GC-MS/MS ranged between 4 and 6% and between 10 and 14 %, respectively and they were comparable with results obtained by GC-MS (4-11% and 7-11% respectively). Methodological limits of detection (LOD Table 6) as well as instrumental limits of detection (IDL Table 5) were obtained for a signal-to-noise ratio of 3 and were much lower for GC-MS/MS, this is especially evident for 2-naphtol and 3-benzo(a)pyrenol where IDLs were from 4 to 16 times lower than for GC/MS. Comparing those two methods GC-MS/MS is more sensitive, specific and has lower limits of detection.

Table 5: Method performance parameters for standard solutions (prepared in dichloromethane) measured in PTV mode n=5, 1 µl injected, IDL instrumental limit of detection.

Analytes	Range of linearity		R ²		Repeatability (RSD %)		Reproducibility (RSD %)		IDL (pg injected)	
	GC/MS	GC-MS/MS	GC/MS	GC-MS/MS	GC/MS	GC-MS/MS	GC/MS	GC-MS/MS	GC/MS	GC-MS/MS
2-OHN	3 ng.g ⁻¹ - 30 µg.g ⁻¹	0.1-441 ng.g ⁻¹	0.9918	0.9999	5	4	9	11	0.3	0.08
1-OHPhe	3 ng.g ⁻¹ - 30 µg.g ⁻¹	0.2-440 ng.g ⁻¹	0.9935	0.9986	4	4	10	10	0.1	0.07
1-OHP	3 ng.g ⁻¹ - 30 µg.g ⁻¹	0.2-502 ng.g ⁻¹	0.9978	0.9910	4	5	7	13	0.3	0.25
1-OHC	3 ng.g ⁻¹ - 30 µg.g ⁻¹	0.4-490 ng.g ⁻¹	0.9843	0.9903	6	4	8	14	2.5	0.16
3-OHBaP	7 ng.g ⁻¹ - 40 µg.g ⁻¹	1.7- 1,850 ng.g ⁻¹	0.9255	0.9903	11	6	11	11	8.1	2.79

Table 6: Methodological limits of detection (LOD) measured by GC-MS/MS for spiked water and spiked bile samples with comparison to GC/MS, PTV mode, 1 µl injected, n=4.

Analytes	Spiked water		Spiked bile	
	LOD (ng.l ⁻¹ of water) GC/MS	LOD (ng.l ⁻¹ of water) GC-MS/MS	LOD (ng.l ⁻¹ of bile) GC/MS	LOD (ng.l ⁻¹ of bile) GC-MS/MS
2-naphtol	1.6	0.2	3.9	0.7
1-phenanthrol	0.4	0.1	0.9	0.5
1-pyrenol	0.6	0.7	1.3	0.3
1-chrysenol	4.5	0.6	6.6	1.4
3- benzo(a)pyrenol	13.6	4.9	20.6	8.5

3.3 *Spiked bile samples*

For spiked bile samples turbot (*scophthalmus maximus*) from the Aquacole Farm in the city of Re (50 g weight and 13 cm length) were caught and transported to the lab. Afterwards, the fish were kept for 40 days in a large 760 litres aquarium for acclimatization. 10 fish were subsequently used and bile was harvested from the gall bladder and the collected bile was used for spiking.

Figure 4 shows chromatograms for spiked bile samples analyzed with the above described procedure. The absence of interfering peaks around the retention times of analytes in chromatograms demonstrates that the clean-up procedure fitted the purpose. Recoveries obtained in PTV mode were between 79% and 102% for all metabolites excluding 2-naphtol (63%), the precision of the experimental procedure was evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD) from three different extractions of the spiked sample. Values ranged from 3% to 11% for all analytes (Table 7), which indicates good repeatability of the method.

Table 7: Recovery (R %) of spiked bile samples n=3.

Analytes	R %	Concentration in the bile [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	RSD %
2-naphtol	63	1.0	4
1-phenanthrol	80	2.1	11
1-pyrenol	98	1.4	3
1-chrysenol	102	0.9	11
3- benzo(a)pyrenol	79	2.8	3

The limits of detection (LODs), defined as the amount injected which gave a signal equivalent to three times the baseline noise, was determined experimentally for the spiked water and spiked bile samples. The LODs based on areas of the optimized transition ions are presented in Table 6 with comparison to GC/MS. Detection limits obtained for GC-MS/MS method are much lower than those for single GC/MS method. These LOD values illustrate the high sensitivity of the proposed method in the determination of the target compounds in fish bile.

To illustrate sensitivity of GC-MS/MS method, two chromatograms obtained for spiked water (Figure 5) and spiked bile (Figure 4) samples are presented. As it can be seen there is no significant matrix effect even on chromatogram presented for spike bile sample. The chromatograms are devoid of interfering ions.

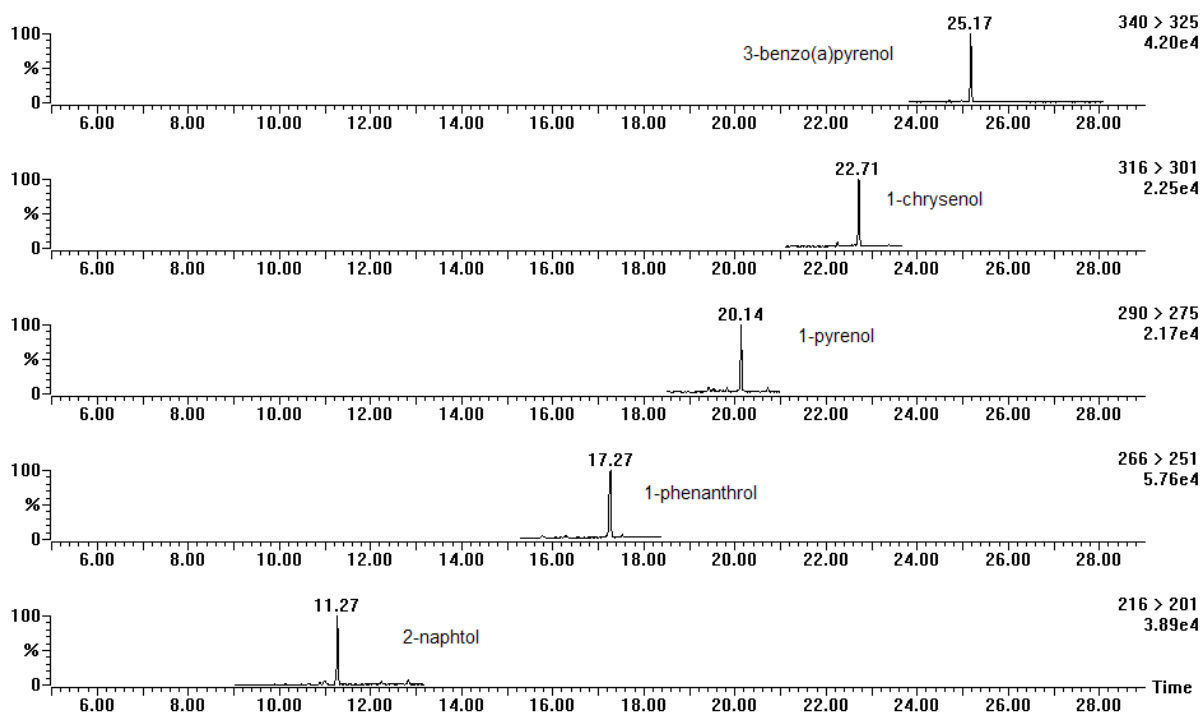


Figure 4: Efficiency of spiked bile sample preparation for 5 metabolites. MRM acquisition mode. Ion chromatogram corresponding to areas of spiked bile sample in which quantity of metabolites were around: 30 ng.g⁻¹ of bile for 2-naphtol, 1-phenanthrol, 1-pyrenol, 1-chrysenol and 98 ng.g⁻¹ of bile for 3-benzo(a)pyrenol.

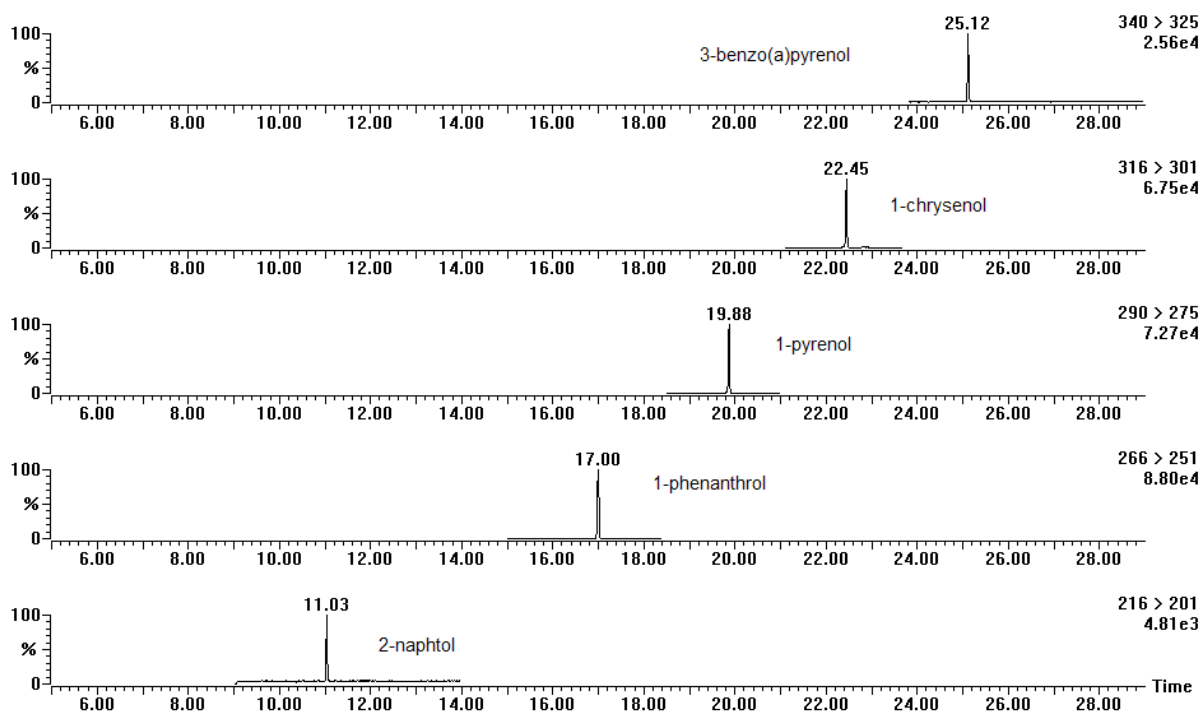


Figure 5: Efficiency of spiked water sample preparation for 5 metabolites. MRM acquisition mode. Ion chromatogram corresponding to areas of spiked water sample in which quantity of metabolites were around: 15 ng.g⁻¹ of water for 2-naphtol, 1-phenanthrol, 1-pyrenol, 1-chrysenol and 45 ng.g⁻¹ of water for 3-benzo(a)pyrenol.

3.4 Environmental samples

The entire protocol was applied to the analysis of several bile samples from hake fish (*Merluccius merluccius*) which were caught in the Mediterranean Sea (Figure 6).

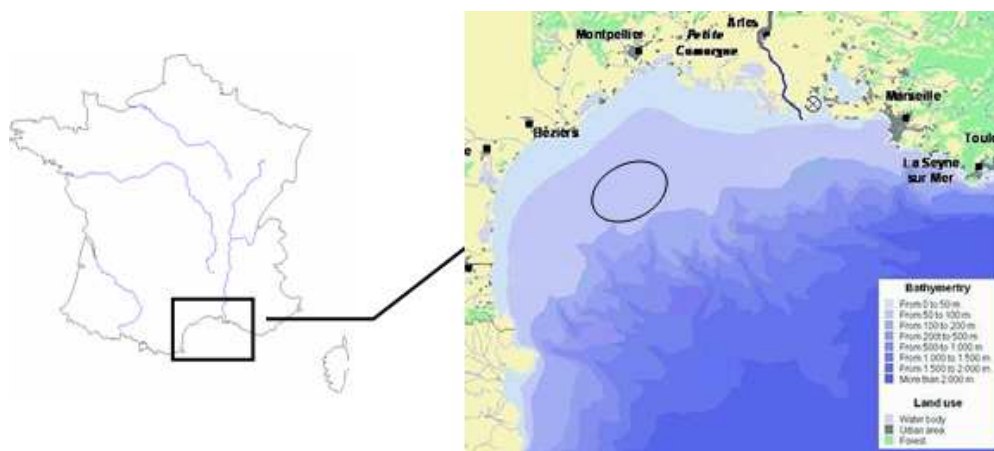


Figure 6: Sampling sites for hake fish (*Merluccius merluccius*) during October 2006 in the Mediterranean Sea, France.

Three individual bile samples (coming from individual fish) were pooled (in order to have a homogenous sample) and three replicates of each pool of biles were analysed. The volume of samples was approximately 100 μl . The samples were analyzed by GC-MS/MS and GC/MS for comparison. The results are presented in Tables 8 and 9 respectively. The sensitivity of the analytical procedure was sufficient to detect most of the studied compounds. Figure 7 shows an example of a natural bile chromatogram.

Four metabolites (2-naphtol, 1-pyrenol, 1-chrysenol and 3-benzo(a)pyrenol) were detected in natural samples by the GC-MS/MS method. 1-phenanthrol was not found. However, another product, 9-phenanthrol, was present in all the samples. 1-chrysenol and 3-benzo(a)pyrenol were below detection limit for GC/MS (34 and 107 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively) and could be only detected by GC-MS/MS. This result is very important because 3-benzo(a)pyrenol is one of the most significant mono-hydroxylated PAH metabolites and is known to play major role in the genotoxic and mutagenic processes in organisms [16,17,18]. To evaluate the potential effect of such compounds as well as to study the mechanic aspect of benzo(a)pyrene metabolism in organisms it is essential to quantify 3-benzo(a)pyrene at very low levels. In such case GC-MS/MS methodology offers several advantages in comparison with conventional GC/MS methods. As it can be seen, 1-pyrenol was the dominant contaminant in all the samples, with concentrations varying from 18 to 27 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ and an average contribution of 47%. The difference in contamination levels between fish could be caused by different ability for PAHs accumulation varying from fish to fish (age, sex, size).

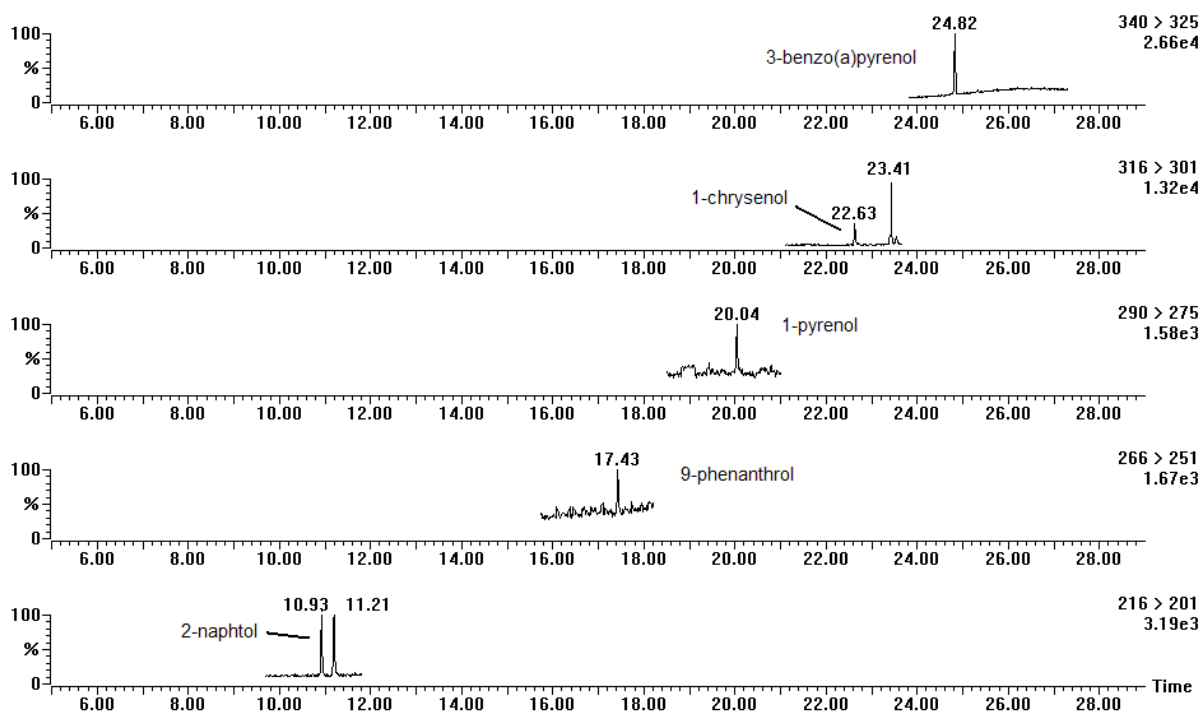
Table 8: Levels of contaminations in natural bile samples (ng.g⁻¹ of bile) obtained by GC-MS/MS.

Analytes	Bile 1	Bile 2	Bile 3
2-naphtol	0.7	2.7	1.0
9-phenanthrol	2.3	0.9	2.5
1-pyrenol	23.4	27.4	17.7
1-chrysenol	5.5	8.4	2.0
3- benzo(a)pyrenol	19.3	22.4	10.7

Table 9: Levels of contaminations in natural bile samples (ng.g⁻¹ of bile) obtained by GC/MS.

Analytes	Bile 1	Bile 2	Bile 3
2-naphtol	1.0	1.9	0.9
9-phenanthrol	2.5	nd	2.8
1-pyrenol	27.7	24.9	6.7
1-chrysenol	nd	nd	nd
3- benzo(a)pyrenol	nd	nd	nd

nd= non detected

Figure 7: Identification of five PAH metabolites (2-naphtol, 1-phenanthrol, 1-pyrenol, 1-chrysenol and 3-benzo(a)pyrenol) in the bile of hake fish (*Merluccius merluccius*) which were caught in the Mediterranean Sea. MRM acquisition mode. Transitions from derivatized products to $[M+ Si(CH_3)_3]^+ -15$ (the loss of a methyl group from the parent ion).

4 Conclusions

The assessment of the potential health hazard has been of great concern in recent years. A new, rapid and specific multicomponent procedure for determining PAH metabolites in complex environmental matrices is needed. Some sources of PAH contamination have been recognized as marine oil spills and discharges from refineries into estuarine waters. The potential health hazard associated with the consumption of commercial species of shellfish (oysters, mussels, and clams) contaminated by petroleum products must be assessed for the presence of PAH compounds which are carcinogenic [19, 20, 21]. By detecting PAH metabolites (which are sometimes even more dangerous than PAHs) in the environment we can follow the level and pattern of PAH contamination.

GC-MS/MS analysis of PAH metabolites was studied in an attempt to achieve better sensitivity, precision and repeatability than in currently available methods that use single quadrupole GC-MS. Using MRM mode we were able to eliminate the matrix effect from the quantification of the target compounds at a 0.3 ng.g⁻¹ level in bile. Both instruments were evaluated in terms of sensitivity. If GC-MS/MS is used the detection limit is sometimes even 25 times lower (ranged from 0.3 to 0.8 ng.g⁻¹ of bile) than with single MS. The precision was satisfying (3-11%) for spiked bile samples. The spectral quality of spiked samples is excellent due to the ion isolation step and selectivity of GC-MS/MS.

Several bile samples were analysed by the developed method and 4 of 5 investigated metabolites were detected in all tested samples, which shows the objectives of an improved method were achieved. The single quadrupole in Selected Ion Monitoring (SIM) mode was not able to detect some of the PAH metabolites (1-chrysenol, 3-benzo(a)pyrenol) in environmental samples.

GC-MS/MS is a more powerful analytical technique that provides a method for detecting target compounds in complex matrices at trace levels. This method is designed to provide a better analysis for environmental samples. The resulted methodology was proved to be sensitive, reliable, reproducible and precise.

Acknowledgements: The authors wish to thank the "ORQUE" program (Observatoire Régional de la Qualité de l'Environnement) and the French Minister of Environment for research fundings. Justyna Sekula would like to thank EC for Marie-Curie grant and LPTC for all support. The authors want also to acknowledge the "Region Aquitaine" and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

- [1] D.M. Jauhiainen, R. Berg, G.F. Grinstead, J. R. Kruse, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74 (2005) 512.
- [2] M.H. Topal, J. Wang, Y.A. Levenolis, J.B. Carlson, J. Jordan, *Fuel*, 83 (2004) 2357.
- [3] P. Fernandez, R.M. Vilanova, J.O. Grimalt, *Environmental Science & Technology* 33 (1999) 3716.
- [4] K. Liu, W. Han, W-P. Pan, J.T. Riley, *Journal of Hazardous Materials*, 84 (2001) 175.
- [5] N. Yassaa, A. Cecinato, *Chemosphere* 60 (2005) 1660.
- [6] J. Djinovic, A. Popovic, W. Jira, *Meat Science* 80 (2008) 449.
- [7] R. Hurt, *Spitzer Science Center*, June 27 (2005).
- [8] A.P. Il'nitsky, V.S. Mischenko, L.M. Shabad, *Cancer Letters*, 3 (1977) 227.
- [9] E. Terzi, C. Samara, *Atmospheric Environment*, 39 (2005) 6261.
- [10] M. Kalaitzoglou, E. Terzi, C. Samara, *Atmospheric Environment* 38 (2004) 2545.
- [11] J.O. Allen, N.M. Dookeran, K.A. Smith, A.F. Sarofim, K. Taghizadeh, A.L. Lafleur, *Environmental Science & Technology* 30 (1996) 1023.
- [12] C. J. Halsall, A.J. Sweetman, L.A. Barrie, K.C. Jones, *Atmospheric Environment*, 35 (2001) 255.
- [13] D.L. Leister, J.E. Baker, *Atmospheric Environment*, 28 (1994) 1499.
- [14] R.M. Harrison, D.J.T. Smith, L. Luhana, *Environmental Science & Technology* 30 (1996) 825.
- [15] P. Boffetta, N. Jourenkova, P. Gustavson, *Cancer Causes and Control*, 8 (1997) 444.
- [16] D. Chakravarti, D. Venugopal, P.C. Mailander, J.L. Meza, S. Higginbottam, E.L. Cavalieri, E.G. Rogan, *Mutation Research*, 649 (2008) 161.
- [17] V.A. Du Four, C.R. Janssen, E. Brits, N. Van Larebeke, *Mutation Research* 588 (2005) 106.
- [18] L. Flowers, S.H. Rieth, V.J. Coliano, G.L. Foureman, R. Hertzberg, E.L. Hofmann, D.L. Murphy, S. Nesnow, R.S. Schoeny, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22 (2002) 811.
- [19] G. Grimmer, H. Brune, G. Dettbarn, J. Jacob, J. Misfeld, U. Mohr, K.W. Naujack, J. Timm, R. Wenzel-Hartung, *Journal of Analytical Chemistry*, 339 (1991) 792.
- [20] T.L. Shchekaturina, A.L. Khesina, O.G. Mironov, L.G. Krivosheeva *Marine Pollution Bulletin*, 30 (1995) 38.
- [21] R. Singh, B. Kaur, I. Kalina, T.A. Popov, T. Georgieva, S. Garte, B. Binkova, R.J. Sram, E. Taioli, P.B. Farmer, *Mutation Research*, 602 (2007) 71.
- [22] U. Varanasi, M. Nishimoto, W.L. Reichert, J.E. Stein, *Xenobiotica*, 12 (1982) 417.
- [23] S. Reynaud, P. Deschaux, *Aquatic Toxicology*, 77 (2006) 229.
- [24] D.R. Mattison, K. Shiromizu, M.S. Nightingale, *American Journal of Industrial Medicine*, 4 (1983) 191.
- [25] B. Mahadevan, A. Luch, C.F. Bravo, J. Atkin, L.B. Steppan, C. Pereira, N.I. Kerkvliet, W.M. Baird, *Cancer Letters*, 227 (2005) 25.
- [26] R.J. Law, V.J. Dawes, R.J. Woodhead, P. Matthiessen, *Marine Pollution Bulletin*, 34 (1997) 306.
- [27] A.R. Steward, Ch. Kandaswami, S. Chidambaram, C. Ziper, J.P. Rutkowski, H.C. Sikka, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9 (1990) 1503.
- [28] G. Witt, *Marine Pollution Bulletin*, 31 (1995) 237.

- [29] G. Witt, H. Siegel, *Marine Pollution Bulletin*, 40 (2000) 1124.
- [30] G. Claireaux, Y. Desaunay, F. Akcha, B. Auperin, G. Bocquene, H. Budzinski, J.C. Cravedi, F. Davoodi, R. Galois, C. Gilliers, Ch. Goanvec, D. Guerault, N. Imbert, O. Mazeas, G. Nonnotte, L. Nonnotte, P. Prunet, P. Sebert, A. Vettier, *Aquatic Living Resources*, 17 (2004) 335.
- [31] R.J. Law, J.L. Biscaya, *Marine Pollution Bulletin*, 29 (1994) 235.
- [32] P.M. Gschwend, R.A. Hites, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45 (1981) 2359.
- [33] Y. Liang, M.F. Tse, L. Young, M.H. Wong, *Water Research*, 41 (2007) 1303.
- [34] M.S. Shailaja, C. D'Silva, *Chemosphere*, 53 (2003) 835.
- [35] Environment Canada *Toxic chemicals in Atlantic Canada-PAHs* (2001).
- [36] U. Varanasi, J.E. Stein, M. Nishimoto, Biotransformation and disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish, In U. Varanasi (editor), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, p. 93-149. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 1989.
- [37] G. Luthe, G.J. Stroomberg, F. Ariese, U.A.T. Brinkman, N.M. Straalen, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 12 (2001) 221.
- [38] G.J. Stroomberg, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138 (2004) 129.
- [39] J. Hellou, J.H. Banoub, A. Ryan, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 (1989) 871.
- [40] P. van den Hurk, *Marine Environmental Research*, 62 (2006) 16.
- [41] W. Zhang, D. X. G. Zhuang, C. Ding, G. Wang, J. Chang, G. Ren, *Environmental Monitoring and Assessment* 131 (2007) 387.
- [42] A. Palmqvist, L.J. Rasmussen, V.E. Forbes, *Aquatic Toxicology*, 80 (2006) 309.
- [43] R. Aina, L. Palin, S. Citterio, *Chemosphere* 60 (2006) 666.
- [44] P. Baumard, H. Budzinski, P. Garrigues, J.C. Sorbe, T. Burgeot, J. Bellocq, *Marine Pollution Bulletin* 36 (1998) 951.
- [45] H. Nakata, Y. Sakai, T. Miyawaki, A. Takemura, *Environmental Science and Technology* 37 (2003) 3513.
- [46] U. Kammann, *Environmental Science and Pollution Research* 14 (2007) 102.
- [47] L.L. Johnson, G.M. Ylitalo, M.R. Arkoosh, A.N. Kagley, C. Stafford, J.L. Bolton, J. Buzitis, B.F. Anulacion, T.K. Collier, *Environmental Monitoring and Assessment* 124 (2007) 167.
- [48] A.L. Pikkarainen *Chemosphere* 65 (2006) 1888.
- [49] J.D. Leonard, J. Hellou, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (2001) 618.
- [50] S. Gorbi, F. Regoli, *Marine Environmental Research*, 58 (2004) 511.
- [51] J. Lintelmann, K. Fischer, G. Matuschek, *Journal of Chromatography A*, 1133 (2006) 241.
- [52] M.M. Krahn, G.M. Ylitalo, J. Buzitis, S.L. Chan, U. Varanasi, *Journal of Chromatography A* (1993) 15.
- [53] G.M. Troisi, S. Bexton, I. Robinson, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7938.
- [54] O. Mazéas (2004) Thèse n° 2945. Université Bordeaux 1, France.
- [55] Le Dû - Lacoste M and Budzinski H. *Anal Bioanal Chem.* (Submitted)

Publication n°3**Selective and sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (OH-PAH) in fish bile using a new ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (UPLCTM-MS/MS).**

Marie Le Dû-Lacoste and H el ene Budzinski*

ISM-LPTC, UMR 5255 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 cours de la Lib eration, 33405
TALENCE, FRANCE

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

A sensitive and fast method was developed to quantify selected mono-hydroxylated PAH metabolites by Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLCTM) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). The UPLC method, using an acetonitrile:water gradient as a mobile phase, provided baseline separation of the selected metabolites during a run time shorter than 10 min. The excellent linearity (4 orders of magnitude) and the signal-to-noise performance provided by the MRM method allowed the development of a sensitive and specific UPLC-MS/MS methodology. The limits of detection ranged from 0.1 to 0.4 pg on column. Applied to chub bile samples, this methodology has proved to be suitable for environmental survey study.

Keywords: PAH metabolites, UPLC, tandem mass spectrometry, fish bile.

Submitted to Journal of Chromatography B

1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of hydrophobic organic compounds that are ubiquitous pollutants derived from pyrogenic and petrogenic sources [1]. PAHs have been shown to be toxic to marine life [2-4]. Some PAHs (e.g. benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene) are metabolically activated in vertebrates to form carcinogens [5-12]. Thus, the quantification of PAHs in tissues of marine organisms is usually carried out to evaluate the impact of such a contaminant on these organisms [13]. The feasibility of measuring tissue concentrations of PAHs in marine species to monitor for exposure depends on rates of uptake, biotransformation, and excretion. However, biotransformation processes are considered to be low in many invertebrates [14]. In contrast, fish and other marine vertebrates rapidly biotransform PAHs to form epoxy and hydroxyl derivatives during phase I metabolism. Subsequently, during phase II metabolism, the phase I metabolites are converted into highly water-soluble conjugates (e.g., glucuronides or sulfates) that accumulate in the bile [15-17]. Therefore, measuring PAH metabolites in bile provides a means for determining exposure [18-26].

Analysis for metabolites in fish bile has been used to monitor for PAH exposure in a number of studies [27-30]. The complex nature of PAH metabolites in bile of fish exposed to oil or other environmental pollution makes analysis challenging. As a result, selecting the best analytical method will depend upon the questions that need to be answered. The concentration of PAH metabolites is usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs). Several analytical techniques have been used to estimate FACs in fish bile, such as high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence (HPLC/F) [23, 31-39], synchronous fluorescence spectrometry (SFS) [40, 41] or fixed fluorescence (FF) [42]. A limited degree of compound specificity has been achieved by optimization of fluorescence wavelength pairs for analysis of naphthalene-, phenanthrene-, pyrene- and benzo(a)pyrene-like metabolites [43-45]. These screening methods have been successfully used in a large number of PAH monitoring studies [23-26, 46-53], but their use seems to be limited when applied to complex mixtures of fluorescent aromatic compounds [54]. This limitation becomes evident when compounds have similar structures such as isomeric metabolites, PAH parent compounds and its metabolites.

Since the 80's, the mass spectrometric detection (MS) allowed considerable progresses in terms of sensitivity and specificity for the PAH metabolites analysis, especially in complex biological matrices. In recent years liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) instruments has become available in many laboratories, a major driving force being their widespread use in drug discovery and development. With LC coupled to triple-stage quadrupole tandem mass spectrometers (LC-MS/MS), a wide range of substances in complex biological matrixes can be quantified at low levels and with high specificity. Despite this advantage, relatively few LC-MS methods have been reported for the determination of PAH metabolites. Van de Wiele *et al.*[55] have developed an LC-MS method that utilized a single quadrupole instrument with electrospray ionization in negative mode (ESI-) for the determination of phenolic metabolites of PAHs from *in vitro* metabolism studies. Several LC/MS methods using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or ESI, both in positive and negative mode, for determination of various hydroxylated PAH metabolites have been reported but not applied to biological samples[38, 56-58]. More recently, LC-MS/MS methods for selective detection and quantification of selected monohydroxy PAH metabolites in human urine were reported [59-62]. Recently, ultra-performance liquid chromatography (UPLC) with < 2 μm particle size column was introduced for rapid and efficient compound separation over traditional HPLC [63]. UPLC coupled with mass spectrometry is increasingly being used for rapid multiple component quantitation for *in vitro* and *in vivo* BaP metabolite characterization [64].

The present protocol was focused on the development of a new specific and sensitive UPLCTM-MS/MS method to separate and simultaneously quantify five mono-hydroxylated

PAH metabolites in fish bile. Their developed chemical structure is presented in Figure 1. The studied metabolites are known to be some of the major products of biotransformation in fish, which are present in their free form or more commonly conjugated with endogenous molecules [4, 65-67]. Such compounds are extensively excreted into the bile. Potential metabolites of priority PAH listed by the US-EPA (United States Environmental Protection Agency) have been chosen for their interest in environmental surveys [68]. Thus, the developed methodology was finally applied to fish bile samples to evaluate the applicability of this method to natural samples.

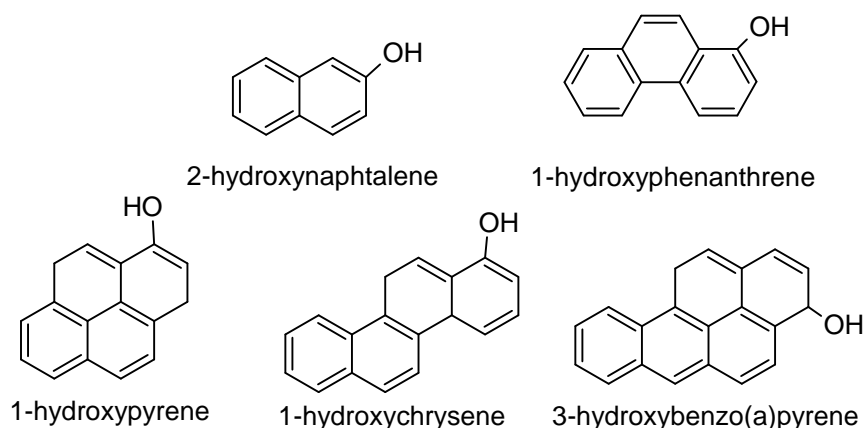


Figure 1: Chemical structures of OH-PAH analysed by UPLC-MS/MS

2 Experimental

2.1 Materials and reagents

1-hydroxynaphthalene (1-OHN) and 2-hydroxynaphthalene (2-OHN) were purchased from Lancaster (Bischeim, France); 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and 9-hydroxyphenanthrene (9-OHPhe), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d9 (1-OHPd9) and pyrene-d10 (Pd10) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Ste Foy La Grande, France). All the standards were of analytical grade (purity > 98%). All the solvents used were of analytical grade (purity > 98%). Ultra gradient HPLC grade acetonitrile was obtained from J.T Baker (VWR International, Strasbourg, France). Methanol Supersolv was provided by Merck. Formic acid and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) were obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) was purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Two solid-phase extraction (SPE) cartridges were used: Strata-X cartridge (3 cc, 200 mg) was from Phenomenex (Le Pecq, France) and HF Bond Elut-PSA cartridge (3 cc, 500 mg) from Varian (Atlantic Labo, Eysines, France).

2.2 UPLC™ instrument and chromatographic conditions

The Ultra Performance™ Liquid Chromatography (UPLC) was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ system (Milford, MA, USA), equipped with a binary solvent delivery manager, and a sample manager. The UPLC separation was performed on a Waters

ACQUITY BEH™ C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 mm x 150 mm) maintained at 30°C. A 0.2 μm precolumn filter (ACQUITY UPLC™ stainless steel in-line filter) was used to protect the analytical column. 10 μl sample, dissolved in acetonitrile, was injected for UPLC analysis. The mobile phase used was a mixture of acetonitrile (A) and Milli-Q water (B) with the following multi-step gradient: 0-2 min: 60/40 (A/B, v/v); 2-4 min: 60/40 (A/B, v/v) to 80/20 (A/B, v/v); 4-6 min: 80/20 (A/B, v/v) to 60/40 (A/B, v/v); 6-8 min: 60/40 (A/B, v/v) at a flow rate of 0.45 ml.min⁻¹. Total run time was 8 min per sample.

2.3 *Mass Spectrometric conditions*

Mass spectrometric (MS) measurement was performed on a Waters Micromass® Quattro Premier™ tandem quadrupole mass spectrometer (Manchester, UK) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The MS system was controlled by MassLynx™ 4.0 Software. All MS optimization experiments were performed in Scan mode and in product scan mode. All quantifications were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The cone voltage and collision energies for each of the MRM transitions were optimized by infusing the individual neat standard solution into the mass spectrometer at 2 μg.ml⁻¹. To ensure that the ionisation source parameters were compatible with the mobile phase flow during the tuning, a flow of 0.6 ml.min⁻¹ at 60% A was introduced into the mass spectrometer at the same time by using a PEEK T connector. MRM data collection during the chromatographic experiments were performed in both negative and positive mode with the capillary voltage fixed at 3.5 kV, the source temperature at 90°C, the desolvation temperature at 400°C, the desolvation gas flow at 1,000 l.h⁻¹, and the cone gas flow at 90 l.h⁻¹. Inter-scan delay for the polarity switching, inter-channel delay and dwell time for each MRM channel were set at 20, 5 and 50 ms, respectively. This allowed a sufficient cycle time to collect at least 15 data points per peak.

2.4 *Standard and working solutions*

Individual stock solutions of hydroxylated metabolites (100 ng.μl⁻¹) and internal standard (50 ng.μl⁻¹) were prepared in acetonitrile. Working standard solutions for linear calibration were prepared by mixing and diluting in acetonitrile the individual stock solutions of metabolites and internal standard. The final concentrations of compounds in the working solutions ranged from 1 pg.μl⁻¹ to 8 ng.μl⁻¹ of solvent (ACN). Both the stock and working solutions were stored at -20°C until use. The samples were then extracted as described in section 2.5. Quality control (QC) samples were prepared at five different concentrations (0.1, 1, 10, 1,000 and 3,000 pg.μl⁻¹ of bile), by adding working standard solutions in 100 μl of bile. They were used to assess accuracy and precision.

2.5 *Sample preparation*

Samples were prepared according to a protocol developed by Le Dû-Lacoste and Budzinski [69].

The weighted samples (100 μl of bile sample) were homogenized in 2 ml precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d₉ was added to the samples (20 μl of a diluted solution at 0.5 ng.μl⁻¹ of solvent). Glass vials were used to avoid adsorption phenomena on inner surface. Following centrifugation (10 min, 5,000 rpm, 20°C), samples were extracted on solid-phase Strata X cartridges which were preconditioned with 2 ml methanol and 4 ml buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml buffered water and 2 ml water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. Extracts were

reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride mixture (20/80, v/v) before purification. Solid-phase HF PSA Varian cartridges were used for the purification step. Before loading the extracts redissolved in methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the cartridges were first preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. Extracts were finally reduced to dryness under a nitrogen stream and redissolved in 100 μ l acetonitrile. Finally the extracts were stored at -20°C until injection.

2.6 Method validation

This UPLCTM-MS/MS method was validated considering different criteria, including linearity, inter- and intra-day precision, intra-day accuracy and recovery. The method was then applied for the analysis of PAH metabolites produced by chub (*Leuciscus cephalus*) caught in the Drôme River (city of Saillans, France) in September 2006 and 2007.

2.6.1 Linearity and limits of detection

The calibration curves for metabolites were constructed by plotting measured peak ratios of analyte to internal standard (IS) against nominal OH-PAH concentrations in bile using a 1/x weighted linear least-squares regression model. The minimally acceptable correlation coefficient (r^2) for the calibration curve was 0.99 or greater. The only use of one IS is a limitation of the method due to the variability of chemical structure/properties between compound studied and the chosen internal standard. The choice of only one IS is explained by the very high cost of isotope labelled compounds and by the lack of adequate labelled metabolites. Detection limits were determined using a signal-to-noise approach (3:1). Standard solutions were used for the determination of instrumental detection limits (IDL). Bile samples spiked before extraction were used for method detection limits determination (MDL).

2.6.2 Precision and accuracy

In order to assess the intra- and inter-batch precision and accuracy, QC samples at three concentrations were prepared. The intra- and inter-batch precisions of the assay were assessed by calculating the relative standard deviation (RSD) for the analysis of QC samples in three replicates. Accuracy was presented as the percent bias of the calculated concentration in comparison to the nominal concentration. The criterion for acceptability of precision was that RSD for each concentration level should not exceed $\pm 15\%$ with the exception of the low level, for which it should not exceed $\pm 20\%$. Similarly, the averaged value for accuracy should be in the range of $\pm 15\%$ of the nominal concentration except for the lowest level ($\pm 20\%$)[70].

2.6.3 Extraction recoveries

The recoveries of PAH metabolites have been determined in triplicates using metabolite-free bile samples spiked with standard solutions of metabolites prepared in acetonitrile. Final concentrations of metabolites in bile were 0.1, 1, 10, 1,000 and 3,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile. The spiked samples were then extracted as described in Section 2.5. The extraction recoveries were calculated according to the internal standard methodology.

2.6.4 Natural sample

Chub (*Leuciscus cephalus*) were collected in the Drôme River (near the city of Saillans, France) in September 2007. This location is known to have a good chemical and biological quality of water, because it is not directly impacted by human activities and industrial discharges. 10 chubs were collected each year. Bile samples were removed from gall bladders and stored at -80°C. Samples were prepared for analysis by UPLC-MS/MS as indicated in section 2.5.

3 Results and discussion

3.1 Mass spectrometry

For quantitative analysis, peak integration with high precision and reproducibility is critical for the final results. No less than 15 data points are generally recommended to defined chromatographic peaks [70]. As peaks become narrower, the mass spectrometer is required to acquire data faster. Such considerations make essential the use of tandem mass spectrometry, especially when UPLC technology is used for the chromatographic separation of compounds.

When optimizing an analytical method, it is desirable to produce an intense ion signal that is characteristic of the target compound. Using tandem mass spectrometry, selectivity and sensitivity are increased by almost suppressing the noise level. Thus mass spectrometric parameters were optimized to achieve maximum abundance of the product and fragmented ions of PAH metabolites. Acquisition parameters were determined by direct infusion into the tandem mass spectrometer of 2 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ solutions (in mobile phase) of each compound at a flow rate of 20 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Full scan and product ion mass spectra of each compound were obtained in negative ESI mode for IS and mono-hydroxylated metabolites. In the negative mode, OH-PAHs gave a precursor ion which corresponded to $[\text{M}-\text{H}]^-$. The isolation time was set at 20 ms and the isolation window was fixed at 5 ms in all cases, in order to get good sensitivity and selectivity. The collision energies applied to the fragmentation of the parent ion was adjusted in order to avoid its complete disappearance. Fragmented ions under collision-induced decomposition were chosen upon the criterion of abundance in order to enhance the sensitivity of the analysis. The chosen m/z values for daughter ions were as follows: m/z 115 for 2-OHN, m/z 165 for 1-OHPhe, m/z 189 for 1-OHP, m/z 215 for 1-OHC and m/z 239 for 3-OHBaP. The MRM transition of m/z 226 \rightarrow 198 was chosen for the quantification of the IS (1-OHPd9). The use of internal standard allows a more reliable and rapid analysis when compared to external calibration. The optimum mass spectrometric conditions along with mass transitions in MRM are presented in Table 1.

Table 1: The MRM transitions

Compounds	Mode	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Cone tension (V)	Collision Energy (eV)	Dwell time (ms)
2-OHN	ESI -	143	115	40	32	50
1-OHPhe	ESI -	193	165	50	30	50
1-OHP	ESI -	217	189	60	30	50
1-OHC	ESI -	243	215	60	32	50
3-OHBaP	ESI -	267	239	60	40	50

3.2 *Chromatography*

In the literature, several HPLC methods described the use of methanol/water as mobile phase for the separation of OH-PAH and especially BaP metabolites [71-75]. Thus we tried methanol/water. However the overall pressure of the UPLC system did not support a methanol/water gradient. Overpressures ($> 15,000$ psi) at working flow rates (between 0.4 and 1 ml.min⁻¹) were too frequently reached leading to an unreliable method. When changing the organic phase to acetonitrile with the gradient described in Section 2.2, all the compounds were separated (Figure 2) and no more problem with the pressure in the system were encountered.

The total run time was set at 10 min. Thus, this method increased the gain in time and decreased solvent consumption. Compared to traditional HPLC instrument, UPLC exhibited a higher peak capacity resulting in a reduction of ion suppression for MS detector, which gave an improvement in the detection sensitivity.

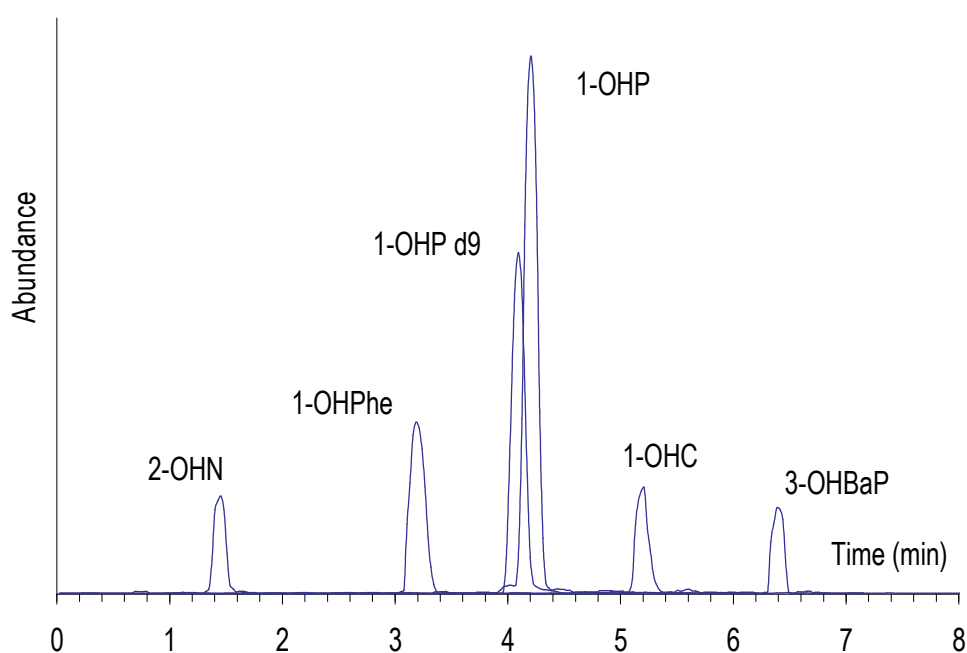


Figure 2: MRM chromatogram by UPLC-MS/MS

3.3 *UPLCTM-MS/MS method validation*

Linearity was tested with standard mixtures in acetonitrile at different levels of concentrations (Table 2). Correlation coefficient ranged between 0.9954 (3-OHBaP) and 0.9990 (1-OHPhe). Analytical limits of detection as well as methodological limits of detection (Table 2) were obtained for a signal-to-noise ratio of 3. The instrumental detection limits ranged between 0.01 and 0.04 pg.μl⁻¹ (10 μl injected). Methodological limits of detection (MDL) varied between 0.02 and 0.1 pg.μl⁻¹ of bile. The within-batch precisions were between 3 and 9 % RSD and the inter-day precisions were between 3 and 11 % RSD at all five concentrations (Table 3). The intra-day accuracy varied from 92 % and 104 % for all compounds at the five concentrations studied (Table 4).

In the literature there are many publications that describe different methods to analyse PAH metabolites in bile. In a previous study we have developed a GC/MS methodology that can achieve limits of detection between 1 and 21 pg.μl⁻¹ of bile for the selected analytes [69]. In this paper the MDL obtained were lower according to compounds, that it shows the greater sensitivity of this UPLC method compared to traditional GC/MS.

Table 2: Linearity and limit of detection of the methodology. IDL: instrumental limit of detection expressed in $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of solvent. MDL: methodological limit of detection expressed in $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile.

Compounds	Range of concentrations	Linearity	R ²	IDL ($\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	LOD ($\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile)
2-OHN	1 ng/g - 8 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 1,46x + 0,024$	0.9961	0.01	0.01
1-OHPhe	1 ng/g - 8 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 144,45x - 2,99$	0.9990	0.01	0.03
1-OHP	1 ng/g - 9 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 358,03x + 21,36$	0.9987	0.01	0.02
1-OHC	1 ng/g - 8 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 50,87x + 2,87$	0.9982	0.01	0.03
3-OHBaP	2ng/g - 13 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 12,70x + 1,41$	0.9954	0.04	0.1

Table 3: Intra- and inter-precision data of OH-PAH at five different concentrations (expressed in $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile).

Compound	Intra-day precision (RSD %, n=6 injections)					Inter-day precision (RSD %, n=3 injections)				
	0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	3,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	3,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
2-OHN	9	8	6	6	8	9	8	6	6	9
1-OHPhe	4	7	5	4	5	7	7	5	4	6
1-OHP	4	6	5	3	3	8	6	6	3	5
1-OHC	6	6	7	6	5	9	10	7	6	7
3-OHBaP	7	8	7	9	7	11	10	8	8	10

Table 4: Accuracy data of OH-PAH at five different concentrations expressed in $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile (mean \pm SD).

Compound	Accuracy (RSD %, n=3 injections)				
	0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	3,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
2-OHN	101 \pm 10	97 \pm 7	100 \pm 7	96 \pm 5	101 \pm 10
1-OHPhe	94 \pm 9	95 \pm 9	96 \pm 3	94 \pm 4	96 \pm 6
1-OHP	97 \pm 7	104 \pm 2	99 \pm 4	98 \pm 3	100 \pm 5
1-OHC	93 \pm 6	94 \pm 7	92 \pm 7	92 \pm 8	96 \pm 7
3-OHBaP	95 \pm 8	101 \pm 7	98 \pm 5	98 \pm 8	97 \pm 7

Besides, the use of UPLC-MS/MS technology in the MRM mode allows us to obtain better chromatograms which are cleaner and with less interference than those obtained with GC-MS (Data not shown). This is especially true for the largest OHPAH (1-OHC and 3-OHBaP). Recently Zhu *et al.* [64] have developed a UPLC-MS methodology for PAH metabolites analysis in fish bile. Limits of detection obtained were closed to 10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile. When comparing these detection limits with those obtained by the present methodology they were found to be more than 100 times higher for 3-OHBaP. This result showed the greater sensitivity of UPLC-MS/MS method compared to UPLC-MS. Currently no comparison can be done with other UPLC-MS/MS methodology since no previous work has been published yet.

The very good precisions and accuracy results over the five concentrations allow us to present the usefulness of this method to quantify selected mono-hydroxylated PAH metabolites in biological samples.

3.4 *Application to fish bile*

This method has been satisfactorily applied for detection of biliary metabolites from fish caught in the Drôme River (France) in September 2007. Sampled in a site considered as a non-polluted area, fish were supposed to be poorly impacted by PAHs. Thus the presumed PAH metabolites concentrations could be in the lower range. Therefore the application of the sensitive UPLC-MS/MS methodology developed in this work was justified. As with any biological sample, potential matrix interference by endogenous compounds present in bile must be considered. For all samples, no interfering peak was observed leading to accurate quantitation of the targeted compounds. All compounds have been detected and quantified in all samples (Table 5). Moreover isomeric metabolites of 1-OHPhe (2-, 3-, 4-, 9-OHPhe) have been also detected and quantified in the fish samples. Relative standard deviation (RSD) and coefficients of variation (CV) have been calculated.

Table 5: Mean concentrations of the different metabolites detected in the bile of chubs (n=10) collected in the Drôme River (Saillans, France) for three replicates, coefficients of variation (CV, n=10) and relative standard deviation (RSD %, n=3). Concentrations are expressed in ng.g⁻¹.

	Mean concentration	CV	RSD %
2-OHN	6	13	5
3-OHPhe	1	23	8
1-OHPhe	14	7	4
9-OHPhe	9	7	4
4-OHPhe	6	8	4
1-OHP	167	7	4
1-OHC	20	18	7
3-OHBaP	13	14	6
sum OH-PAH	236	4	4

1-OHP was found to be the major metabolite detected in all bile samples. The mean concentration was determined at 167 ng.g⁻¹ of bile. This corroborated previous studies in which 1-OHP was considered as a reliable PAH exposure biomarker [23, 25, 26, 46, 51, 76-81]. Chrysene and phenanthrene metabolites and 3-OHbaP were measured at 18, 30 and 13 ng.g⁻¹ of bile, respectively. When looking at the metabolites distribution, one could notice that 1-OHP represented more than 70% and phenanthrene metabolites at least 13%. These results suggest that the origin of PAH contamination is more pyrolytic than petrogenic since the proportion of phenanthrene is minor. The presence of BaP metabolite also suggests the predominance of a pyrolytic origin. A general transportation of industrial and traffic discharges by sewage and aerosol deposition to the river could explain the origins of PAH in the Drôme River.

4 Conclusions

This paper represents the first developments and validation of an UPLCTM-MS/MS method for the detection of PAH metabolites at low levels. Thanks to the UPLC technology coupled to the tandem mass spectrometry, this methodology allows to separate and analyze PAH metabolites with an increase in resolution, sensitivity, and specificity when compared to traditional methods. New developments could be considered to enhance the number of metabolites that can be separated and quantified. As a tool for biomonitoring and risk assessment studies, PAH metabolites analysis has to be increasingly more sensitive because of ultra-trace concentrations of these compounds in organisms. The use of UPLC-MS/MS enhances the analytical performances of the method and the limits of detection at pg level appear suitable to extend the window of detection.

Furthermore this method has been applied to natural fish bile samples and has proved its efficiency and performance. The sensitivity and the specificity of the method were sufficient to identify and quantify PAH metabolites in a complex biological sample.

Acknowledgements: The authors wish to thank the National Program for Ecotoxicology (PNETOX), the French Minister of Environment and the research team IMOPHYS (Integration of molecular and physiologic responses to organic contaminants in coastal area) for research fundings. They want also to acknowledge the "Region Aquitaine" and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

1. Neff, J. M., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. 1979, London: Applied Science Publishers Ltd. 262.
2. Malins, D. C., McCain, B. B., Myers, M. S., Brown, D. W., Krahn, M. M., Roubal, W. T., Schiewe, M. H., Landahl, J. T., and Chan, S. L. 1987. *Environmental health perspectives* **71**: p. 5-16.
3. Myers, M. S., Landahl, J. T., Krahn, M. M., and McCain, B. B. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 7-15.
4. Varanasi, U. and Stein, J. E. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 93-100.
5. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human*. Vol 32. 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
6. Zhang, W., Xu, D., Zhuang, G., Ding, C., Wang, G., Chang, J., and Ren, G. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **131**(1-3): p. 387-394.
7. Ruchirawat, M., Settachan, D., Navasumrit, P., Tuntawiroon, J., and Autrup, H. 2007. *Toxicology Letters* **168**(3): p. 200-209.
8. Palmqvist, A., Rasmussen, L. J., and Forbes, V. E. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(3): p. 309-319.
9. Inzunza, B., Orrego, R., Penalosa, M., Gavilan, J. F., and Barra, R. 2006. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(2): p. 242-251.
10. Fragoso, N. M., Hodson, P. V., and Zambon, S. 2006. *Environmental Monitoring and Assessment* **116**(1-3): p. 481-511.
11. Aina, R., Palin, L., and Citterio, S. 2006. *Chemosphere* **65**(4): p. 666-673.
12. van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): p. 57-149.
13. Robertson, A. 1998 *Petroleum Hydrocarbons*, in *Amap Assessment Report: Arctic Pollution Issues*, Wilson, S.J., Murray, J.L., and Hungtington, H.P., Editors: Oslo. p. 859
14. James, M. O. 1989 *Biotransformation and Disposition of Pah in Aquatic Invertebrates*, P 69-92, in *Metabolism Fo Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Varanasi, U., Editor CRC Press: Boca Raton. p. 341.
15. Lee, R. F., Sauerheber, R., and Dobbs, G. H. 1972. *Marine Biology* **17**: p. 201-208.
16. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1981. *Aquatic Toxicology* **1**(1): p. 49-67.
17. Varanasi, U., Reichert, W. L., Stein, J. E., Brown, D. W., and Sanborn, H. R. 1985. *Eviron. Sci. Technol.* **19**: p. 836-841.
18. Varanasi, U., Chan, S. L., McLeod, W. D., Stein, J. E., Brown, D. W., Burrows, D. G., Tilbury, K. L., Landahl, J. T., Wigren, C. A., Hom, T., and Pierce, S. M., *Noaa Technical Memorandum: Survey of Subsistence Fish and Shellfish for Exposure to Oil Spilled from the Exxon Valdez : First Year, 1989.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1990.

19. Tuvikene, A. 1995. *Ann. Zool. Fenn.* **32**: p. 295-309.
20. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T., and Bellocq, J. 1998. *Marine Pollution Bulletin* **36**(12): p. 951-960.
21. Nakata, H., Sakai, Y., Miyawaki, T., and Takemura, A. 2003. *Environmental science & technology* **37**(16): p. 3513-3521.
22. Meador, M. R., Brown, L. R., and Short, T. 2003. *Ecological Indicators* **3**(2): p. 81-92.
23. Kammann, U. 2007. *Environmental Science and Pollution Research* **14**(2): p. 102-108.
24. Johnson, L. L., Ylitalo, G. M., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Stafford, C., Bolton, J. L., Buzitis, J., Anulacion, B. F., and Collier, T. K. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **124**(1-3): p. 167-194.
25. Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., and Schiedek, D. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 479-487.
26. Pikkarainen, A. L. 2006. *Chemosphere* **65**(10): p. 1888-1897.
27. Krahn, M. M., Burrows, D. G., MacLeod, W. D., and Malins, D. 1987. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**(5): p. 511-522.
28. Krahn, M. M., Kittle, J., Lewey J., and MacLeod, J., William D. 1986. *Marine Environmental Research* **20**(4): p. 291-298.
29. McDonald, S. J., Kennicutt II, M. C., Liu, H., and Safe, S. H. 1995. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**: p. 232-240.
30. Van der Oost, R., Van Schooten, F.-J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K., and Vermeulen, N. P. E. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(6): p. 859-870.
31. Krahn, M. M., Moore, L. K., and McLeod, W. D., *Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1986 : Metabolites of Aromatic Compounds in Fish Bile.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1986, NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-102.
32. Vuontisjärvi, H., Keinänen, M., Vuorinen, P. J., and Peltonen, K. 2004. *Polycycl. Aromat. Compd.* **24**: p. 333-342.
33. Jonsson, G., Taban, I. C., Jorgensen, K. B., and Sundt, R. C. 2004. *Chemosphere* **54**(8): p. 1085-1097.
34. Jonsson, G., Beyer, J., Wells, D., and Ariese, F. 2003. *J. Environ. Monit.* **5**: p. 513-520.
35. Ferrari, S., Mandel, F., and Berset, J. D. 2002. *Chemosphere* **47**(2): p. 173-182.
36. Gündel, J. and Angerer, J. 2000. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **738**(1): p. 47-55.
37. Lee, C.-K., Cho, S.-H., Kang, J.-W., Lee, S.-J., Ju, Y.-S., Sung, J., Strickland, P. T., and Kang, D. 1999. *Toxicology Letters* **108**(2-3): p. 209-215.
38. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1994. *Journal of Chromatography A* **683**(1): p. 9-19.

39. Mastenbroek, J. W. G., Ariese, F., Gooijer, C., Velthorst, N. H., Hofstraat, J. W., and van Zeijl, W. J. M. 1990. *Chemosphere* **21**(3): p. 377-386.
40. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Racine, R. N. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(5): p. 707-715.
41. Ariese, F., Burgers, I., Oudhoff, K., Rutten, T., Stroomberg, G., and Vethaak, D. 1997.
42. Aas, E. and Klungsoyr, J. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 229-232.
43. Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N. H., and Hofstraat, J. W. 1993. *Aquatic Toxicology* **26**(3-4): p. 273-286.
44. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Torsella, J. A. 1996. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **35**(1): p. 16-23.
45. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 2000. *Biomarkers* **5**(1): p. 9-23.
46. Yang, X. and Baumann, P. C. 2006. *Ecological Indicators* **6**(3): p. 567-574.
47. Schiedek, D., Broeg, K., Barsiene, J., Lehtonen, K. K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjarvi, H., Vuorinen, P. J., Dedonyte, V., Koehler, A., Balk, L., and Schneider, R. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 387-405.
48. Mdegela, R., Myburgh, J., Correia, D., Braathen, M., Ejobi, F., Botha, C., Sandvik, M., and Skaare, J. U. 2006. *Ecotoxicology* **15**(1): p. 51-59.
49. Martinez-Gomez, C., Campillo, J. A., Benedicto, J., Fernandez, B., Valdes, J., Garcia, I., and Sanchez, F. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(5-7): p. 305-314.
50. Malins, D. C., Anderson, K. M., Stegeman, J. J., Jaruga, P., Green, V. M., Gilman, N. K., and Dizdaroglu, M. 2006. *Environmental Health Perspectives* **114**(6): p. 823-829.
51. Da Silva, D. A. M., Buzitis, J., Krahn, M. M., Bicego, M. C., and Pires-Vanin, A. M. S. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **52**(2): p. 175-183.
52. Barsiene, J., Lehtonen, K. K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Lang, T., Pempkowiak, J., Syvokiene, J., Dedonyte, V., and Rybakovas, A. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **Volume 53**(Issues 8-9): p. Pages 422-436.
53. Fuentes-Rios, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gaviln, J. F., and Barra, R. 2005. *Chemosphere* **61**(2): p. 192-199.
54. Santana Rodriguez, J. J. and Miller, J. N. 1998. *Analytist* **123**(11).
55. Van de Wiele, T. R., Peru, K. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D., and Headley, J. V. 2004. *Journal of Chromatography B* **806**(2): p. 245-253.
56. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1996. *Journal of Chromatography A* **731**(1-2): p. 75-84.
57. Letzel, T., Poschl, U., Wissiack, R., Rosenberg, E., Grasserbauer, M., and Niessner, R. 2001. *Analytical Chemistry* **73**(7): p. 1634-1645.
58. Letzel, T., Rosenberg, E., Wissiack, R., Grasserbauer, M., and Niessner, R. 1999. *Journal of Chromatography A* **855**(2): p. 501-514.

59. Fan, R., Dong, Y., Zhang, W., Wang, Y., Yu, Z., Sheng, G., and Fu, J. 2006. *Journal of Chromatography B* **836**(1-2): p. 92-97.
60. Jacob, P., Wilson, M., and Benowitz, N. L. 2007. *Analytical Chemistry* **79**(2): p. 587-598.
61. Pignini, D., Cialdella, A. M., Faranda, P., and Tranfo, G. 2006. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **20**: p. 1013-1018.
62. Xu, X., Zhang, J., Zhang, L., Liu, W., and Weisel, C. P. 2004. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **18**: p. 2299-2308.
63. Sherma, J. 2005. *J. AOAC Int* **88**(3): p. 63-67.
64. Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., and Willett, K. 2008. *Journal of chromatography B* **863**(1): p. 141-149.
65. Steward, A. R., Kandaswami, C., Chidambaram, S., Ziper, C., Rutkowski, J. P., and Sikka, H. C. 1990. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**: p. 1503-1512.
66. Law, F. C. P., Meng, J. X., He, Y. T., and Chui, Y. C. 1994. *Xenobiotica* **24**(3): p. 221-229.
67. Leonard, J. D. and J., H. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): p. 618-623.
68. Keith, L. H. and Telliard, W. A. 1979. *Environ Sci Technol* **13**: p. 416-423.
69. Le Dû - Lacoste, M. and Budzinski, H. Submitted. *Anal Bioanal Chem*.
70. Waters. 2004. *Waters Application Note* **720000917EN**.
71. James, M. O., Kleinow, K. M., Zhang, Y., Zheng, R., Wang, L., and Faux, L. R. 2004. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): p. 343-346.
72. Ruddock, P. J., Bird, D. J., McEvoy, J., and Peters, L. D. 2003. *The Science of The Total Environment* **301**(1-3): p. 105-117.
73. Schanke, A. v., Holtz, F., der Meer, J. v., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., den Berg, M. v., and Everaarts, J. M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): p. 1641-1647.
74. Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W. L., and Le Eberhart, B. T. 1986. *Cancer Research* **46**(8): p. 3817-3824.
75. Willett, K. L., Gardinali, P. R., Lienesch, L. A., and Di Giulio, R. T. 2000. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **58**(1): p. 68-76.
76. Gold-Bouchot, G., Zapata-Perez, O., Rodriguez-Fuentes, G., Ceja-Moreno, V., Del Rio-Garcia, M., and Chan-Cocom, E. 2006. *International Journal of Environment and Pollution* **26**(1-3): p. 129-141.
77. Cormier, S. M. and Lin, E. L. C. 2006. *Ecotoxicology* **15**(2): p. 111-120.
78. Casini, S., Marsili, L., Fossi, M. C., Mori, G., Bucalossi, D., Porcelloni, S., Caliani, I., Stefanini, G., Ferraro, M., and di Catenaja, C. A. 2006. *Marine Environmental Research* **62**(SUPPL. 1).

79. Winter, M. J., Verweij, F., Garofalo, E., Ceradini, S., McKenzie, D. J., Williams, M. A., Taylor, E. W., Butler, P. J., van der Oost, R., and Kevin Chipman, J. 2005. *Aquatic Toxicology* **73**(4): p. 394-405.
80. Le Dù - Lacoste M, Morin B, Akcha F, Burgeot T, and Budzinski H. Submitted. *Aquatic Toxicology*.
81. Le Dù - Lacoste, M., Akcha, F., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T., and Budzinski, H. Submitted. *Environmental Science & Technologies*.

Publication n°4**Development and validation of a sensitive ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (UPLCTM-MS/MS) for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites.**

Marie Le Dû-Lacoste, Nathalie Wessel^b, Karyn Le Menach^a, Patrick Pardon^a, Farida Akcha^b, H  l  ne Budzinski^{a*}

^aISM-LPTC, UMR 5255 CNRS, University of Bordeaux 1, FRANCE

^bLaboratoire d'Ecotoxicologie, Ifremer, Nantes, FRANCE

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

A rapid and reliable method was developed to analyze selected benzo(a)pyrene (BaP) and fluoranthene (Fluo) metabolites by Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLCTM) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). Electrospray ionization was operated in both negative and positive ion mode to detect a selection of BaP-diols, BaP-diones, Fluo-diol, Fluo-dione and mono-hydroxylated Fluo and BaP metabolites. The excellent linearity (4 orders of magnitude) and the signal-to-noise performance provided by the MRM method allowed the development of a sensitive and specific UPLC-MS/MS methodology. The limits of detection ranged from 11 to 24 pg on column for diol and dione metabolites and varied from 0.6 and 0.9 pg on column for monohydroxylated metabolites tested in this study. Applied to liver microsomes from soles exposed to BaP and Fluo, this methodology has proved to be suitable for metabolism study.

Keywords: PAH metabolites, UPLC, tandem mass spectrometry, fish.

Submitted to Rapid Communication in Mass Spectrometry (RCM)

1 Introduction

Many classes of chemicals are thought to be genotoxic or/and carcinogenic. Among these, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the most significant priority pollutants based upon their toxic properties and the amounts produced by combustion of biogenic and anthropogenic materials [1]. As major pollutants in the marine environment, PAH toxicity is well investigated in marine organisms. The expression of PAH toxicity requires a biotransformation process. In fish and bivalves, similarities were reported with higher vertebrates in the biotransformation of the model PAH, benzo[a]pyrene (BaP) [2-7]. In most cases, oxidation of PAHs by P450 enzymes is an initial step in the activation process producing major metabolites such as phenols, dihydrodiols and diones. These metabolites can be conjugated to glucuronic acid, sulphate and glutathione to become more water-soluble facilitating their excretion. The biotransformations of PAHs produce also polar biochemically reactive electrophilic species (ultimate carcinogenic metabolites) capable of interacting with cellular macromolecules, particularly nucleic acids and proteins. Bioactivation to reactive metabolites for the DNA is known as a key event in the initiation of carcinogenesis, aging and in some pathologies including those related to the reproduction process. The identification and characterization of ultimate metabolites and of DNA/protein adducts contribute to the elucidation of the mechanisms involved in the metabolic activation of PAHs and in chemical carcinogenesis[8]. PAHs are known as pro-carcinogens due to the metabolic activation requires for the expression of their genotoxicity and cancerogenicity [4-6, 9]. For other major PAH compounds like fluoranthene (Fluo), there are still some uncertainties concerning their bioactivation pathways and their genotoxic potential. Fluoranthene is one of the PAHs the most abundant in the different compartments of the marine environment. Its genotoxic properties are well controverted [10]. Therefore our goal was to develop a sensitive and reliable method to quantify BaP and Fluo metabolism in fish.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods with Ultra-Violet (UV) detection were originally used to quantify PAH metabolites[11-18]. In recent years liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) instruments has become available in many laboratories, a major driving force being their widespread use in drug discovery and development. With LC coupled to triple-stage quadrupole tandem mass spectrometers (LC-MS/MS), a wide range of substances in complex biological matrixes can be quantified at low levels and with high specificity. Despite this advantage, relatively few LC-MS methods have been reported for the determination of PAH metabolites. Van de Wiele *et al.*[19] have developed an LC-MS method that utilized a single quadrupole instrument with electrospray ionization in negative mode (ESI-) for the determination of phenolic metabolites of PAHs from *in vitro* metabolism studies. Several LC/MS methods using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or ESI, both in positive and negative mode, for determination of various hydroxylated PAH metabolites have been reported but not applied to biological samples [20-23]. More recently, LC-MS/MS methods for selective detection and quantification of selected monohydroxy PAH metabolites in human urine were reported [24-27]. However none of these methods were dedicated to the study of pro-carcinogen metabolites which are more reactive and sensible to degradation. One additional difficulty is that BaP metabolites share mostly the same parent and product ion patterns making impossible the use of mass spectrometry to distinguish them without good chromatographic separation.

Recently, ultra-performance liquid chromatography (UPLC) with < 2 µm particle size column was introduced for rapid and efficient compound separation over traditional HPLC [28]. UPLC coupled with mass spectrometry is increasingly being used for rapid multiple component quantitation for *in vitro* and *in vivo* BaP metabolite characterization [29].

The objective of this study was to develop a new specific and sensitive UPLCTM-MS/MS method to separate and simultaneously quantify eight BaP and Fluo metabolites. This development showed overall improvement compared to currently used methods, and provided the methodological support to study the role of biotransformation enzymes (e.g. CYP1A1) in BaP and Fluo metabolism.

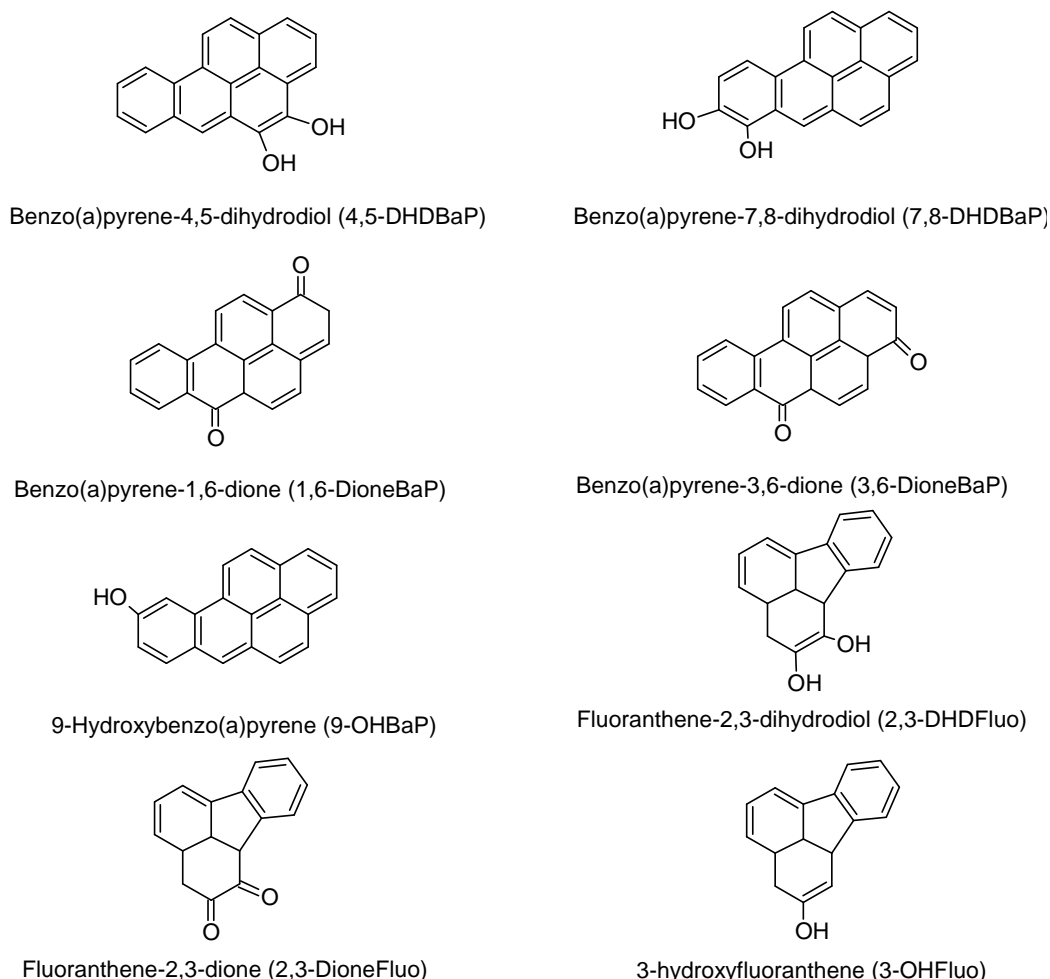


Figure 1: Chemical structures of investigated PAH metabolites

2 Experimental

2.1 *Materials and reagents*

Benzo[a]pyrene (CAS No 50-32-8) and Fluoranthene (CAS No 206-44-0) were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (St Quentin Falavier, France). BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione, 9-hydroxy BaP, Fluo-2,3-dihydrodiol, Fluo-2,3-dione and 3-hydroxy Fluo were purchased from National Cancer Institute Chemical Carcinogen Reference Standard Repository (Kansas City, MO, USA). 1-hydroxy pyrene-d9 was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Sainte Foy la Grande, France). The structures of studied metabolites are shown in Figure 1. All the standards were of analytical grade (> 98%).

All the solvents used were of analytical grade (purity > 98%). Ultra gradient HPLC grade acetonitrile was obtained from J.T Baker (VWR International, Strasbourg, France). Methanol Supersolv was provided by Merck. Formic acid and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) were obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) was purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Two solid-phase extraction (SPE) cartridges were used: Strata-X cartridge (3 cc, 200 mg) was from Phenomenex (Le Pecq, France) and HF Bond Elut-PSA cartridge (3 cc, 500 mg) from Varian (Atlantic Labo, Eysines, France).

2.2 UPLCTM instrument and chromatographic conditions

The Ultra PerformanceTM Liquid Chromatography (UPLC) was performed on a Waters ACQUITY UPLCTM system (Milford, MA, USA), equipped with a binary solvent delivery manager, and a sample manager. The UPLC separation was performed on a Waters ACQUITY BEHTM C₁₈ column (1.7 μm , 2.1 mm \times 150 mm) maintained at 30°C. A 0.2 μm precolumn filter (ACQUITY UPLCTM stainless steel in-line filter) was used to protect the analytical column. 10 μl sample, dissolved in acetonitrile, was injected for UPLC analysis. The mobile phase used was a mixture of 0.1 % of formic acid in acetonitrile (A) and 0.1 % of formic acid in Milli-Q water (B) with the following multi-step gradient: 0-2 min: 40/60 (A/B, v/v); 2-6 min: 40/60 (A/B, v/v) to 80/20 (A/B, v/v); 6-8 min: 80/20 (A/B, v/v) to 40/60 (A/B, v/v); 8-10 min: 40/60 (A/B, v/v) at a flow rate of 0.40 ml.min⁻¹. Total run time was 10 min per sample.

2.3 Mass Spectrometric conditions

Mass spectrometric (MS) measurement was performed on a Waters Micromass[®] Quattro PremierTM tandem quadrupole mass spectrometer (Manchester, UK) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The MS system was controlled by MassLynxTM 4.0 Software. All MS optimization experiments were performed in Scan mode and in product scan mode. All quantifications were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The cone voltage and collision energies for each of the MRM transitions were optimized by infusing the individual neat standard solution into the mass spectrometer at 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. To ensure that the ionisation source parameters were compatible with the mobile phase flow during the tuning, a flow of 0.6 ml.min⁻¹ at 40% A was introduced into the mass spectrometer at the same time by using a PEEK T connector. MRM data collection during the chromatographic experiments were performed in both negative and positive mode with the capillary voltage fixed at 3.5 kV, the source temperature at 90°C, the desolvation temperature at 350°C, the desolvation gas flow at 900 l.h⁻¹, and the cone gas flow at 80 l.h⁻¹. Inter-scan delay for the polarity switching, inter-channel delay and dwell time for each MRM channel were set at 20, 5 and 50 ms, respectively. This allowed a sufficient cycle time to collect at least 15 data points per peak.

2.4 Standard and working solutions

Individual stock solutions of hydroxylated metabolites (100 ng. μl^{-1}) and internal standard (50 ng. μl^{-1}) were prepared in acetonitrile. Working standard solutions for linear calibration were prepared by mixing and diluting in acetonitrile the individual stock solutions of metabolites and internal standard. The final concentrations of compounds in the working solutions ranged from 1 pg. μl^{-1} to 8 ng. μl^{-1} of solvent (ACN). Both the stock and working solutions were stored at -20°C until use. The samples were then extracted as described in section 2.5. Quality control (QC) samples were prepared at three different concentrations (10 pg. μl^{-1} , 0.1

and 1 ng. μl^{-1} of bile), by adding working standard solutions in 100 μl bile. They were used to assess accuracy and precision.

2.5 Sample preparation

Samples were prepared according to a protocol developed by Le Dû-Lacoste and Budzinski [30].

The weighted samples (100 μl of microsome and bile sample) were homogenized in 2 ml precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d9 was added to the samples (20 μl of a diluted solution at 0.5 ng. μl^{-1} of solvent). Glass vials were used to avoid adsorption phenomena on inner surface. Following centrifugation (10 min, 5,000 rpm, 20°C), samples were extracted on solid-phase Strata X cartridges which were preconditioned with 2 ml methanol and 4 ml buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml buffered water and 2 ml water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride mixture (20/80, v/v) before purification. Solid-phase HF PSA Varian cartridges were used for the purification step. Before loading the extracts redissolved in methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the cartridges were first preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. Extracts were finally reduced to dryness under a nitrogen stream and redissolved in 100 μl acetonitrile. Finally the extracts were stored at -20°C until injection.

2.6 Method validation

This UPLCTM-MS/MS method was validated considering different criteria, including linearity, inter- and intra-day precision, intra-day accuracy and recovery. The method was then applied for the analysis of PAH metabolites produced by sole (*Solea solea*) following microsomal incubation.

2.6.1 Linearity and limits of detection

The calibration curves for metabolites were constructed by plotting measured peak ratios of analyte to internal standard (IS) against nominal OH-PAH concentrations in bile using a 1/x weighted linear least-squares regression model. The minimally acceptable correlation coefficient (r^2) for the calibration curve was 0.99 or greater. The only use of one IS is a limitation of the method due to the variability of chemical structure/properties between compound studied and the chosen internal standard. The choice of only one IS is explained by the very high cost of isotope labelled compounds and by the lack of adequate labelled metabolites. Detection limits were determined using a signal-to-noise approach (3:1). Standard solutions were used for the determination of instrumental detection limits (IDL). Bile samples spiked before extraction were used for method detection limits determination (MDL).

2.6.2 Precision and accuracy

In order to assess the intra- and inter-batch precision and accuracy, QC samples at three concentrations were prepared. The intra- and inter-batch precisions of the assay were assessed by calculating the relative standard deviation (RSD) for the analysis of QC samples

in three replicates. Accuracy was presented as the percent bias of the calculated concentration in comparison to the nominal concentration. The criterion for acceptability of precision was that RSD for each concentration level should not exceed $\pm 15\%$ with the exception of the low level, for which it should not exceed $\pm 20\%$. Similarly, the averaged value for accuracy should be in the range of $\pm 15\%$ of the nominal concentration except for the lowest level ($\pm 20\%$) [31].

2.6.3 Extraction recoveries

The recoveries of PAH metabolites have been determined in triplicates using metabolite-free bile samples spiked with standard solutions of metabolites prepared in acetonitrile. Final concentrations of metabolites in bile were 10, 100 and 1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile. The spiked samples were then extracted as described in Section 2.5. The extraction recoveries were calculated according to the internal standard methodology.

2.6.4 Microsomal incubation

Microsomes of sole liver were prepared and used for in vitro bioactivation of BaP and Fluo as described in a complementary study on PAH metabolism in fish by Wessel *et al.* [32]. Following exposure to 20 and 40 μM of each PAH, samples were prepared for analysis by UPLC-MS/MS as indicated in section 2.5.

3 Results and discussion

3.1 Mass spectrometry

For quantitative analysis, peak integration with high precision and reproducibility is critical for the final results. No less than 15 data points are generally recommended to defined chromatographic peaks [31]. As peaks become narrower, the mass spectrometer is required to acquire data faster. Such considerations make essential the use of tandem mass spectrometry, especially when UPLC technology is used for the chromatographic separation of compounds.

When optimizing an analytical method, it is desirable to produce an intense ion signal that is characteristic of the target compound. Using tandem mass spectrometry, selectivity and sensitivity are increased by almost suppressing the noise level. Thus mass spectrometric parameters were optimized to achieve maximum abundance of the product and fragmented ions of PAH metabolites. Acquisition parameters were determined by direct infusion into the tandem mass spectrometer of 2 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ solutions (in mobile phase) of each compound at a flow rate of 20 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Full scan and product ion mass spectra of each compound were obtained in positive ESI mode for dione and diol compounds and in negative ESI mode for IS and monohydroxylated metabolites. BaP-diols gave a precursor ion which corresponded to $[\text{M}-18]^+$. For Fluo-diol, it corresponded to $[\text{M}-15]^+$. For both BaP-dione and Fluo-dione, the precursor ion chosen was $[\text{M}+\text{H}]^+$. Finally in the negative mode, 3-OHFluo and 9-OHBaP gave a $[\text{M}-\text{H}]^-$ as precursor ion. The isolation time was set at 20 ms and the isolation window was fixed at 5 ms in all cases, in order to get good sensitivity and selectivity. The collision energies applied to the fragmentation of the parent ion was adjusted in order to avoid its complete disappearance. Fragmented ions under collision-induced decomposition were chosen upon the criterion of abundance in order to enhance the sensitivity of the analysis. The chosen m/z values for daughter ions were as follows: m/z 189 for 3-OHFluo and Fluo-2,3-diol, m/z 176 for Fluo-2,3-dione, m/z 239 for 9-OHBaP and BaP-diols and m/z 226 for

BaP-diones. The MRM transition of m/z 226 \rightarrow 198 was chosen for the quantification of the IS (1-OHPd9). The optimum mass spectrometric conditions along with mass transitions in MRM are presented in Table 1.

The use of internal standard allows a more reliable and rapid analysis when compared to external calibration. However for the analysis of PAH metabolites, the use of internal standard was commercially limited. The use of 1-OHPd9 as internal standard has led to choose the ESI negative mode analysis. But the majority of the metabolites of interest could only be analysed in the ESI positive mode. That is why a compromise was done. For each LC injection, the mass spectrometer was set to collect data in MRM mode using ESI, both in negative and positive ion modes.

Table 1: MRM parameters for selected PAH metabolites

Compound	Mode	MRM	Cone Voltage / Collision energy (V / eV)	Dwell time (s)
2,3-DHD-Fluo	ESI+	219 \rightarrow 189	60/38	0.050
2,3-Dione-Fluo	ESI+	233 \rightarrow 176	60/40	0.050
4,5-DHD-BaP	ESI+	268 \rightarrow 239	60/40	0.050
7,8-DHD-BaP	ESI+	268 \rightarrow 239	60/40	0.050
1,6-Dione-BaP	ESI+	283 \rightarrow 226	60/42	0.050
3,6-Dione-BaP	ESI+	283 \rightarrow 226	60/42	0.050
3-OHFluo	ESI -	217 \rightarrow 189	60/30	0.050
9-OHBaP	ESI -	267 \rightarrow 239	60/40	0.050
1-OHP d9	ESI-	226 \rightarrow 198	60/32	0.050

3.2 *Chromatography*

In the literature, several HPLC methods described the use of methanol/water as mobile phase for the separation of OH-PAH and especially BaP metabolites [33-37]. Thus we tried methanol/water. However, even after optimization, we did not achieve accurate separation of the BaP diones and the overall pressure of the UPLC system did not support a methanol/water gradient. Overpressures ($> 15,000$ psi) at working flow rates (between 0.4 and 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) were too frequently reached leading to an unreliable method. When changing the organic phase to acetonitrile with the gradient described in Section 2.2, all the compounds were separated (Figure 2) and no more problem with the pressure in the system were encountered. Moreover when looking at the storage of stock solutions and samples, labile compounds such as diones and epoxides demonstrated better stability in acetonitrile than in methanol (data not shown).

Various combinations of acetonitrile and water and a number of acidic modifiers (trifluoroacetic acid, formic acid and glacial acetic acid) were investigated to identify the optimal mobile phase composition that produced the best sensitivity and peak shape for the analyte. It was found that the use of formic acid as an acidic modifier in the mobile phase gave excellent positive ESI response for metabolites analysed in the positive mode. An increase in the acetonitrile content could improve the peak shape whereas an increase in water content broadened the peak. However an increase in acetonitrile content could lead to an overpressure in the column that could only be avoided by a decrease in the mobile phase flow rate. So a compromise was done between all factors taking a mobile phase made of 40% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid at 0.4 ml/min (Pressure $\sim 10,000$ psi).

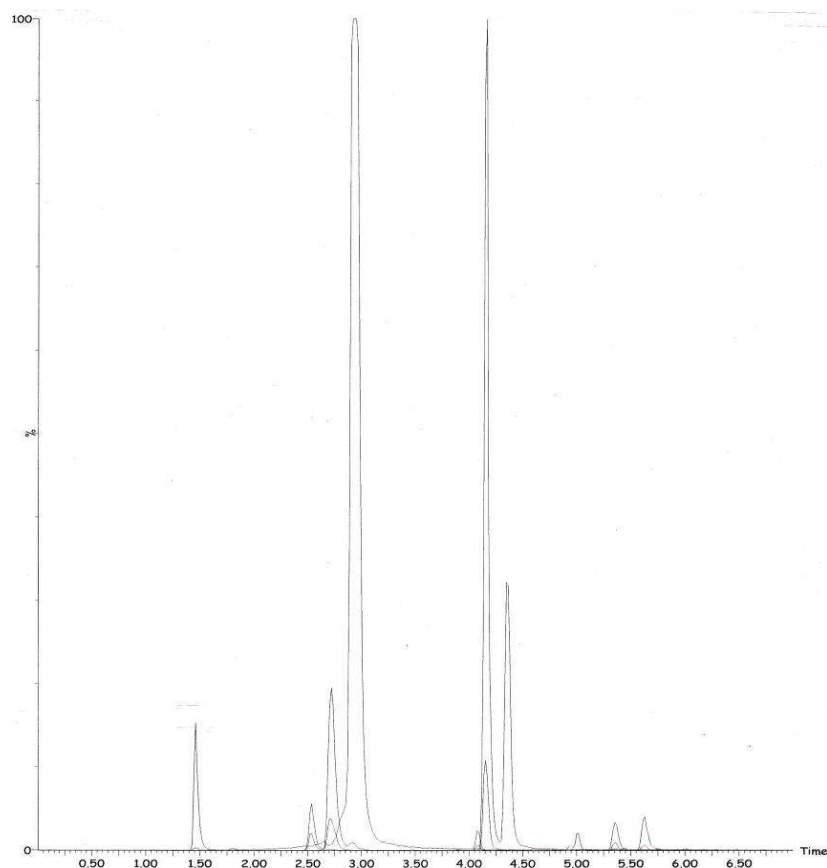


Figure 2: UPLC™-MS/MS chromatogram of the PAH metabolites mixtures. Retention time in min.

The total run time was set at 10 min. Thus, this method increased the gain in time and decreased solvent consumption. Compared to traditional HPLC instrument, UPLC exhibited a higher peak capacity resulting in a reduction of ion suppression for MS detector, which gave an improvement in the detection sensitivity.

3.3 *UPLC™-MS/MS method validation*

Linearity was tested with standard mixtures in acetonitrile at different levels of concentrations (Table 2). Correlation coefficient ranged between 0.9971 (BaP-1,6-dione) and 0.9996 (3-OHFluo). Analytical limits of detection as well as methodological limits of detection (Table 2) were obtained for a signal-to-noise ratio of 3. The instrumental detection limits ranged between 1.1 and 2.4 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ for metabolites analyzed in the positive mode (10 μl injected). For mono-hydroxylated PAHs they were lower with values of 0.06 and 0.09 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ for 3-OHFluo and 9-OHBaP, respectively. When comparing these detection limits with those obtained by UPLC-MS [29], they were found to be more than 10 times lower for the same studied metabolites. This result showed the greater sensitivity of UPLC-MS/MS method compared to UPLC-MS. Methodological limits of detection (MDL) varied between 30 and 73 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile for diol and dione compounds. For 3-OHFluo and 9-OHBaP, MDL were 2 and 6 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile, respectively.

At all three concentrations, intra-day and inter-day precisions were below 9 % RSD (Table 3). The intra-day accuracy ranged between 64 % and 88 % for all compounds at the three concentrations (Table 4). The lower recoveries for diol and dione compounds (between 64 and 79%) compared to mono-hydroxylated metabolites (more than 76%) may be explained

by the loss of these more hydrophilic compounds during sample preparation steps. Compared to 3-OHFluo or 9-OHBaP, diol and dione compounds would bind more weakly to the SPE-cartridge and would be partly removed during the purification step on SPE-cartridge. Moreover diols and diones are more reactive compounds than mono-hydroxylated ones. They can react easily with light and air which can result in degradation into more stable compounds. Despite lower recoveries for some compounds reproducibility was acceptable at all three concentrations. This allows us to present the usefulness of this method to quantify selected BaP and Fluo metabolites in biological samples.

Table 2: Linearity and limits of detection of the UPLC-MS/MS method. IDL: instrumental limit of detection (10 µl injected). MDL: methodological limit of detection.

Compounds	Range of concentrations	Linearity	R ²	IDL (pg/µl of solvent)	MDL (pg/µl of bile)
4,5-DHDBaP	8 ng.g ⁻¹ - 34 µg.g ⁻¹	y = 712,9x + 33,9	0,9983	1.5	30.2
7,8-DHDBaP	8 ng.g ⁻¹ - 34 µg.g ⁻¹	y = 689,9x + 47,5	0,9976	1.7	39.1
1,6-dioneBaP	8 ng.g ⁻¹ - 33 µg.g ⁻¹	y = 262,9x + 12,6	0,9971	1.2	58.0
3,6-dioneBaP	8 ng.g ⁻¹ - 33 µg.g ⁻¹	y = 282,3x + 9,4	0,9975	1.7	60.1
9-OHBaP	8 ng.g ⁻¹ - 32 µg.g ⁻¹	y = 908,6x + 1,4	0,9995	0.09	5.6
2,3-DHDFluo	17 ng.g ⁻¹ - 70 µg.g ⁻¹	y = 1185,9x + 83,8	0,9980	1.1	51.8
2,3-dioneFluo	11 ng.g ⁻¹ - 44 µg.g ⁻¹	y = 297,6x + 19,9	0,9994	2.4	72.8
3-OHFluo	12 ng.g ⁻¹ - 48 µg.g ⁻¹	y = 1921,4x + 18,9	0,9996	0.06	2.2

Table 3: Intra- and inter-precision data of PAH metabolites at three different concentrations

Compound	Intra-day precision (RSD %, n=3 injections)			Inter-day precision (RSD %, n=3 injections)		
	1 pg.µl ⁻¹	10 pg.µl ⁻¹	1 ng.µl ⁻¹	1 pg.µl ⁻¹	10 pg.µl ⁻¹	1 ng.µl ⁻¹
4,5-DHDBaP	4	5	3	8	8	9
7,8-DHDBaP	4	4	2	8	9	8
1,6-dioneBaP	5	4	5	7	7	7
3,6-dioneBaP	9	4	4	7	9	9
9-OHBaP	5	2	2	8	9	9
2,3-DHDFluo	4	5	4	8	8	8
2,3-dioneFluo	5	6	5	7	7	8
3-OHFluo	5	3	2	8	9	9

Table 4: Accuracy data of PAH metabolites at three different concentrations (mean \pm SD)

Compound	Accuracy (RSD %, n=3 injections)		
	10 pg. μ l ⁻¹	100 pg. μ l ⁻¹	1 ng. μ l ⁻¹
4,5-DHDBaP	75 \pm 10	78 \pm 9	79 \pm 8
7,8-DHDBaP	71 \pm 11	70 \pm 10	75 \pm 8
1,6-dioneBaP	65 \pm 10	64 \pm 9	69 \pm 9
3,6-dioneBaP	69 \pm 11	70 \pm 10	65 \pm 10
9-OHBaP	77 \pm 7	76 \pm 6	77 \pm 6
2,3-DHDFluo	71 \pm 11	68 \pm 9	75 \pm 10
2,3-dioneFluo	64 \pm 11	64 \pm 9	70 \pm 9
3-OHFluo	87 \pm 9	84 \pm 7	88 \pm 6

3.4 Application to hepatic microsomes of flatfish: In vitro study

For all samples, no interfering peak was observed leading to accurate quantitation of the targeted compounds. Concerning BaP exposure, BaP-diols, BaP-dione and OH-BaP metabolites were identified and quantified. Results are presented in Table 5. BaP-diols and OH-BaP were produced at higher levels than BaP-diones. A few amount of 9-OHBaP was measured but one isomer was predominant (3-OHBaP). This preferred metabolism pathway for BaP is corroborated by previous studies [5, 9, 38-40]. Concerning fluoranthene exposure, the same trend was observed. Fluo-2,3-diol and 3-OHFluo were found to be major metabolites measured in the liver microsomes. Lower amount of Fluo-2,3-dione was quantified. There are very poor data concerning the metabolism pathways of fluoranthene. Having regards to these preliminary results, the metabolism of fluoranthene seems to follow the same patterns as those of BaP. To go further in our investigations, a complementary study using our UPLC-MS/MS analytical method for metabolite identification was conducted [32].

Table 5: BaP and Fluo metabolites detected in sole liver microsome samples after exposure to parent compounds. Concentrations are expressed in ng.g⁻¹ microsomes (mean \pm SD, n = 3).

Compound	PAH concentration (μ M)	
	20	40
Sum of DHDBaP	1,791 \pm 186	9,245 \pm 960
Sum of dioneBaP	409 \pm 33	2,946 \pm 138
9-OHBaP	259 \pm 15	1,508 \pm 59
OHBaP isomer	1,883 \pm 196	11,084 \pm 960
2,3-DHDFluo	3,319 \pm 410	5,442 \pm 672
2,3-dioneFluo	116 \pm 13	334 \pm 78
3-OHFluo	8,319 \pm 1,325	8,388 \pm 1,804

4 Conclusions

This paper represents the first developments and validation of an UPLCTM-MS/MS method for the detection of PAH metabolites at low levels. Thanks to the UPLC technology coupled to the tandem mass spectrometry, this methodology allows to separate and analyze PAH metabolites with an increase in resolution, sensitivity, and specificity when compared to traditional HPLC methods. New developments could be considered to enhance the number of metabolites that can be separated and quantified.

Furthermore this method has been applied to *in vitro* metabolism studies and has proved its efficiency and performance. The sensitivity and the specificity of the method were sufficient to identify and quantify PAH metabolites in a complex biological sample.

Acknowledgements: The authors wish to thank the National Program for Ecotoxicology (PNETOX), the French Minister of Environment and the research team IMOPHYS (Integration of molecular and physiologic responses to organic contaminants in coastal area) for research fundings. They want also to acknowledge the "Region Aquitaine" and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

1. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human*. Vol 32. 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
2. Johnson, L. L., Ylitalo, G. M., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Stafford, C., Bolton, J. L., Buzitis, J., Anulacion, B. F., and Collier, T. K. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **124**(1-3): p. 167-194.
3. Rewitz, K. F., Styrislave, B., Løbner-Olesen, A., and Andersen, O. 2006. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **143**(4): p. 363-381.
4. Patel, M. R., Scheffler, B. E., Wang, L., and Willett, K. L. 2006. *Aquatic Toxicology* **77**(3): p. 267-278.
5. Miranda, C. L., Chung, W. G., Wang-Buhler, J. L., Musafia-Jeknic, T., Baird, W. M., and Buhler, D. R. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(2): p. 101-108.
6. Aina, R., Palin, L., and Citterio, S. 2006. *Chemosphere* **65**(4): p. 666-673.
7. Platt, K. L. and Grupe, S. 2005. *Chemical Research in Toxicology* **18**(4): p. 700-710.
8. Pitot, H. 1995. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **333**(1-2): p. 3-14.
9. Harrigan, J. A., Vezina, C. M., McGarrigle, B. P., Ersing, N., Box, H. C., Maccubbin, A. E., and Olson, J. R. 2004. *Toxicological Sciences* **77**(2): p. 307-314.
10. Palmqvist, A., Rasmussen, L. J., and Forbes, V. E. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(3): p. 309-319.
11. Kammann, U. 2007. *Environmental Science and Pollution Research* **14**(2): p. 102-108.
12. Buratti, M., Campo, L., Fustinoni, S., Cirila, P. E., Martinotti, I., Cavallo, D., and Foa, V. 2007. *Biomarkers* **12**(3): p. 221-239.
13. Walker, S. A., Whitten, L. B., Seals, G. B., Lee, W. E., Archibong, A. E., and Ramesh, A. 2006. *Food and Chemical Toxicology* **44**(3): p. 380-387.
14. Vuorinen, P. J., Keinanen, M., Vuontisjarvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., and Schiedek, D. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 479-487.
15. van den Hurk, P. 2006. *Marine Environmental Research* **62**(SUPPL. 1).
16. van den Hurk, P. 2006. *Aquatic Toxicology* **77**(2): p. 202-209.
17. Shailaja, M. S., Rajamanickam, R., and Wahidulla, S. 2006. *Environmental Pollution* **143**(1): p. 174-177.
18. Pikkarainen, A. L. 2006. *Chemosphere* **65**(10): p. 1888-1897.

19. Van de Wiele, T. R., Peru, K. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D., and Headley, J. V. 2004. *Journal of Chromatography B* **806**(2): p. 245-253.
20. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1994. *Journal of Chromatography A* **683**(1): p. 9-19.
21. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1996. *Journal of Chromatography A* **731**(1-2): p. 75-84.
22. Letzel, T., Poschl, U., Wissiack, R., Rosenberg, E., Grasserbauer, M., and Niessner, R. 2001. *Analytical Chemistry* **73**(7): p. 1634-1645.
23. Letzel, T., Rosenberg, E., Wissiack, R., Grasserbauer, M., and Niessner, R. 1999. *Journal of Chromatography A* **855**(2): p. 501-514.
24. Fan, R., Dong, Y., Zhang, W., Wang, Y., Yu, Z., Sheng, G., and Fu, J. 2006. *Journal of Chromatography B* **836**(1-2): p. 92-97.
25. Jacob, P., Wilson, M., and Benowitz, N. L. 2007. *Analytical Chemistry* **79**(2): p. 587-598.
26. Pignini, D., Cialdella, A. M., Faranda, P., and Tranfo, G. 2006. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **20**: p. 1013-1018.
27. Xu, X., Zhang, J., Zhang, L., Liu, W., and Weisel, C. P. 2004. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **18**: p. 2299-2308.
28. Sherma, J. 2005. *J. AOAC Int* **88**(3): p. 63-67.
29. Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., and Willett, K. 2008. *Journal of chromatography B* **863**(1): p. 141-149.
30. Le Dù - Lacoste, M. and Budzinski, H. Submitted. *Anal Bioanal Chem.*
31. Waters. 2004. *Waters Application Note* **720000917EN**.
32. Wessel, N., Le Dù - Lacoste, M., Budzinski, H., Perdu-Durand, E., Burgeot, T., and Akcha, F. Submitted. *Aquatic Toxicology*.
33. James, M. O., Kleinow, K. M., Zhang, Y., Zheng, R., Wang, L., and Faux, L. R. 2004. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): p. 343-346.
34. Ruddock, P. J., Bird, D. J., McEvoy, J., and Peters, L. D. 2003. *The Science of The Total Environment* **301**(1-3): p. 105-117.
35. Schanke, A. v., Holtz, F., der Meer, J. v., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., den Berg, M. v., and Everaarts, J. M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): p. 1641-1647.
36. Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W. L., and Le Eberhart, B. T. 1986. *Cancer Research* **46**(8): p. 3817-3824.
37. Willett, K. L., Gardinali, P. R., Lienesch, L. A., and Di Giulio, R. T. 2000. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **58**(1): p. 68-76.
38. Willett, K. L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., and Di Giulio, R. T. 2001. *Toxicology and Applied Pharmacology* **177**(3): p. 264-271.

39. Padros, J. and Pelletier, E. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 347-351.
40. Stein, J. E., Hom, T., and Varanasi, U. 1984. *Marine Environmental Research* **13**(2): p. 97-119.

Publication n°5**PAH biliary metabolites as exposure diagnostic tool in fish: A review of analytical approaches**

Marie Le Dû-Lacoste, Olivier Mazéas and Hélène Budzinski*

ISM-LPTC, UMR 5255 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 cours de la Libération, 33405 TALENCE, FRANCE

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a major environmental threat due to their carcinogenic properties. The need for monitoring such biological effects is now fully recognised by several international programmes and committees. Monitoring for PAH exposure can involve analysing the exposure media or the exposed organisms for PAHs and/or their biotransformation products and biochemical and/or biological endpoints. As a biomarker of exposure, the determination of PAH metabolite in fish bile has several advantages over other assessment techniques. One of them is the strong fluorescence emitted by the compounds leading to the use of straightforward fluorescence detection techniques. These methods are excellent for rapid screening of overall PAH exposure levels, but less suitable for the absolute quantification of individual compounds. To reach this objective, mass spectrometric detection is needed and particularly gas chromatography separation coupled to a mass spectrometric detection (GC/MS). However in such a case, sample pre-treatment steps are required (deconjugation, extraction, purification, derivatization). Analysis of individual compounds can also be achieved with high-performance liquid chromatographic separation coupled to fluorescence detection (HPLC/F). In the present review, the state-of-art for the main analytical methods is described. The advantages and limitations of each approach are discussed. The scope is illustrated with some relevant applications in environmental monitoring highlighting the efficiency of the PAH metabolites analysis in fish bile as a diagnostic tool of short-term PAH exposure.

Keywords: PAH, bile metabolites, fish, analytical methods, diagnostic tool, biomarkers.

Submitted to Analytical Bioanalytical Chemistry

1 Introduction

1.1 PAH in the marine environment

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous and persistent environmental contaminants. This class of compounds can be found in fossil fuels or as by-products of combustion of organic matter. Primary sources of PAHs are anthropogenic (e.g., road and river transport, industrial effluents, extraction and transport of oil, heating) [1]. Natural sources (e.g., forest fires, volcanism, and crude oil leaking from natural stocks) contribute to a minor degree to the overall PAH burden in the environment as compared to anthropogenic ones [2, 3]. The most significant sources of petrogenic PAH in the marine environment are petroleum spills and by-products released from offshore drilling installations (e.g., released water) [4] whereas the primary source of pyrogenic PAHs is combustion of fossil fuels and transportation [1]. Three sources for PAHs can be distinguished by order of importance: pyrolytic sources, petrogenic sources then in very minority quantity diagenetic sources. The relative distribution of these sources varies with the localizations (regional, urban, or rural space, streets public parks) and seasons. Each source generates PAHs with a characteristic fingerprint and it is thus possible to determine the process by which these compounds were generated by studying the distribution of these compounds. Thus the pyrolytic source (incomplete combustion of organic matter at high temperature) is known to produce rich mixtures in high molecular-weight compounds (more than 3 rings) and with a low proportion of alkylated ones. On the contrary the petrogenic and diagenetic sources lead to rich mixtures of alkylated PAH and low molecular-weight compounds (2 or 3 rings). Though it is the various sources have as a common point to produce complex mixtures of compounds. The physical properties of PAHs vary according to their molecular mass and their structure. Generally their solubilities in water are very low and their octanol/water coefficients (log Kow) are high that indicates an important potential of adsorption on the particulate matters suspended in water, as well as a strong potential of bioconcentration in the organisms [5]. In addition, the alkylated compounds are more hydrophobic than the parent compounds. Numerous works studied the PAH contamination of the different compartments of the marine environment allowing a better understanding of contaminant fluxes and fate. However, due to availability and transformation phenomena, this approach does not allow to access the actual exposure level of organisms in order to evaluate the health state of the environment and the toxic potential of the observed pollution [6-9]. Nevertheless strong correlations between the degree of contamination of the medium and the presence of hepatic lesions, in particular of cancerous nature, were shown [10-17]. These observations highlight that PAH have a low acute toxicity but a strong chronic toxicity. Their toxicity seems to increase after having undergone a stage of biotransformation. Many studies were thus undertaken in order to better understand the mechanisms of biotransformation and toxicity of these compounds, especially in fish.

The present review will only deal with the biotransformation of PAH in fish and the analysis of metabolites in fish. Several works have shown the capability of other organisms such as bacteria or copepods to biotransform PAH and to produce metabolites [18]. And although this point remains important, it will not be approach in the present work.

1.2 *Biotransformation of PAHs in fish*

The metabolisation of the PAHs is carried out in two phases which are the functionalisation (phase I) and the conjugation (phase II) (Figure 1). The majority of the mechanisms implied in these stages are of enzymatic type. Several authors studied the metabolism of PAH in fish since the 80's [19-26] and they have showed a strong accumulation of metabolites in the gall bladder [27, 28]. Then the liver comes, as the principal body of biotransformation, then skin and other tissues like the gills, gonads, kidneys, intestines, the bladder, the brain, blood, and the plasma with variable orders according to studies. The hepatic cells will implement the processes of biotransformation in order to be able to excrete PAHs as metabolites via the kidneys and the bladder (urine) or, mainly, via the gall bladder then the intestines (excrements). The bile seems the biological fluid of choice to study the phenomena of biotransformation. Each PAH has its own biotransformation pathway according to its chemical structure. Thus the metabolisation process can lead to more or less complex phenomena producing various kinds of metabolites (quinones, diols, epoxydes, mono- or polyhydroxylated compounds ...). Into the liver, PAHs are the target of oxidative metabolism by cytochrome P-450 monooxygenase enzymes (also called mixed-function oxidase or CYP1A1) and epoxide hydrolases into liver microsoms leading to the formation of epoxides, phenols, diols and dihydrodiol-epoxides (Figure 2). In the case of benzo(a)pyrene (BaP), those processes end up producing different isomers of BaP dihydrodiol-epoxides, among them +(anti) 7,8-diol-9,10-oxide benzo(a)pyrene which is known to be one of the most potent PAH carcinogen (Figure 2). Concerning pyrene, the metabolisation process is really easier, leading predominantly to a single, strongly fluorescent metabolite (1-hydroxypyrene). This specificity led to a massive use of this compound as a target molecule. The main forms of PAH metabolites in fish are hydroxy-PAH and their conjugates (Figure 1). They can be detected either as conjugates or after hydrolysis as free metabolites. Both approaches have their specific advantages as well as drawbacks: the analysis of conjugates may lead to extra complicated metabolite patterns and also complexify the analysis itself (lack of standards, need to use special analytical methods ...). It is also important to notice that metabolites of alkylated PAH are also formed. Their presence can therefore indicate the origin and the fingerprint of the organism exposure. Nevertheless it is important to print out the lack of the marketable choices of PAH metabolites. Only the hydroxylated metabolites are manufactured and no conjugated one is sold. This reduces considerably the field of investigation of the techniques of analysis.

1.3 *Interest in using PAH metabolites*

Levels of PAHs in the marine environment have been monitored in many areas from the time that these compounds were recognized as a serious environmental concern [1]. Because of the weak accumulation of PAH in the higher organisms and the toxicity of this metabolites, it appeared necessary to seek out PAH metabolites in the organisms so as to establish relations between exposures to PAHs and observed toxicity [17]. Analytical protocols were thus developed in order to identify and to quantify these compounds. In the long term, environmental surveys using the metabolites as indicators of contamination and bioavailability of PAHs in the aquatic environment will have to be developed. The OSPAR commission (Oslo-Paris) for the North-East Atlantic marine environment protection set up the Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP) (OSPAR, 2005). Monitoring in the past has been based mostly on chemical measurements, but biological effect techniques have become increasingly important over recent years. As such, they have become part of the OSPAR Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP) and, more recently, also of the OSPAR coordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP) (publication OSPAR 2005/235; www.ospar.org/fr/html/welcome.html).

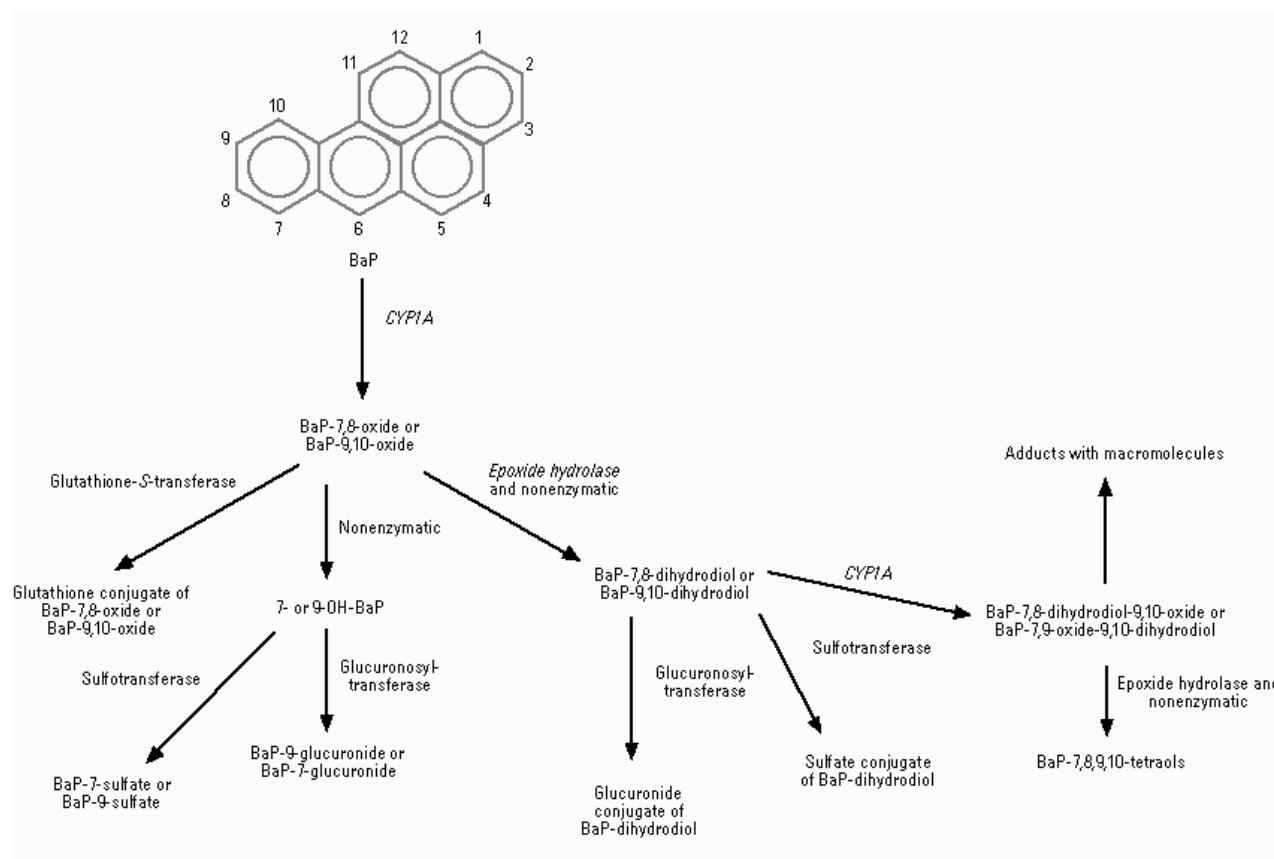


Figure 2: Metabolic cascade for benzo(a)pyrene (BaP) via the cytochrome P4501A (CYP1A) in fish [29].

One of hot lines of JAMP is the continuous monitoring of biological effects and the integration within the continuous chemical monitoring of dangerous substances. It has been envisaged from 2005 to set up a system of collection of information related to the results of the continuous monitoring of the biological effects in the zones where these effects can occur because of the potential levels of contamination. From this point of view, the use of PAH metabolites is very promising. Some studies showed the interest of the follow-up of the metabolites in natural environment as a tool for diagnosis of the exposure of the aquatic organisms to PAHs and in particular, their exposure following the oil slick of Exxon Valdez in 1989 [30-33]. Analysis of fluorescent aromatic compounds (FACs) in fish bile has been used as a monitoring parameter of PAH exposure in many studies [34-37] and the determined concentrations were found to be correlated with the PAH exposure levels [30, 38-40]. They made it possible to show the bioavailability of the PAH contained in the oil with respect to various fish and geographically to delimit the zone impacted by the oil slick. Lastly, work, realized within the framework of the impact study of the oil slick of Erika on the French Atlantic coast (1999), clearly showed an exposure of the targeted organism (*Solea solea*) by the means of the study of the biliary metabolites. Moreover, this exposure had not been highlighted by traditional measurements of accumulation in tissues [41].

1.4 The aim of the present work

The complex nature of bile sampled from a fish exposed to PAHs is a challenge for the analytical chemist, and the analytical method of choice will depend upon the questions to be answered.

This paper will present an overview of the various techniques used to characterize PAH metabolites in fish bile. However it will not be only one list of successive standard operating

procedures, but it will provide sufficient information including advantages and drawbacks of each, to enable a judicious choice according to cases.

In a first part screening and semi-quantitative techniques based on spectrofluorimetric detection will be presented (liquid chromatography coupled to fluorimetry, fixed fluorescence and synchronous fluorescence spectrometry). In a second part quantitative techniques will be detailed. An overview of sample preparation methodologies will precede a presentation of separation and detection techniques mainly based on mass spectrometric detection (gas phase chromatography and liquid phase chromatography coupled to mass spectrometry).

The paper will also demonstrate the applicability of PAH metabolites in the case of monitoring pollution from hydrocarbons. This discussion will be illustrated with some relevant applications in environmental monitoring.

2 Total metabolites estimation (screening) and semi-quantitative techniques

Various analytical techniques have been used to determine fluorescent aromatic compounds (FAC) in fish bile. Krahn *et al.* [42] introduced a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for quantification and Lin *et al.* [43] presented a method based on synchronous fluorescence spectrometry (SFS). Ariese *et al.* [44] compared the SFS and HPLC methods with bile samples from flounders (*Platichthys flesus*) exposed to contaminated sediments in a mesocosm study. Lin *et al.* [45] made a comparison between HPLC and a fixed wavelength fluorescence (FF) method for benzo[a]pyrene- and naphthalene-type metabolites; Vuontisjärvi *et al.* [46] compared a HPLC method with an FF method for pyrene-type metabolites. Aas *et al.* [47] used the FF method for detecting FACs in fish bile.

Screening or semi-quantitative techniques are based on spectrofluorimetric detection. This one is founded on the property which has the aromatic compounds to emit fluorescence when they are excited, due to the delocalized electrons on their aromatic rings. Most of the larger PAH molecules in the bile of exposed fish are present in the form of hydrophilic conjugates such as glucuronides (Figure 1). One of the attractive features of these rapid techniques is that the time-consuming hydrolysis step can be left out and the conjugated species can be measured directly by fluorescence. However, for quantification one should be aware of the fact that their fluorescence intensities are usually enhanced relative to the hydroxy PAH and the optimal excitation and emission wavelengths are slightly shifted to shorter wavelengths (i.e., higher energy levels). Therefore, when the conjugated species is not available, as it is most often the case, the corresponding free hydroxy PAH cannot be used for calibration without caution [48]. In general, these three bile screening methods all represent tools for easy, rapid, and semi-quantitative assessment of PAH metabolites in fish. A brief review of each method is provided below.

2.1 High Pressure Liquid Chromatography coupled to Fluorescence (HPLC/F)

In the great majority of HPLC/F screening methods, PAH metabolites in fish are separated by reversed phase chromatography (Table 1) using octadecyl columns. It can be noticed that normal phase chromatography was also used to separate benzo(a)pyrene diols in the bile of fish [23]. Most of the studies using reversed phase chromatography are based on the protocol set up by Krahn *et al.* [35, 39, 49] (Table 1). Non-hydrolyzed bile samples are directly injected in HPLC and fluorescence is measured at fixed excitation and emission wavelength. It is a semi-quantitative method where metabolites are not quantified individually but by integrating unresolved group of peaks corresponding to global fluorescent aromatic

compounds (FACs). Their concentrations are expressed in external standard equivalents. Measures are conducted at 290/335 nm (excitation/emission wavelengths) to detect naphthalenic metabolites (generally indicators of petroleum contamination), at 260/380 nm for phenanthrenic metabolites and at 380/430 nm for benzo(a)pyrene ones (generally indicators of pyrolytic contamination). It can be noticed that pyrene metabolites were also quantified at 340/384 nm [40] and chrysene ones at 270/390 nm [50]. Concentrations are respectively expressed in naphthalene, phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene equivalents which are the compounds used as external standards. Some studies use monohydroxy-PAH, such as 1-OHP or 3-OHBaP, as external standards instead of parent PAH to quantify metabolites [51, 52]. In this way, the quantification is performed with compounds structurally closer to the ones present in the samples. Tetrahydrotetraolbenzo(a)pyrene was also used as an internal standard [53]. With the wavelength parameters indicated above, the contribution of interfering compounds is considered as low. However, the existence of interferences in HPLC/F chromatograms is sometimes noted [54, 55]. McDonald *et al.* [55] additionally specify that some phenanthrene metabolites respond to naphthalene metabolite wavelength and reversely, and that fluoranthene and pyrene metabolites can also respond to benzo(a)pyrene metabolite wavelength. Some works also describe the enzymatic deconjugation of bile samples before performing the analysis [35, 56-59]. In a survey dealing with the Exxon Valdez oil spill Krahn *et al.* [30] analyzed PAH metabolites both in HPLC/F and GC/MS. They precised that, in spite of a very good global correlation between the two techniques (both efficient to discriminate uncontaminated and contaminated sites), the fingerprint obtained by HPLC/F (naphthalene, phenanthrene and benzo(a)pyrene metabolites) is highly variable. Thus the source identification is very difficult with HPLC/F while GC/MS analysis allows a very accurate diagnosis. Other studies successfully used HPLC/F to evaluate fish exposure to PAH during the Exxon Valdez oil spill [30, 32, 33, 60, 61]. It can be noticed that Varanasi *et al.* [60] selected, among fish collected in 1989, the ones exhibiting the highest levels of metabolites in the bile in order to look for PAH metabolites in their muscles by HPLC/F and identify possible sanitary risks for human consumption. The whole analyses showed FAC levels under detection limits. Furthermore, HPLC/F was revealed efficient to demonstrate the exposure of fish to PAH during a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel [62]. FAC levels were higher in the bile of fish collected in the vicinity of the leak than in a reference site. Other studies, especially recent ones, use HPLC/F after enzymatic deconjugation to quantify metabolites individually [42, 51, 60, 63-68]. Among the compounds detected in those studies, they found 2-hydroxynaphthalene, 1-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxypyrene, as well as several chrysene and BaP metabolites (monohydroxy-PAH and dihydrodiols). However, Jonsson *et al.* [51] underline the lack of selectivity and separation abilities of HPLC/F for 2-hydroxynaphthalene and 1-hydroxyphenanthrene, which are thus likely to suffer from chromatographic overlap. Using this method to study the PAH exposure of eels from several English estuaries, Ruddock *et al.* observed important differences of global metabolite levels between estuaries [68]. Moreover, fish presented relative compositions of bile metabolites characteristic of each estuary. 1-hydroxypyrene is however always prominent (from 57 to 94 % of the studied metabolites) whatever the estuary [68] and the studied species (eel, flounder and conger) [63].

Table 1: Sample preparation and HPLC analysis of hydrolyzed PAH metabolites

Target compounds	Separation	Detection	LOD	Reference
BaP metabolites	HPLC	Scintillation counting	not given	[28]
Pyrene metabolites	HPLC	Fluorescence	not given	[56]
Pyrene metabolites	HPLC/APCI	Tandem mass spectrometry	not given	[69]
BaP metabolites	HPLC/APCI	Mass Spectrometry	not given	[70, 71]
2- to 5-ring PAC metabolites	HPLC	Fluorescence	not given	[72]
2- to 5-ring PAC metabolites	HPLC	Fluorescence	not given	[72]
BaP metabolites	HPLC	Fluorescence	not given	[65]
2- to 4-ring PAC metabolites	HPLC	Fluorescence	not given	[66]
3- to 5-ring PAC metabolites	HPLC	Fluorescence	not given	[63, 68]
BaP metabolites	HPLC	Fluorescence	0.02 ng/mL of urine for OHBaP and 0.04-0.1 ng/ml of urine for diols BaP	[73]
2- to 5-ring PAC metabolites	HPLC	Fluorescence	24, 20, 14 and 14 ng/g of bile for 2-OHN, 1-OHPhe, 1-OHP and 3-OHBaP	[51]
Chrysene metabolites	HPLC	Fluorescence	5-60 ng/g of bile for OHChrys isomers and 12-50 ng/g of bile for diols-chrysene isomers	[50, 64]
2- to 5-ring PAC metabolites	HPLC	Fluorescence	Between 20.2 and 477.3 ng/g of bile OH-PAH	[46]
2- to 5-ring PAC metabolites	HPLC/ESI	Mass Spectrometry	Between 0.6 and 31.3 μ /l of intestinal OH-PAH	[74]
2- to 5-ring PAC metabolites	HPLC/ESI	Tandem mass spectrometry	Instrumental LOD: between 0.08 and 5.0 pg injected (10 μ l injected)	[75]
Pyrene metabolites	HPLC/ESI	Tandem mass spectrometry	0.01 ng/l of urine	[76]
BaP metabolites	UPLC/ESI	Mass Spectrometry	< 0.01 ng/ μ l for BaP metabolites	[77]

2.2 Fixed Fluorescence (FF)

Fixed fluorescence (FF) is the simplest fluorescent method for the semi-quantification of PAH metabolites, consisting in directly measuring fluorescence at fixed excitation and emission wavelengths in diluted bile samples. Most of the published works are based on the studies of Lin *et al.* [45], Beyer *et al.* [78] and Aas *et al.* [47, 79] (Table 2). Standard solutions of hydroxy PAHs and bile sample from fish exposed to single compounds of PAH have both been used to establish optimal wavelength pairs for different classes of PAH metabolites. The latter approach is preferred because the optimal excitation/emission wavelengths of free hydroxy metabolites will not be exactly the same as those of the conjugated species that can be found in natural bile samples. Quantification is achieved thanks to external standards such as hydroxylated PAHs (1-OHN, 9-OHPhe, 1-OHP, 3-OHBaP equivalents) or parent PAH. The wavelengths used vary from a study to another but are globally closed to the ones reported for HPLC/F. In the literature, certain excitation/emission wavelength have been suggested for FF detection of different PAH metabolites, such as 290/335 nm and 380/430 nm for naphthalene and benzo[a]pyrene type metabolites, respectively [45]. It can be noticed that Beyer *et al.* [78] performed a combined quantification of naphthalene and phenanthrene metabolites at 275/383 nm, while Lin *et al.* [45] measured naphthalene metabolites at 290/335 nm and Fillmann *et al.* [80] phenanthrene ones at 252/357 nm. The main studies using FF are summarized in Table 2. FF is a technique that does not differentiate PAH metabolites from other compounds due to the fluorescence overlap contributed by different PAH compounds, which may occur in field situations. At specified wavelength pairs, the fluorescence measured included the parent compound, its metabolites and the alkylated derivatives of the parent and its subsequent metabolites [39]. FF analysis is regarded as a qualitative measure of exposure to various PAH groups [81]. Nevertheless signal intensity ratios at the three wavelength pairs 290/335, 341/383, and 380/430 nm may also provide information about the dominant PAH source [45, 81]. On the one hand, strong FF fluorescence intensity at 290/335 nm can be the fingerprint of a complex mixture of non-alkylated and alkylated naphthalene metabolites which is typically found in fish exposed to petrogenic contamination. On the other hand combustion-type sources (traffic, domestic heating) yield a stronger FF signal at 341/383 and 380/430 nm because of 4- to 5-ring PAH [45, 81]. Because of a lack of glucuronidated hydroxy PAH standards, FF data are often expressed in arbitrary fluorescence units, which may be considered as acceptable within the framework of a screening tool (e.g., in discriminating exposed samples from non-exposed ones), as long as all samples are analyzed with the same instrument under identical conditions. The FF signal may also be expressed as equivalents of a PAC standard, such as pyrene [81]. As an application to field studies, Beyer *et al.* [82] used FF measurements of pyrene metabolites to investigate the exposure of caged cods to PAHs in the vicinity of an aluminium plant (South-West of Norway). Levels of pyrene metabolites up to 37 times higher were detected in the bile of fish collected near the aluminium plant compared to the ones measured in a reference site while pyrene concentrations were similar in the sediment of the two locations. This result suggests a contamination of the fish by the water column. For each caging location of this study, two cages were installed: one in contact with sediment and one 2 meters under the surface water. The higher levels of pyrene equivalents measured in the bile of fish from the cages located in the water column confirm this hypothesis. Finally, though a good correlation is generally observed between FF and HPLC results, Lin *et al.* [45], comparing HPLC/F and FF, put in evidence the always higher results obtained for benzo(a)pyrene metabolites in HPLC/F with respect to FF while not such a trend is observed for naphthalene metabolites.

2.3 Synchronous Fluorescence Spectrometry (SFS)

SFS can also be alternative method to FF or HPLC/F in order to decrease the time of analysis, to simplify protocols and to perform low cost analyses. It consists in scanning

monochromatic excitation and emission wavelengths of diluted samples with a constant wavelength difference. SFS may also encounter less interference from other compounds and therefore be more discriminatory than conventional FF. Although conventional excitation and emission spectra are often complicated with many peaks, a simpler spectrum can be obtained using SFS. By scanning excitation and emission synchronously with a fixed wavelength difference ($\Delta\lambda$), fewer peaks emerge, in some cases only one, because signal is only seen when $\Delta\lambda$ matches the interval between one excitation and one emission band. By comparison to HPLC/F, SFS is more sensitive in detecting three- and four-ring chromophores, and excitation/emission at 380/430 nm is more sensitive in detecting five-ring chromophores. Therefore the SFS method preferentially detects hydroxylated pyrene chromophores (pyrene-type metabolites) more strongly than other chromophores or parent pyrene. Method neither distinguishes specific compounds but indicates in relative terms that PAH metabolites are present. SFS methods are mainly based on the work of Ariese *et al.* [56], Lin *et al.* [43] and van der Oost *et al.* [83] for the semi-quantification of the global metabolites of pyrene (Table 2). Among the PAH, B[a]P is the most studied compound and one of the most potent carcinogens. However, pyrene and its metabolites may be more sensitive indicators of PAH exposure and were therefore chosen to develop the SFS method [43]. Compounds are generally quantified in comparison to 1-hydroxypyrene and expressed as hydroxypyrene equivalents. The quasi-totality of the published works is focused on pyrene metabolites due to three reasons. At first, pyrene is always present in environmental mixtures of PAH and is often one of the more abundant constituents [84]. Secondly, pyrene has a less complicated metabolite pattern than B[a]P. Pyrenols are the only major metabolites of pyrene, whereas B[a]P is metabolized to more than 20 different metabolites [84]. Finally, even though 380/430 nm is optimal for detecting phenolic-type metabolites of B[a]P, pyrenols have been reported to be major contributors to fluorescence in HPLC/F at 380/430 nm of bile of English sole from polluted sites, whereas metabolites of B[a]P contributed only to a minor extent [42]. Other PAH metabolites have been also investigated. Chrysene metabolites have been quantified in bile of various fish species [50] and global quantification of phenanthrene metabolites was also realized in the urine and haemolymph of crabs [80]. To finish, applied to environmental field [43, 85], SFS analysis of non-hydrolyzed bile samples is a very rapid and non-expansive method. Both non-hydrolyzed and hydrolyzed bile samples can be used. However, in order to save time, and because the conjugated PAH metabolites typically display enhanced fluorescence compared to their hydrolyzed counterparts, it is generally recommended that non-hydrolyzed samples be used for PAH screening purposes.

Table 2: Main studies involving SFS or FF for the analysis of PAH metabolites in fish bile

Target compounds	Detection	Context	Reference
Pyrene metabolites	SFS	Harbour estuary (near aluminium plant)	[86]
		Wadden Sea	[87]
		Estuary	[88]
Pyrene and BaP metabolites	SFS	Estuary (caging)	[89]
Pyrene metabolites	SFS	Bay	[90]
Naphtalene, Phenanthrene and BaP metabolites	FF	North Sea, (near an offshore station)	[91]
		Detroit (near aluminium plant)	[40]
		Harbour (caging)	[92]
Naphtalene, Phenanthrene, BaP and Pyrene metabolites	FF	Bay	[93]
		Fjord (caging)	[78]
Pyrene metabolites	FF	Detroit (near aluminium plant, caging)	[82]
		Fjord (caging)	[47]
Pyrene and BaP metabolites	FF	Estuary (caging)	[89]

2.4 Other fluorometric techniques

Other types of fluorescence scanning techniques, such as excitation or emission spectroscopy, can also be used. For example, as demonstrated by Hawkins *et al.* [94], metabolite emission spectra collected at a fixed excitation wavelength of 254 nm can be used for screening detection of phenanthrene metabolites in bile. Moreover combination of supercritical fluid chromatography (SFC) with UV [95] has been presented as alternative analytical technique for determination of oxygenated PAH. Detection limits for SF-UV were at ng level, but vary (2-8 ng for SFC-UV) with target compound. However this technique has not been tested on biological samples and thus its applicability to natural bile sample and thus the limit of detections associated are not available.

3 Quantitative determination of individual metabolites

However fluorescence spectroscopy is known to be highly sensitive for PAH analysis at trace levels, its use seems to be limited when applied to complex mixtures of FACs [96]. This limitation becomes evident when compounds have similar structures such as isomeric metabolites, PAH parent compounds and its metabolites. Moreover in order to link the activity and the structure of a compound and to understand the PAHs biotransformation processes, more specific and more sensible analytical tools have been developed.

High performance liquid chromatography coupled to fluorescence (HPLC/F) still remains the most frequently used methodology in the laboratories, also for quantitative analysis. Indeed, it allows to target a compound with a couple of wavelengths, via an external standard calibration method [46, 50, 51, 64, 97, 98, 99]. However since the 80's, the mass spectrometric detection (MS) allowed considerable progresses in terms of sensitivity and specificity for the PAH metabolites analysis, especially in complex biological matrices. The followings paragraphs attempt to describe separation techniques coupled to mass spectrometric detection (simple or tandem) used for PAH metabolites quantification (their principles, their applicability to natural samples and their limitations).

These separation and detection techniques which are very sensible even in biological tissues have to be compulsory associated with preliminary sample preparation techniques. Indeed the complexity of biological samples (e.g. multiple interference sources) and the common need to concentrate the sample for a sufficient detection level made essential the implementation of sample preparation protocol. These protocols often compromise several steps: from the extraction to the separation and the detection of selected compounds.

3.1 Sample preparation

Two tables summarize various sample preparation methodologies in order to provide a guide to the preparation and analysis for PAH metabolites in bile. Methods for sample preparation and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) analysis are given in Table 3. Methods for sample preparation and liquid chromatography coupled to either fluorescence (HPLC/F) or mass spectrometry (LC/MS) analysis are presented in Table 1. Sample stability has traditionally been a matter of great concern. For the preparation of the two certified reference materials (CRM), Ariese *et al.* [100] have tested the stability of PAH metabolites in fish bile at four different temperatures for a period of 13 months and the main conclusions were the followings. No degradation was observed in the sample stored at -20°C or +4°C. Even the samples stored at +20°C were found to be surprisingly stable, although a separate test with non-hydrolyzed samples showed a significant decrease in the 1-pyrene-glucuronide levels after a few months at room temperature. Apparently, at room temperature spontaneous deconjugation can occur, but the resulting phase-I metabolites seem not to be very sensitive to further degradation in the fish bile. In conclusion it seems that for long-term storage and stability of reference materials and thus, for natural samples, -20°C or colder is preferred. Nevertheless brief exposure to ambient temperatures during sample preparation is not likely to cause any significant degradation [100].

Table 3: Sample preparation and GC/MS analysis of hydrolyzed PAH metabolites

Target compounds	Sample preparation				GC analysis			Ref.
	Enzymatic treatment	Incubation	Extraction solvent	Derivatization products	Internal standard	Column	Detection	
Phenanthrene metabolites	β -glucuronidase sulfatase	37 °C for 10 h.	Ethylacetate	TMS-ethers	α -naphthol	SE-54 5% phenyl; 20 m \times 0.33 mm	MS EI, 70 eV	[101]
2- to 4-ring PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	40 °C for 4 h.	Methylene chloride and isopropanol	TMS-ethers	hexamethylbenzene	J & W DB5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[39, 42]
2- to 3-ring alkylated & non-alkylated PAC metabolites	β -glucuronidase	37 °C for 24 h.	Methylene chloride and methanol	Acetylates	n-pentadecane	SE-30	MS EI, 70 eV	[102]
2- to 4-ring alkylated & non-alkylated PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	40 °C for 3 h.	Methylene chloride and methanol		2,6-dibromophenol	J & W DB5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[30]
2- to 5-ring alkylated & non-alkylated PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	40 °C for 2 h.	Methylene chloride and methanol	TMS-ethers	2,6-dibromophenol, 1-naphthol-d8, phen-d10, chry-d12, flu-d10 and BaP-d12	J & W DB5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[25]
2- to 4-ring PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	40 °C for 2 h.	Ethylacetate		2,6-dibromophenol hexamethylbenzene	HP-5 MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[57, 58]
1- to 4-ring PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	37 °C overnight	Hexane : methyl-t-butyl ether (2:1)		octadecane	MSBP5 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[103]
2- to 4-ring PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase			Acetylates	decachlorobiphenyl	GC separation	MS EI, 70 eV	[72]
2- to 4-ring PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	37 °C for 2 h.	SPME (no solvent)	TMS-ethers		DB5-MS 5% phenyl; 25 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[104]
BaP metabolites			n-Hexane	Iodoethane	Phenanthrene-d ₁₀	HP Ultra-2 5% phenylmethylsilicon; 25 m \times 0.2 mm	MS EI, 70 eV	[73]
2- to 5-ring PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	40 °C for 2 h.	Ethylacetate	TMS-ethers	2,6-dibromophenol	CP-Sil 8 5% phenyl; 50 m \times 0.25	MS EI, 70 eV	[51]
Chrysene metabolites	β -glucuronidase sulfatase	40 °C for 2 h.	Ethylacetate	TMS-ethers	4-Cl-naphthol perylene	CP-Sil 8 5% phenyl; 50 m \times 0.25	MS EI, 70 eV	[50, 64]
2- to 5-ring PAC metabolites	β -glucuronidase	37 °C overnight	Pentane	TMS-ethers	¹³ C ₁₂ -3-MeO-CB79	DB5-MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 50 eV	[105]
2- to 5-ring PAC metabolites	β -glucuronidase sulfatase	37 °C overnight	Methylene chloride and methanol	TMS-ethers	¹³ C labelled standard	DB5-MS 5% phenyl; 30 m \times 0.25 mm	MS EI, 70 eV	[106]

3.1.1 Deconjugation

As stated previously, metabolites of PAHs in fish bile are mainly present as conjugates (glucuronides, sulfates, glutathione). Thus most analytical methods aimed at quantifying individual metabolite will start with a deconjugation step to hydrolyze the conjugates and so to liberate the hydroxylated phase-I metabolites. Different reasons justify this deconjugation step. Firstly, in the case of absolute quantifications, very few conjugate standards are available for calibration purposes whereas various primary metabolites are commercialized. Moreover, conjugated compounds are not detected in GC/MS (volatilization issues in GC). Finally, in terms of diagnosis of exposure, the conversion of different conjugated forms in a single phase I metabolite improves signal intensity for a better detection. However, from a toxicological point of view, it would be interesting to separately quantify naturally occurring phase I metabolites and conjugates ones as they have not the same toxicological relevance and impact: phase I metabolites are the ones exhibiting most important toxic properties. The deconjugation process is usually carried out by adding a mixture of β -glucuronidase and arylsulfatase [23, 28, 39, 56, 57, 63, 69, 101-103, 107, 108] to the diluted and homogenized sample (during 2 to 24 hours). As described by Hellou and Payne [102], Jonsson *et al.* [51], Krahn *et al.* [42], Steward *et al.* [24, 28], and van Schanke *et al.* [65], glucuronides and sulfates can be simultaneously hydrolyzed by adding β -glucuronidase containing arylsulfatase activity and pH 4.8–5.0 acetate buffer, followed by incubation for one to 24 hours at 37–40 °C.

The majority of publications about PAH metabolite analysis in fish bile focus on the determination of glucuronides and sulfates, but a significant portion of PAH conjugated metabolites can be present as glutathione conjugates [109]. However, unlike glucuronides and sulfates these conjugates are more likely to be retained in the liver [109]. Thus the use of γ -glutamyltransferase for glutathione conjugates was rarely reported in the literature [24]. Glutathione bounds can also be broken by acid attacks with chlorhydric acid [25, 58, 110] or sulfuric acid [69, 108]. To prevent oxidation of the hydrolyzed metabolites, Ariese *et al.* [72] and Richardson *et al.* [66] added 0.5 and 4% ascorbic acid, respectively, to a mixture of the bile and the deconjugation enzymes and Mazéas and Budzinski [111] added β -mercaptoethanol, an anti-oxidant, to bile samples at the very beginning of their protocol (before deconjugation and extraction). To ensure the completeness of the deconjugation reaction, an inter-laboratory test was made to determine how critical this step was [72]. The results showed that the deconjugation was very efficient and that experimental conditions (incubation time, buffering) were not preponderant factors of this reaction [72].

After the hydrolysis step, samples are then centrifuged and supernatants are recovered for either direct analysis by fluorimetry, injection in HPLC or either for extraction. Some studies then perform an elimination of proteins (and of potential added enzymes) contained in fish bile by the mean of acetone [112], ethanol [28, 90, 113], methanol [113] or ethanol/hexane precipitation [114].

3.1.2 Extraction

Major studies dealing with HPLC analysis of hydrolyzed bile for individual quantification describe simple sample preparation without any extraction step involved [51, 65, 66]. Only a dilution step is needed; for example a dilution of 2- to 5-fold or more with ethanol [48, 66] or methanol [51, 65], followed by centrifugation before injection onto the HPLC column. Alternatively, extraction of bile samples can be done as a clean-up step prior to [28, 114] or following deconjugation of PAH metabolites [48, 70, 71, 114]. One of principal aim of extraction is usually to transfer hydroxylated PAH into a volatile organic solvent compatible with gas chromatography analysis [42]. Liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) are the two major techniques currently reported. They will be described below.

Liquid-Liquid Extraction (LLE)

Liquid-liquid extraction is the most widely used technique to extract PAH metabolites. Ethyl acetate appears to be the solvent employed in the majority of the published works (Table 1). For example, Steward *et al.* [28] extracted bile with ethyl acetate:acetone (2:1, v/v) prior to enzymatic treatment. Methylene chloride, methanol and hexane are also used in different protocols, alone or in combination with other solvents. Thus, hydrolyzed metabolites have been successfully extracted from acidified (pH 4.8–5.0) samples using methylene chloride containing 10% methanol [30, 102], ethyl acetate [51, 57, 103], or a mixture of hexane and methyl-*t*-butyl ether (2:1) [103]. The extractions are usually repeated three to five times and the combined organic phase dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated to 0.1–0.5 ml [51, 57], or to dryness for some derivatization procedures [30]. Furthermore, Stroomberg *et al.* carried out a saponification on whole crustaceans before liquid-liquid extraction by heating in presence of an ethanolic solution of potassium hydroxide [115].

Solid Phase Extraction (SPE)

Solid phase extraction (SPE) offers different advantages compared to liquid-liquid extraction such as automation, reduced analytical time, smaller amount of solvent. SPE was widely developed for the study of PAH metabolites, and especially of pyrene metabolites, in human urine [74, 116–119]. However, only few studies have reported the application of this technique to the marine environment. McElroy *et al.* [120] and Simpson *et al.* [121] developed a method using octadecyl disks to quantify pyrene or benzo(a)anthracene metabolites in water from laboratory experiments. Law *et al.* [69] as well as Mazéas and Budzinski [111] used a chromatographic extraction step (Bond Elut C₁₈ cartridge containing 500 mg sorbent) to separate hydrolyzed PAH metabolites from the bile matrix. The metabolites were eluted with 100% methanol. Additionally, Bond Elut C₁₈ columns were used as an alternative to liquid-liquid extraction [71, 102] to separate conjugated from deconjugated metabolites. Furthermore, Willet *et al.* [71] successively extracted the bile sample before and after treatment with pure β -glucuronidase and arylsulfatase, providing information about the relative amounts of deconjugated metabolites (sulfates, and glucuronides). Very few studies reported the use of other types of phases. In one of the very first studies published on PAH metabolites in fish, Statham *et al.* used a polymeric XAD-2 phase to extract naphthalene and methylnaphthalene metabolites from trout biles (water rinsing, methanol elution) [122]. Moreover, a particular technique using centrifugation to pass samples (plasma, bile and liver) through cells filled with styrene divinylbenzene was described by Krahn *et al.* [20] and applied in a few works to extract metabolites of naphthalene, 2,6-dimethylnaphthalene and benzo(a)pyrene [39, 42, 123]. However, this technique does not seem to be applied afterwards.

Other techniques (SPME, LLME ...)

Other techniques have been reported to extract PAH metabolites from various matrices, such as solid-phase microextraction (SPME) [124, 125] or liquid-liquid microextraction (LLME) [126–128]. However no study has reported their use in the field of marine organism and especially in the case of fish bile. Solid phase micro-extraction (SPME) is not addressed in this paper. In spite of its large use in human urine studies (especially with a polyacrylate fiber), this technique has not been applied to aquatic organisms. However, SPME could turn out to be a useful method to allow a fast and precise screening of bile metabolites by GC/MS or LC/MS [124, 125]. Moreover Marlow and Hurtubise [126] have reported for the first time the use of liquid-liquid microextraction (LLME) system in the extraction of phenol, 2-naphthol, and several hydroxyl polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. Also,

fluorescence spectroscopy was used to determine the enrichment factors and the mass distribution of the solute between the liquid and the solid phases. Fluorescence spectroscopy was very effective in determining the very small concentrations of the solute in the various phases. More recently the same authors [129] have published a study in which liquid-liquid-liquid microextraction (LLLME) was performed. However this approach has not been already tested with biological matrices.

3.1.3 Purification

Most of the techniques used for extraction can also be used for purification and clean up. The major aims of this step are to remove most of protein and lipid contents and in a general way to remove most of the impurities that are responsible of the complex structure of bile samples. Natural matrices and especially biological ones are complex mixtures made of constituents, which can interfere with compounds of interest and affect analytical systems. However, only a few marine studies report the use of such a step for the analysis of PAH metabolites. One of the strategies is to fraction the sample by HPLC in order to isolate the different kind of constituents (e.g. lipids, proteins, metabolites, pigments). The other method is the use of solid-phase extraction with specific sorbents in order to retain the different impurities.

HPLC clean up

Different protocols using reversed phase and normal phase HPLC were set up (Table 1). Krahn *et al.* [19] developed a fractionation protocol to isolate metabolites from fish bile samples in reversed phase. Another method was set up, still in reverse phase, to remove interfering compounds from fish liver and to fractionate conjugated metabolites, unconjugated ones and parent PAHs [123]. A protocol was also developed to purify bile samples in normal phase HPLC with a size exclusion column [130].

Solid Phase Extraction (SPE)

Very few studies have used SPE purification protocols in the range of marine studies. However, Mazéas and Budzinski [111] described the purification of fish bile samples on amino phase with methanol/methylene chloride (20:80, v/v) elution to detect properly different monohydroxylated metabolites by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

3.2 Separation and detection of individual metabolites

3.2.1 GC/MS analysis

After a series of sample pre-treatment steps, final quantification of individual metabolites can be achieved by GC/MS in electron impact (EI) mode. A selection of typical GC/MS method is listed in Table 3.

Derivatization

Hydroxylated metabolites are not the ideal candidates to perform a GC/MS analysis because of their low volatility. By modifying the functionality of the molecule, derivatizing reagents enable the analysis by GC/MS. Derivatization also reduces analyte adsorption in the GC system and improves detector response, peak separations, and peak symmetry, and therefore it also improves detection limits [51, 131]. Derivatization also prevents dehydration of dihydrodiols to the two corresponding phenolic compounds in the GC [39, 42, 131]. In general silylation and acylation are the preferred techniques used for hydrolyzed bile metabolites before GC/MS analysis. Several reagents for derivatization are commercially available such as bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) which is the most widely used reagent for silylation and which easily forms TMS-ethers with alcohols [132]. By adding 100-200 μ l BSTFA to concentrated extract [51] or to dried extract [42], the derivatization is complete by heating the mixture for two hours at 60°C. Mazéas and Budzinski [111] also recommended the use of 30 μ l BSTFA and the heat for 30 min at 65°C. Trimethylsilylimidazole (TMSI) in pyridine (1:4) forms TMS ethers with phenolic PAH as well as with diols and tetrols within 15 minutes at room temperature [64, 133]. Additional silylating reagents used for derivatization of PAC metabolites are 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (SYLON TP) [101] and N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) [69]. Acetylated hydroxylated PAHs are prepared for GC/MS analysis using ethereal diazomethane as described by Hellou and Payne [102, 134]. Some studies underlined the decrease of sensitivity induced by this derivatization step [39, 57, 58]. Indeed the derivatization efficiency decreases as the number of fused rings increases, resulting in lower recovery and reduced sensitivity for larger hydroxylated PAHs [51].

Metabolites detection and identification

Metabolites are identified by comparing their retention time and their mass spectra to those of reference standards. Each mass spectrum is characterized by the presence of the molecular ion and specific fragment ions depending on the derivatization reagent used. For derivatized metabolites (e.g. TMS-ethers) the most abundant fragment ions include $[M-15]^+$ and $[M-31]^+$, and a strong $[M-89]^+$ ion $[-O-Si(CH_3)_3]^+$ that indicates the presence of a hydroxyl group [25]. For underivatized metabolites a major fragment ion is $[M-29]^+$ [30, 57, 135].

Internal standard is usually used to quantify individual metabolites in GC/MS. Based on their response relative to that of the internal standard, metabolites are quantified after injection of calibration solutions that are prepared with commercially available PAH metabolites. It should be stressed that PAH metabolites in clean solvents are much more prone to degradation than the same compounds in the fish bile matrix [113]. Calibration solutions should therefore be prepared fresh, and a suitable antioxidant (e.g., 0.5% ascorbic acid in water/methanol, or 1.5% butylhydroxytoluene (BHT) for nonpolar GC-solvents) should be added for protection. Different ways for quantification can be chosen. The molecular ion together with a major fragmentation ion can be used, e.g., m/z 144,115 for 1-naphthol; m/z 182, 152 for 9-fluoreno; m/z 194, 165 for 9-phenanthrol, and m/z 218, 189 for 1-pyrenol [57, 135]. Alternatively, ions corresponding to the trimethylsilyl derivatives can also be used, e.g., m/z 216 for 1-naphthol; m/z 254,165 for 9-fluoreno; m/z 266 for 9-phenanthrol, and m/z 290 for 1-pyrenol [25]. Although the GC/MS technique needs sample

pretreatment and it is limited by the few metabolites standards available, this method provides detailed information about which particular metabolites are present in the hydrolyzed samples. This gives information about the fingerprint of the contamination source of PAH. Krahn *et al.* implemented GC/MS analyses to highlight the exposure of fish to PAHs following the Gulf war oil spill [136]. Thus, after a screening of bile samples by HPLC/F, selected samples were analyzed by GC/MS and showed high concentration of metabolites of petrogenic aromatic compounds such as phenanthrols or dibenzothiophenols. Besides, in a study concerning the Exxon Valdez oil spill, Krahn *et al.* put forward dibenzothiophenols as promising marker compounds for the diagnosis of fish exposure to some typical high sulfur content crude oils [30]. In this last study, alkylated naphthols were also quantified in large amounts in the bile of fish. Furthermore, Jonsson *et al.* presented HPLC/F and GC/MS as complementary methods [51, 64]. In comparison to HPLC/F, GC/MS is showed to be a method of choice for the determination of 2-OH-N and 1-OH-PHE due to its selectivity and separation abilities. Meanwhile, as GC/MS sensitivity is decreasing with increasing molecular weight, HPLC/F appears to be more sensitive for compounds such as BaP metabolites [42, 51]. Those findings are confirmed by Ariese *et al.* [113]. An overview of limits of detection found with HPLC/F and GC/MS methodologies is given in Table 4. Generally speaking, quantitative methodologies present LOD in the range of ng to μg per ml of bile. Better LOD (ng.l^{-1}) have been obtained for PAH metabolites quantified in urine [104].

3.2.2 HPLC/Fluorescence analysis for individual quantification

As an alternative to GC/MS for quantification of individual metabolites, HPLC/F technique can also be used for separation and quantification. Most laboratories apply reversed phase HPLC conditions and an acetonitrile/aqueous buffer gradient. The fluorescence excitation/emission wavelength settings are programmed for optimal detection of each target analyte: 2-OH-naphthalene, 325/358 nm; 1-OH-phenanthrene, 269/380 nm; 1-OH-pyrene, 346/384 nm; 3-OH-BaP, 385/450 nm. In such a case the external calibration is preferred, based on peak heights. HPLC/F methods generally offer excellent sensitivity, especially for the larger PAH. Typical LODs for 3-OH BaP are 2–10 ng g^{-1} bile. On the other hand, the chromatographic resolution of HPLC is poorer than that of GC and the fluorescence detector does not add sufficient extra selectivity, especially for smaller, two-ring PAH metabolites in bile from oil-exposed fish. This triggers to obtain very crowded and overlapped chromatograms. When specific analysis for conjugated metabolites in non-hydrolyzed bile is needed, HPLC/F as a technique for individual quantification can be useful. Stroomberg and coworkers optimized the separation of conjugated PAH metabolites using ion-pair conditions (acetonitrile gradient at pH 2.0 with 5 mM tetrabutylammonium bromide as ion pair reagent in the buffer) for phase-II metabolism studies [137].

3.2.3 HPLC/MS analysis

The combination of HPLC separation with the selectivity of an MS detector constitutes a very powerful tool to analyze polar and thermolabile conjugated metabolites [69, 121, 138, 139] and PAHs that contain one or more hydroxyl group [71, 140]. Moreover, the possibility of detecting glucuronide and sulfate conjugates allows a simplified procedure (compared to methods needing a deconjugation step) and provides information about the actual form of metabolites in organisms. This information can be very helpful in terms of toxicity. HPLC/MS has particularly been used for the quantification of PAH metabolites in terrestrial mammals [97, 141–144] but little in marine organisms [69, 114, 121]. Both Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) and Electrospray Ionization (ESI) were used (in positive and negative ion mode). In those studies, HPLC/MS was only used for identification purposes and was demonstrated to successfully analyze conjugated and free metabolites of PAHs. In the case of fish bile, the use of HPLC/MS has not been routinely

implemented, because it suffers of problems caused by adsorption, contamination, surface reactions, and other interferences, making difficult trace analysis [145]. However some attempts have to be noticed. Law *et al.* [69] used HPLC/MS analysis to characterize metabolites in bile and in urine of pyrene-exposed trout (*Oncorhynchus mykiss*). After a first separation of free and conjugated metabolites with an HPLC reversed-phase column, each fraction was identified using HPLC/APCI/MS. In a later study, Willet *et al.* [71] were able to determine 3-OH-BaP, two BaP-dihydrodiols and three BaP-diones in deconjugated fish bile using HPLC/APCI/MS. Diones are not easily determined by HPLC/F due to their low fluorescence intensity [65], which underscores the importance of HPLC/MS as an alternative analytical method for these compounds. HPLC/APCI/MS detection limits were excellent for BaP-diones (1 ng injected) and also very good for BaP-dihydrodiols and 3-OH BaP (2.5–25 ng injected) [71]. Table 4 sums up the sensitivity performance for LC/MS methods.

Recently, ultra-performance liquid chromatography (UPLC) with $< 2 \mu\text{m}$ particle size column was introduced for rapid and efficient compound separation over traditional HPLC [146]. UPLC coupled with mass spectrometry (UPLC/MS) is increasingly being used for rapid multiple component quantitation for *in vitro* and *in vivo* metabolite characterization [77]. Zhu *et al.* [77] have developed an UPLC/MS methodology for PAH metabolites analysis in fish bile. Limits of detection obtained were closed to $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ for BaP metabolites such as diones and diols. The increasing progress in analytical techniques is a real chance for PAH metabolites analysis at trace levels. The specificity and the sensitivity of new analytical tools allow their application for the metabolites quantification in complex matrices and make possible the simplification of sample preparation protocols.

3.2.4 Other analytical techniques

Capillary electrophoresis coupled to fluorescence detection (CE-F) has also been investigated [147-149]. The separation was achieved by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography (CD-MECK) and two kinds of fluorescence were tested, conventional (lamp-excited) fluorescence and the laser-induced fluorescence (LIF) [48, 147, 148, 150, 151]. When analyzing a complex PAH metabolite mixture in a bile sample from oil-exposed plaice (*Pleuronectes platessa*) a very good separation was obtained. Separation of conjugated pyrene metabolites was achieved and the major advantage was the much reduced time required for the analysis (only one minute for small fish). However, despite of this practical benefit, so far the method has not been applied to monitoring studies.

An other method that allows the detailed and sensitive determination of specific metabolites is Laser Excited Shpol'skii Spectroscopy (LESS). With this method metabolites are first methylated into their methoxy derivatives, and then subsequently frozen in an n-octane matrix to temperature of 30K or lower. This way the metabolites can be determined (without actual physical separation) based on their high-resolution fluorescence spectrum [56]. However this method is also quite complicated, time consuming, and requires sophisticated equipment, preventing application to large series of samples.

Table 4: Overview of limits of detection of PAH metabolites according to various analytical methodologies. Instrumental: only instrumental limits of detection are investigated.

References	Analytical methods	Compounds	Sensitivity
[47]	FF	1OHP	500 ng 1OHP-eq/ml of bile
[51]	GC-MS	1-OHP	6 pg injected (instrumental)
[64]	GC-MS	OHC isomers	50-120 ng.g ⁻¹ bile
[104]	GC-MS (SPME)	1-OHP	1.6 ng.l ⁻¹ of urine
[104]	GC-MS (SPME)	1-OHC	1.68 ng.l ⁻¹ of urine
[44]	HPLC/F	1-OHP	20.2 ng.g ⁻¹ of bile
[44]	HPLC/F	3-OHBaP	41.5 ng.g ⁻¹ of bile
[51]	HPLC/F	1-OHP	6 pg injected (instrumental)
[51]	HPLC/F	3-OHBaP	3 ng injected (instrumental)
[50]	HPLC/F	OHC	5-60 ng.g ⁻¹ of bile
[140]	LC-APCI-MS	OHPAH	0.3-50 µg.ml ⁻¹ (instrumental)
[152]	LC-APCI-MS	BaP Metabolites	0.002-0.2 ng injected (instrumental)
[74]	LC-MS	OHPAH	0.36-14.09 µg.l ⁻¹ of gastrointestinal fluid
[74]	LC-MS	1-OHP	0.6 µg.l ⁻¹ of gastrointestinal fluid
[75]	LC-MS/MS	OHPAH	0.1-5 pg injected (instrumental)
[76]	LC-MS/MS	1-OHP	0.01 ng.l ⁻¹ of urine
[76]	LC-ESI-MS/MS	1OHP	0.5 ng.l ⁻¹ of urine
[153]	LC-QTOFMS	BaP metabolites	40-60 pg injected (instrumental)
[77]	UPLC-ESI-MS	BaP metabolites	< 0.01 ng.µl ⁻¹ (instrumental)

4 Conclusions and Recommendations

Monitoring of fish bile is usually conducted to assess the PAH burden of fish in a particular aquatic environment. PAHs pollution almost always involves a complex mixture of PAHs and it may not seem important to determine individual compounds if the main goal is to quantify the overall PAH burden.

Two major reasons can be given for obtaining a higher degree of specificity:

- Source identification

As shown in this paper, the relative intensities of certain metabolites or metabolite classes can be extremely important in deducing the major contributor(s) to the overall PAH burden (e.g., marine fuel, crude oil, creosote, or fossil fuel combustion).

- Quality control

When analyzing individual compounds the results can be compared to those obtained with other methods and certified values of CRMs can be used for quality control.

These two points should be considered when deciding which of the techniques would be most appropriate for a particular application.

4.1 Screening Methods

As shown in the review, FF and SFS are both very rapid, because of the simplicity of the sample preparation (only dilution) and the rapidity of the fluorescence analysis per sample. The repeatability of these techniques is usually excellent since limited numbers of manual steps are involved. In principle a short analysis time means that a large number of samples can be analyzed. This is important because the biological variability is often substantial in field situations. Field studies have shown that FF and SFS are sufficiently sensitive to discriminate between two sites with different contamination level [81]. Moreover with the HPLC/F alternative and the choice of the excitation/emission wavelength pair, this semi-quantitative method can be considered as a good indicator of the source of PAH pollution. However these methods are considered as semi-quantitative techniques and they do not provide sufficient information on the fingerprint of the contamination comparing to detection involving mass spectrometry. The speciation of the different metabolites is difficult and the structural approach of the molecule cannot be achieved.

4.2 Absolute quantification

Table 4 presents an overview of limits of detection obtained with several analytical techniques commonly used for PAH metabolites analysis. GC/MS technique proves to be sufficient in terms of sensitivity and selectivity, especially for complex chromatograms.

With the help of derivatization, the sensitivity for larger PAH metabolites is enhanced [154]. The major disadvantage of such a technique is the numerous sample treatment steps and thus the time spent and the increase in risk of human errors. However, only mass spectrometric detection can achieve molecular characterisation and identification of the biotransformation metabolites.

Concerning the HPLC/F used to specific wavelengths, it has been proved to be a very sensitive technique (particularly for larger PAH metabolites). It has been shown to be the most suitable in areas where fossil fuel combustion, coke and aluminium plants, or creosote leaching are the dominant sources of pollution. Furthermore, this technique does not require many sample treatment steps (only hydrolysis and centrifugation). Nevertheless, since not the overall PAH are fluorescent, and since for molecules with very close structure no discrimination between compounds can be done, this method is less appropriate for

monitoring in areas with petrogenic pollution sources.

By pushing forward the analytical limits in terms of sensitivity and specificity, analytical methodologies that couple liquid chromatography and mass spectrometry (simple or in tandem) are become a major driving force in analytical development for PAH metabolites quantification. The limits of detection become lower at each new technological innovation (e.g. UPLC/MS). The improvement that can bring new methodologies compared to former and current used methods, has to be the driving aim for scientist working on PAH metabolites quantification. More sensitive and specific analytical tools could provide the methodological support to study deeper the PAH metabolism processes in organisms by quantify primary metabolites and all biotransformation products.

Acknowledgements: The authors wish to acknowledge the “Region Aquitaine” and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

1. Robertson, A. 1998 *Petroleum Hydrocarbons*, in *Amap Assessment Report: Arctic Pollution Issues*, Wilson, S.J., Murray, J.L., and Hungtington, H.P., Editors: Oslo. p. 859
2. Neff, J. M., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. 1979, London: Applied Science Publishers Ltd. 262.
3. Neff, J. M. 1985 *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, in *Fundamentals of Aquatic Toxicology, Methods and Applications*, Pp. 416-454, Rand, G.M. and Petrocelli, S.R., Editors Hemisphere: New York. p. 666
4. Roe, U., Durell, G., and Johnsen, S. 1999. *Marine Pollution Bulletin* **38**(11): p. 977-989.
5. McElroy, A. E., Farrington, J. W., Teal, J. M., and Varanasi, U., *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Pp 1-40. 1989, Boca Raton: CRC Press.
6. Malins, D. C. and Hodgins, H. O. 1981. *Environ Sci Technol (Feature)* **15**(11): p. 1273-1280.
7. Varanasi, U. and Stein, J. E. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 93-100.
8. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T., and Bellocq, J. 1998. *Marine Pollution Bulletin* **36**(12): p. 951-960.
9. Nakata, H., Sakai, Y., Miyawaki, T., and Takemura, A. 2003. *Environmental science & technology* **37**(16): p. 3513-3521.
10. Baumann, P. C. 1998. *Mutation research* **411**(3): p. 227-233.
11. Landahl, J. T., McCain, B. B., Myers, M. S., Rhodes, L. D., and Brown, D. W. 1990. *Environmental health perspectives* **89**: p. 195-203.
12. Marigomez, I., Soto, M., Cancio, I., Orbea, A., Garmendia, L., and Cajaraville, M. P. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(5-7): p. 287-304.
13. Hinton, D. E., Kullman, S. W., Hardman, R. C., Volz, D. C., Chen, P. J., Carney, M., and Bencic, D. C. 2005. *Marine Pollution Bulletin* **51**(8): p. 635-648.
14. Akcha, F., Leday, G., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2004. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **552**(1-2): p. 197-207.
15. Au, D. W. T. 2004. *Marine Pollution Bulletin* **48**(9-10): p. 817-834.
16. Stehr, C. M., Myers, M. S., Johnson, L. L., Spencer, S., and Stein, J. E. 2004. *Marine Environmental Research* **57**(1-2): p. 55-74.
17. van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): p. 57-149.
18. James, M. O. 1989 *Biotransformation and Disposition of Pah in Aquatic Invertebrates*, P 69-92, in *Metabolism Fo Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Varanasi, U., Editor CRC Press: Boca Raton. p. 341.
19. Krahn, M. M., Brown, D. W., Collier, T. K., Firedman, A. J., Jenkins, R. G., and Malins,

- D. C. 1980. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2**(4): p. 233-246.
20. Krahn, M. M., Collier, T. K., and Malins, D. C. 1982. *Journal of Chromatography A* **236**(2): p. 429-440.
21. Gmur, D. J. and Varanasi, U. 1982. *Carcinogenesis* **3**(12): p. 1397-1403.
22. Varanasi, U., Stein, J. E., and Hom, T. 1981. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **103**(2): p. 780-787.
23. Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W. L., and Le Eberhart, B. T. 1986. *Cancer Research* **46**(8): p. 3817-3824.
24. Steward, A. R., Zaleski, J., and Sikka, H. C. 1990. *Chemico-Biological Interactions* **74**(1-2): p. 119-138.
25. Yu, Y., Wade, T. L., Fang, J., McDonald, S., and Brooks, J. M. 1995. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **29**(2): p. 241-246.
26. Hellou, J., Leonard, J., Meade, J., Sharpe, S., Banoub, J. H., Papiernik, S., Eglington, L., and Whelan, J. 1999. *Polycyclic Aromatic Compounds* **14/15**: p. 221-230.
27. Varanasi, U., Reichert, W. L., Stein, J. E., Brown, D. W., and Sanborn, H. R. 1985. *Environ. Sci. Technol.* **19**: p. 836-841.
28. Steward, A. R., Kandaswami, C., Chidambaram, S., Ziper, C., Rutkowski, J. P., and Sikka, H. C. 1990. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**: p. 1503-1512.
29. Kleinow, K. M., James, M. O., Tong, Z., and Venugopalan, C. S. 1998. *Environmental Health Perspectives* **106**(3): p. 155-166.
30. Krahn, M. M., Burrows, D. G., Ylitalo, G. M., Brown, D. W., Wigren, C. A., Collier, T. K., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1992. *Environ Sci Technol* **26**: p. 116-126.
31. Krahn, M. M., Ylitalo, G. M., Buzitis, J., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1993. *Journal of Chromatography A* **642**(1-2): p. 15-32.
32. Jewett, S. C., Dean, T. A., Woodin, B. R., Hoberg, M. K., and Stegeman, J. J. 2002. *Marine Environmental Research* **54**(1): p. 21-48.
33. Marty, G. D., Hoffmann, A., Okihiro, M. S., Hepler, K., and Hanes, D. 2003. *Marine Environmental Research* **56**(5): p. 569-584.
34. Oikari, A. O. 1986. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **36**(3): p. 429-436.
35. Krahn, M. M., Rhodes, L. D., Myers, M. S., Moore, L. K., MacLeod, W. D., and Malins, D. C. 1986. *Archives of environmental contamination and toxicology* **15**(1): p. 61-67.
36. Van Der Oost, R., Van Schooten, F.-J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K., and Vermeulen, N. P. E. 1995. *Marine Environmental Research* **39**(1-4): p. 368-368.
37. McDonald, S. J., Kennicutt II, M. C., Liu, H., and Safe, S. H. 1995. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**: p. 232-240.
38. Collier, T. K. and Varanasi, U. 1991. *Archives of environmental contamination and toxicology* **20**(4): p. 462-473.

39. Krahn, M. M., Myers, M. S., Burrows, D. G., and Malins, D. C. 1984. *Xenobiotica* **14**(8): p. 633-646.
40. Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W. L., and Andersen, O. K. 2001. *Marine Environmental Research* **52**(3): p. 213-229.
41. Budzinski, H., Mazéas, O., Tronczynski, J., Desaunay, Y., Bocquene, G., and Claireaux, G. 2004. *Aquat. Living Resour.* **17**: p. 329-334.
42. Krahn, M. M., Burrows, D. G., MacLeod, W. D., and Malins, D. 1987. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**(5): p. 511-522.
43. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Racine, R. N. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(5): p. 707-715.
44. Ariese, F., Burgers, I., Oudhoff, K., Rutten, T., Stroomberg, G., and Vethaak, D. 1997.
45. Lin, E. L. C., Cormier, S. M., and Torsella, J. A. 1996. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **35**(1): p. 16-23.
46. Vuontisjärvi, H., Keinänen, M., Vuorinen, P. J., and Peltonen, K. 2004. *Polycycl. Aromat. Compd.* **24**: p. 333-342.
47. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 225-228.
48. Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Hoornweg, G. P., Gooijer, C., Velthorst, N. H., and Hofstraat, J. W. 1993. *Anal. Chem.* **65**(8): p. 1100-1106.
49. Krahn, M. M., Moore, L. K., and McLeod, W. D., *Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1986 : Metabolites of Aromatic Compounds in Fish Bile.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1986, NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-102.
50. Jonsson, G., Sundt, R. C., Aas, E., and Beyer, J. 2004. *Chemosphere* **56**(1): p. 81-90.
51. Jonsson, G., Beyer, J., Wells, D., and Ariese, F. 2003. *J. Environ. Monit.* **5**: p. 513-520.
52. Gagnon, M. M. and Holdway, D. A. 2000. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **38**(1): p. 70-77.
53. Deshpande, A. D. 1989. *Archives of environmental contamination and toxicology* **18**(6): p. 900-907.
54. Da Silva, D. A. M., Buzitis, J., Krahn, M. M., Bicego, M. C., and Pires-Vanin, A. M. S. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **52**(2): p. 175-183.
55. McDonald, S. J., Kennicutt, I., Mahlon C., and Brooks, J. M. 1992. *Marine Pollution Bulletin* **25**(9-12): p. 313-317.
56. Ariese, F., Kok, S. J., Verkaik, M., Gooijer, C., Velthorst, N. H., and Hofstraat, J. W. 1993. *Aquatic Toxicology* **26**(3-4): p. 273-286.
57. Escartin, E. and C., P. 1999. *Eviron. Sci. Technol.* **33**: p. 406-409.
58. Escartin, E. and Porte, C. 1999. *Environ Sci Technol* **33**: p. 2710-2714.

-
59. Upshall, C., Payne, J. F., and Hellou, J. 1993. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**: p. 2105-2112.
 60. Varanasi, U., Chan, S. L., McLeod, W. D., Stein, J. E., Brown, D. W., Burrows, D. G., Tilbury, K. L., Landahl, J. T., Wigren, C. A., Hom, T., and Pierce, S. M., *Noaa Technical Memorandum: Survey of Subsistence Fish and Shellfish for Exposure to Oil Spilled from the Exxon Valdez : First Year, 1989.*, US Department of Commerce, S., Editor. 1990.
 61. Huggett, R. J., Stegeman, J. J., Page, D. S., Parker, K. R., Woodin, B., and Brown, J. S. 2003. *Environ Sci Technol* **37**(18): p. 4043-51.
 62. Spies, R. B., Stegeman, J. J., Hinton, D. E., Woodin, B., Smolowitz, R., Okihiro, M., and Shea, D. 1996. *Aquatic Toxicology* **34**(3): p. 195-219.
 63. Ruddock, P. J., Bird, D. J., and McCalley, D. V. 2002. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**(2): p. 97-105.
 64. Jonsson, G., Taban, I. C., Jorgensen, K. B., and Sundt, R. C. 2004. *Chemosphere* **54**(8): p. 1085-1097.
 65. Schanke, A. v., Holtz, F., der Meer, J. v., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., den Berg, M. v., and Everaarts, J. M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): p. 1641-1647.
 66. Richardson, D. M., Davies, I. M., Moffat, C. F., Pollard, P., and Stag, R. M. 2001. *J Environ Monit* **3**(6): p. 610-615.
 67. Richardson, D. M., Gubbins, M. J., Davies, I. M., Moffat, C. F., and Pollard, P. M. 2004. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **17**(2): p. 79-85.
 68. Ruddock, P. J., Bird, D. J., McEvoy, J., and Peters, L. D. 2003. *The Science of The Total Environment* **301**(1-3): p. 105-117.
 69. Law, F. C. P., Meng, J. X., He, Y. T., and Chui, Y. C. 1994. *Xenobiotica* **24**(3): p. 221-229.
 70. Willett, K., Rogers, J., and Di Giulio, R. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1): p. 67-68.
 71. Willett, K. L., Gardinali, P. R., Lienesch, L. A., and Di Giulio, R. T. 2000. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **58**(1): p. 68-76.
 72. Ariese, F., Beyer, J., and Wells, D., *Preparation and Certification of Fish Bile Reference Materials for Exposure Monitoring of Pahs in the Aquatic Environment, 2nd Progress Report, W-00/07, R., Editor. 2000, Institute for Environmental Studies/IVM: Amsterdam, the Netherlands.*
 73. Lee, W., Shin, H. S., Hong, J. E., Pyo, H., and Kim, Y. 2003. *Bull. Koreab Chem. Soc.* **24**(5): p. 559-565.
 74. Van de Wiele, T. R., Peru, K. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D., and Headley, J. V. 2004. *Journal of Chromatography B* **806**(2): p. 245-253.
 75. Xu, X., Zhang, J., Zhang, L., Liu, W., and Weisel, C. P. 2004. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **18**: p. 2299-2308.
 76. Pignini, D., Cialdella, A. M., Faranda, P., and Tranfo, G. 2006. *Rapid Communication in*

- Mass Spectrometry* **20**: p. 1013-1018.
77. Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., and Willett, K. 2008. *Journal of chromatography B* **863**(1): p. 141-149.
 78. Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J. U., and Goksoyr, A. 1996. *Aquatic Toxicology* **36**(1-2): p. 75-98.
 79. Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., and Andersen, O. K. 2000. *Aquatic Toxicology* **51**(2): p. 241-258.
 80. Fillmann, G., Watson, G. M., Francioni, E., Readman, J. W., and Depledge, M. H. 2002. *Marine Environmental Research* **54**(3-5): p. 823-828.
 81. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 2000. *Biomarkers* **5**(1): p. 9-23.
 82. Beyer, J., Aas, E., Borgenvik, H. K., and Ravn, P. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 233-236.
 83. Van der Oost, R., Van Schooten, F.-J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K., and Vermeulen, N. P. E. 1994. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(6): p. 859-870.
 84. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Vol 32*. 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
 85. Gorbi, S. and Regoli, F. 2004. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): p. 511-515.
 86. Paine, M. D., Chapman, P. M., Allard, P. J., Murdoch, M. H., and Minifie, D. 1996. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(11): p. 2003-2018.
 87. Eggens, M. L., Opperhuizen, A., and Boon, J. P. 1996. *Chemosphere* **33**(8): p. 1579-1596.
 88. Lyons, B. P., Stewart, C., and Kirby, M. F. 1999. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **446**(1): p. 111-119.
 89. Barra, R., Sanchez-Hernandez, J. C., Orrego, R., Parra, O., and Gavilan, J. F. 2001. *Chemosphere* **45**(4-5): p. 439-444.
 90. Eickhoff, C. V., Gobas, F., and Law, F. 2003. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(1): p. 59-66.
 91. Aas, E. and Klungsoyr, J. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 229-232.
 92. Ahmad, I., Pacheco, M., and Santos, M. A. 2004. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**(3): p. 290-302.
 93. Gagnon, M. M. and Holdway, D. A. 2002. *Marine Pollution Bulletin* **44**(3): p. 230-237.
 94. Hawkins, S. A., Billiard, S. M., Tabash, S. P., Brown, R. S., and Hodson, P. V. 2002. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(9): p. 1845-1853.
 95. Moyano, E., McCullagh, M., Galceran, M. T., and Games, D. E. 1997. *Journal of Chromatography A* **777**(1): p. 167-176.
 96. Santana Rodriguez, J. J. and Miller, J. N. 1998. *Analyst* **123**(11).

97. Ferrari, S., Mandel, F., and Berset, J. D. 2002. *Chemosphere* **47**(2): p. 173-182.
98. Elovaara, E., Mikkola, J., Makela, M., Paldanius, B., and Priha, E. 2006. *Toxicology Letters* **162**: p. 158-163.
99. Hellou, J. and Leonard, J. 2004. *Polycyclic Aromatic Compounds* **24**(4-5): p. 697-712.
100. Ariese, F., Beyer, J., Wells, D., Maier, E. A., Gawlik, B. M., and Lambert, A., *The Certification of the Mass Fractions of Pah Metabolites (1-Hydroxyphenanthrene, 1-Hydroxypyrene, and 3-Hydroxybenzo[a]Pyrene) in Two Fish Bile Materials: Bcr-720 (Sediment-Exposed Flounder Bile); Bcr-721 (Oil-Exposed Plaice Bile)*. 21068, E.R., Editor. 2004, Institute for Reference Materials and Measurements: Luxembourg.
101. Solbakken, J. E., Palmork, K. H., Neppelberg, T., and Scheline, R. R. 1980. *acta pharmacol. et toxicol.* **46**: p. 127-132.
102. Hellou, J. and Payne, J. F. 1987. *Environmental Toxicology and Chemistry* **6**: p. 857-862.
103. Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., and Forlin, L. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1): p. 439-439.
104. Smith, C. J., Walcott, C. J., Huang, W., Maggio, V., Grainger, J., and Patterson, J., Donald G. 2002. *Journal of Chromatography B* **778**(1-2): p. 157-164.
105. Li, Z., Romanoff, L. C., Trinidad, D. A., Hussain, N., Jones, R. S., Porter, E. N., Patterson Jr, D. G., and Sjodin, A. 2006. *Analytical chemistry* **78**: p. 5744-5751.
106. Romanoff, L. C., Li, Z., Young, K. J., Blakely Iii, N. C., Patterson, J. D. G., and Sandau, C. D. 2006. *Journal of Chromatography B* **835**(1-2): p. 47-54.
107. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1981. *Aquatic Toxicology* **1**(1): p. 49-67.
108. Seubert, J. M. and Kennedy, C. J. 2000. *Archives of environmental contamination and toxicology* **38**(3): p. 342-349.
109. Varanasi, U., Stein, J., Nishimoto, M., Reichert, W., and Collier, T. 1987. *Environ Health Perspective* **71**: p. 155-170.
110. Lee, R. F. 1989. *Marine Environmental Research* **28**(1-4): p. 93-97.
111. Mazéas, O. and Budzinski, H. 2005. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**(6): p. 985-990.
112. Collier, T. K., Thomas, L. C., and Donald C. Malins. 1978. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **61**(1): p. 23-28.
113. Ariese, F., Beyer, J., and Wells, D. 2005. *Journal of environmental monitoring : JEM* **7**(9): p. 869-876.
114. Leonard, J. D. and Hellou, J. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): p. 618-623.
115. Stroomberg, G. J., Reuther, C., Kozin, I., van Brummelen, T. C., van Gestel, C. A. M., Gooijer, C., and Cofino, W. P. 1996. *Chemosphere* **33**(10): p. 1905-1914.
116. Maisonnette, C., Simon, P., Hennion, M. C., and Pichon, V. 2006. *Journal of*

- Chromatography A* **1120**(1): p. 185-193.
117. Romanoff L.C, Li Z, Young K.J, Blakely N.C, Patterson Jr D.G, and Sandau C.D. 2006. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **835**(1-2): p. 47-54.
 118. Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., Andre, F., and Rychen, G. 2005. *Journal of analytical toxicology* **29**(3): p. 175-181.
 119. Munoz-Olivas, R. 2004. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **23**(3): p. 203-216.
 120. McElroy, A. E., Farrington, J. W., and Teal, J. M. 1990. *Environ Sci Technol* **24**: p. 1648-1655.
 121. Simpson, C. D., Cullen, W. R., He, T. Y. T., Ikonomou, M., and Reimer, K. J. 2002. *Chemosphere* **49**(3): p. 315-322.
 122. Statham, C., Melancon, M. J., and Lech, J. J. 1976. *Nature* **193**: p. 680-681.
 123. Krahn, M. M. and Malins, D. C. 1982. *Journal of Chromatography A* **248**(1): p. 99-107.
 124. Gmeiner, G., Krassnig, C., Schmid, E., and Tausch, H. 1998. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **705**(1): p. 132-138.
 125. Bergknut, M., Sehlin, E., Lundstedt, S., Andersson, P. L., Haglund, P., and Tysklind, M. 2007. *Environmental Pollution* **145**(1): p. 154-160.
 126. Marlow, M. and Hurtubise, R. J. 2004. *Analytica Chimica Acta* **526**(1): p. 41-49.
 127. Platt, K. L. and Grupe, S. 2005. *Chemical Research in Toxicology* **18**(4): p. 700-710.
 128. Harvey, R. G. 1996. *Polycyclic Aromatic Compounds* **9**(1-4): p. 1-23.
 129. Marlow, M. and Hurtubise, R. J. 2006. *Talanta* **69**(2): p. 443-449.
 130. Krahn, M. M., Moore, L. K., Bogar, R. G., Wigren, C. A., Chan, S.-L., and Brown, D. W. 1988. *Journal of Chromatography A* **437**: p. 161-175.
 131. Jacob, J. and Grimmer, G. 1988. *Review of Analytical Chemistry* **9**: p. 49-89.
 132. Evershed, R. P. 1993 *Advances in Silylation*, in *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Blau, K. and Halket, J., Editors John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK. p. 51-108.
 133. Day, B. W., Naylor, S., Gan, L. S., Sahali, Y., Nguyen, T. T., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. 1991. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **562**(1): p. 563-571.
 134. Hellou, J. and Payne, J. F. 1986. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology* **84**(2): p. 257-261.
 135. Stephensen, E., Adolfsson-Erici, M., Celander, M., Hulander, M., Parkkonen, J., Hegelund, T., Sturve, J., Hasselberg, L., Bengtsson, M., and Förlin, L. 2003. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* **22**(12): p. 2926-2931.
 136. Krahn, M. M., Ylitalo, G. M., Buzitis, J., Bolton, J. L., Wigren, C. A., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1993. *Marine Pollution Bulletin* **27**: p. 285-292.

137. Stroomberg, G. J., de Knecht, J. A., Ariese, F., Van Gestel, C. A. M., and Velhorst, N. H. 1999. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(10): p. 2217-2224.
138. Andreoli, R., Manini, P., Bergamaschi, E., Mutti, A., Franchini, I., and Niessen, W. M. A. 1999. *Journal of Chromatography A* **847**(1): p. 9-17.
139. Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A., and Guglielmetti, G. 2004. *Biodegradation* **15**(2): p. 79-85.
140. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1996. *Journal of Chromatography A* **731**(1-2): p. 75-84.
141. Grova, N., Rychen, G., Monteau, F., Le Bizec, B., and Feidt, C. 2006. *Agronomy for Sustainable Development* **26**(3): p. 195-199.
142. Baer-Dubowska, W. 1999. *Acta Biochimica Polonica* **46**(2): p. 263-274.
143. Schober, W., Luch, A., Soballa, V. J., Raab, G., Stegeman, J. J., Doehmer, J., Jacob, J., and Seidel, A. 2006. *Chemico-Biological Interactions* **161**(1): p. 37-48.
144. Walker, S. A., Whitten, L. B., Seals, G. B., Lee, W. E., Archibong, A. E., and Ramesh, A. 2006. *Food and Chemical Toxicology* **44**(3): p. 380-387.
145. Oehme, M., Berger, U., Brombacher, S., Kuhn, F., and Kolliker, S. 2002. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**(5): p. 322-331.
146. Sherma, J. 2005. *J. AOAC Int* **88**(3): p. 63-67.
147. Smith, C. J., Grainger, J., and Patterson, D. G. 1998. *Journal of Chromatography A* **803**(1): p. 241-247.
148. Kuijt, J., Garcia-Ruiz, C., Stroomberg, G. J., Marina, M. L., Ariese, F., Brinkman, U. A. T., and Gooijer, C. 2001. *Journal of Chromatography A* **907**(1-2): p. 291-299.
149. Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A., Toriba, A., and Hayakawa, K. 2000. *Analyst* **125**: p. 1555-1559.
150. Weeks, S., Gilles, S., Dobson, R., Senne, S., and D'Silva, A. P. 1990. *Analytical chemistry* **62**(14): p. 1472-1477.
151. Kozin, I. S., Gooijer, C., and Velthorst, N. H. 1996. *Analytica Chimica Acta* **333**(3): p. 193-204.
152. Koeber, R., Niessner, R., and Bayona, J. M. 1997. *Fresenius J Anal Chem* **359**: p. 267-273.
153. Wang, J. J., Frazer, D. G., Law, B., and Lewis, D. M. 2003. *Analyst* **128**(7): p. 864-870.
154. Mazéas O and Budzinski H. 2005. *Anal. Bioanal.Chem* **383**: p. 985-990.

Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric (UPLCTM-MS/MS) quantification of biliary polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) metabolites.

Marie Le Dû-Lacoste and H el ene Budzinski*

ISM-LPTC, UMR 5255 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 cours de la Lib eration, 33405 TALENCE, FRANCE

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Submitted to Waters (Application note)

Introduction

Many classes of chemicals are thought to be carcinogenic or genotoxic. Among these, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are one of the most significant priority pollutants based upon the amounts produced by combustion of biogenic and anthropogenic materials [1]. Absorbed PAH are efficiently metabolised in vertebrates by P450 enzymes and biotransformed into reactive intermediates which are bioaccumulated in bile before being excreted [2, 3]. Biliary metabolites analysis offers information about the actual exposure of organism to PAH compound and reveals the state and suitability of the environment [4, 5].

Widely reported methods involved semi-quantitative analysis and the screening of fluorescent aromatic compound equivalents (FAC) [4-9] by HPLC/F for which a limited degree of compound specificity is achieved. GC and LC separation coupled to a mass spectrometric detection (MS) were investigated [10-12] to achieve more sensitivity and specificity. But there is still a need to develop a straightforward method that can monitor exposure to different PAH at very low level with a strong sensitivity and specificity. Such a technique could examine PAH metabolites profiles to determine correlation between the PAH source and the resulting metabolites, changes in the source exposure and whether exposure reduction practices were effective.

This paper describes a sensitive, specific and reproducible UPLC-MS/MS methodology developed for the quantitative analysis of five OH-PAH metabolites (with chemical structures shown in Figure 1).

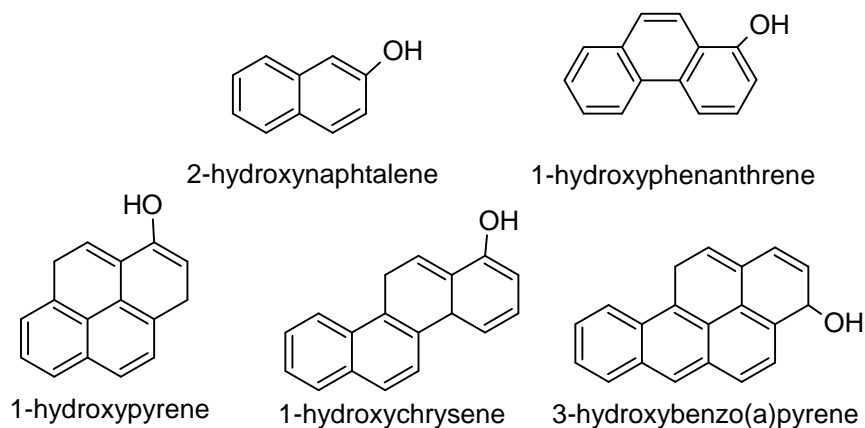


Figure 1: Chemical structures of OH-PAH analysed by UPLC-MS/MS

Experimental

Specimens

The method has been validated with controlled OH-PAH-free trout bile samples spiked with different concentration of OH-PAH. The samples were stored at -20°C until analysis.

Sample preparation

The weighted whole bile were thawed and then homogenized in precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid) (100 μl of bile: 2 ml buffer). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d₉, 20 μl of mercaptoethanol, used as antioxidant, and 20 μl of β -glucuronidase and arylsulfatase mixture were added to the samples. They were then placed at 37.5°C in an oven during 18 hours for hydrolysis. Glass vials were used for the deconjugaison step to avoid adsorption phenomena on inner surface.

After deconjugaison bile samples were ultrasonicated and centrifuged (10 min, 5,000 rpm, 20°C). Solid-phase STRATA X (200 mg, 3 cc) cartridges (Phenomenex, Le Pecq, France) were preconditioned with 2 ml methanol and 4 ml buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml buffered water and 2 ml water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v) before purification.

Solid-phase HF PSA Varian (500 mg, 3 cc) cartridges (Atlantic Labo, Eysines, France) were used for the purification step. Before loading the extracts redissolved in methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the cartridges were first preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. Extracts were finally reduced to dryness under a nitrogen stream and redissolved in 100 μl methanol. Finally the extracts were stored at -20°C until injection.

UPLC/MS/MS conditions

The Ultra Performance™ liquid chromatography (UPLC) was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ system (Milford, MA, USA), which was equipped with a binary solvent delivery manager, and a sample manager. MS was performed on a Waters Micromass®

Quattro Premier™ tandem quadrupole mass spectrometer (Manchester, UK) equipped with electrospray ionization (ESI) source. The LC/MS system control was by MassLynx™ 4.0 with QuanLynx™ Application Manager.

Chromatographic conditions

The UPLC separation was performed on a Waters ACQUITY BEH™ C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 mm x 150 mm) maintained at 30°C. A 0.2 μm precolumn filter (ACQUITY UPLC™ stainless steel in-line filter) was used to protect the analytical column. 10 μl sample, dissolved in acetonitrile, was injected for UPLC analysis. The mobile phase used was a mixture of acetonitrile (A) and Milli-Q water (B) with the following multi-step gradient: 0-2 min: 60/40 (A/B, v/v); 2-4 min: 60/40 (A/B, v/v) to 80/20 (A/B, v/v); 4-6 min: 80/20 (A/B, v/v) to 60/40 (A/B, v/v); 6-8 min: 60/40 (A/B, v/v) at a flow rate of 0.45 ml.min⁻¹. Total run time was 8 min per sample.

MS conditions

All MS optimization experiments were performed in MS scan mode and in product scan mode. All quantifications were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The cone voltage and collision energies for each of the MRM transitions were optimized by infusing the individual neat standard solution into the mass spectrometer at 2 μg.ml⁻¹. To ensure that the ionisation source parameters were compatible with the mobile phase flow during the tuning, a flow of 0.6 ml.min⁻¹ at 60% A was introduced into the mass spectrometer at the same time by using a PEEK T connector. MRM data collection during the chromatographic experiments were performed in both negative and positive mode with the capillary voltage fixed at 3.5 kV, the source temperature at 90°C, the desolvation temperature at 400°C, the desolvation gas flow at 1,000 l.h⁻¹, and the cone gas flow at 90 l.h⁻¹. Inter-scan delay for the polarity switching, inter-channel delay and dwell time for each MRM channel were set at 20, 5 and 50 ms, respectively. This allowed a sufficient cycle time to collect at least 15 data points per peak.

The MRM transitions for the analytes are presented in Table 1.

Table 1: The MRM transitions

Compounds	Mode	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Cone tension (V)	Collision Energy (eV)	Dwell time (ms)
2-OHN	ESI -	143	115	40	32	50
1-OHPhe	ESI -	193	165	50	30	50
1-OHP	ESI -	217	189	60	30	50
1-OHC	ESI -	243	215	60	32	50
3-OHBaP	ESI -	267	239	60	40	50

Method validation

Individual stock solutions in acetonitrile of hydroxylated metabolites (100 ng.μl⁻¹), and internal standard (50 ng.μl⁻¹) were prepared. The working standard solutions for linear calibration were prepared by mixing and diluting the individual stock solutions of metabolites and internal standard. The final concentrations of compounds in the working

solutions ranged from 1 pg. μl^{-1} to 8 ng. μl^{-1} (except to 3-OHBaP, from 2 pg. μl^{-1} to 13 ng. μl^{-1}). Both the stock and working solutions were stored at -20°C until use.

Quality control (QC) samples were prepared by adding standard solutions (100 μl) in blank bile sample. The sample was then extracted as described in 'Sample extraction' section below. Quality control (QC) samples prepared at five different concentrations (0.1, 1.0, 10, 1,000 and 3,000 pg. μl^{-1}) were used to assess accuracy, precision and matrix interferences.

Standard solutions were used for instrumental detection limits determination (IDL). Bile samples spiked before extraction were used for method detection limits determination (MDL). The limit of detection (LOD) corresponded to the concentration that gave a signal-to-noise ratio of 3:1.

The carryover experiments were performed with the following injection sequence: fish bile blank (three injections), standard solutions in fish bile with concentrations low to high, fish bile blank (three injections).

The calibration curves for metabolites were constructed by plotting measured peak ratios of analyte to IS against nominal OHPAH concentrations in bile using a $1/x$ weighted linear least-squares regression model. The minimally acceptable correlation coefficient (r^2) for the calibration curve was 0.99 or greater.

In order to assess the intra- and inter-batch precision and accuracy, QC samples at different concentrations were prepared as above. The intra-batch precision of the assay was assessed by calculating the RSD for the analysis of QC samples in six replicates, and inter-batch precision was determined by the analysis of QC samples in three batches. Accuracy was presented as the percent bias of the calculated concentration in comparison to the nominal concentration. The criteria for acceptability of precision was that RSD for each concentration level should not exceed $\pm 15\%$ with the exception of the low level, for which it should not exceed $\pm 20\%$. Similarly, for accuracy, the averaged value should be in the range of $\pm 15\%$ of the nominal concentration except for the lowest level ($\pm 20\%$).

Results

It is necessary to produce an intense ion signal that is characteristic for the target compounds. By using tandem mass spectrometry selectivity and sensitivity are increased by almost suppressing the noise level. Under the chromatographic conditions used, there was no interference with the analytes or the internal standard by any extractable endogenous materials present in bile. The parent and daughter ions of OH-PAH were chosen based upon criterion of specificity and abundance (Table 1). The MRM chromatogram of the mixture obtained by UPLC-MS/MS is shown in Figure 2.

The response for all compounds was linear in the studied range (Table 2). The correlation coefficient ranged between 0.9961 (2-OHN) and 0.9990 (1-OHPhe).

IDL and MDL were calculated for all compounds (Table 2). They ranged between 0.01 and 0.04 pg. μl^{-1} for IDL and between 0.02 and 0.1 pg. μl^{-1} of bile for MDL. The within-batch precisions were between 3 and 9 % RSD and the inter-day precisions were between 3 and 11 % RSD at all five concentrations (Table 3). The intra-day accuracy varied from 92 % and 104 % for all compounds at the five concentrations studied (Table 4).

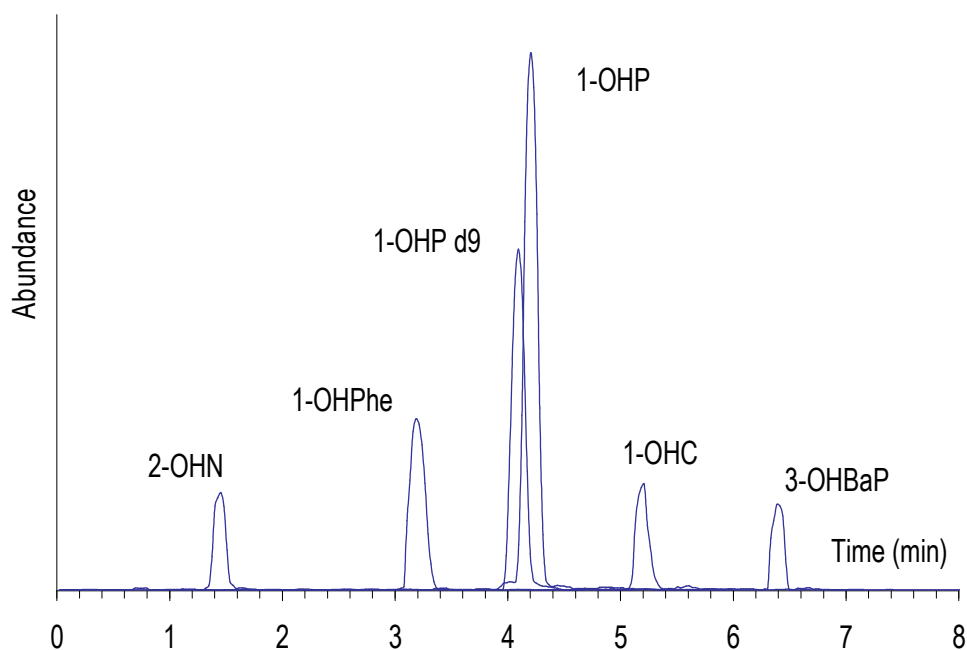


Figure 2: MRM chromatogram by UPLC-MS/MS

Table 2: Linearity and limit of detection of the methodology. IDL: instrumental limit of detection expressed in $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of solvent. MDL: methodological limit of detection expressed in $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile.

Compounds	Range of concentrations	Linearity	R ²	IDL ($\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	LOD ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile)
2-OHN	1 ng/g - 8 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 1,46x + 0,024$	0.9961	0.01	0.1
1-OHPhe	1 ng/g - 8 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 144,45x - 2,99$	0.9990	0.01	0.03
1-OHP	1 ng/g - 9 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 358,03x + 21,36$	0.9987	0.01	0.02
1-OHC	1 ng/g - 8 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 50,87x + 2,87$	0.9982	0.01	0.03
3-OHBaP	2ng/g - 13 $\mu\text{g}/\text{g}$	$y = 12,70x + 1,41$	0.9954	0.04	0.1

Table 3: Intra- and inter-precision data of OH-PAH at five different concentrations (expressed in $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile).

Compound	Intra-day precision (RSD %, n=6 injections)					Inter-day precision (RSD %, n=3 injections)				
	0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	3,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	3,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
2-OHN	9	8	6	6	8	9	8	6	6	9
1-OHPhe	4	7	5	4	5	7	7	5	4	6
1-OHP	4	6	5	3	3	8	6	6	3	5
1-OHC	6	6	7	6	5	9	10	7	6	7
3-OHBaP	7	8	7	9	7	11	10	8	8	10

Table 4: Accuracy data of OH-PAH at five different concentrations expressed in $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile (mean \pm SD).

Compound	Accuracy (RSD %, n=3 injections)				
	0.1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	3,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
2-OHN	101 \pm 10	97 \pm 7	100 \pm 7	96 \pm 5	101 \pm 10
1-OHPhe	94 \pm 9	95 \pm 9	96 \pm 3	94 \pm 4	96 \pm 6
1-OHP	97 \pm 7	104 \pm 2	99 \pm 4	98 \pm 3	100 \pm 5
1-OHC	93 \pm 6	94 \pm 7	92 \pm 7	92 \pm 8	96 \pm 7
3-OHBaP	95 \pm 8	101 \pm 7	98 \pm 5	98 \pm 8	97 \pm 7

Discussion

In the literature there are many publications that describe different methods to analyse PAH metabolites in bile. In a previous study we have developed a GC/MS methodology that can achieve limits of detection between 1 and 21 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile for the selected analytes [13]. Recently Zhu et al. [14] have developed a UPLC/MS methodology for PAH metabolites analysis in fish bile. Limits of detection obtained were closed to 10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile. In this paper the MDL obtained were between 10 and 50 times lower according to compounds, which shows the greater sensitivity of this UPLC method compared to traditional GC/MS. Besides, the use of UPLC-MS/MS technology in the MRM mode allows us to obtain better chromatograms which are cleaner and with less interference than those obtained with GC/MS. This is especially true for the largest OHPAH (1-OHC and 3-OHBaP).

Finally the rapidity of the analysis (less than 8 min) allows its use for routine analysis and for environmental survey analysis, in which numerous samples have to be rapidly analyzed.

Conclusion

This sensitive, specific and reproducible method developed is suitable for the detection and quantification of PAH metabolites in bile. As a tool for biomonitoring and risk assessment studies, PAH metabolites analysis has to be increasingly more sensitive because of ultra-trace concentrations of these compounds in organisms. The use of UPLC-MS/MS enhances the analytical performances of the method and the limits of detection at pg level appear suitable to extend the window of detection.

References

1. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human*. Vol 32. 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
2. Zhang, W., Xu, D., Zhuang, G., Ding, C., Wang, G., Chang, J., and Ren, G. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **131**(1-3): p. 387-394.
3. Ruchirawat, M., Settachan, D., Navasumrit, P., Tuntawiroon, J., and Autrup, H. 2007. *Toxicology Letters* **168**(3): p. 200-209.
4. Kammann, U. 2007. *Environmental Science and Pollution Research* **14**(2): p. 102-108.
5. Johnson, L. L., Ylitalo, G. M., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Stafford, C., Bolton, J. L., Buzitis, J., Anulacion, B. F., and Collier, T. K. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **124**(1-3): p. 167-194.
6. Yang, X. and Baumann, P. C. 2006. *Ecological Indicators* **6**(3): p. 567-574.
7. Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., and Schiedek, D. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 479-487.
8. Vuontisjärvi, H., Keinänen, M., Vuorinen, P. J., and Peltonen, K. 2004. *Polycycl. Aromat. Compd.* **24**: p. 333-342.
9. Aas, E., Beyer, J., and Goksoyr, A. 2000. *Biomarkers* **5**(1): p. 9-23.
10. Romanoff, L., Li, Z., Young, K., Blakely, N., Patterson Jr, D., and Sandau, C. 2006. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **835**(1-2): p. 47-54.
11. Luan, T. G., Yu, K. S. H., Zhong, Y., Zhou, H. W., Lan, C. Y., and Tam, N. F. Y. 2006. *Chemosphere* **65**(11): p. 2289-2296.
12. Jonsson, G., Taban, I. C., Jorgensen, K. B., and Sundt, R. C. 2004. *Chemosphere* **54**(8): p. 1085-1097.
13. Le Dû - Lacoste, M. and Budzinski, H. Submitted. *Anal Bioanal Chem.*
14. Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., and Willett, K. 2008. *Journal of chromatography B* **863**(1): p. 141-149.

Publication n°7**Bioavailability, biotransformation and genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in flat fish (*Scophthalmus maximus*): Experimental approach.**

M. Le Dû-Lacoste^a, F. Akcha^b, B. Morin^a, T. Burgeot^b, H. Budzinski^{a*}

^a ISM-LPTC, UMR 5255 CNRS - University Bordeaux I, Talence, FRANCE

^b DEL-PC, IFREMER, Nantes, FRANCE

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

In this study, laboratory experiments were carried out in order to have a better understanding of the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the marine environment and especially on their bioaccumulation, biotransformation and genotoxic effects in fish. Juveniles of turbot (*Scophthalmus maximus*) were exposed to PAHs by different ways, via a mixture of dissolved PAHs, the sediment and oil fuel elutriates. Fish were exposed during four days, followed by a six day-depuration period.

Despite the existence of differences in nature and quantity of metabolites produced, correlations were observed between the levels of biliary metabolites and the levels of exposure. Whatever the levels of exposure, a rapid production of metabolites was observed. This was especially true for 1-hydroxypyrene (1-OHP) that is the major metabolite of pyrene. These observations corroborate the assumption that the level of PAH metabolites in fish bile and in particular the level of 1-OHP can be used as an early biomarker of PAH exposure in fish, even at low level of contamination. To the opposite, no bioaccumulation was observed in fish tissues demonstrating the inadequacy of chemical characterization of parent PAHs in fish tissues for the assessment of PAH exposure.

Biological markers were also investigated. The analysis of DNA strand breaks showed a significant effect of both experimentation time and PAH exposure. Correlations between the levels of DNA lesions and PAH metabolites showed the importance of combined analysis of chemical and biochemical markers to correctly assess the contribution of chemical contamination to the measured biological responses.

Keywords: PAH metabolites, DNA strand breaks, fish, mesocosms

Submitted to Aquatic Toxicology

1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants of the environment [1] due to their stability and multiplicity of their sources. Pyrolytic processes represent the major source of PAHs into the environment; this includes anthropogenic sources (incomplete combustion of organic matter such as petroleum derivatives) [2, 3] and natural sources (forest fires) [4]. PAHs and alkylated PAHs are also naturally present in crude oils resulting from the diagenetic and catagenetic transformation of organic matter. PAHs belong to the list of priority pollutants established by the EPA (Environmental Protection Agency, USA) due to the mutagenicity and carcinogenicity of some of them.

The marine environment and aquatic systems in general appears to be a repository for PAHs by the way of terrestrial runoffs, atmospheric depositions and petroleum release [2]. Petroleum releases in the marine environment are mainly occurring in the case of oil tanker transportation (operational discharges at terminals, deliberate releases of oiled ballast water, wreckage), offshore petroleum exploitation, natural seeps [5]. Sediments in freshwater and marine harbours are also frequently contaminated with industrial releases, spilled fuel, street run-off, natural releases from creosote sources [2].

To assess the level of PAH contamination in organisms, the quantification of PAHs in the animal tissues is usually carried out. However, depending on the ability of the organisms to metabolise PAHs, measurement of the bioaccumulated part of the PAHs absorbed can be restrictive and not representative of the environmental contamination [6]. Moreover, PAHs can be extensively metabolised into more toxic molecules than the parent ones [7]. In this way, the study of PAH biotransformation in marine organisms appears to be necessary in order to access bioavailability and toxicity of those contaminants, more particularly towards fish. The biomarker approach is suggested as a suitable strategy for studying sublethal effects of pollutants, providing an early indication of possible adverse effects in the organisms [8]. Biochemical markers of exposure have been used extensively to evaluate biological effects in fish exposed to PAHs [9-13]. For this purpose, biliary metabolites of PAHs have been shown to be particularly efficient biomarkers of fish exposure to environmental PAHs [14]. Among biological markers of pollutant effects, genotoxic effects including strand breaks, DNA base modifications, cross-linkages, and depurination are associated with exposure to a wide number of genotoxic contaminants, including PAHs [14-24]. Genotoxicity is well studied in ecotoxicology due to its role in the initiation of chemical carcinogenesis and aging and its suspected link with the development of some pathologies including those related to the reproduction process [17, 25-31]. In order to have a better understanding of the bioavailability, the bioaccumulation and the biotransformation processes of PAHs in flatfish, several exposures of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) to PAHs in dissolved phase, petroleum products and naturally contaminated sediment have been carried out. PAH concentrations have been monitored in water and biological tissues. Biotransformation products of PAHs have been quantified in the bile. A second objective was to study the relationship between exposure of fish to PAHs, biotransformation activity as measured by the level of biliary PAH metabolites and the induced genotoxic effects in terms of DNA strand breakage. This work should lead to a better assessment of fish exposure to PAH and to establish links between exposure and biological effects such as DNA alterations.

2 Material and Methods

2.1 Chemical, solvents and reagents

Hydroxylated PAHs, 1-hydroxynaphthalene (1-OHN) and 2-hydroxynaphthalene (2-OHN) were purchased from Lancaster (Bischeim, France); 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and 9-hydroxyphenanthrene (9-OHPhe), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d9 (1-OHPd9) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Ste Foy La Grande, France). Concerning parent PAHs, the standard reference SRM 2260, constituted of about 20 aromatic compounds, was provided by the U.S. National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg MD, USA) and perdeuterated aromatic compounds by MSD Isotopes (Montreal, Canada). All the standards and solvents used were of analytical grade (> 98%). Dichloromethane was provided by Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Methanol Supersolv was provided by Merck and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) was obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) and β -glucuronidase-aryl-sulfatase mixture from Helix pomatia (100,000 and 7,500 units/ml respectively) were provided by Sigma Aldrich (St Quentin Falavier, France). 2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Two solid-phase extraction (SPE) cartridges were used: the Strata-X cartridge (3 cc, 200 mg) from Phenomenex (Le Pecq, France) and the HF Bond Elut-PSA cartridge (3 cc, 500 mg) from Varian and provided by Atlantic Labo (Eysines, France). Aluminium oxide (150 basic type T; 0.063-0.2 mm) and silica gel (0.063-0.2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

RPMI 1640 medium, dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.4% trypan-blue solution, ethidium bromide (BET), foetal bovine serum (SVF), normal and low melting point agarose, N-sarcosinate, Triton X-100, were purchased from Sigma Aldrich Chemicals.

2.2 Fish

Juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) were purchased from a fish farm (France Turbot, Groupe Adrien, Noirmoutier Island, France). They were housed in fish tanks filled with seawater (salinity at 30 ‰) at 16°C and acclimated for a minimum of 25 days. The light regime was also controlled and was set at 6 hours light per day (from 8h to 14h). Fish were not fed during the acclimation period and during the experiments. The mean weight and size were 101 ± 1 g and 152 ± 4 mm (n=255 fishes) at the beginning of the experiment.

2.3 Exposure design and sample collection

After acclimation, 30 fishes were placed in 100 litres fish tankers. A control group was only exposed to solvent (Ethanol) used in the preparation of mixture of dissolved PAHs. Three groups of fishes were exposed respectively to a mixture of dissolved PAHs, a natural sediment from the Arcachon harbour (France) and a petrol elutriate prepared from oil fuel ERIKA #2. Dissolved PAH mixture was prepared with seven PAH compounds (gravimetrically weighted) and dissolved in ethanol. The raw solution of PAH mix was then diluted in seawater and distributed in fish tank. The elutriate solution was prepared from oil fuel #2 (gravimetrically weighted), firstly dissolved in acetone and then diluted in seawater. This final diluted solution called petrol elutriate was distributed in fish tank. For both condition, solution was distributed in fish tankers by a peristaltic pumps (Pump Analog Reglo® 4/8 from ISMATEC, Fisher Bioblock, France) at flow rates of 1 ml/min for dissolved

PAHs and 0.8 ml.min⁻¹ fro petrol elutriate. The PAH solutions and the sediment used for experimentation were previously characterized and analyzed by GC-MS (according to protocols exposed in section 2.4.) in order to determine the level of exposure in each fish tank (Table 1). During 4 days, fishes were exposed to PAHs and sacrificed each day (Days 0, 1, 2, 3 and 4). In parallel, water samplings in each tanker were done to control the level of exposure of each group. After 4 days, fishes were placed in clean water for 6 days of depuration. At day 10, the four groups of fishes were sampled to assess the depuration ability of fishes. At each sampling time and for each exposure group, 10 fishes were sacrificed. Blood (for comet assay) and bile (for PAH metabolites determination), were sampled individually. The bile was stored at -80°C. The blood was withdrawn in a freezing medium and stored at -80°C as previously described [32]. The muscle and the liver samples (for PAH body burden measurement) were pooled (n = 10) and stored at -20°C until analysis.

Table 1: PAH concentrations in natural sediment (mg.kg⁻¹ dw), oil fuel solution (µg.g⁻¹) and dissolved PAH mixture (µg.l⁻¹)

Compounds	PAH concentrations in natural sediment (mg.kg ⁻¹ dw)	PAH concentrations in the oil fuel #2 ERIKA (µg.g ⁻¹)	PAH concentrations in dissolved PAH solution (µg.l ⁻¹)
Naphtalene	0.002	nd	10.6
Anthracene	0.096	90	10.2
Phenanthrene	0.018	614	7.5
Fluoranthene	0.362	46	15.3
Pyrene	0.281	218	3.3
Chrysene	0.201	324	15.5
Benzo[a]pyrene	0.190	96	5.2
Total PAH	2.561	1388	67.5

2.4 *PAH analysis*

Heavy fuel oil was analyzed according to the protocol described by Mazéas and Budzinski [33]. For this purpose, fuel oil was first dissolved in methylene chloride. For the determination of PAHs in the aqueous phase, water was first passed through a 0.7 µm GFF filter (VWR, Strasbourg, France) to separate dissolved PAHs from PAHs adsorbed on particulate matter. Dissolved PAHs were extracted by passing water samples through an octadecyl speedisk (Baker, Atlantic Labo, Eysines, France) on which PAHs are retained. Analytes were then recovered by successive elution with methylene chloride and methylene chloride/ethyle acetate (1:1, v/v). Water traces were then removed by passing the extract through sodium sulphate. PAHs were extracted from freeze-dried and grounded solid matrices (sediment, liver, muscle) by micro-wave assisted extraction (10 min, 30 W) with methylene chloride followed by filtration on clean glass cotton [34]. Several perdeuterated PAHs used as internal standards were added to the samples prior to the extraction step for PAH quantification [35].

Extracts of the different matrices were then purified on aluminium oxide (Al₂O₃) and silica (SiO₂) columns [33, 36] and analysed by GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry). Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1 min); purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C; interface temperature: 280°C; oven temperature:

from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at 2°C/min) coupled to an HP MSD 5973 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s (Dwell time: 50 ms for each ion) using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity [35]. The response factors of PAHs relatively to perdeuterated PAHs were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAH (SRM 2260, National Institute of Science and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the solution of perdeuterated PAHs used for spiking samples. The monitored PAHs are, in ascending order of molecular weight, naphthalene* (N), acenaphthylene* (Ay), acenaphthene* (Ae), fluorene* (Fe), phenanthrene* (Phe), anthracene* (Ant), fluoranthene* (F), pyrene* (P), benz(a)anthracene* (BaA), chrysene*+triphenylene (C+T), benzo(b)fluoranthene* + benzo(j)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene* (BbF+BjF+BkF=BF), benzo(a)pyrene* (BaP), indeno(1,2,3-cd)pyrene* (IP), benzo(g,h,i)perylene* (BPer) and dibenz(a,h)anthracene*+ dibenz(a,c)anthracene (DB(ah)A+DB(ac)A=DBA). Compounds marked with a '*' are the 16 PAHs of the US-EPA. In this study, the sum of those compounds is referred as 19 PAHs because of the coelution of three other PAHs by GC-MS.

2.5 PAH metabolites analysis

Bile samples were prepared according to the protocol described by Le Dû-Lacoste and Budzinski [37].

The weighted whole bile were thawed and then homogenized in precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid) (100 µl of bile: 2 ml buffer). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d9, 20 µl of mercaptoethanol, used as an antioxidant, and 20 µl of β-glucuronidase and arylsulfatase mixture were added to the samples. They were then placed at 37°C in an oven during 18 hours for hydrolysis. After deconjugation, bile samples were ultrasonicated and centrifuged (10 min, 5,000 rpm, 20°C). Solid-phase Strata X cartridges were preconditioned with 2 ml methanol and 4 ml buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml buffered water and 2 ml water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v) before purification made on solid-phase HF PSA Varian cartridges. Before loading the extracts redissolved in methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the purification cartridges were first preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. Extracts were reduced to dryness under a nitrogen stream, redissolved in 50 µl dichloromethane and 30 µl of a derivatizing agent (BSTFA) were finally added. The derivatization was then completed by incubation at 65°C during 30 min. After derivatization and before GC-MS analysis, a solution of deuterated internal standard (pyrene-d10, 20 µl) was added to the sample for recovery determination.

The analyses were carried out with an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies, both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). The separation was performed on an Agilent Technologies HP5-MS capillary column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethyl-siloxane), with the following oven parameters: from 70°C (2 min) to 180 °C (1 min) at

5°C/min from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min. The injection volume was set at 1 µl (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min)), while the injector temperature was set at 250°C and the interface temperature at 280°C. The purge flow was set at 60 ml/min during 1.5 min and helium 6.0 (Linde, Bassens, France) was used as the carrier gas (constant flow: 1 ml/min). Acquisition was performed in selected ion monitoring (SIM), with 1.53 scan/s and a dwell time of 50 ms for each ion. The source temperature was set at 150°C, and the electron multiplier voltage set at 2,000 V. The compounds were quantified in SIM mode using the ions below: 1-hydroxynaphtalene (m/z=201), 2-hydroxynaphtalene (m/z=216), 2-hydroxybiphenyl (m/z=211), 9-hydroxyfluorene (m/z=165), 9-hydroxyphenanthrene and isomers (m/z=266), 1-hydroxypyrene (m/z=290), 1-hydroxychrysene (m/z=316) 3-hydroxybenzo(a)pyrene (m/z=340) and 1-hydroxypyrene-d9 (m/z=299), pyrene-d10 (m/z=212). A mixture of the standard metabolites, 1-hydroxypyrene-d9, and pyrene-d10 in dichloromethane was injected, after derivatization, at the beginning and at the end of each sequence for the determination of response factors.

2.6 Comet assay

Blood samples were slowly defrosted at ambient temperature and diluted in PBS buffer before analysis. The comet assay was performed as previously described in [32]. In order to obtain permanent preparations, the slides (two slides per sample) were immersed for 10 min in absolute ethanol for deshydrating, and allowed to dry at room temperature. Just before analysis, 75 µL of BET at 20 µg/ml were deposited on the slide and spread over it using a cover glass. Slides were placed for at least 30 min at 4°C for coloration. Slides were analysed using an optical fluorescence microscope (Olympus BX60, x 40) fitted to a CDD camera (Olympus) and an image analysis system (Komet 4, Kinetic Imaging Ltd). Several parameters were calculated for each observed cell (75 cells/slide), including the percentage of DNA present in the comet tail.

2.7 Statistical analysis

Data normality was tested with a Shapiro-Wilk test. To normalize the distribution raw comet data were mathematically transformed. Transformed data as well as chemical data were analysed by Analysis of Variances (ANOVA) using Statistica 6.0 software (Statsoft, France). When a significant effect was observed, significant differences among means were determined using Tukey's comparison test. Pearson correlations between markers were calculated. All tests were regarded as statistically significant when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Bioavailability: PAHs dissolved in water

The concentration of dissolved PAHs showed different patterns depending on the mode of PAH exposure. During the exposure period, total PAH concentrations varied from 21 to 388 ng.l⁻¹, 204 to 538 ng.l⁻¹, 6,602 to 69,285 ng.l⁻¹ and from 368 to 116,244 ng.l⁻¹ for control tank, sediment exposure, petrol elutriate exposure and dissolved PAHs exposure, respectively (Figure 1). The distribution of individual PAH is presented for each way of exposure in Figure 2.

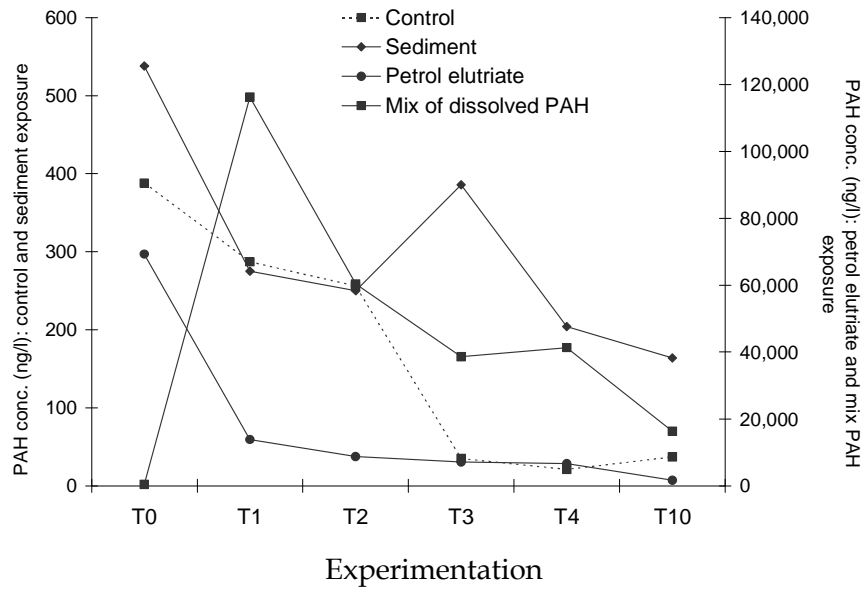


Figure 1: Total concentrations of dissolved PAHs (ng.l⁻¹ of water) for the different fish tanks.

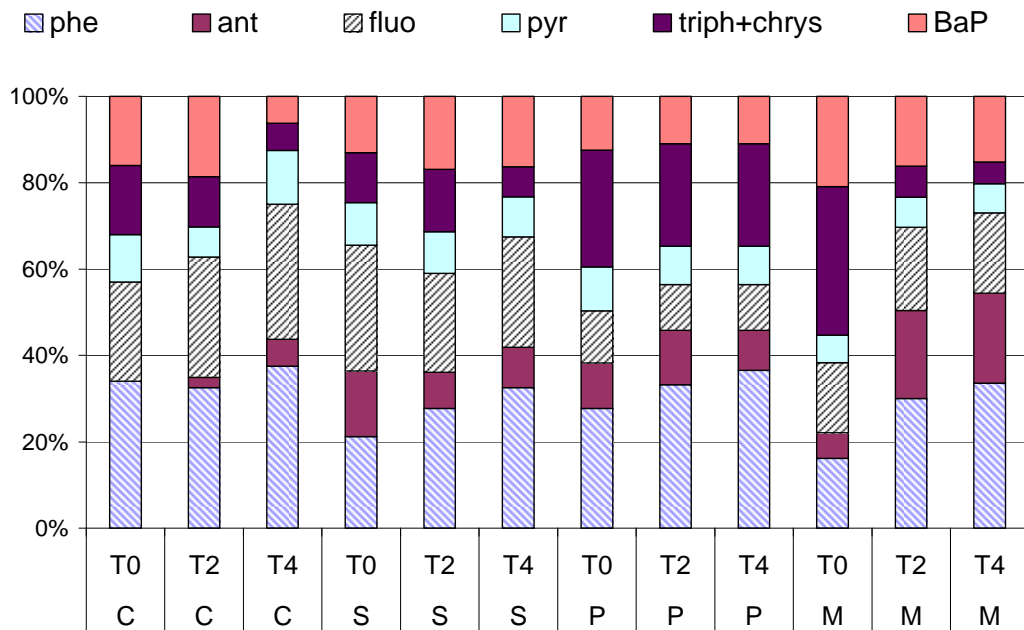


Figure 2: Distribution (%) of selected individual PAH in the dissolved phase of the control and exposure fish tankers during the exposure period (T0, T2 and T4). C: control fish; S: sediment exposure; P: petrol elutriates exposure; M: mix of dissolved PAH exposure.

3.2 *Bioaccumulation: PAHs in muscle and liver*

PAH Concentrations were measured in the white muscles and the liver of turbot (Figure 3). A statistical analysis (ANOVA) of the whole results showed the significant effect of the way of exposure ($p < 0.01$ and 0.05 for muscle and liver, respectively). PAH concentrations were higher in the muscles and the liver of fishes exposed to the mix of dissolved PAHs rather than in fishes exposed to sediment and elutriate. No effect of the time of exposure was observed. PAH concentrations in white muscles ranged from 30 to 52 ng.g^{-1} dry weight, 33 to 310 ng.g^{-1} dry weight, 38 to 432 ng.g^{-1} dry weight and from 45 to 12,682 ng.g^{-1} dry weight for control, sediment, petrol elutriate and dissolved PAH exposure, respectively. Concerning the PAH concentrations in the liver, values ranged from 80 to 260 ng.g^{-1} dry weight, 104 to 437 ng.g^{-1} dry weight, 152 to 1,828 ng.g^{-1} dry weight and from 153 to 26,679 ng.g^{-1} dry weight for control, sediment, petrol elutriate and dissolved PAH exposure, respectively. These PAH concentrations in body burden were relatively high. This can be explained by the high concentrations of PAHs measured in the dissolved phase of the tanks exposed to the high exposure levels designed for elutriate and PAH mixture exposure.

Bioconcentration factors (BCF) can be calculated in muscle and liver for each PAHs and each mode of contamination. BCF value represents the relationship between the concentration measured in fish and that measured in water and it is expressed in l.g^{-1} . BCF in muscle and liver are summarized in Table 2.

3.3 *Biotransformation: PAH metabolites in bile*

In this study, only the total sum of metabolites and of some major metabolites such as pyrene (1-OHP), the metabolites of phenanthrene (OHPhe) and those of benzo(a)pyrene (OHBaP) were considered. Following exposure to the dissolved mixture of PAHs, it was noticed an increase in the total metabolite concentrations during the exposure phase ($p < 0.01$) and a decrease during the depuration phase ($p < 0.001$). At the end of the depuration time the decrease in PAH metabolites corresponded to 51% of the maximum concentration in metabolites obtained at the end of exposure time. However, differences in kinetics were observed between compounds. Two cases were distinguished. In the first one, the molecule was quickly biotransformed and excreted in the bile during the exposure period and was eliminated during the depuration period in an almost linear way ($R^2 = 0.93$). This was particularly true for the 1-OHP of which the concentration varied from 179 $\mu\text{g.g}^{-1}$ to 79 $\mu\text{g.g}^{-1}$ between T4 and T10 in depuration, corresponding to a reduction of 56%. In the second case, the rate of biotransformation in the liver and excretion in the bile was slower during the first two days of exposure before increasing between T2 and T4. This phenomenon was particularly visible for the 3-OHBaP like for isomers of phenanthrene. During the depuration time BaP and Phe metabolites concentrations exhibited differences in the decrease. The reduction in concentrations corresponded to 31% and 64% for OHPhe and OHBaP metabolites, respectively.

Concerning the sediment exposure, the production of biliary metabolites was slower since it was necessary to wait the third day of contamination to have a significant production of metabolites in the bile, whatever the studied metabolites. A strong increase in the concentrations was then observed at the last day of exposure. The 'time' effect was found to be highly significant ($p < 0.001$). These trends were different from those obtained for organisms exposed to the mixture of dissolved PAHs. Considering 1-OHP metabolite, excretion in the bile was slower than during PAH mixture exposure T0 and T3 (48 ng.g^{-1} and 503 ng.g^{-1}) and then increased rapidly between T3 and T4, passing from 503 ng.g^{-1} to more than 5 $\mu\text{g.g}^{-1}$. During the depuration time, a decrease in 1-OHP concentrations was observed (22%) but in a less extent than in the case of exposure to dissolved PAHs.

In the case of the exposure to elutriate of heavy fuel n°2 ERIKA, A significant effect of the factor 'experimental time' ($p < 0.001$) was observed for all the metabolites. In a general way, the quantity of metabolites produced was higher than during the sediment exposure but lower than that obtained following exposure to the dissolved mixture of PAHs. Concerning the 1-OHP, a linear increase in the concentration was observed between T0 and T2 ($R^2 = 0.99$) and T2 and T10 ($R^2 = 0.99$). No decrease in biliary metabolite concentration appeared during the depuration phase. Figure 4 presents the results obtained for control fishes (A), for sediment exposure (B), for petrol elutriate exposure (C) and for PAH mixture exposure (D).

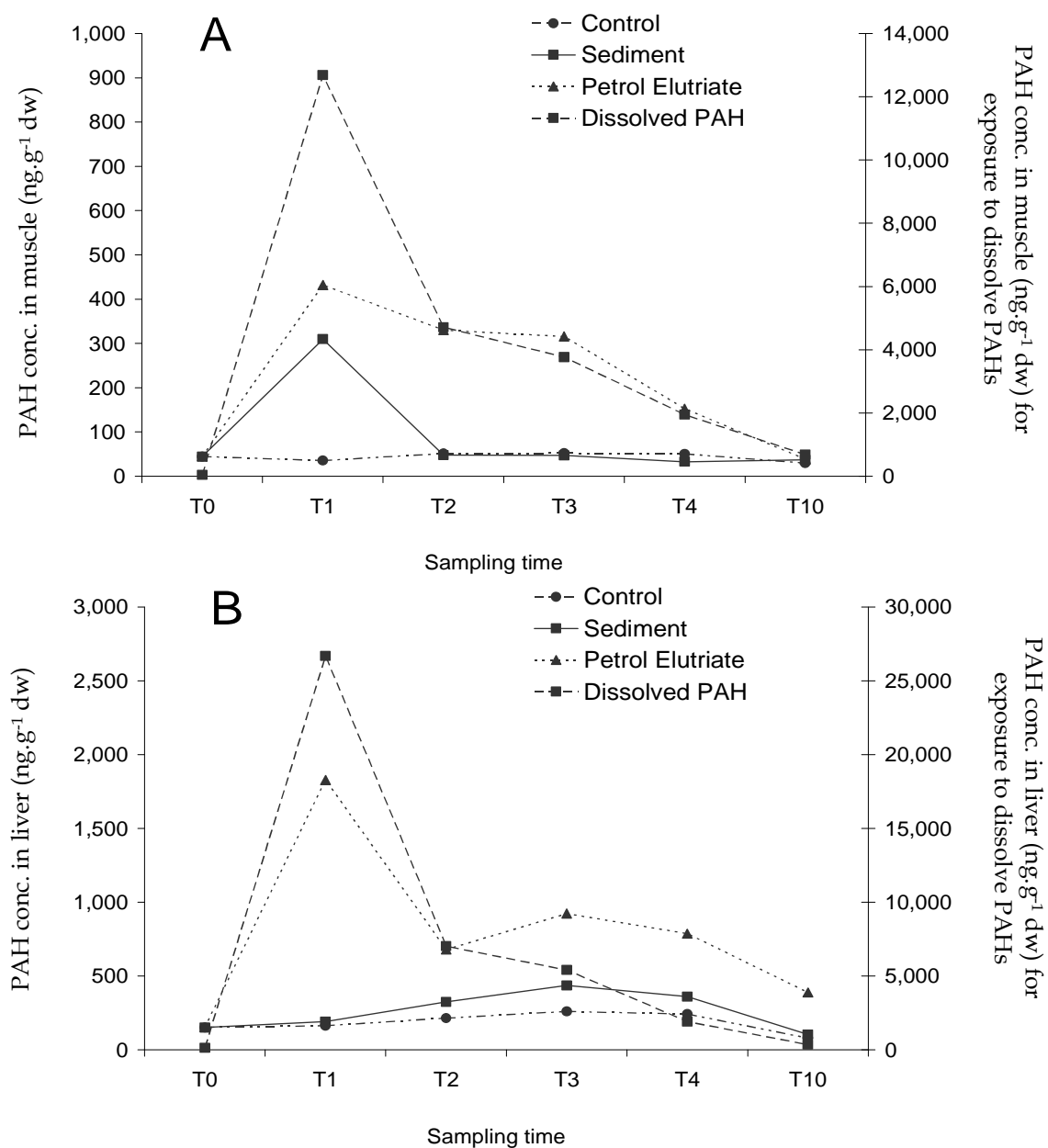


Figure 3: PAHs in muscles (A) and liver (B) expressed in ng.g^{-1} dry weight, for the control and exposed fish tank.

Table 2: Bioconcentration factors (BCF) of PAHs calculated in muscle and liver expressed in L.g⁻¹.

Exposure Time (day)	T1	T2	T4	T1	T2	T4	T1	T2	T4	
Mode of PAH exposure	Sediment	Sediment	Sediment	Petrol elutriate	Petrol elutriate	Petrol elutriate	PAH mixture	PAH mixture	PAH mixture	
Muscle	Phenanthrene	1.93	0.79	1.17	0.05	0.08	0.05	0.38	0.34	0.11
	Anthracene	7.35	0.58	0.74	0.06	0.08	0.04	0.29	0.35	0.11
	Fluoranthene	1.07	0.39	0.37	0.08	0.05	0.01	0.39	0.15	0.09
	Pyrene	0.74	0.93	0.93	0.03	0.01	0.01	0.13	0.05	0.22
Liver	Phenanthrene	1.38	9.11	16.62	0.28	0.16	0.23	1.12	0.47	0.16
	Anthracene	5.95	5.45	10.61	0.27	0.06	0.22	0.72	0.32	0.05
	Fluoranthene	0.36	1.33	2.55	0.22	0.10	0.09	0.49	0.49	0.12
	Pyrene	0.33	0.46	1.03	0.07	0.02	0.05	0.13	0.09	0.02

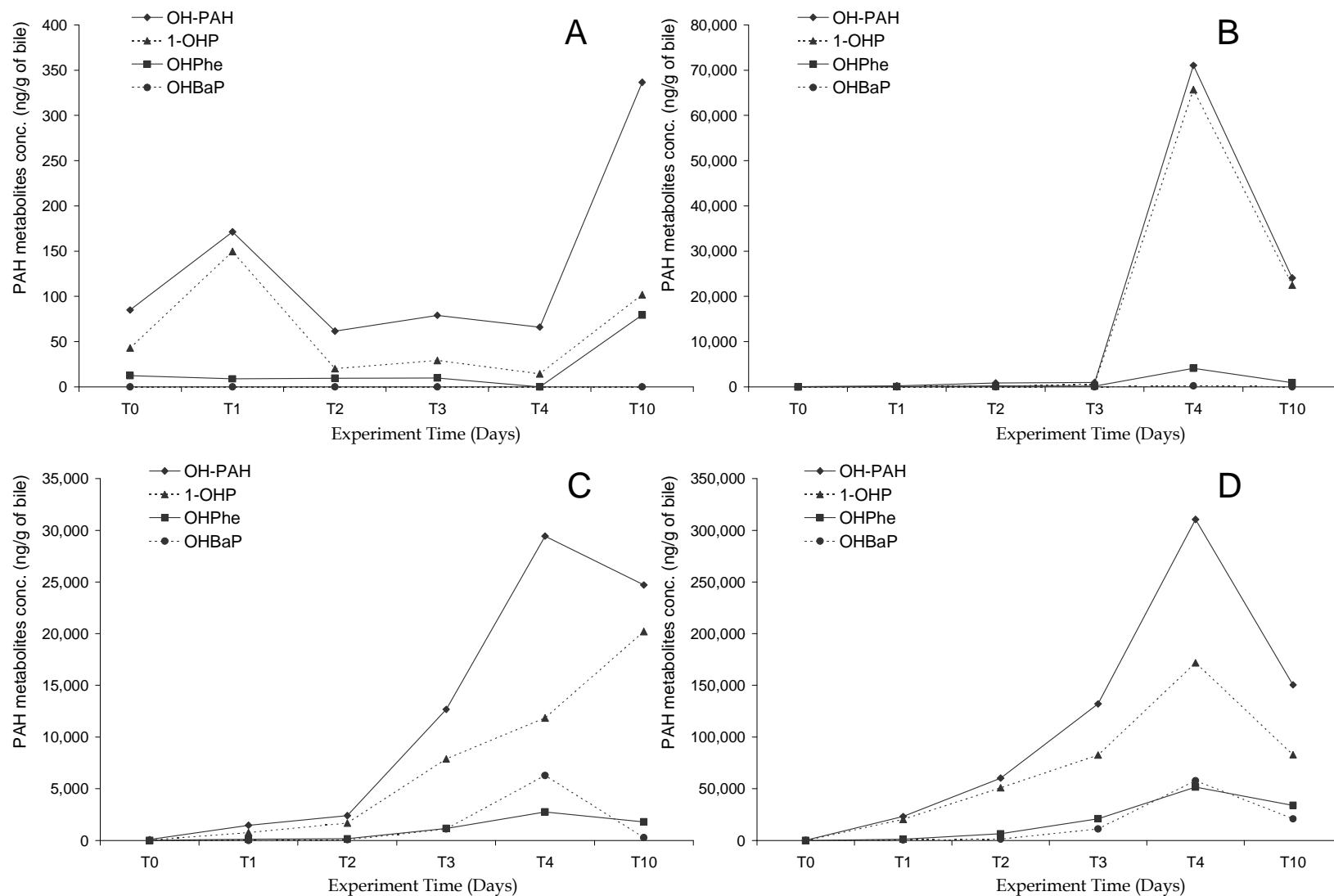


Figure 4: PAH metabolite concentrations in fish bile expressed in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile. A: Control fish; B: Sediment exposure; C: Petrol elutriate exposure; D: Dissolved PAH mixture exposure.

3.4 *DNA Strand breaks: the Comet Assay*

For the control group, the results of an ANOVA showed an inter-individual variability in the extent of DNA damage in fish ($p < 0.001$). However, comet parameters appeared to be stable during the experimental period, validating our experimental conditions for fish maintenance at the laboratory.

In a second step, the data obtained for the control and the PAH-exposed groups were subjected to a main effects ANOVA analysis (factors: 'individual', 'treatment', 'experimental time'). Results obtained showed significant effects of experimental time and treatment on the extent of DNA strand breaks ($p < 0.001$). For the all set of data analyzed, a general increase in DNA damage was observed 4 days after the beginning of the experiment. Whatever the mode of exposure (petrol, sediment, dissolved phase), a higher level of DNA damage was measured in fish exposed to PAHs with comparison with the control group (Tukey test, $p < 0.001$, Figure 5). No difference in the extent of the genotoxic response was observed with the mode of PAH contamination ($p > 0.05$).

The effect of the depuration period was studied by t-test comparisons for each PAH exposed-group. For fish exposed to the contaminated sediment, a non-significant decrease in comet parameter was observed following depuration ($p = 0.09$). Decrease was significant for the fish exposed via the dissolved phase ($p < 0.001$) (Figure 6A). For fish exposed to the petrol, the level of DNA damage was still increasing during the depuration phase ($p < 0.001$) (Figure 6B).

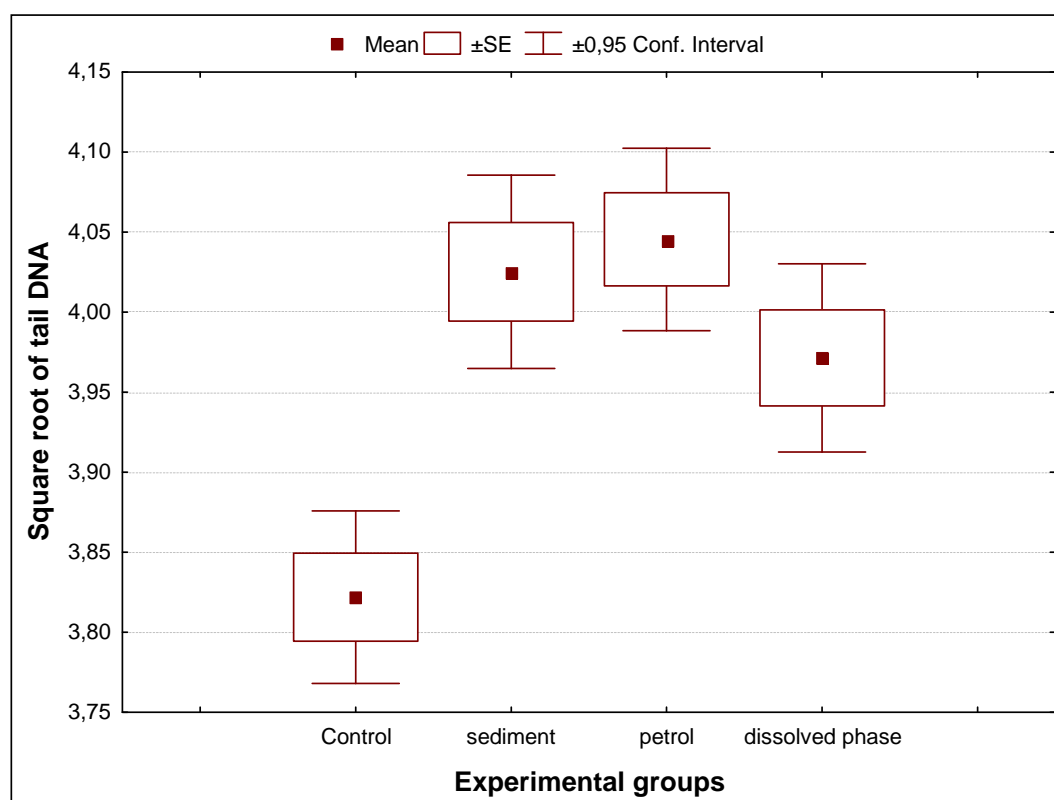


Figure 5: Effects of PAH exposure and mode of PAH exposure on the extent of DNA damage of fish erythrocytes.

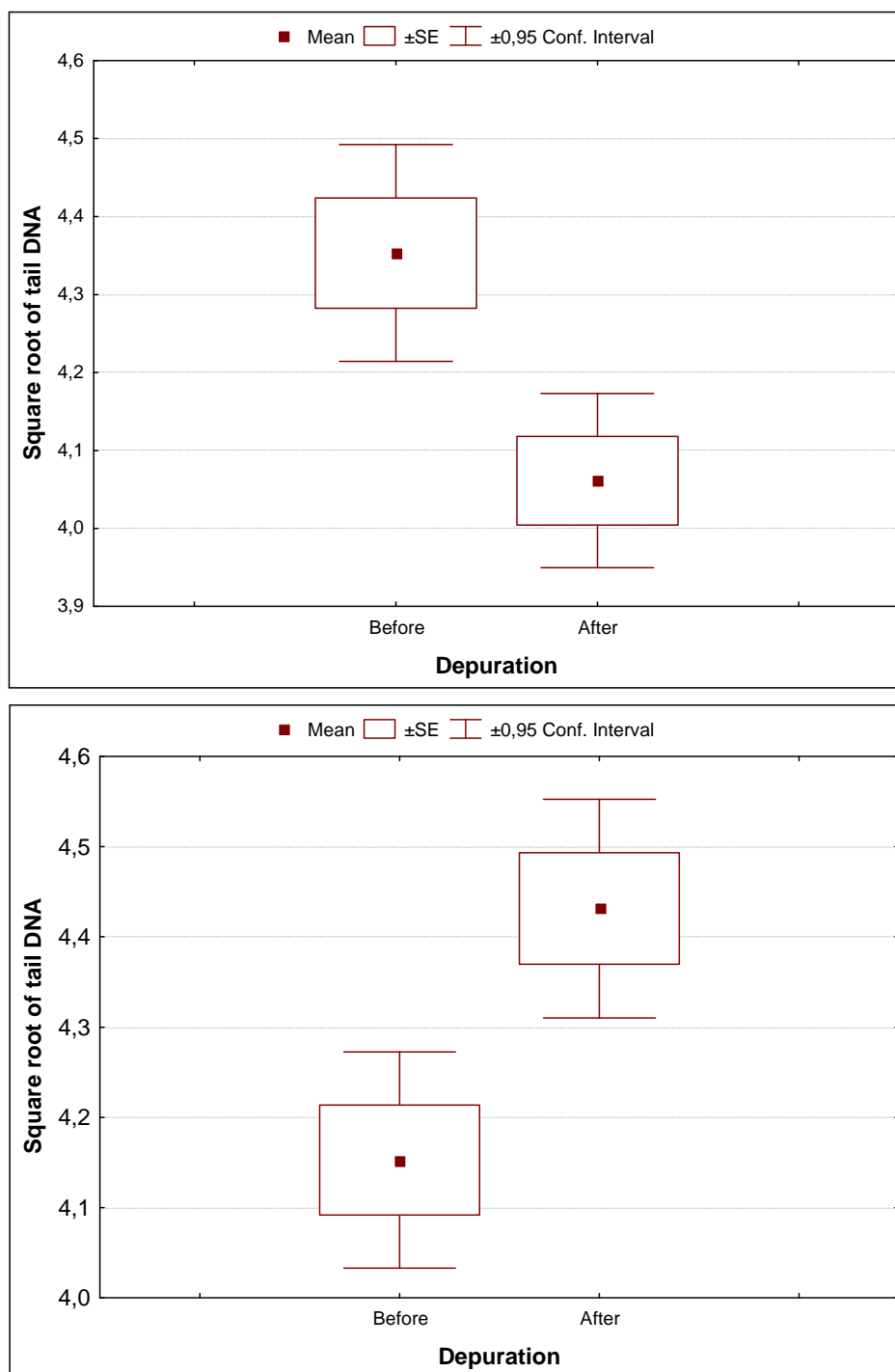


Figure 6: Effect of depuration on the level of DNA strand breaks of fish exposed to a mixture of dissolved PAHs (A: upper graph) or to the petrol elutriate (B: lower graph).

3.5 Statistical correlations between biomarkers

A statistical analysis was performed taking into account all the data collected whatever the mode of PAH contamination (Table 3). Significant positive correlations were demonstrated between the level of DNA damage as measured by the comet assay and the level of different individual metabolites.

Table 3: Correlations observed between DNA damage and PAH metabolites in fish bile (Spearman correlations, *p < 0.05, n = 80)

Biomarkers	1-OHP	3-OHBaP	OHPhe	OHHAP
%Tail DNA	0.286*	0.250*	0.365*	0.325*

4 Discussion

4.1 Bioavailability and Bioaccumulation

The focus of the present study was to investigate sublethal effects of PAHs on juvenile turbot, emphasising the influence of the route of exposure and the biological effects induced in terms of genotoxicity.

As shown in Figures 1 and 2, the distribution of PAHs in the dissolved phase made it possible to highlight various behaviours of individual PAHs in the dissolved phase. In the experimental design, contents of nominal PAHs in the medium were targeted. The measurement of the water concentrations of PAHs showed they were certainly not constant in the dissolved phase. Targeted values of PAHs were not reached during the experiment. This justified the necessity of chemical analysis to measure the exact level of PAH exposure. It thus made it possible to define the real experimental conditions and to prove the feasibility of the experimental installation. The lowest effective concentrations were thus representative of the environmental concentrations. The bioavailability of PAHs in fish is a complex phenomenon involving different factors such as the percentage and the composition of the organic matter in the dissolved phase and the shape of the particles [38-40]. This is particularly true in the case of sediment exposure. Some works showed the importance of the particle size for the distribution of PAHs in the sediment [41, 42]. Thus the dissolved concentrations measured in the aquariums were different to the bioavailable PAH amount for the organism. In this study, each method of contamination reflected a particular PAHs distribution. In order to understand and to interpret the various processes of bioaccumulation and biotransformation in fish, it was necessary to consider the differences in PAHs bioavailability according to the ways of contamination. For elutriate exposure, phenanthrene and chrysene were the major compounds, according to the petrogenic origin of the PAH source. For the sedimentary exposure, fluoranthene and phenanthrene were predominant, which was a characteristic profile of sediments contaminated by PAHs.

Despite different PAH concentrations were reached in the dissolved phase during the sediment exposure and the petrol elutriate exposure, the PAH concentrations in turbot muscle and liver were similar. This observation corroborated the fact that bioavailability of PAHs differs according to the way of contamination. The absorption of PAHs dissolved in water by fish could be regarded as a simple partition between the water and the lipids [43]. Thus, PAHs of higher molecular weight and hydrophobic should be more easily bioavailable for absorption. However, physical constraints can occur by increasing the complexity of the

molecular structure and the volume occupied by the molecules. This could lead to a passive transfer through the lipidic membrane [43, 44]. Indeed contents of particulate (MOP) and dissolved (MOD) organic matter in water are very important factors which significantly deteriorate the absorption of PAH [40]. An increase in the values of MOP and MOD reduces the bioavailability of PAHs, affecting first the molecules of higher molecular weight followed by those of weaker molecular weight, more water-soluble [40]. In the case of sediment contamination, the nature and the size of sediment particles are governing factors of PAH bioavailability and thus of PAH bioaccumulation in tissues. It is the same for the exposure to petrol elutriate. At the end of the exposure period (T4), PAH concentrations in muscles are similar for the sediment and for the petrol elutriate mode of exposure. For the organisms exposed to the mixture of dissolved PAHs, these concentrations are a little higher due to the largest amounts of PAHs dissolved in the aquariums during the exposure. In a general way, concentration of PAHs in muscles decreased during the phase of exposure, whatever the mode of contamination and the level of dissolved PAHs in water. Therefore, the metabolic capacity to regulate in the organism seems to be never exceeded in this experiment. At the end of the period of depuration (T10), PAH concentrations are similar whatever the mode of contamination. In muscle, they returned at the basic level measured in the control fishes. In the liver, they remained at a higher level than control fishes even if they dramatically decreased during the depuration period. No significant bioaccumulation was observed in muscles and in liver. The elimination of PAH by organism is thus a combination of passive diffusion and enzymatic transformations, followed by an excretion. This is why, the measurement of PAH body burden, defined as the internal and time-dependent exposure concentration of a contaminant in organism, is the result of a dynamic and complex balance between phenomena of assimilation and elimination [43].

When considering BCF values, BCF calculated in muscle exhibited lower values than those for liver. This is due to the higher lipid contents in liver than in muscle. Nevertheless, trends observed for muscle BCF were the same than those observed for liver BCF. BCF values were the highest following sediment contamination. BCF values for petrol elutriates exposure were the lowest and did not vary during the exposure. These results seemed to indicate that PAHs introduced via the sediment were better bioaccumulated. In fish, dissolved phase is the major source of exposure for low lipophilic compounds ($\log K_{ow} < 5$) whereas the particles of the sediment, just as food, can contribute in a substantial way to the bioaccumulation process of compounds with high $\log K_{ow}$ (> 5) [45]. For these turbot which were not fed during the experimentation, the bioaccumulation is mainly due to respiratory exchanges [46, 47]. Nevertheless, it is necessary to take into account the way of BCF calculation to interpret these results. Indeed, the PAH measurement in the dissolved phase does not correspond completely to the quantity of bioavailable PAHs for the organism. In the case of the exposure to the petrol elutriate, small hydrocarbon pellets floated on the surface and in the water column. PAHs present in these pellets were not taken into account for the determination of the PAH concentration in the dissolved phase. Absorption by oral or dermal way in fish are however possible and can contribute to the BCF. Moreover, in the case of the petrol elutriate, it is not right to consider only PAH compounds. The heavy fuel, which composes this solution, is a complex mixture of saturated and unsaturated hydrocarbons. The alkenes are present in great quantity and their presence influences the physicochemical properties of the other molecules. Thus, the oil alkenes can have a role in the capacity of PAHs to cross lipid membranes of fish and thus can influence their absorption.

4.2 Biotransformation: PAH metabolites in bile

The level of PAH metabolites in the bile is depending on the level of PAH exposure but also on the flow rate of bile through gall bladder. The regulation of this flow is mainly due to the

feeding status of the organism since bile constituted an excretion way of the digestion process [48]. Because the animals were not fed during the experiment, the experiment conditions were different from that of the natural environment but allowed a higher amount of bile available for analysis. The choice of studied metabolites was made regarding the specificity of the parent compounds to be chemical markers of PAH origin of contamination. Phenanthrene being a predominant PAH in the case of petrogenic origin of PAH contaminations, the follow-up of its metabolites could bring additional information on the source of the contamination. In the same way, benzo(a)pyrene is a major PAH in the case of a pyrolytic origin of the contamination. Lastly, pyrene is a PAH present in both contamination from petrogenic and pyrolytic origins. Its metabolite can thus be a good indicator of a multi-source contamination, being more general and diffuse.

In this study, the level of PAH metabolites in the bile increased during the exposure and decreased during the depuration period. These levels of metabolites quantified in the bile of fish correlated with the levels of contamination of the dissolved phase, even if differences in nature and in quantity of metabolites formed existed. During the sediment exposure, the formation of bile metabolites was the latest and can be explained by the longer time required from the induction of biotransformation enzymes. Bioavailability plays a role in the activation of the biotransformation processes. Higher is the quantity of PAHs dissolved in the dissolved phase, faster is expected to be the induction of the enzymatic systems involved in the production of PAH metabolites. In addition, the sedimentary mode of exposure can give variable results because of the differences in fish behaviour in the aquarium (hiding or stroke in the water column, ingestion or not of the sediment). This difference in fish behaviour could also exist in the other exposition routes. Nevertheless in the sediment exposure, this could lead to higher inter-individual differences in level of exposure and thus in the absorption of the parent PAHs.

A rapid production of metabolites was also observed whatever the levels of exposure of the dissolved phase in particular for the 1-hydroxypyrene (1-OHP), the major metabolite of pyrene. This indicated that the low BCF (Table 2) calculated for pyrene was the result of a very efficient metabolism rather than a pronounced reduced bioavailability. These results are in accordance with the findings of Spacies *et al.* [40], who determined in fish a high bioavailability of BaP which is a larger PAH molecule than pyrene. The biotransformation was shown to be more efficient for pyrene than for phenanthrene in the present study. This is in agreement with the results of previous studies that have reported a more efficient metabolism of larger PAHs compared to smaller compounds [49, 50].

These observations corroborated the assumption that PAH metabolites and in particular 1-OHP could be used as early biomarker of exposure, even at low level of contamination. The use of the metabolites of phenanthrene seemed to be also good indicators of PAH exposure in fish. Similar results have been previously obtained in sheepshead minnows exposed to PAHs dissolved in seawater [49].

4.3 DNA strand breaks

During this study, genotoxicity of PAHs for turbot was confirmed whatever the tested mode of contamination. The genotoxic effect was significant only at day 4 of exposure. This delay in response may be attributed to the time necessary for the production of a threshold amount of genotoxic metabolites for which a positive response can be measured by the comet assay. During this study, the differences observed with the mode of contamination in the profile of PAH metabolites pointed out differences in PAH bioavailability. Despite obvious differences in biotransformation, it is noteworthy that the genotoxic response was of same order whatever the tested mode of contamination. The latter finding can be explained by the lack of significant differences between exposed groups in the production of genotoxic

metabolites. In fact, among the produced metabolites only one fraction is thought to be involved in the genotoxic response. In our study, 3-OHBaP is the only metabolite that is potentially genotoxic. In fish exposed to PAHs via the dissolved phase or the petrol, it is detectable in the bile from day 3 of exposure. Following sediment contamination, one more day of exposure is necessary for the detection of this metabolite. 3-OHBaP represents a small fraction of the total metabolites produced, from 0.3 to 19.1% of the metabolites analysed depending on the time and mode of exposure.

In the case of PAH, different mechanisms of genotoxicity have been proposed for higher vertebrates. The incomplete repair of stable and depurinating DNA adducts by base and nucleotide excision repair systems can lead to DNA breakage [51, 52] that could account for a high amount of the strand breaks induced by PAH exposure [53]. The biotransformation of PAH can also result in an oxidative stress via the by-production of reactive oxygen species by quinone metabolism [54-56]. DNA fragmentation occurs either by direct action on the DNA or by the incomplete repair of the resulting oxidized DNA bases [57, 58]. The production of DNA strand breakage was already demonstrated in fish following PAH exposure. A significant increase in the level of DNA strand-breaks and alkali-labile sites was shown in turbot exposed PAH contaminated sediment [59, 60]. Similar results were obtained in the rainbow trout [61] and in flounder exposed to waterborne BaP [62].

For fish exposed via the sediment or the dissolved phase, the decrease observed with depuration can indicate effective repair mechanisms of DNA damage in fish like in higher vertebrates. In fish exposed to the petrol, DNA damage still increased during the depuration phase. In this group, the balance between the production of genotoxic metabolites and the detoxication/DNA repair mechanisms may be different.

4.4 *Interactions between biomarkers*

The significant positive correlation observed between the levels of biliary PAH metabolites and the level of DNA strand breaks tend to confirm a rule for the biotransformation of PAHs in the genotoxic effects measured in turbot. Because of a rapid bile evacuation, it is noteworthy that the detection of PAH metabolites in fish bile is considered as an early marker of recent PAH exposure such as genotoxicity biomarker. During this study, only some few metabolites were analysed. They were selected because of their easy detection due to their production in high amount. Looking at genotoxicity as an endpoint, it would have been more pertinent to focus the chemical analysis on known genotoxic metabolites of PAHs. A large number of research papers [63-70] pointed out the rule of diols-, diol-epoxides and dione metabolites in the genotoxicity of PAHs. These metabolites can interact either directly with the DNA (diol-epoxides) or indirectly via the formation of reactive intermediates (e.g. semi-quinone radicals). Research is in course to allow a better detection of this kind of metabolites.

The biomarkers proposed in this study were validated in laboratory and also during campaigns in the Seine estuary (Normandy, France) [71]. The strong point of this study was the joint interpretation of chemical (parent PAHs, PAH metabolites) and biological data (genotoxicity) to demonstrate the relationship between PAH exposure and biological effects in terms of genotoxicity.

Acknowledgements: The authors wish to thank the National Program for Ecotoxicology (PNETOX), the French Minister of Environment and the research team IMOPHYS (Integration of molecular and physiologic responses to organic contaminants in coastal area) for research fundings. They want also to acknowledge the "Region Aquitaine" and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

1. McElroy, A. E., Farrington, J. W., Teal, J. M., and Varanasi, U., *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Pp 1-40. 1989, Boca Raton: CRC Press.
2. Neff, J. M., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. 1979, London: Applied Science Publishers Ltd. 262.
3. Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C., and Garrigues, P. 1997. *Marine Chemistry* **58**(1-2): p. 85-97.
4. Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., and Tillitt, D. E. 2000. *Critical Reviews in Toxicology* **30**(4): p. 347-570.
5. GESAMP, (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). *Impact of Oil and Related Chemicals and Wastes on the Marine Environment.*, 50., G.R., Editor. 1993.
6. Meador, M. R., Brown, L. R., and Short, T. 2003. *Ecological Indicators* **3**(2): p. 81-92.
7. Varanasi, U. and Stein, J. E. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 93-100.
8. Hugget, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., and Bergman, H. L., *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress.*, ed. Publishers, L. 1992, Chelsea, MI.
9. Collier, T. K., Anulacion, B. F., Stein, J. E., Goks@?yr, A., and Varanasi, U. 1995. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**(1): p. 143-152.
10. French, B. L., Reichert, W. L., Hom, T., Nishimoto, M., Sanborn, H. R., and Stein, J. E. 1996. *Aquatic Toxicology* **36**(1-2): p. 1-16.
11. Myers, M. S., French, B. L., Reichert, W. L., Willis, M. L., Anulacion, B. F., Collier, T. K., and Stein, J. E. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 197-202.
12. Spies, R. B., Stegeman, J. J., Hinton, D. E., Woodin, B., Smolowitz, R., Okihiro, M., and Shea, D. 1996. *Aquatic Toxicology* **34**(3): p. 195-219.
13. Stein, J. E., Collier, T. K., Reichert, W. L., Casillas, E., Hom, T., and Varanasi, U. 1992. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**: p. 701-714.
14. van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): p. 57-149.
15. Mahadevan, B., Marston, C. P., Luch, A., Dashwood, W. M., Brooks, E., Pereira, C., Doehmer, J., and Baird, W. M. 2007. *International Journal of Cancer* **120**(6): p. 1161-1168.
16. Sturve, J., Balk, L., Adolfsson-Eric, M., Lindstrom, P., Holmqvist, I., Parkkonen, J., Albertsson, E., Carney-Almroth, B., and Fo?rlin, L. 2006. *Marine Environmental Research* **62**(SUPPL. 1).
17. Schiedek, D., Broeg, K., Bars?iene, J., Lehtonen, K. K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisja?rvi, H., Vuorinen, P. J., Dedonyte, V., Koehler, A., Balk, L., and Schneider, R. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 387-405.

18. Hansson, T., Schiedek, D., Lehtonen, K. K., Vuorinen, P. J., Liewenborg, B., Noaksson, E., Tjarnlund, U., Hanson, M., and Balk, L. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 451-468.
19. James, M. O., Kleinow, K. M., Zhang, Y., Zheng, R., Wang, L., and Faux, L. R. 2004. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): p. 343-346.
20. Reynolds, W. J., Feist, S. W., Jones, G. J., Lyons, B. P., Sheahan, D. A., and Stentiford, G. D. 2003. *Chemosphere* **52**(7): p. 1135-1145.
21. Telli-Karakoc, F., Ruddock, P. J., Bird, D. J., Hewer, A., Van Schanke, A., Phillips, D. H., and Peters, L. D. 2002. *Marine Environmental Research* **54**(3-5): p. 511-515.
22. Johnson, L. L., Collier, T. K., and Stein, J. E. 2002. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **12**(5): p. 517-538.
23. Akcha, F., Burgeot, T., Budzinski, H., Pfohl-Leszkowicz, A., and Narbonne, J. F. 2000. *Marine Ecology Progress Series* **205**: p. 195-206.
24. Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., and Andersen, O. K. 2000. *Aquatic Toxicology* **51**(2): p. 241-258.
25. Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M. H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., Andre, V., Lebailly, P., and Cachot, J. 2006. *Aquatic Toxicology* **79**(1): p. 65-77.
26. Pagnout, C., Rast, C., Veber, A. M., Poupin, P., and Ferrard, J. F. 2006. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(2): p. 151-158.
27. Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M. H., Budzinski, H., Pottier, D., Andre, V., and Cachot, J. 2006. *Aquatic Toxicology* **79**(1): p. 55-64.
28. Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D., and Budzinski, H. 2006. *Aquatic Toxicology* **79**(3): p. 257-267.
29. Hoffmann D. J., R. B. A., Burton G. A., Cairns J., *Handbook of Ecotoxicology*. second edition ed. 2003: Lewis. 1290.
30. Gravato C. and M.A., S. 2003. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**: p. 352-358.
31. Gravato, C. and Santos, M. A. 2002. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**(2): p. 115-127.
32. Akcha, F., Vincent Hubert, F., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2003. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **534**(1-2): p. 21-32.
33. Mazeas, L. and Budzinski, H. 2002. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **82**(3): p. 157-173.
34. Budzinski, H., Letellier, M., Garrigues, P., and Le Ménach, K. 1999. *J. Chromatogr. A* **837**(1-2): p. 187-200.
35. Baumard, P. and Budzinski, H. 1997. *Analisis* **25**: p. 246-252.

36. Baumard, P., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1997. *Fresenius J Anal Chem* **359**(6): p. 502-509.
37. Le Dû - Lacoste M and Budzinski H. Submitted. *Anal Bioanal Chem*.
38. Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., and Børseth, J. F. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(6): p. 1175-1184.
39. Jonsson G, B. R., Bamber SD, Baussant T. 2004. *Environ Toxicol Chem.* **23**(6): p. 1538-48.
40. Spacie, A. 1983. *Ecotoxicological and environmental safety* **7**(3): p. 330-341.
41. Jonhson-Restrepo, B., Olivero-Verbel, J., Lu, S., Guette-Fernandez, J., Baldiris-Avila, R., O'Byrne-Hoyos, I., Aldous, K., Addink, R., and Kannan, K. 2008. *Environmental Pollution* **151**(3): p. 452-459.
42. Liang, Y., Britt, D., McLean, J., Sorensen, D., and Sims, R. 2007. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(6): p. 1368-1375.
43. Barron, M. G. 1990. *Environ. Sci. Technol.* **24**(11): p. 1612-1618.
44. Opperhuizen, A. and Sijm, D. 1990. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**: p. 175-186.
45. Belfoid, A. C. 1996. *Environmental Review* **4**: p. 276-299.
46. Kelly, B. C. 2004. *Environ Toxicol Chem.* **23**(10): p. 2324-2336.
47. Randall, D. J. 1998. *Chemosphere* **37**(7): p. 1263-1270.
48. Collier, T. K. and Varanasi, U. 1991. *Archives of environmental contamination and toxicology* **20**(4): p. 462-473.
49. Jonsson, G., Bechmann, R., Bamber, S., and Baussant, T. 2004. *Environ Toxicol Chem.* **23**(6): p. 1538-48.
50. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1981. *Aquatic Toxicology* **1**(1): p. 49-67.
51. Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozino, F., Raspagliuo, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A., and Dogliotti, E. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**: p. 9573-9578.
52. Van Steeg, H. 2001. *Toxicol. Lett.* **120**: p. 209-219.
53. Speit, G. and Hartmann, A. 1995. *Mutagen.* **10**: p. 555-559.
54. Flowers-Geary, L., Harvey, R. G., and Penning, T. M. 1992. *Biochem. J.* **11**: p. 49- 58.
55. Gelboin, H. V. 1980. *Physiol. Rev.* **60**: p. 1107-1166.
56. Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., and Monks, T. J. 2000. *Chemical Research in Toxicology* **13**(3): p. 135-160.
57. Laval, J., Jurado, J., Saparbaev, M., and Sidorkina, O. 1998. *Mutat. Res.* **402**: p. 93-102.
58. Memisoglu, A. and Samson, L. 2000. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **451**(1-2): p. 39-51.

59. Hartl, M. G. J., Kilemade, M., Sheehan, D., Mthersill, C., O'Halloran, J., O'Brien, N. M., and van Pelt, F. N. A. M. 2007. *Mar. Environ. Res* **64**: p. 191-208.
60. Kilemade, M. F., Hartl, M. G. J., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F. N. A. M., O'Halloran, J., and O'Brien, N. M. 2004. *Environ. Mol. Mutagen.* **44**: p. 56-64.
61. Inzunza, B., Orrego, R., Penalosa, M., Gavilan, J. F., and Barra, R. 2006. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(2): p. 242-251.
62. Woo, S., Kim, S., Yum, S., Yim, U. H., Lee, T. K., and . , . 2006. *Mar. Poll. Bull.* **52**: p. 1768-1775.
63. Afshar, C. E., Carrell, C. J., Carrell, H. L., Harvey, R. G., Kiselyov, A. S., Amin, S., and Glusker, J. P. 1996. *Carcinogenesis* **17**(11): p. 2507-2511.
64. Basu, N., Billiard, S., Fragoso, N., Omoike, A., Tabash, S., Brown, S., and Hodson, P. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(6): p. 1244-1251.
65. Krahn, M. M., Myers, M. S., Burrows, D. G., and Malins, D. C. 1984. *Xenobiotica* **14**(8): p. 633-646.
66. Krahn, M. M., Rhodes, L. D., Myers, M. S., Moore, L. K., MacLeod, W. D., and Malins, D. C. 1986. *Archives of environmental contamination and toxicology* **15**(1): p. 61-67.
67. Pangrekar, J., Kandaswami, C., Kole, P., Kumar, S., and Sikka, H. C. 1995. *Marine Environmental Research* **39**(1-4): p. 51-55.
68. Varanasi, U., Eberhart, B. T., Nishimoto, M., and Reichert, W. 1985. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **VOL. 26**.
69. Varanasi, U. and Nishimoto, M. 1985. *Federation Proceedings* **44**(3).
70. Wenzel-Hartung, R., Brune, H., Grimmer, G., Germann, P., Timm, J., and Wosniok, W. 1990. *Experimental Pathology* **40**(4): p. 221-227.
71. Le Dû - Lacoste M, Akcha F, Peluhet L, Le Menach K, Burgeot T, and Budzinski H. Submitted. *Environmental Science & Technologies*.

Publication n°8**Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) pollution in dab (*Limanda limanda*) collected in the Seine estuary (France).**

M. Le Dû-Lacoste^a, F. Akcha^b, L. Peluheta^a, K. Le Menach^a, T. Burgeot^b H. Budzinski^a

^aISM-LPTC, UMR 5255 CNRS – University Bordeaux I, Talence, FRANCE

^bDEL-PC, IFREMER, Nantes, FRANCE

* Corresponding author : h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

The Seine estuary is well known to be widely contaminated by organic pollutants and especially by PAH. Fish are known to metabolize PAH triggering to the formation of genotoxic damages at the cellular and sub-cellular levels. In this work, relationships between liver 7-ethoxyresorufin-O-deethylase dealkylation (EROD) activity, DNA strand breaks in blood cells, and PAH metabolites in bile of dab (*Limanda limanda*) were analyzed. Female and male dab of two class of size (juvenile and adult) were collected by trawling in two sites with different degrees of pollution during March and September 2005 and 2006. Significant effect of sex, age, site and season were demonstrated on EROD activity and on the level of strand breaks. Significant interaction between age and sex was shown that might indicate the complex influence of other factors on the extent of DNA damage and induction of EROD activity (i.e. reproduction status). For PAH metabolites only the influence of the site and of the season was demonstrated. Generally speaking, dabs collected at the entrance of the estuary appeared to be the most impacted considering all the markers studied. Variations in biomarkers responses between males and females and between adults and juveniles may be due to seasonal variations related to the variations in lipid content and levels of biotransformation activities and/or spawning cycles. Correlations between DNA lesions and PAH metabolites showed the importance of combined analysis of chemical and biochemical markers to correctly assess the contribution of chemical contamination to the measured biological responses.

Keywords: PAH metabolites, DNA strand breaks, EROD activity, fish, biomonitoring.

Submitted to Environmental Science & Technologies

Introduction

Anthropogenic compounds of industrial, agricultural and domestic origin are discharged into the coastal environments inducing a variety of reactions in organism depending on their concentration, toxicity and exposure time [1]. In biomonitoring studies, a suitable set of biological responses can be useful not only to determine the degree of harm on biota health but also to identify the stressors or pollutants responsible for such effects. At a cellular level, it is possible to use indicators such as the hepatic mixed function oxygenase (MFO) activity to detect functional changes. Induction can be useful to determine the relationship between these discharges and their bioavailability to organisms [2], and to demonstrate exposure and residency. In this way, several studies have recognized the induction of the cytochrome P450-dependent MFO system (EROD activity) as an excellent biological indicator of exposure to anthropogenic organic contaminants and especially to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) [3-11].

Since induction of the MFO system is considered a general biological indicator of exposure, the induction response does not reveal the identity of a specific class of pollutants [12]. Therefore determination of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites (OH-PAH) in bile has become a complementary method to assess and identify fish exposure to PAH [7, 13-15]. Biological effect monitoring, including determination of PAH metabolites, is part of international monitoring programmes, among them 'OSPAR Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP)'. The OSPAR JAMP guideline are the basis for monitoring activities in the North Sea and include the measurement of PAH metabolites [16] with dab and flounder as target species. Only little is known about concentrations of PAH metabolites in dab from the North Sea. Some studies have been carried out with flounder [7, 14, 17] and plaice [18, 19], but investigations of PAH metabolites in dab bile are rare [3, 20]. In addition to EROD activity and PAH metabolites determination others biological markers are recommended for environmental biomonitoring of PAH exposure such as the comet assay [21]. Exposure to pro-oxidant pollutants such as PAH can lead to the formation of DNA strands breaks that can be measured with the comet assay.

PAH are ubiquitous contaminants of the marine environment because of their stability and because of the multiplicity of their sources. Pyrolytic processes represent the major source of PAH into the environment; this includes anthropogenic sources (incomplete combustion of organic matter such as petroleum derivatives) [22, 23] and natural sources (forest fires) [24]. PAH and alkylated PAH are also naturally present in crude oils resulting from the diagenetic and catagenetic transformation of organic matter. They belong to the list of priority pollutants established by the EPA (Environmental Protection Agency, USA) due to the mutagenicity and carcinogenicity of some of them. The exposure of organisms towards PAH has been often evaluated by measuring the bioaccumulated amounts. This approach can be criticized if we take into account biotransformation ability of these organisms. It does not either give information on the potential toxic effects.

The aim of the present field study was firstly to study bioavailability, bioaccumulation and biotransformation phenomena for PAH in the case of marine flat fish. The PAH exposure of benthic fishes was evaluated via the analysis of produced metabolites. A second objective was to study the relationship between exposure of organisms to these PAH, biotransformation and genotoxic effects. The EROD activity was studied in liver as phase 1 of metabolization of PAH. The produced metabolites were analyzed in bile in order to precise the rapid activation of PAH. Furthermore, primary alterations of DNA related to generated metabolites were examined in order to identify produced effects. The DNA-alterations were determined by the measurement of structural lesions of DNA (DNA-strand breaks). Finally, this work aimed to propose new tools for biomonitoring programs in the case of hydrocarbon pollutions in marine environment (oil spills). The determination of PAH metabolites on a more systematic way in environmental monitoring programs should lead to

a better knowledge of the organism exposure to PAH and to establish links between exposure and biological effects such as DNA alterations.

Material and Methods

Area of study

The Seine Estuary (Figure 1), 170 km long, is at the interface between important basin slopes and the Seine Bay. Its physical characteristics have profoundly been modified during the last 150 years by human activities. 40% of the French economic activity is located on the basin slope of Seine, which represents also 50% of the French fluvial transport. The Seine Estuary is under the influence of important harbours such as Le Havre and Rouen, and industrial site activities such as petroleum plants. Upstream, Paris can not be overlooked as an actor of the Seine River contamination. The River is 776 km long with an average water flow of 410 m³/s at the Poses dam (located at the limit between the River and the Estuary) and an average particular matter flow of 650,000 tones per year that brings contaminants in the Estuary. The Estuary is known to be highly polluted [25-27]. PAH have been shown to be some of the major organic contaminants of this Estuary [28]. The physical modifications of the Estuary combined with the action of contaminants are suspected to be responsible for the degradation of this environment. The Estuary is a site of reproduction and growth for numbers of fish species. Thus, the assessment of PAH bioavailability and the relation between exposure and genotoxicity towards fish is of particular interest.

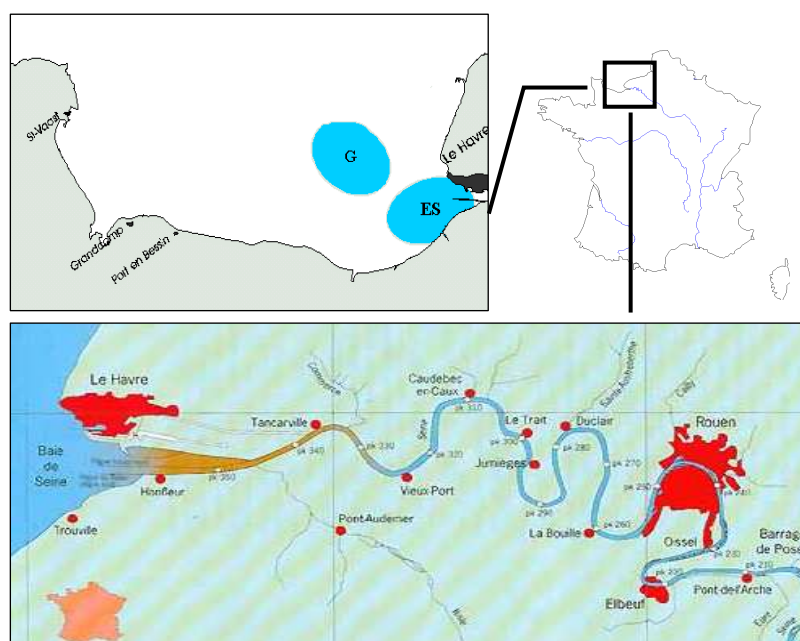


Figure 1: Study area and sampling sites in the Seine estuary (France). ES: estuary mouth site; G: granulates site.

Sampling design and collection

Dab (*Limanda limanda*) were collected in March and September 2005 and in March and September 2006 by trawling at different sites in the Seine Bay (Seine Estuary, ES; Granulat Site, G) (Figure 1). The sampling locations have been previously determined with specific studies on dab [29, 30]. At each site, female and male dab of two sizes classes (14-18 and 22-26 cm) were collected from several trawl nets (standard haul duration of 20 min). These fish were considered, respectively, as juveniles (≤ 2 years-old) and adults (~ 2.5 to ≤ 4 years-old). In the eastern part of the Channel, sexual maturity is observed in the dab at an average age of 2.6 years, corresponding to an average size of 21.6 cm [31]. Fish were kept alive on board in a fish well and dissected once back to the quay. Blood (for comet assay), bile (for PAH metabolites determination) and liver (for EROD activity measurement) samples were stored individually at -80°C . The muscle and liver samples (for PAH body burden measurement) were pooled ($n = 10$) and stored at -20°C until analysis. The sampling design and collection are resumed in Table 1.

Chemical, solvents and reagents

Hydroxylated PAHs, 1-hydroxynaphtalene (1-OHN) and 2-hydroxynaphtalene (2-OHN) were purchased from Lancaster (Bischeim, France); 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and 9-hydroxyphenanthrene (9-OHPhe), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d9 (1-OHPd9) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Ste Foy La Grande, France). Concerning parent PAHs, the standard reference SRM 2260, constituted of about 20 aromatic compounds, was provided by the U.S. National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg MD, USA) and perdeuterated aromatic compounds by MSD Isotopes (Montreal, Canada). All the standards and solvents used were of analytical grade ($> 98\%$). Dichloromethane was provided by Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Methanol Supersolv was provided by Merck and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) was obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity $> 99\%$) and β -glucuronidase-aryl-sulfatase mixture from Helix pomatia (100,000 and 7,500 units/ml respectively) were provided by Sigma Aldrich (St Quentin Falavier, France). 2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Two solid-phase extraction (SPE) cartridges were used: the Strata-X cartridge (3 cc, 200 mg) from Phenomenex (Le Pecq, France) and the HF Bond Elut-PSA cartridge (3 cc, 500 mg) from Varian and provided by Atlantic Labo (Eysines, France). Aluminium oxide (150 basic type T; 0.063-0.2 mm) and silica gel (0.063-0.2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

RPMI 1640 medium, dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.4% trypan-blue solution, ethidium bromide (BET), foetal bovine serum (SVF), normal and low melting point agarose, N-sarcosinate, nuclease P1, RNase A, RNase T1, proteinase K, micrococcal nuclease, spleen phosphodiesterase, T4 polynucleotide kinase, Triton X-100, sodium dodecylsulfate, phenol, SEVAG were purchased from Sigma Aldrich Chemicals.

Table 1: Sampling design and collection for the four campaigns.

Campaign	Location	Class of dabs	Analysis	PAH	PAH	OH-PAH	EROD activity	Comet Assay
				Muscle : pool (n=10)	Liver : pool (n=10)	Bile : individual (n=10)	Liver : individual (n=5)	Blood : individual (n=10)
March 2005	<i>Seine Estuary ES</i>	<i>Juveniles</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
		<i>Adults</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
	<i>Granulate G</i>	<i>Juveniles</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females					
		<i>Adults</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
September 2005	<i>Seine Estuary ES</i>	<i>Juveniles</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
		<i>Adults</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females			X	X	X
	<i>Granulate G</i>	<i>Juveniles</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
		<i>Adults</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females			X	X	X
March 2006	<i>Seine Estuary ES</i>	<i>Juveniles</i>	Males					
			Females					
		<i>Adults</i>	Males			X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
	<i>Granulate G</i>	<i>Juveniles</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
		<i>Adults</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
September 2006	<i>Seine Estuary ES</i>	<i>Juveniles</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
		<i>Adults</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
	<i>Granulate G</i>	<i>Juveniles</i>	Males	X	X	X	X	X
			Females	X	X	X	X	X
		<i>Adults</i>	Males			X	X	X
			Females	X	X	X	X	X

PAH analysis

PAH were extracted from freeze-dried and grounded solid matrices (liver, muscle) by microwave assisted extraction (10 min, 30 W) with methylene chloride followed by filtration on clean glass cotton [32]. Several perdeuterated PAH used as internal standards were added to the samples prior to the extraction step for PAH quantification [33]. Extracts of the different matrices were then purified on aluminium oxide (Al₂O₃) and silica (SiO₂) columns [34, 35] and analysed by GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry). Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1 min); purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at 2°C/min) coupled to an HP MSD 5973 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s (Dwell time: 50 ms for each ion) using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France). Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity [33]. The response factors of PAH relatively to perdeuterated PAH were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAH (SRM 2260, National Institute of Science and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the solution of perdeuterated PAH used for spiking samples. The monitored PAH are, in ascending order of molecular weight, naphthalene* (N), acenaphthylene* (Ay), acenaphthene* (Ae), fluorene* (Fe), phenanthrene* (Phe), anthracene* (Ant), fluoranthene* (F), pyrene* (P), benz(a)anthracene* (BaA), chrysene*+triphenylene (C+T), benzo(b)fluoranthene* + benzo(j)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene* (BbF+BjF+BkF=BF), benzo(a)pyrene* (BaP), indeno(1,2,3-cd)pyrene* (IP), benzo(g,h,i)perylene* (BPer) and dibenz(a,h)anthracene*+dibenz(a,c)anthracene (DB(ah)A+DB(ac)A=DBA). Compounds marked with a "*" are the 16 PAH of the US-EPA. In this study, the sum of those compounds is referred as 19 PAH because of the coelution of three other PAH by GC-MS.

PAH metabolites analysis

Bile samples were prepared according to the protocol described by Le Dû-Lacoste and Budzinski [36].

The weighted whole bile were thawed and then homogenized in precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid) (100 µl of bile: 2 ml buffer). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d₉, 20 µl of mercaptoethanol, used as an antioxidant, and 20 µl of β-glucuronidase and arylsulfatase mixture were added to the samples. They were then placed at 37°C in an oven during 18 hours for hydrolysis. After deconjugation, bile samples were ultrasonicated and centrifuged (10 min, 5 000 rpm, 20°C). Solid-phase Strata X cartridges were preconditioned with 2 ml methanol and 4 ml buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml buffered water and 2 ml water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v) before purification made on solid-phase HF PSA Varian cartridges. Before loading the extracts redissolved in methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the purification cartridges were first preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. Extracts were reduced to dryness under a nitrogen stream, redissolved in 50 µl

dichloromethane and 30 μl of a derivatizing agent (BSTFA) were finally added. The derivatization was then completed by incubation at 65°C during 30 min. After derivatization and before GC-MS analysis, a solution of deuterated internal standard (pyrene-d10, 20 μl) was added to the sample for recovery determination.

The analyses were carried out with an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies, both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). The separation was performed on an Agilent Technologies HP5-MS capillary column (length: 30 m; internal diameter: 250 μm ; stationary phase thickness: 0.25 μm ; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethylsiloxane), with the following oven parameters: from 70°C (2 min) to 180 °C (1 min) at 5°C/min from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min. The injection volume was set at 1 μl (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min)), while the injector temperature was set at 250°C and the interface temperature at 280°C. The purge flow was set at 60 ml/min during 1.5 min and helium 6.0 (Linde, Bassens, France) was used as the carrier gas (constant flow: 1 ml/min). Acquisition was performed in selected ion monitoring (SIM), with 1.53 scan/s and a dwell time of 50 ms for each ion. The source temperature was set at 150°C, and the electron multiplier voltage set at 2 000 V. The compounds were quantified in SIM mode using the ions below: 1-hydroxynaphtalene ($m/z=201$), 2-hydroxynaphtalene ($m/z=216$), 2-hydroxybiphenyl ($m/z=211$), 9-hydroxyfluorene ($m/z=165$), 9-hydroxyphenanthrene and isomers ($m/z=266$), 1-hydroxypyrene ($m/z=290$), 1-hydroxychrysene ($m/z=316$) 3-hydroxybenzo(a)pyrene ($m/z=340$) and 1-hydroxypyrene-d9 ($m/z=299$), pyrene-d10 ($m/z=212$). A mixture of the standard metabolites, 1-hydroxypyrene-d9, and pyrene-d10 in dichloromethane was injected, after derivatization, at the beginning and at the end of each sequence for the determination of response factors.

EROD activity

Individual liver samples were homogenized (5 ml/g tissue) in 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 100 mM phosphate buffer pH 8, 1 mM dithiothreitol, pH 7.5. Samples were centrifuged (9000g, 15 min, 4°C) and the supernatants (S9 fraction) were recovered. The protein content of each fraction was determined by colorimetry using a Bradford method adapted for microplate reader (Safire, TECAN). EROD activity was measured applying a protocol adapted for fluorescence microplate reader. The assay was made of 10 μL of S9 fraction (5-10 μg proteins), 200 μL of 100 mM phosphate buffer (pH 8) and 10 μL of 46 μM 7-ethoxyresorufine. Reaction was started by the addition of 10 μl of 5 mM NADPH. The excitation and emission fluorescence wavelengths were set at respectively 535 and 580 nm. Measurement was made every 10s during 10 min. EROD activity was expressed in pmol/min/mg proteins.

Comet assay

Blood samples were slowly defrosted at ambient temperature and diluted in PBS buffer before analysis. The comet assay was performed as previously described in [30]. In order to obtain permanent preparations, the slides (two slides per sample) were immersed for 10 min in absolute ethanol for deshydrating, and allowed to dry at room temperature. Just before analysis, 75 μL of BET at 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ were deposited on the slide and spread over it using a cover glass. Slides were placed for at least 30 min at 4°C for coloration. Slides were analysed using an optical fluorescence microscope (Olympus BX60, x 40) fitted to a CDD camera (Olympus) and an image analysis system (Komet 4, Kinetic Imaging Ltd). Several parameters were calculated for each observed cell (75 cells/slide), including the percentage of DNA present in the comet tail.

Statistical analysis

Data normality was tested with a Shapiro-Wilk test. To normalize the distribution raw comet data were mathematically transformed. Transformed data as well as chemical data were analysed by Analysis of Variances (ANOVA) using Statistica 6.0 software (Statsoft, France). When a significant effect was observed, significant differences among means were determined using Tukey's comparison test. Spearman correlations between markers were calculated. All tests were regarded as statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Bioaccumulation: PAH in muscle and liver

The accumulation of PAH tissues (white muscle and livers) of dab sampled on the two sites was relatively limited (Figure 2). The values obtained were lower than those found for other flatfish species at the same locations. In this study concentrations ranged between 2 and 107 ng.g⁻¹ dry weight for PAH content in muscle and between 16 and 102 ng.g⁻¹ dry weight for PAH content in livers. Mazéas et al. [37] found similar concentrations in flounder livers collected at the entrance of the Seine estuary (between 74 and 100 ng.g⁻¹ dry weight). PAH are hydrophobic compounds that accumulate in lipids but they are also metabolized through specific pathways [18]. The trend displayed by PAH body burden in dab from the two locations suggested a chronic exposure to PAH but these data alone do not assess to a specific punctual contamination such as an oil spill or fuel discharges.

When compared the two locations (ES, Figure 2 A, B and Granulate, Figure 2 C, D) no discrimination between both of them has been possible significantly (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). However significant effects of the year and of the period of sampling (March or September, 2005 or 2006) were demonstrated whatever the area considered. In March the accumulation of PAH in tissues (muscle and livers) was higher than those in September ($p < 0.001$) and values obtained in 2005 were lower than those measured in 2006 ($p < 0.001$). These results could be linked with the Seine river flow rate at these periods of the year. Indeed the mean flow rates of the river were lower during the September campaigns (236 and 269 m³/s in 2005 and 2006, respectively) rather than during the March campaigns (495 and 1198 m³/s in 2005 and 2006, respectively). Lower rates suggest lower inputs of contaminants in the estuary and thus triggers a decrease in the PAH concentrations in tissues. The very highest flow rate for the Seine River observed in March 2006 as well as the increase in the PAH contents in tissues for the same period corroborate the link between the flow rate and bioaccumulation processes of PAH in dab.

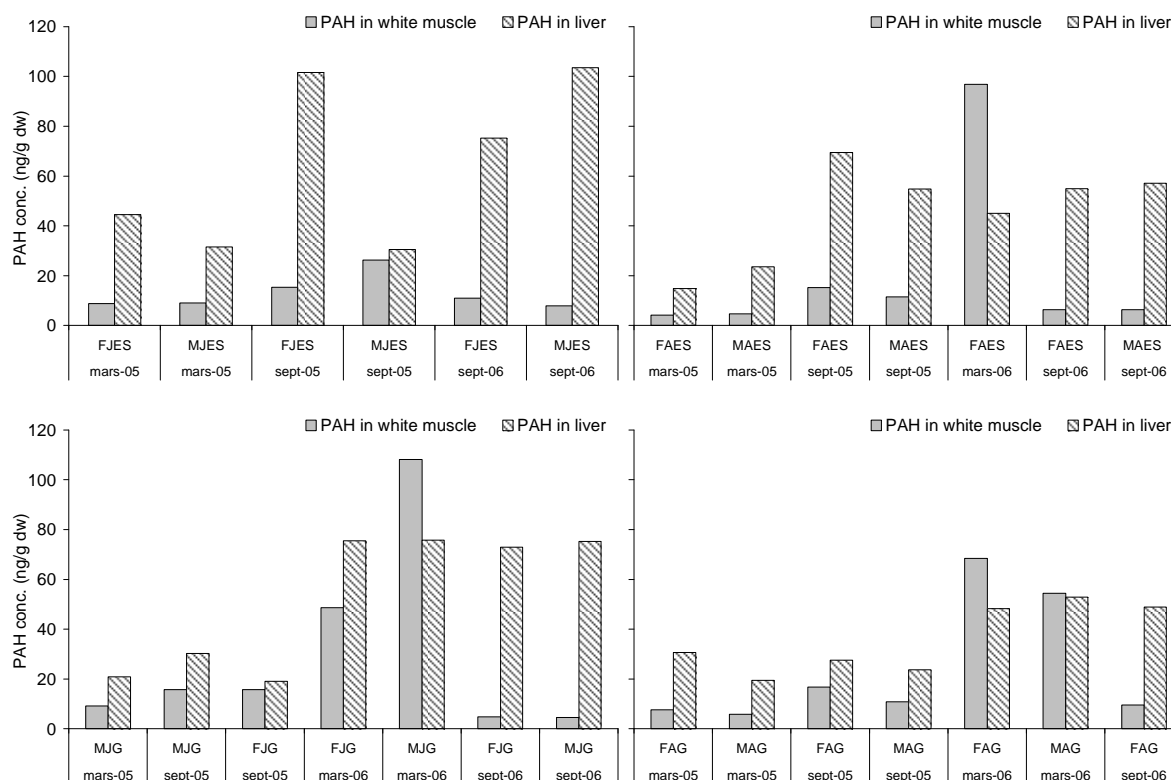


Figure 2: Total PAH content (sum of 19 PAHs) in tissues (white muscle and livers) in dab collected from the assessed area in 2005 and 2006. Data from the estuary site are presented in figures A and B. Data from the granulate site are presented in figures C and D. ES: estuary site; G: granulate site; F: female; M: male; J: juvenile; A: adult. Concentrations expressed in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight.

Biotransformation: PAH metabolites in bile

The concentrations revealed to be variable throughout time. Concentrations of total PAH metabolites (OH-PAH), OHPhe and 1-OHP are presented in Figure 3 for all campaigns and all groups of dabs collected in both sites. Major metabolites measured in bile were 1-OHP, OHPhe isomers and 2-OHBi (Figure 4). The biphenyl compound does not belong to the PAH group but it is present in high quantities in the marine environment. That is why its hydroxylated metabolite (2-OHBi) was quantified because it reveals a general pollution of the environment. Concerning 1-OHP and OHPhe, their contributions to the total sum of OH-PAH in bile ranged between 4 and 61% and between 5 and 38 %, respectively. It was also noticed that fishes which had the highest contribution in 1-OHP exhibited the lowest contribution in OHPhe, and conversely. The two markers seemed to be linked together.

The results obtained for the dab have been compared to other studies on flounders [37, 38] that have been collected in the Seine estuary and in other sites along the French Atlantic coasts. In this work, dabs from ES site exhibited similar concentrations of PAH metabolites that flounders collected at the same location. However, when compared the whole results, dabs collected in 2005-2006 have showed higher concentrations that flounders collected along the French Atlantic coasts. In 2005-2006, Laroche *et al.* [38] showed relatively low concentrations for flounders in the Loire estuary (between 91 and 174 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile) and in the Gironde estuary (between 70 and 213 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile). In the Seine estuary in 2002-2003, Mazéas *et al.* [37] have measured mean concentrations between 91 and 217 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile in flounders. Thus dabs collected in the Seine estuary in this survey (2005-2006) seemed to be more impacted than flounders collected along the French coasts. However such inter-species

and inter-sites comparisons should be relativized. Indeed the specific metabolism of each species can influence qualitatively and quantitatively concentrations of biliary PAH metabolites [39, 40].

When considering the total sum of PAH metabolites quantified (OH-PAH), influences of the site and of the year of sampling were demonstrated significantly ($p < 0.001$). Between 2005 and 2006 the level in PAH metabolites increased as well as between the September and the March surveys. These can be explained with the seasonal differences in the dab metabolism. Before the spawning season (March) the metabolism seems to be increased whereas during the summer season (September) and the sexual rest it seems to slow down. These seasonal differences have been already described in mussels with the RNO survey (National Observation Network) [41]. It was observed that PAH concentrations measured in mussels were higher in winter because of the higher flow rate of the Seine River that enhanced PAH inputs. This observation that is valid for the bioaccumulation phenomena is directly linked to biotransformation processes. Moreover dabs collected in the ES location showed higher levels of OH-PAH than those caught in the Granulate area. Thus the analysis of OH-PAH seems to be a good and reliable indicator for exposure of dabs to PAH.

When looking at the 1-OHP metabolite levels, significantly effects of the site and of the age ($p < 0.001$) were observed. Concentrations were 3 times higher at the ES site compared to the Granulate site and the adults presented 2.5 times highest levels of 1-OHP rather than juveniles. Moreover it was shown that juveniles of both sites presented similar concentrations of 1-OHP whereas adults of the ES sites had 4 times higher levels than those collected in the Granulate site. Additionally females from ES site showed higher levels of 1-OHP than males. As a result the influence of the Seine estuary mouth resulting in a higher input of contaminants highlighted different adaptation efforts for dabs according to sex and age. A more important bioaccumulation of PAH as well as a higher metabolism for adult fishes compared to juveniles could be explained by changes in feeding. Indeed feeding (nature, quality and quantity) is a factor that influences bioavailability of organic contaminants [42]. Moreover since females allocate more energy during the gametogenesis for the formation of energetic stocks, they bioaccumulate more PAH than males.

The total concentration of OH-PAH was highly correlated with the concentration of 1-OHP and with OHPhe ($p < 0.0001$). However no correlation was found between 1-OHP, OHPhe and 3-OHBaP. These markers seemed to be specific markers for PAH contamination's source (pyrolytic, petrogenic or both). This is an advantage for the proposal of indicator and biomonitoring tools.

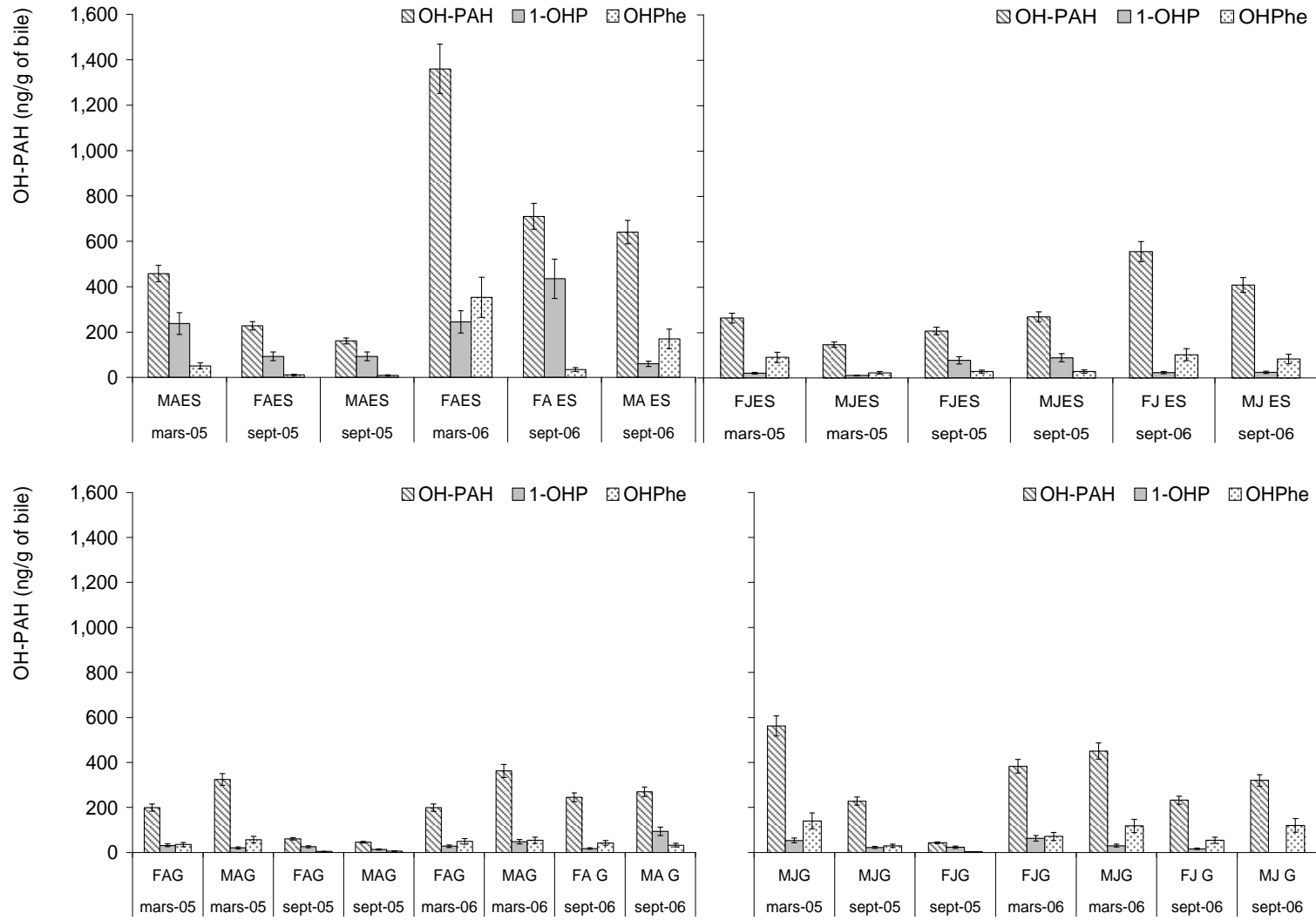


Figure 3: Mean concentrations of OH-PAH in dabs collected during the 4 surveys. Concentrations expressed in ng.g⁻¹ of bile (Mean ± RSD, n=6). ES: estuary site; G: granulate site; F: female; M: male; J: juvenile; A: adult.

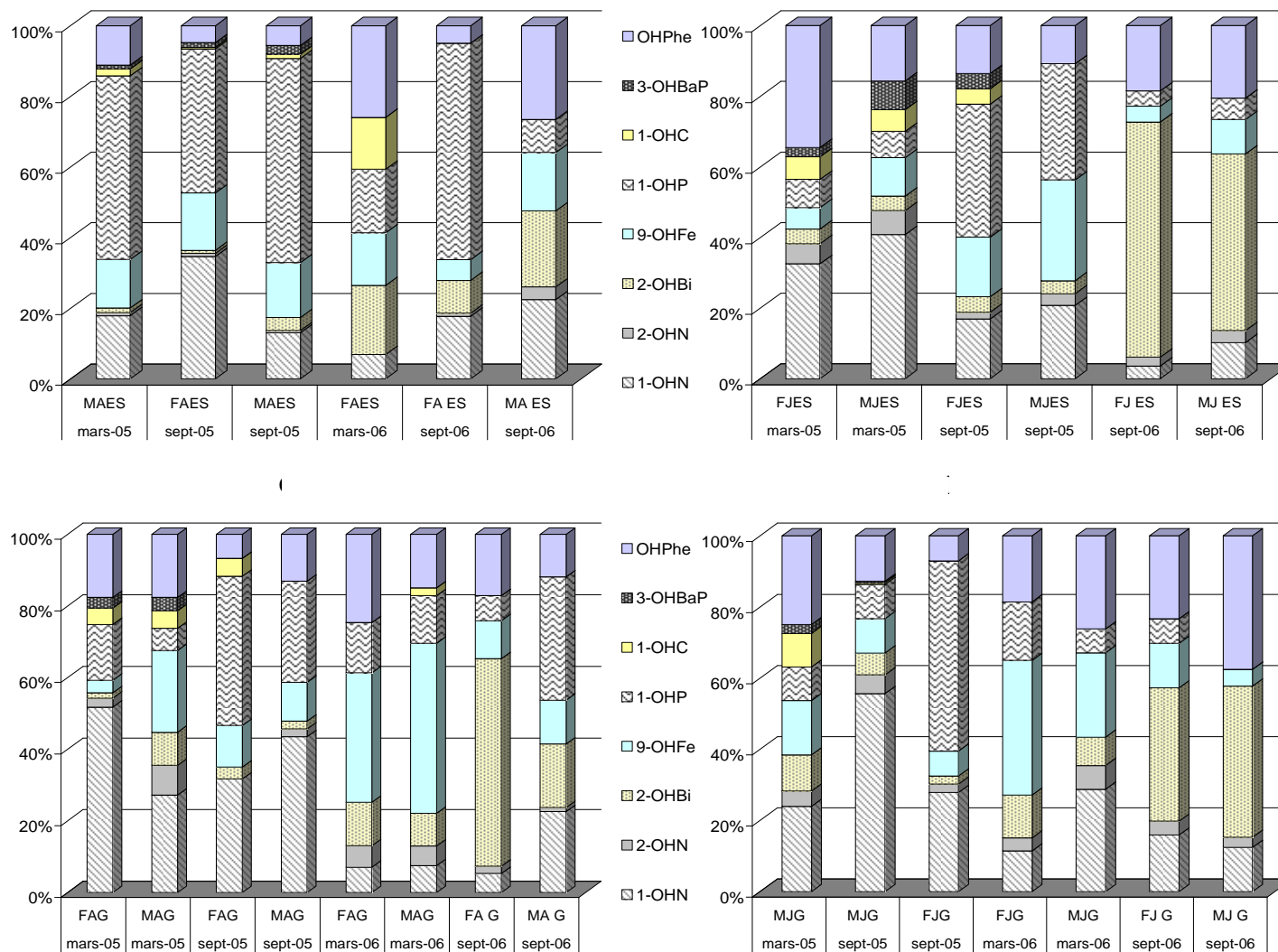


Figure 4: Contribution (%) of individual PAH metabolites to the total sum of OH-PAH in bile of dab collected from the assessed area in 2005 and 2006. Data from the estuary site are presented in figures A and B. Data from the granulate site are presented in figures C and D. ES: estuary site; G: granulate site; F: female; M: male; J: juvenile; A: adult.

DNA damages: Comet Assay

In order to study global effect for each factor (site, age, sex, season) it was decided to only work with a complete matrix of raw data. Thus the campaign of September 2005 and the set of raw data concerning female adults were considered.

In September 2005 all of the studied factors have shown a significant effect ($p < 0.001$ for the factors "sex" and "site", $0.01 < p < 0.05$ for the factor "age"). Generally speaking male dabs showed DNA strand break's levels that were higher than those of female dabs (Figure 5A). Moreover adults presented higher levels of breakage than those of juveniles (Figure 5B). The interaction between the two factors (age and sex) was highly significant ($p < 0.001$). Whereas for the male population the level of breakages was higher for adults than for juveniles, the contrary was observed for the female population. These results confirmed those obtained during previous studies [29, 30]. The presence of a higher number of DNA strand breaks in adult than juvenile was attributed to age-related differences in activities involved in pollutant biotransformation. In fact, it has been shown for flatfish species an increase with age in the induction level of CYP1A protein and cytochrome P450-dependent enzymatic activities [43, 44]. Sex, like age, has an influence on the levels of biotransformation processes. However this effect showed seasonal variations because of sex-dependent influences on enzyme activities relative to negative temperature compensation and/or changes in hormonal status. In order to identify the most sensitive type of individuals for genotoxicity assessment by the comet assay, it appears so necessary to check for these effects for each season of the year.

When considering the population of female adult dabs collected in both sites the effect of the site factor was more precisely evaluated. Significant effect of the factor 'site' and of the factor 'season' and a significant interaction between the two factors were demonstrated ($p < 0.001$). Female adults collected on the ES site shown higher levels of DNA strand breaks than those collected on the Granulate site (Figure 5C). Nevertheless differences between the two stations varied according to the season and the year (Figure 5D). In March 2005 and March 2006, the levels of strand breaks were higher on the ES site rather than on the Granulate site. The contrary was stated in September 2005. This result correlated with the results exposed before. Since such an inter-site differences was no completely confirmed in September, winter (e.g. March) appears to be more appropriate season for observing differences in the extent of oxidative DNA lesions in this sentinel flatfish species.

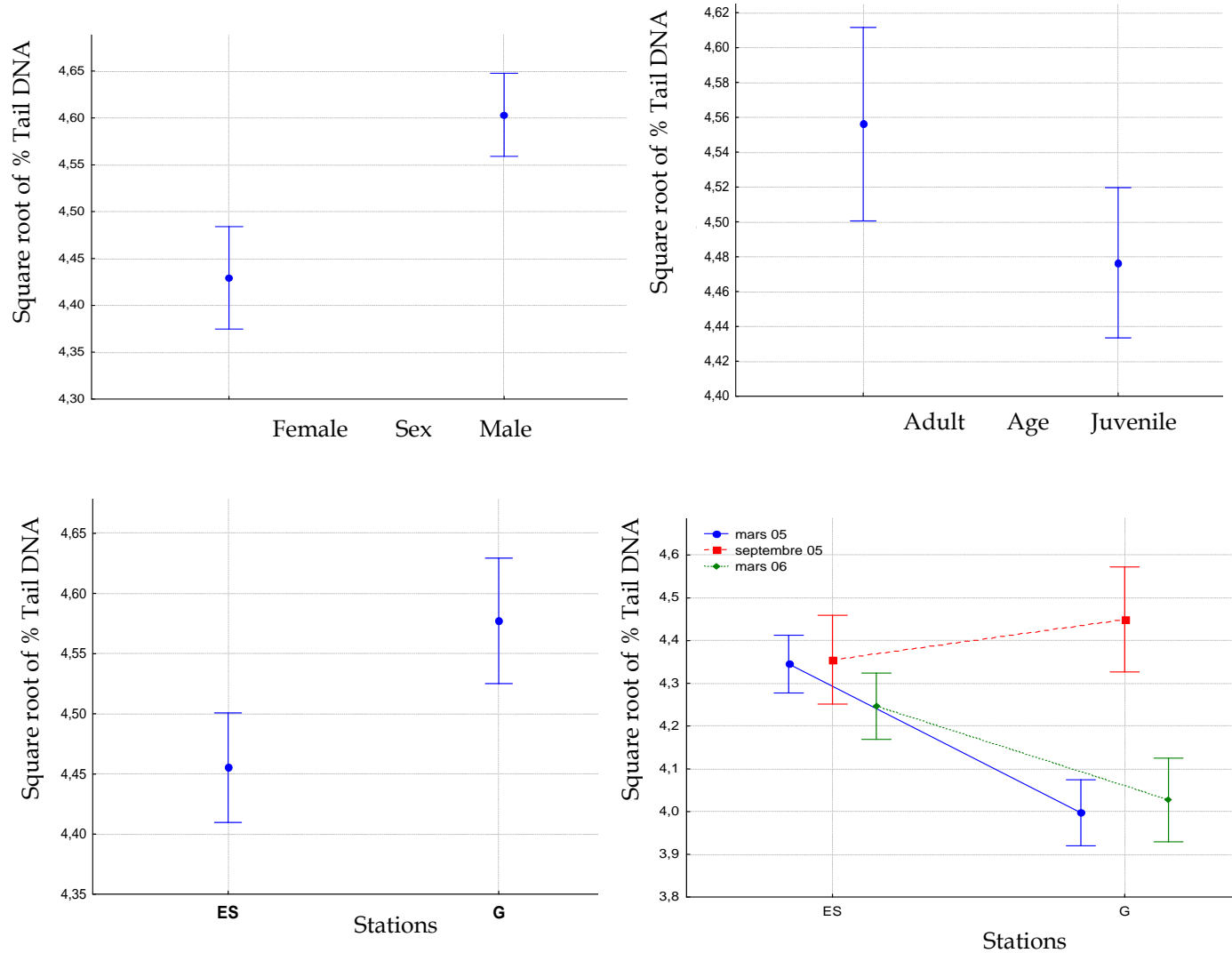


Figure 5: Mean square root of percent tail DNA measured in dab collected from the assessed area in 2005 and 2006. (A), (B), (C): global effects of the 'sex', 'age' and 'site' factors (respectively) during the September 2005 campaign. (D): interactions between the factors 'site' and 'season' for the female adult dabs collected during the 4 campaigns. Expressed as mean \pm SD.

EROD activity

The induction of cytochrome P4501A, assayed as EROD activity, showed significant differences in dab ($p < 0.01$). A Tukey comparison test indicated that EROD activities from dab from ES location were significantly higher than EROD activities in dab from granulates area ($p < 0.01$) (Figure 6A). This variability inter- and intra-site could be explained by an inter-individual variability already demonstrated [26, 45] since all factors (age, sex, site and season) are taken together. Nevertheless a global interpretation leads to confirm the influence of the Seine estuary mouth since the factor “site” is highly significant. Thus the measurement of the EROD activity appears sufficiently robust to determine the effect of the Seine plume after the integration of the whole factors. This result is in consistency with the analysis of PAH metabolites and DNA strand breakage.

When looking at a temporal effect (Figure 6B), this factor appeared to be very determinant ($p < 0.0001$). EROD activities measured in 2005 were lower than those measured in 2006 ($p < 0.01$) as well as activities measured in September that were lower than those measured in March ($p < 0.0001$). In 2006 the highest EROD activities were related to the concentrations of PAH in tissues and to the levels of PAH metabolites. 2005 was an atypical year because measures of EROD activities were higher in September than in March. However this atypical profile was related to the profile of DNA strand breaks (Figure 5D).

Besides EROD activities were higher for adults rather than for juveniles for both sexes. Differences between the two sexes were not significant for the adults. However within the same sex differences were observable between juveniles and adults. Males and females exhibited higher EROD activities when they were adults ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). Males presented a higher sensibility to EROD activities. The effort for reproduction as well as the elimination of bioaccumulated contaminants during spawning [42] could explain the less sensitivity toward EROD activity in female dabs. On the contrary they appeared more sensible at the juvenile age (Figure 6C)

The combination of sex and age effects was in this study very significant for adults ($p < 0.0001$). The study of sex and age effects is representative of the dab population dynamics. The studied factors following on the variations of the EROD activity represent the metabolic effort done by the population for adaptation.

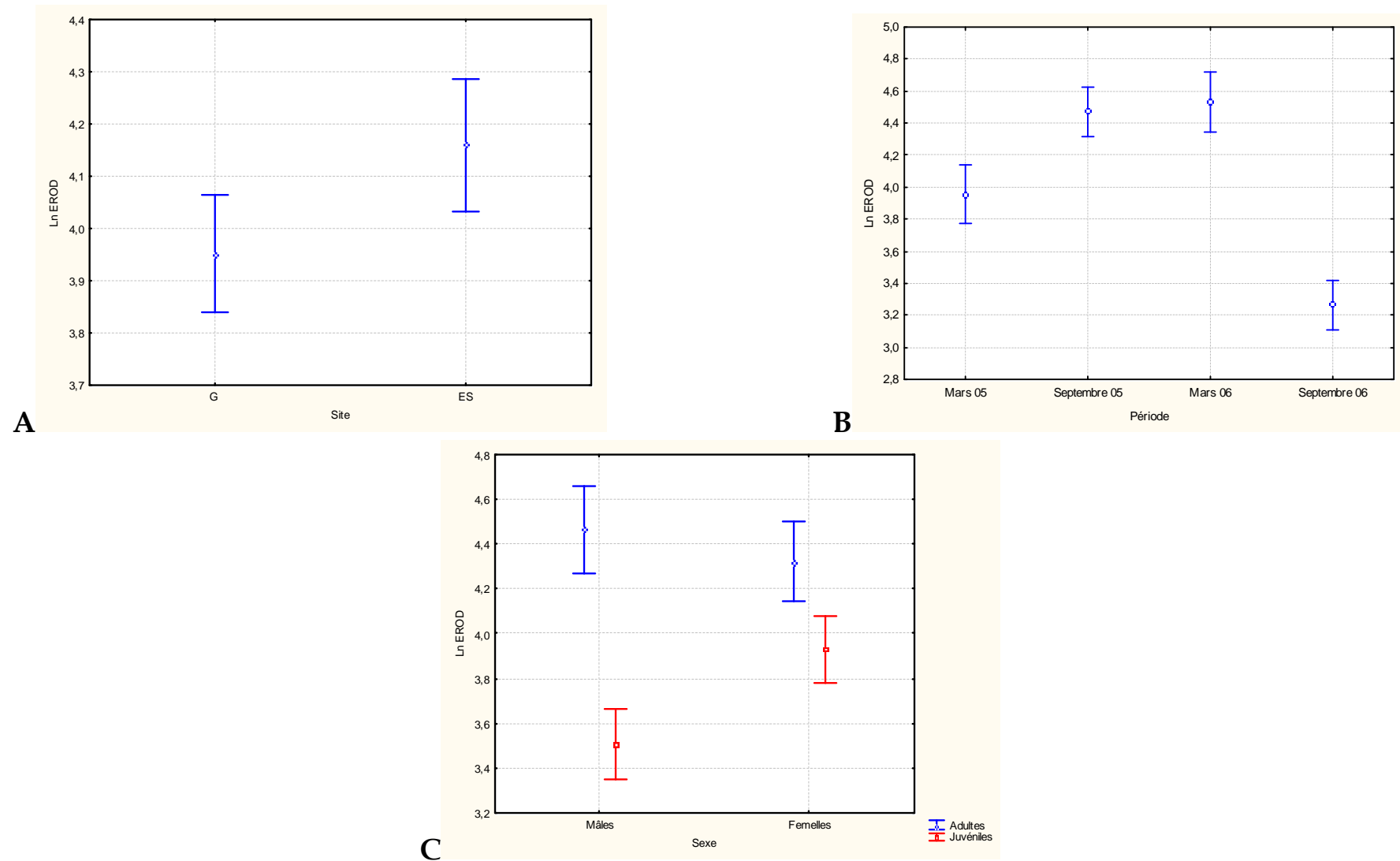


Figure 6: EROD activity (log) measured in dab collected from the assessed area in 2005 and 2006. (A), (B), (C): global effects of the 'site', 'season' and 'age/sex' factors (respectively) during the 4 campaigns. Expressed as mean \pm SD.

Interactions between biomarkers

To assess statistical interactions between biomarkers levels (PAH metabolites, EROD activity and DNA strand breaks), correlation analyses were undertaken on whole datasets (all seasons, field sites and groups of dabs combined together). Two observations were particularly interesting. The first one was the absence of correlation between EROD activities and PAH metabolites (OHPhe, 1-OHP or OH-PAH). Even though PAH metabolites indicated an exposure to PAH and even though EROD activities were measured and discriminated the two locations this lack of interactions takes in for questioning. An alternative explanation may be that the two markers are independently influenced by the short-term (days) migratory movements of the dab population within the Seine estuary. Biliary metabolites formation has been shown to respond over much shorter time scale than CYP1A1 induction. Several studies have reported the formation of detectable metabolites within hours (between 4 and 24h) after the exposure [46-49]. This rapid response coupled to the short persistence of metabolites in feeding fish [50] may give greater discrimination in estuarine monitoring. In contrast to metabolites, the time scale of maximum CYP1A1 induction under experimental exposure has been shown to be between 2 and 5 days and the return to control levels appeared between 4 and 7 days [51, 52]. Therefore this work tends to prove that fish caught from specific sample sites may more likely to reflect local contamination through their metabolite profile than through CYP1A1 induction. Besides others factors than migration can also influence the EROD activities such as the influence of multiple xenobiotic compounds (especially heavy metals and PCB) that do not influence the PAH metabolite profiles. The Seine estuary is well known for its multiple contamination sources and this can also explain the lack of correlation between the two markers. Looking at other interactions, DNA strand breaks were positively correlated with total sum of OH-PAH ($p < 0.00002$, $n = 38$), 1-OHP ($p < 0.002$, $n = 38$), and OHPhe ($p < 0.03$, $n = 38$). As stated before, PA metabolites have been detected in dab bile collected during this survey, even if the levels were very low. Thus the exposure of dabs to PAH has been demonstrated. Besides PAH are known to be priority contaminants in the environmental surveys due to the carcinogenic and mutagenic properties of some of them. These properties have been well documented in the literature [53-63]. In parallel genotoxic effects have been observed in collected dabs at the cellular level (activation of the enzymatic system CYP1A1 that catalyzes the biotransformation processes) and at the sub-cellular level (DNA stand breaks).

Thus the whole results of this field study in the Seine Estuary showed that the chemical contamination of the environment was directly linked to genotoxic effects and that it explained the observed damages. Consequently, the biotransformation of PAH would explicate in part the Genotoxicity observed, that could not be done by the bioaccumulation of PAH

Acknowledgements: The authors wish to thank the National Program for Ecotoxicology (PNETOX), the French Minister of Environment and the research team IMOPHYS (Integration of molecular and physiologic responses to organic contaminants in coastal area) for research fundings. They want also to acknowledge the "Region Aquitaine" and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

1. Rudolph, A. and Rudolph, M. I. 1999. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **63**: p. 639-645.
2. Fossi, M. C., *Biomarkers: Strumenti Di Diagnosi E Prognosi Ambientale.*, ed. Press, R.E. 2000, Florence, Italy. 135 pp.
3. Kammann, U. 2007. *Environmental Science and Pollution Research* **14**(2): p. 102-108.
4. Johnson, L. L., Ylitalo, G. M., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Stafford, C., Bolton, J. L., Buzitis, J., Anulacion, B. F., and Collier, T. K. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **124**(1-3): p. 167-194.
5. Hanson, N. and Larsson, A. 2007. *Journal of Environmental Monitoring* **9**(2): p. 168-173.
6. Wang, X., Mu, J., Wang, S., Lin, J., and Hong, H. 2006. *Aquatic Ecosystem Health and Management* **9**(1): p. 49-53.
7. Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., and Schiedek, D. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 479-487.
8. Sturve, J., Balk, L., Adolfsson-Eric, M., Lindstrom, P., Holmqvist, I., Parkkonen, J., Albertsson, E., Carney-Almroth, B., and Forlin, L. 2006. *Marine Environmental Research* **62**(SUPPL. 1).
9. Pikkarainen, A. L. 2006. *Chemosphere* **65**(10): p. 1888-1897.
10. Inzunza, B., Orrego, R., Penalosa, M., Gavilan, J. F., and Barra, R. 2006. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(2): p. 242-251.
11. Fragoso, N. M., Hodson, P. V., and Zambon, S. 2006. *Environmental Monitoring and Assessment* **116**(1-3): p. 481-511.
12. Barra, R., Sanchez-Hernandez, J. C., Orrego, R., Parra, O., and Gavilan, J. F. 2001. *Chemosphere* **45**(4-5): p. 439-444.
13. van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): p. 57-149.
14. Vuontisjärvi, H., Keinänen, M., Vuorinen, P. J., and Peltonen, K. 2004. *Polycycl. Aromat. Compd.* **24**: p. 333-342.
15. Ruddock, P. J., Bird, D. J., McEvoy, J., and Peters, L. D. 2003. *The Science of The Total Environment* **301**(1-3): p. 105-117.
16. OSPAR, *Jamp: Guidelines for Contaminant-Specific Biological Effect Monitoring.*, Commission, O.O.a.P., Editor. 2005: London, UK.
17. Eggens, M. L., Opperhuizen, A., and Boon, J. P. 1996. *Chemosphere* **33**(8): p. 1579-1596.
18. Budzinski, H., Mazéas, O., Tronczynski, J., Desaunay, Y., Bocquene, G., and Claireaux, G. 2004. *Aquat. Living Resour.* **17**: p. 329-334.

19. Richardson, D. M., Gubbins, M. J., Davies, I. M., Moffat, C. F., and Pollard, P. M. 2004. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **17**(2): p. 79-85.
20. Schanke, A. v., Holtz, F., der Meer, J. v., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., den Berg, M. v., and Everaarts, J. M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): p. 1641-1647.
21. Mitchelmore, C. L. and Chipman, J. K. 1998. *Mutation research* **399**: p. 135-147.
22. Neff, J. M., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. 1979, London: Applied Science Publishers Ltd. 262.
23. Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C., and Garrigues, P. 1997. *Marine Chemistry* **58**(1-2): p. 85-97.
24. Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., and Tillitt, D. E. 2000. *Critical Reviews in Toxicology* **30**(4): p. 347-570.
25. Abarnou, A., Loizeau, V., Cugier, P., Le Guellec, A. M., and Ménesguen, A. *Modélisation De La Bioaccumulation: L'exemple Des Pcb Dans Le Réseau Trophique Du Bar En Estuaire De Seine*. in *Modelisation en écologie, Actes Colloque PNETOX*. 2000. Paris.
26. Galgani, F., Bocquené, G., Lucon, M., Grzebyk, D., Letrouit, F., and Claisse, D. 1991. *Marine Pollution Bulletin* **22**(10): p. 494-500.
27. Jaouen, A., Abarnou, A., Loizeau, V., Le Guellec, A. M., Le Boulanger, F., and Minier, C., *Non Ortho and Ortho Pcb and Pah in Food Webs from the Seine Estuary*, in *9th Annual meeting of SETAC-EUROPE*. 1999: Leipzig.
28. Tronczynski, J., Munsch, C., and Moisan, C. 1999. *Fascicule Seine-Aval* **12**.
29. Akcha, F., Leday, G., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2004. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **552**(1-2): p. 197-207.
30. Akcha, F., Vincent Hubert, F., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2003. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **534**(1-2): p. 21-32.
31. Deniel, C. and Tassel, M. 1986. *Cybiurn* **10**: p. 155-176.
32. Budzinski, H., Letellier, M., Garrigues, P., and Le Ménach, K. 1999. *J. Chromatogr. A* **837**(1-2): p. 187-200.
33. Baumard, P. and Budzinski, H. 1997. *Analisis* **25**: p. 246-252.
34. Baumard, P., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1997. *Fresenius J Anal Chem* **359**(6): p. 502-509.
35. Mazeas, L. and Budzinski, H. 2002. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **82**(3): p. 157-173.
36. Le Dù - Lacoste M and Budzinski H. Submitted. *Anal Bioanal Chem*.
37. Mazéas, O., Budzinski, H., and Tronczynski, J. Submitted. *Marine Pollution Bulletin*.
38. Le Dù - Lacoste M, Peluhet L, LeMenach K, Desaunay Y, Laroche J, and Budzinski H. Submitted. *Aquatic Living Resources*.

39. Solbakken, J. E. and Palmork, K. H. 1981. *Comparative Biochemistry And Physiology. C: Comparative Pharmacology* **70**(1): p. 21-26.
40. Krahn, M. M., Burrows, D. G., Ylitalo, G. M., Brown, D. W., Wigren, C. A., Collier, T. K., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1992. *Environ Sci Technol* **26**: p. 116-126.
41. RNO, *Surveillance Du Milieu Marin. Travaux Du Rno.*, in *Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable*. 2006.
42. Loizeau, V., Abarnou, A., Cugier, P., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A. M., and Menesguen, A. 2001. *Marine Pollution Bulletin* **43**: p. 242-255.
43. Peters, L. D. and Livingstone, D. R. 1995. *Marine Environmental Research* **39**: p. 5-9.
44. Sleiderink, H. M., Beyer, J., Scholten, E., Goksoyr, A., Nieuwenhuize, J., Liere, J. M. V., Everaarts, J. M., and Boon, J. P. 1995. *Aquatic Toxicology* **32**: p. 189-209.
45. Stegeman, J. J. and Lech, J. J. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 101-109.
46. Le Dû - Lacoste M, Morin B, Akcha F, Burgeot T, and Budzinski H. Submitted. *Aquatic Toxicology*.
47. Varanasi, U., Reichert, W. L., and Stein, J. E. 1989. *Cancer Research* **49**(5): p. 1171-1177.
48. Varanasi, U. and Gmur, D. J. 1981. *Aquatic Toxicology* **1**(1): p. 49-67.
49. Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., and Andersen, O. K. 2000. *Aquatic Toxicology* **51**(2): p. 241-258.
50. Niimi, A. J. and Palazzo, V. 1986. *Water Research* **20**(4): p. 503-507.
51. Collier, T. K. and Varanasi, U. 1991. *Archives of environmental contamination and toxicology* **20**(4): p. 462-473.
52. Stagg, R. M., Rusin, J., McPhail, M., McIntosh, A. D., Moffat, C. F., and Craft, J. 2000. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: p. 2797-.
53. Arkoosh, M., Casillas, E., Clemons, E., Huffman, P., Kagley, A., Collier, T., and Stein, J. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 470-471.
54. Arkoosh, M. R., Clemons, E., Huffman, P., Sanborn, H. R., Casillas, E., and Stein, J. E. 1996. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(7): p. 1154-1162.
55. Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L. L., Rhodes, L. D., Collier, T. K., Stein, J. E., McCain, B. B., and Varanasi, U. 1991. *Marine Environmental Research* **31**(2): p. 99-122.
56. Johnson, L., Casillas, E., Sol, S., Collier, T., Stein, J., and Varanasi, U. 1993. *Marine Environmental Research* **35**(1): p. 165-170.
57. Johnson, L. L., Collier, T. K., and Stein, J. E. 2002. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **12**(5): p. 517-538.
58. Johnson, L. L., Landahl, J. T., Kubin, L. A., Horness, B. H., Myers, M. S., Collier, T. K., and Stein, J. E. 1998. *Journal of Sea Research* **39**(1): p. 125-137.

-
59. Johnson, L. L., Stein, J. E., Collier, T. K., Casillas, E., and Varanasi, U. 1994. *The Science of the Total Environment* **141**(1): p. 241-260.
 60. Myers, M. S., French, B. L., Reichert, W. L., Willis, M. L., Anulacion, B. F., Collier, T. K., and Stein, J. E. 1998. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): p. 197-202.
 61. Myers, M. S., Johnson, L. L., Hom, T., Collier, T. K., Stein, J. E., and Varanasi, U. 1998. *Marine Environmental Research* **45**(1): p. 47-67.
 62. Rice, C. A., Myers, M. S., Willis, M. L., French, B. L., and Casillas, E. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 527-533.
 63. Stein, J. E., Reichert, W. L., Nishimoto, M., and Varanasi, U. *32p-Postlabeling of DNA: A Sensitive Method for Assessing Environmentally Induced Genotoxicity*. 1989. Seattle, WA, USA: Publ by IEEE.

Publication n°9**Preliminary assessment of biliary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Metabolites in fish from Guanabara Bay, Brazil.**

M. F. G. Meniconi^a, M. Le Dû-Lacoste^b, H. Budzinski^{b*}, D.A.M. da Silva^a and V. J. Fernandes Jr^c

^a PETROBRAS/CENPES, Research & Development Center, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b UMR 5255 CNRS – University Bordeaux I, Talence, France

^c Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Department of Chemistry, Natal, Brazil

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

Fish bile samples collected from several sites located in the Guanabara Bay (Brazil) were analyzed for 12 hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH). The mean concentrations of total OH-PAH in fish bile were 30.7, 48.7, 75.6 and 15.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile for Boa Viagem, Botafogo, Paquetá Island and Refinery, respectively. The results suggested that Paquetá Island was the area the most polluted by PAHs whereas the area near the refinery exhibits lower concentrations in OH-PAHs. Spatial differences in 1-hydroxypyrene and in hydroxyphenanthrene isomer concentrations demonstrate the usefulness of PAH metabolites in fish bile as monitoring parameter in marine regions. This work is the first study that assesses the exposure of fish to PAHs via the determination of OH-PAHs in bile in the Guanabara Bay, which is known to be quite highly polluted.

Keywords: hydroxylated PAH metabolites, fish bile, Guanabara Bay

Submitted to Chemosphere

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are present in worldwide aquatic environmental ecosystems [1] and their monitoring has been extensively performed in different matrices such as water, sediments, soil, atmospheric particulate matter and biota tissues. These compounds may be introduced into the environment by many different mechanisms, including natural and anthropogenic processes [2-11]. The sources of naturally occurring PAHs include natural fires, natural oil seepage and recent biological or diagenetic processes. Anthropogenic sources of PAHs are from direct runoff and discharges and indirect atmospheric deposition, such as wastes and releases/spills of petroleum and derivatives, river and sewage outfalls, maritime transport, pipelines and combustion or pyrolysis of organic matter such as petroleum, coal, wood.

Additional concern over the potential PAH effects on the aquatic organisms [12-17] has led to complementary and crucial studies on the bioaccumulation, biotransformation and elimination of these compounds in organisms, in order to have a comprehensive understanding of the environment contamination and bioavailability and toxicity of those compounds [1, 18]. For that purpose, the organism (especially fish) exposure measurement through biliary PAH metabolites has been shown to be more efficient and appropriate rather than the parent PAH analysis into organism tissues [17, 19-24]. Depending on the organism ability to metabolize PAHs, the PAH congeners in the tissues will be usually detected in minor concentrations for these compounds are biotransformed into hydrophilic metabolites, being secreted into the bile and subsequently excreted into the excretion fluids (or alimentary tract).

In the present study, PAH metabolites in fish bile have been preliminarily investigated in Guanabara Bay, located in Rio de Janeiro, Brazil, in order to evaluate, at a short glance, the exposure of fish within a highly urban and industrialized ecosystem that receives intense chronic anthropogenic pollution and was the scene of an oil spill of 1,300 m³ of marine heavy fuel oil in January 2000 [25-27]. This study sought to quantify, by using GC-MS analysis, individual PAH metabolites in fish bile samples collected in 3 campaigns over the months of February, March and April 2006, along 2 regions of the bay, one at the entrance of the bay, with a relative higher renewable hydrodynamic energy and heterogenic hydrocarbon contamination, and the other in the inner part of the bay, in shallow waters with low hydrodynamics and high hydrocarbon contamination. Potential metabolites of priority PAHs listed by the US-EPA (United States Environmental Protection Agency) have been chosen for their interest in environmental surveys [28]. Their developed chemical structure is presented in Figure 1.

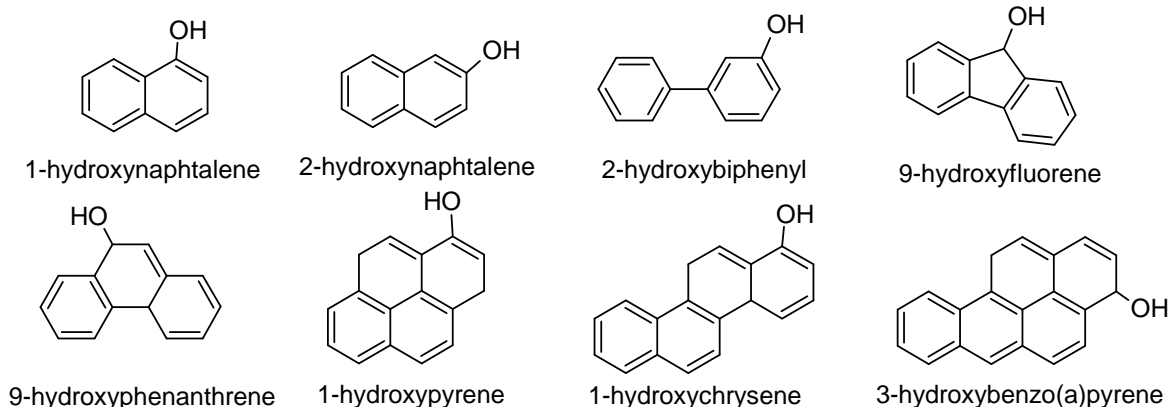


Figure 1: The studied hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites (OH-PAH). Only one isomer of hydrophenanthrene is presented here.

Material and Methods

Chemicals, solvents and reagents

1-hydroxynaphthalene (1-OHN) and 2-hydroxynaphthalene (2-OHN) were purchased from Lancaster (Bischeim, France); 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and 9-hydroxyphenanthrene (9-OHPhe), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d₉ (1-OHPd₉) and pyrene-d₁₀ (Pd₁₀) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Sainte Foy la Grande, France). All the standards were of analytical grade (>90%). Stock standard solutions were prepared, on the one hand in dichloromethane (DCM) (stored at -20°C) and on the other hand in methanol (MeOH) (stored at 4°C). All the solvents used were of analytical grade. Dichloromethane was provided by Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Methanol Supersolv was provided by VWR international (Strasbourg, France) and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) was obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) and β-glucuronidase-aryl-sulfatase mixtures from *Helix pomatia* (100,000 and 7,500 units/ml respectively) were provided by Sigma Aldrich (St Quentin Falavier, France). 2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Mili-Q system (Millipore, Molsheim, France). Two solid-phase extraction (SPE) cartridges were used the Strata-X cartridge (3 cc, 200 mg) from Phenomenex (Le Pecq, France) and the HF Bond Elut-PSA cartridge (3 cc, 500 mg) from Varian and provided by Atlantic Labo (Eysines, France).

Area of study

The anthropogenic input of the bay is the resultant of municipal sewage (disposal) outfall, usually with minimal or no treatment, urban runoff and industrial waste from the country's second largest city, with almost 10 million people and about 14000 industries, 14 oil terminals, 2 commercial ports, 32 dock yards, more than 1000 gas stations and 2 refineries [29, 30]. The annual inflow results (ends up) to be about 6.6 tons of hydrocarbons into the bay [29]. 50% of this inflow is due to the municipal sewage (17 m³.s⁻¹) while 27% corresponds to the urban run off. The bay has a water surface area of approximately 400 km² and about 46% of it corresponds to a shallow area of up to 5 m (Figure 2). However the average flushing time of 50% of the bay water is about 11 days [31]. Spread along the shallow north

and northeast regions of the bay there are approximately 350 fish traps, which support the local artisanal fishery activity (Figure 2). Until the year 2000, the scientific literature reported only a few data in terms of hydrocarbon concentration in the Guanabara Bay sediments, based mainly upon academic studies. The PAH range was found heterogenic throughout the bay. Chalaux detected PAH concentrations varying from 1,051 to 5,861 ng.g⁻¹ [32]. Hamacher observed lower levels for these compounds, in the range of 554 to 1,894 ng.g⁻¹ [33]. On the other hand, Lima detected PAH concentrations from 1,564 to 18,438 ng.g⁻¹ [34].

In relation to the oil spill accident, on 18 January 2000, approximately 1,300 m³ of marine fuel oil (MF-380) were released into the Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil, as a consequence of a pipeline rupture at the Duque de Caxias Refinery. The main portion of the oil, carried along by tidal currents and wind, reached the beaches and some islands in the northern and northeastern parts of the bay. Mangroves in the vicinity of the spill emission point were also affected. Immediately following the oil spill response, 22 water and 57 sediment samples were collected from the Guanabara Bay area [25-27, 35]. Based on the results of this diagnostic study, no significant impact on the intertidal sediments, water column and fish tissue of Guanabara Bay was observed due to the oil spill.

The concentrations of the Σ 16 PAHs and alkylated naphthalenes for 21 sediments collected along the bay in 2000, immediately after the oil spill accident, varied significantly, ranging from 304 to 16,808 ng.g⁻¹ dry weight (median concentration: 2348 ng.g⁻¹) [26]. In spite of the different compounds considered in each work, previous reported data for the studied area, varying from 554 to 18,438 ng.g⁻¹ [32-34], have shown a similar range to the study after the accident, revealing no important influence of the spill on the contamination of the bay sediments. The concentration of PAHs in the bay was also found to be in the range of other estuarine and coastal regions in the world under anthropogenic influence [2, 9, 36-41].

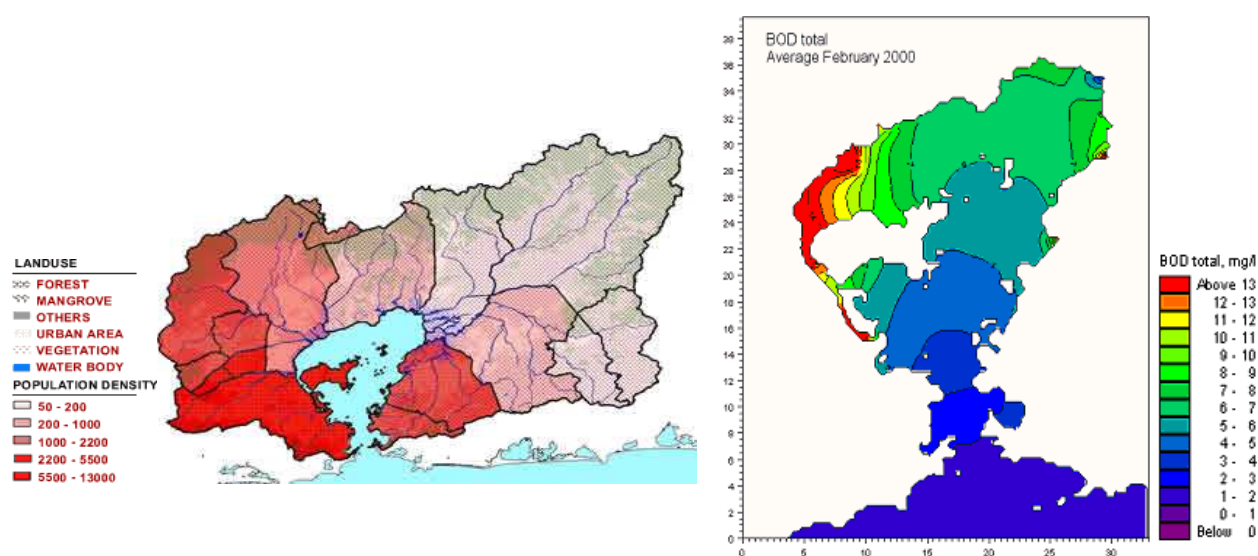


Figure 2: The Guanabara Bay through the population distribution (A) and the water conditions (B). Blue means clean water. Red means much polluted water. Other colors show the variation between these two extremes.

Sampling design and collection

The aim of this study was to quantify individual biliary PAH metabolites present in 4 different fish species (*Genidens genidens*, *Micropogonias furnieri*, *Cylichthys spinosus*, *Ctenoscianea gracilicirrhus*) collected in Guanabara Bay over the months of February, March and April of 2006 in order to preliminary assess the exposure to PAHs in the bay. Bottom trawling was carried out with a single net of 20 mm mesh, during 50 minutes, in order to collect the fish. The two areas of interest were chosen to represent different water qualities of the bay. Thus the inner stations are representative of a more contaminated region with low hydrodynamic energy and high eutrophication processes. The first station is located near the refinery and in the mouth of the oil spill of January 2000 (Dentro-Refinery (DR)). The other inner station is located near the mangrove area in which water is more stagnating and brackish (Dentro-Paquetá (DP)). On the other hand, stations located at the entrance of the bay (Botafogo (BF) and Boa Viagem (BV)) have higher hydrodynamic energy with a hydrocarbon contamination varying from low to high (Figure 3).

The collected fish were transported to the laboratory in ice in thermal boxes. Each fish was then identified, measured and the bile was removed, transferred to eppendorf flasks and immediately frozen into liquid nitrogen and then stored at -80°C until analysis.

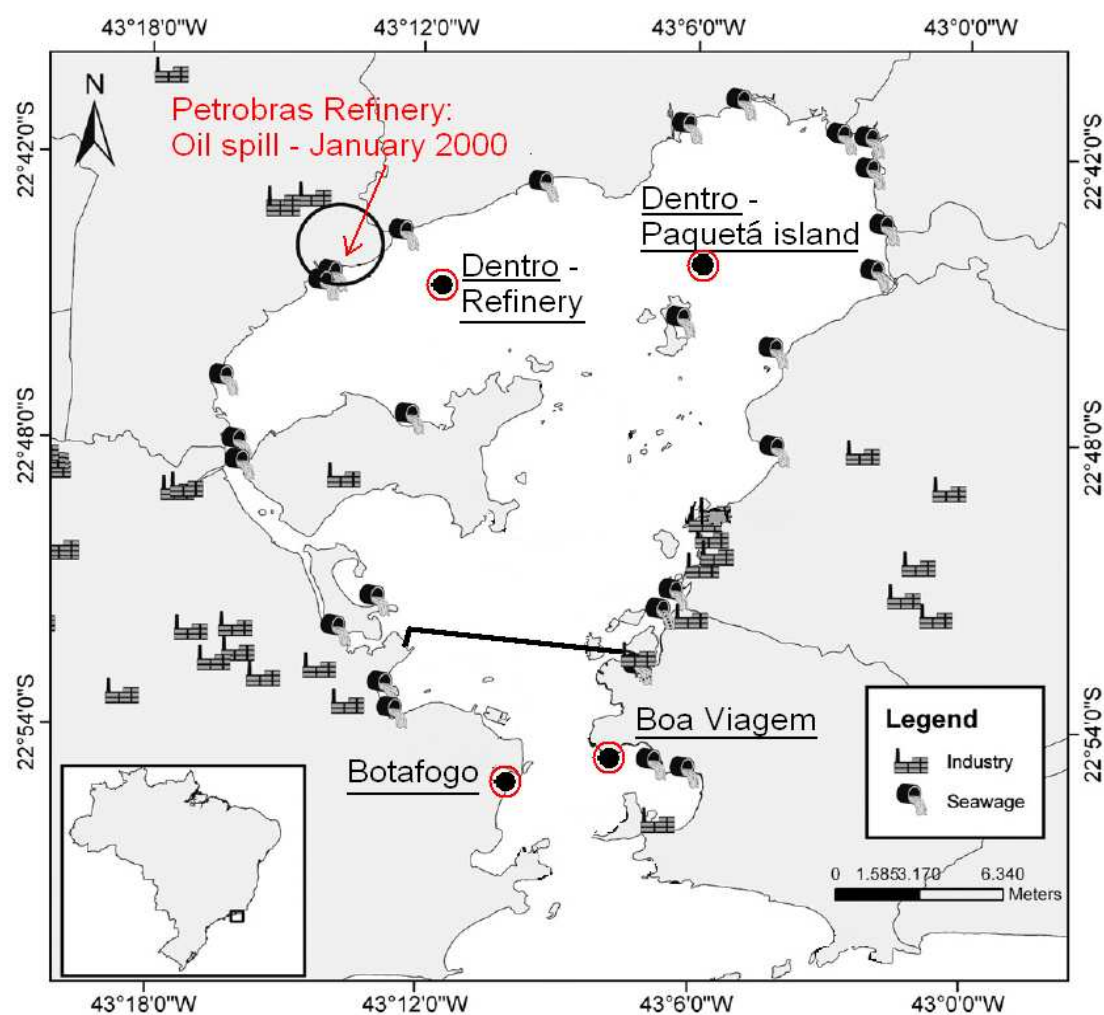


Figure 3: Geographical location of the fish collection areas in Guanabara Bay for biliary PAH metabolites analysis. *Dentro - Refinery: DR; Dentro - Paquetá Island: DP; Boa Viagem: BV; Botafogo: BF.*

Sample preparation

Bile samples were pooled when there was an insufficient volume for individual analysis (Table 1). They were prepared according to a previously established protocol (Le Dû-Lacoste and Budzinski, submitted). The weighed whole bile was thawed and then homogenized in precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid) (100 µl of bile: 2 ml buffer). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d₉, 20 µl of mercaptoethanol, used as antioxidant, and 20 µl of β-glucuronidase and arylsulfatase mixture were added to the samples. They were then placed at 37°C in an oven for 18 hours for hydrolysis. Glass vials were used for the deconjugation step to avoid adsorption phenomena on inner surface.

After deconjugation the bile samples were ultrasonicated and centrifuged (10 min, 5 000 rpm, 20°C). Solid-phase Strata X cartridges were preconditioned with 2 ml of methanol and 4 ml of buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml of buffered water and 2 ml of water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. The extracts were reduced to dryness under a nitrogen stream and redissolved in 1 ml of methanol/methylene chloride (20/80, v/v) before purification.

Solid-phase HF PSA Varian cartridges were used for the purification step. Before loading the redissolved extracts into methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the cartridges were first preconditioned with 2.5 ml of methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. The extracts were reduced to dryness under a nitrogen stream, redissolved in 50 µl of dichloromethane and 30 µl of a derivatizing agent (BSTFA) were finally added. The derivatization was then completed by incubation at 65°C for 30 min.

After derivatization and before GC-MS analysis, a solution of deuterated internal standard (pyrene-d₁₀, 20 µl) was added to the sample for recovery determination.

GC-MS Analysis

The analyses were carried out with an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies, both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). The separation was performed on an Agilent Technologies HP5-MS capillary column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethylsiloxane), with the following oven parameters: from 70°C (2 min) to 180 °C (1 min) at 5°C.min⁻¹ from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C.min⁻¹. The injection volume was set at 1 µl (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min)), while the injector temperature was set at 250°C and the interface temperature at 280°C. The purge flow was set at 60 ml/min for 1.5 min and helium 6.0 (Linde, Bassens, France) was used as the carrier gas (constant flow: 1 ml.min⁻¹). Acquisition was performed in selected ion monitoring (SIM), with 1.53 scan/s and a dwell time of 50 ms for each ion. The source temperature was set at 150°C, and the electron multiplier voltage set at 2,000 V.

The compounds were quantified in SIM mode using the ions below: 1-hydroxynaphthalene (m/z=201), 2-hydroxynaphthalene (m/z=216), 2-hydroxybiphenyl (m/z=211), 9-hydroxyfluorene (m/z=165), 9-hydroxyphenanthrene and isomers (m/z=266), 1-hydroxypyrene (m/z=290), 1-hydroxychrysene (m/z=316) 3-hydroxybenzo(a)pyrene (m/z=340) and 1-hydroxypyrene-d₉ (m/z=299), pyrene-d₁₀ (m/z=212).

A mixture of the standard metabolites, 1-hydroxypyrene-d₉, and pyrene-d₁₀ in dichloromethane was injected, after derivatization, at the beginning and at the end of each sequence for the determination of response factors.

Table 1: Individual PAH metabolites concentration in fish bile samples. Concentrations expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile. Mean \pm SD when it is precise. ND: not determined ($<$ LOD [42])

Location	Dentro - Paqueta island			Dentro - Boa Paqueta island		Boa Viagem Refinery		Boa Viagem	Botafogo
Specie	<i>Genidens genidens</i>			<i>Micropogonias furnieri</i>		<i>Cylichthys spilostylus</i>		<i>Ctenoscianea gracilicirrhus</i>	
Date	February 2006 (n = 3)	March 2006 (n = 2)	April 2006	March 2006	April 2006	March 2006 (n = 2)	April 2006 (n = 3)	April 2006	
1-OHN	0.9 \pm 1.3	1.1 \pm 1.0	1.2	18.9	3.4	0.3 \pm 0.2	1.3 \pm 1.1	2.5	
2-OHN	15.4 \pm 2.9	3.8 \pm 1.2	ND	2.2	ND	0.3 \pm 0.04	0.7 \pm 0.4	1.9	
2-OHBi	33.7 \pm 1.0	15.9 \pm 8.6	ND	10.3	ND	1.2 \pm 0.2	1.9 \pm 2.9	10.0	
9-OHFe	19.1 \pm 5.3	11.8 \pm 0.3	ND	6.3	ND	0.8 \pm 0.3	2.9 \pm 6.5	8.5	
4-OHPhe	3.8 \pm 1.9	0.8 \pm 1.1	1.5	2.2	ND	0.3 \pm 0.2	0.1 \pm 0.3	0.7	
9-OHPhe	ND	1.1 \pm 1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
3-OHPhe	ND	ND	ND	ND	ND	0.3 \pm 0.5	3.9 \pm 4.1	ND	
1-OHPhe	36.1 \pm 26.9	13.2 \pm 2.8	7.5	18.0	ND	3.4 \pm 1.4	7.6 \pm 5.3	ND	
2-OHPhe	19.6 \pm 13.7	14.2 \pm 3.3	ND	5.7	ND	1.3 \pm 0.05	3.3 \pm 3.0	5.2	
1-OHP	11.6 \pm 3.8	11.5 \pm 4.2	2.8	10.1	9.2	7.4 \pm 1.5	27.2 \pm 5.3	20.0	
1-OHC	1.2 \pm 2.3	1.1 \pm 2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
3-OHBaP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
sum OHPhe	59.5 \pm 39.8	29.3 \pm 8.8	8.9	26.0	ND	5.2 \pm 2.1	14.9 \pm 6.7	5.9	
sum OHPAH	141.4 \pm 38.9	74.5 \pm 0.6	12.9	73.7	12.6	15.2 \pm 1.2	48.8 \pm 12.5	48.7	

Quality Assurance (QA)

Quality assurance (QA) procedures included control of the method blank, analysis in triplicate and analysis of spiked bile samples for recoveries. For each series of analyses, the method blank was performed to control potential contamination. The analysis in triplicate was very difficult because of the low amount of bile (< 5 µl) obtained from each fish. Pools were made to homogenize sample volumes. Nevertheless some analyses were performed in only one replicate.

Moreover no certified material is available for PAH metabolites in fish bile. Therefore to control the validity of the methodology, spiked bile samples were prepared from trout bile (obtained from the fishing farm "Ferme aquacole Le Moulin de la Cassadote", Biganos, France). A standard solution of metabolites in methanol was added to bile samples which were then analyzed according to the protocol defined above. Three levels of spiked concentrations were tested (1, 100 and 1,000 ng.g⁻¹). The recoveries obtained for the compounds ranged from 71 (for 3-OHBaP) to 101 % (for 1-OHP) with SD < 10 % (n=3). The limits of detection obtained for the compounds ranged from 18.5 pg.g⁻¹ of bile (for 1-OHPhe) to 411 pg.g⁻¹ (for 3-OHBaP) [42]. These results validated the quantitative methodology.

Results and Discussion

In this study 12 PAH biliary metabolites were studied and quantified in four fish species (*Genidens genidens*, *Micropogonias furnieri*, *Cylichthys spinosus*, *Ctenoscianea gracilicirrhus*) from Guanabara Bay, collected from the entrance (Boa Viagem and Botafogo) and internal region (Dentro-Refinery and Dentro-Paquetá) of the bay (Table 1). This study was made during three months: February, March and April 2006. The results are expressed in µg.g⁻¹ of bile. Furthermore because of the inconsistent correlations between biliary proteins and PAH metabolites [19] and also because of the poor correlations generally found for these parameters [43, 44], the results are presented as non-corrected concentrations. Caution has to be taken because of the few samples studied in this work. As a first and preliminary assessment this study gives only trends and information about the PAH exposure via the determination of biliary PAH metabolites.

The monthly survey in 2006 showed a broad range of concentration distribution in space and time for PAH metabolites (Table 1). Specie-specific differences in the ability to metabolize PAH [45] and the varying amounts of exposure to PAHs of the fish result in high standard deviations. The presence of PAH metabolites indicates exposure to PAHs and confirms that these species of fish are capable of taking up petrogenic contaminants discharged into seawater, directly from the water or from exposed food sources.

The highest concentration was found in DP in February 2006. In spite of being distant from the refinery and known contamination sources, the shoreline morphology and tidal current pattern seem to favor accumulation of contaminants in this part of the bay. Recent studies [19, 46] have shown that chronic inputs of oil residues increased relatively the concentrations of PAHs in the sediments of this area. Moreover the high nutrient availability in this mangrove area could stimulate the bioavailability of PAHs to organisms as well as the coarse grain size of sediments that contributes to an environment favoring oil weathering even in lower sediments layer [46]. Lower concentrations were found in March and April for the all other locations investigated. Botafogo (BF) and Boa Viagem (BV) are located at the entrance of the bay where the fast moving currents remove the sediments from the bay and transfer them to open water areas. This results in a better oxygenation of the water column but the intense sport and leisure boat traffic and maintenance contribute significantly to PAH pollution of this part of the Bay [47].

Generally speaking three levels of PAH metabolite concentrations have been measured. The highest level (141.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile) was found in DP in February. The medium level ranged between 74.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (at DP in March) and 48.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (at BF in April). Finally the lowest level of PAH metabolites was between 15.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (at DR in March) and 12.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (at BV in April). By comparison, Da Silva [19] reported higher PAH metabolites concentrations in fish from Sao Sebastiao Channel (Sao Paulo, Brazil). The PAH metabolites were analyzed by liquid chromatography coupled to a fluorescence detection method (HPLC-F) and they ranged from 96.4 to 525.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of bile.

Concerning the site Dentro-Paquetá the concentrations measured in March 2006 are similar among the different species studied. *Micropogonias furnieri* and *Genidens genidens* are two species that live in brackish waters and the mean concentrations of PAH metabolites found (74.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) were lower than the mean concentrations found for the same species in the Sao Sebastiao Channel [19]. A temporal effect seems also to be present in this area. From February to April, the mean concentrations have been divided by 10. This could be explained by a change in the water temperature that has been proved to influence the bioavailability of PAHs to organisms and also to modify the biotransformation processes leading to a decrease in metabolite production. This decrease in metabolite concentrations could also be due to changes in the lifestyle of fish (changes in feeding, spawning time or migration from other sites). Finally this could also be due to a punctual contamination of PAHs. During this first assessment, no sediment or water sample has been sampled. No correlation or explanation can be drawn from the measure of the contamination of the system.

When studying the distribution patterns of individual PAH metabolites in the total sum measured (Figure 4) the major metabolite is different depending on the location. At the site Dentro-Paquetá, OHPhe are predominant (from 35 to 69 %) whereas at the location called Boa Viagem 1-OHP is the major metabolite quantified (56 and 73 %). Near the refinery (Dentro-Refinery) the major metabolite is also the 1-OHP (48%). Nevertheless the fingerprint left by the OHPhe is persistent since their contribution is always at least of 30 %. Botafogo is an exception but the absence of replicate does not allow us to conclude with certainty.

By calculating the ratio of OHPhe towards 1-OHP (OHPhe/1-OHP) two cases can be distinguished: OHPhe/1-OHP > 2 and OHPhe/1OHP < 1. To link this ratio to a potential source of PAH contamination, several diagnostic ratios such as Phe/Ant [48], Fluo/Pyr [49], MPhe/Phe [50], Chrys/BaA [51] have been calculated for each sediment sample corresponding to the studied areas. Table 2 sums up the diagnostic tools obtained for all locations. As stated when the petrogenic origin is determined by PAHs in sediments, it is confirmed by OHPAH ratio in bile, as well as for pyrolytic sources. The closer diagnostic PAH ratio to OH-PAH ratio seems to be Phe/Ant. For most of the samples the diagnostic ratios point to the presence of a mixture of pyrolytic and petrogenic PAHs. Soclo [52] considered in their study that samples with Phe/Ant < 10 and Fluo/Pyr ≤ 1 contained a mixture of pyrolytic and petrogenic materials with strong pyrolytic input. In such a case, only the site Dentro-Paquetá exhibited a petrogenic origin of PAH contamination.

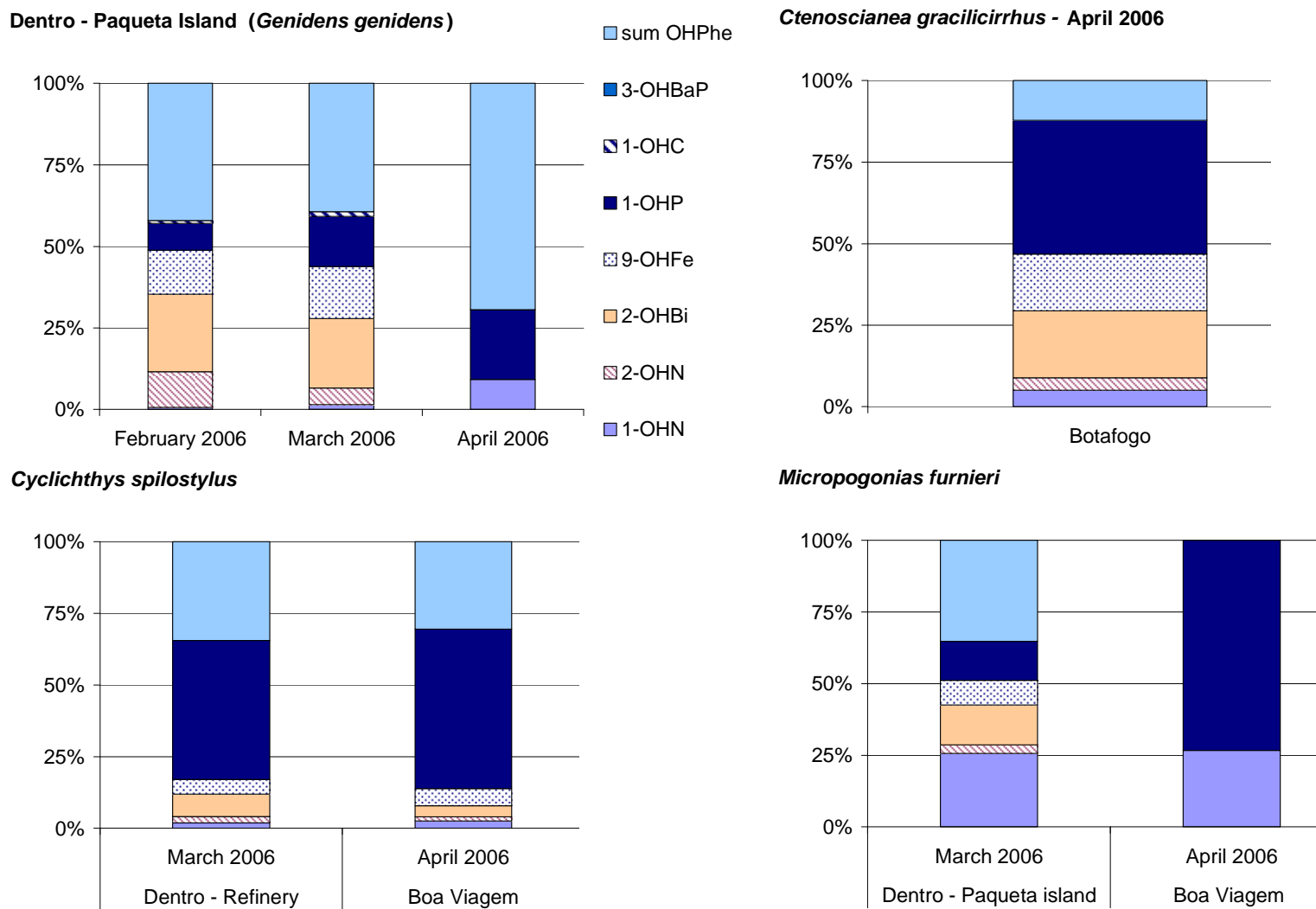


Figure 4: Composition (%) of hydroxylated metabolites in bile of demersal fishes collected in Guanabara Bay in February, March and April 2006.

Table 2: Diagnostic ratios indicative of petrogenic or pyrolytic origin for PAH.

Stations	Phe/Ant	Fluo/Pyr	Chrys/BaA	Σ C-Phe/Phe	OHPhe/1-OHP	Diagnostic
	< 10 Pyr > 15 Petr	> 1 Pyr < 1 Petr	< 1 Pyr > 1 Petr	< 2 Pyr > 2 Petr	< 10 Pyr > 15 Petr	
Dentro - Paqueta	26.2	0.5	1	0.2	3.4 *	Petrogenic
Dentro - Refinery	3	1.4	0.6	8.5	0.7	Pyrolytic
Boa Viagem	4.5	0.9	1	5.1	0.5	Pyrolytic
Botafogo	16.5	0.8	0.7	0.1	0.3	Pyrolytic

* mean value calculated for the 3 months survey

Good correlations were obtained between OHN, OHPhe and the total sum of OH-PAHs (Figure 5). Correlations were not as strong between 1-OHP and OHPhe and between 1-OHP and OH-PAH. These results show that petrogenic PAHs such as naphthalene and phenanthrene, are likely to be obtained from the same source, such as petroleum discharged into the channel. On the other hand, pyrene most likely has a source related to combustion and petroleum discharges that is unrelated to a specific source of PAHs [53].

The source of parent PAHs in the marine environment can be demonstrated by the relationship between OHPhe (or OHN) and 1-OHP (or OHBaP) in the bile. When OHPhe levels are high, a petrogenic source of PAHs is evident. Conversely, when BaP metabolites or/and pyrene metabolites are high, a pyrogenic source is predominate. Very few studies have tried to determine a diagnostic ratio based on PAH metabolites in bile to determine the origin of PAH contamination. Da Silva [19] gave a mean ratio of BaP/Phe equivalents of 0.05 for fish from the São Sebastião Channel. This ratio suggests that petrogenic PAH sources are the predominant contributors to total PAH in this region.

In this current study on fish from the Guanabara Bay the mean ratio of OHPhe/1-OHP was 3.4 ± 1.1 ($n = 7$). This value puts forward the theory that petrogenic PAH sources are prevalent in the Guanabara Bay. Two limits can be given for the diagnostic ratio: OHPhe/1-OHP > 2 for the petrogenic sources and OHPhe/1-OHP < 1 for the pyrolytic sources.

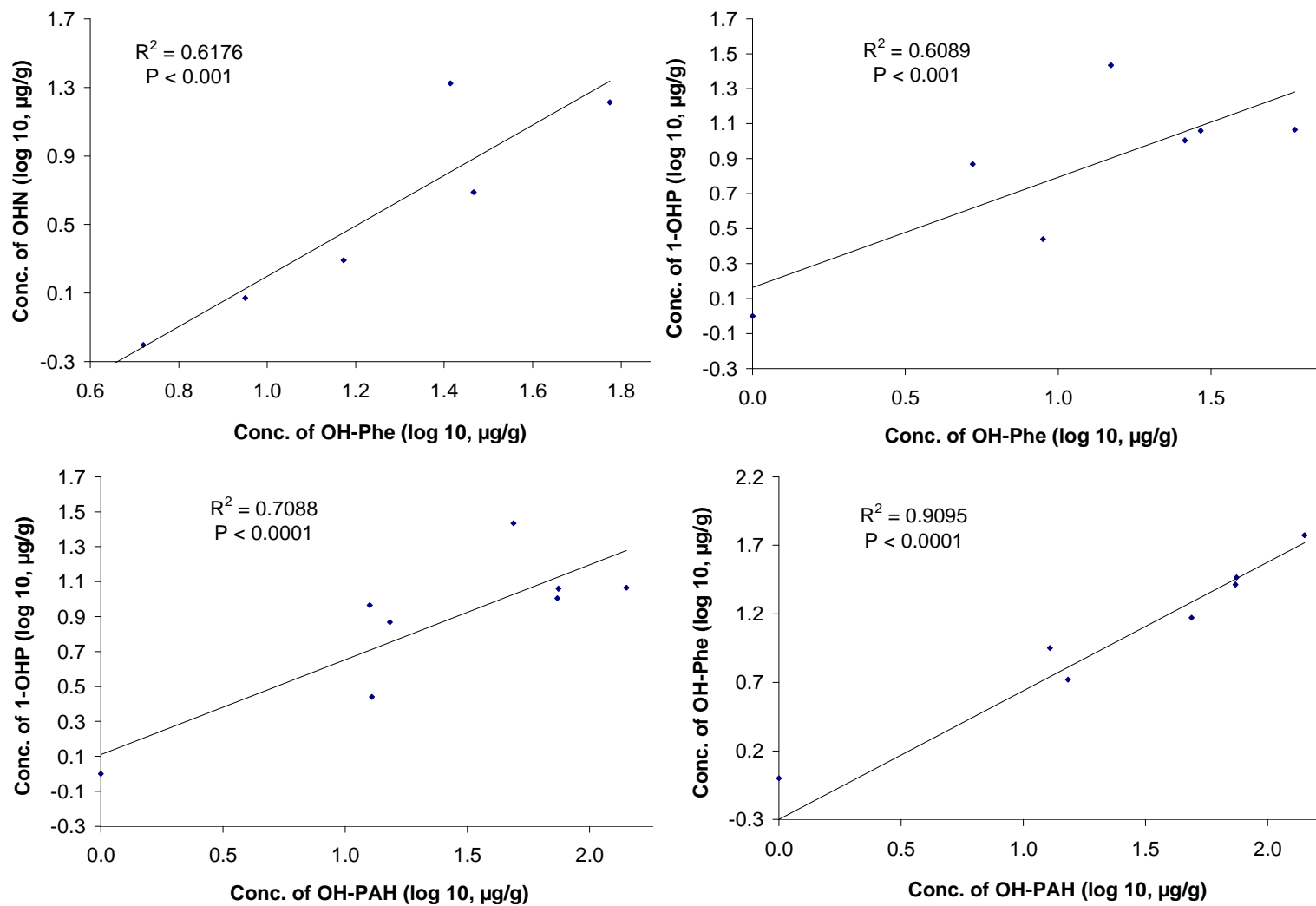


Figure 5: Correlation among log-transformed concentrations of PAH metabolites in bile of all samples from Guanabara Bay: (1) OHN and OHPhe, (2) 1-OHP and OHPhe, (3) 1-OHP and OH-PAH, and (4) OHPhe and OH-PAH.

Conclusions

High levels of phenanthrene and pyrene metabolites in the bile of fish from the Guanabara Bay seem to effectively reveal the state of PAH contamination of the observed sites – the space variability concurs with the presence of different source strengths. The presence of petrogenic sources of PAHs in the internal area of the Bay is likely the result of inputs of petroleum and derivatives into these waters.

Similar to the expression of the proportion of individual PAHs as a percentage of total PAHs in sediments, OH-PAH profiles in fish bile can be used as a biomarker for identifying exposure sources of certain types of PAHs. Since individual PAHs are biotransformed and excreted at different rates by fish, the profile of OH-PAHs has a characteristic fingerprint. Although a variety of factors, bioavailability, and the concentration of parent PAHs in sediments [54], it is clear that the profile of parent PAHs in sediments is reflected in fish bile, as metabolites.

To conclude, as a first assessment, the Guanabara Bay is heavily polluted by PAHs and these chemicals in addition to other factors, may adversely affect the health of biota.

Acknowledgements: This work was financially supported by the ORQUE project (“Regional Observation of the Quality of the Environment” project). The authors also want to acknowledge the “Region Aquitaine” and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

1. Neff, J. M., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. 1979, London: Applied Science Publishers Ltd. 262.
2. Kennicutt II, M. C., Wadw, T. L., Presley, B. J., Requejo, J. M., Brooks, J. M., and Denoux, G. J. 1994. *Environmental science & technology* **28**(1): p. 1-15.
3. Elias, V. O., Simoneit, B. R. T., and Cardoso J, *Levoglucozan, a Molecular Fossil as Indicator of Biomass Burning Contribution in Sediments of the Amazon Shelf*, in *Proceedings of the seventh Latin-American Congress on Organic Geochemistry*. 2000: Foz do Iguacu, Parana, Brazil. p. 243-244.
4. Lipiatou, E. and Albaigés, J. 1994. *Marine Chemistry* **46**: p. 153-164.
5. Philp, R. P., *Fossil Fuel Biomarkers - Applications and Spectra*, ed. Geophysics, M.i.G.a. Vol. 23. 1985, Amsterdam: Elsevier. 294.
6. Hites, R. A., Laflamme, R. E., and Windsor Jr, J. G. 1980. *Advances in Chemistry Series*: p. 289-311.
7. Yunker, M. B., MacDonald, R. W., Brewer, R., Sylvestre, S., Tuominen, T., Sekela, M., Mitchell, R. H., Paton, D. W., Fowler, B. R., Gray, C., Goyette, D., and Sullivan, D., *Assessment of Natural and Anthropogenic Hydrocarbon Inputs Using Pahs as Tracers. The Fraser River Basin and Strait of Georgia 1987-1997.*, in *Environment Canada and Fisheries and Oceans Canada, FRAP, R.D.*, Editor. 2000: Vancouver, BC. p. 128 pp.
8. Yunker, M. B., Backus, S. M., Graf Pannatier, E., Jeffries, D. S., and Macdonald, R. W. 2002. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **55**(1): p. 1-31.
9. Readman, J. W., Mantoura, R. F. C., Llewellyn, C. A., Preston, M. R., and Reeves, A. D. 1986. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **27**: p. 29-54.
10. Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C., and Garrigues, P. 1997. *Marine Chemistry* **58**(1-2): p. 85-97.
11. Lipiatou, E., Tolosa, I., Simo, R., Bouloubassi, I., Dachs, J., Marti, S., Sicre, M. A., Bayona, J. M., Grimalt, J. O., Saliot, A., and Albaigés, J. 1997. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **44**(3-4): p. 881-905.
12. Harvey, R. C., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Chemistry and Carcinogenicity*, ed. Press, C.U. 1991, Cambridge, UK. 11-87.
13. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human*. Vol 32. 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
14. James, M. O. 1989 *Biotransformation and Disposition of Pah in Aquatic Invertebrates*, P 69-92, in *Metabolism Fo Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Varanasi, U., Editor CRC Press: Boca Raton. p. 341.
15. Varanasi, U., Reichert, W. L., Le Eberhart, B. T., and Stein, J. E. 1989. *Chemico-Biological Interactions* **69**(2-3): p. 203-216.
16. Varanasi, U., Reichert, W. L., Stein, J. E., Brown, D. W., and Sanborn, H. R. 1985. *Eviron. Sci. Technol.* **19**: p. 836-841.
17. Varanasi, U. and Stein, J. E. 1991. *Environmental Health Perspectives* **90**: p. 93-100.
18. Malins, D. C. and Hodgins, H. O. 1981. *Environ Sci Technol (Feature)* **15**(11): p. 1273-1280.

19. Da Silva, D. A. M., Buzitis, J., Krahn, M. M., Bicego, M. C., and Pires-Vanin, A. M. S. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **52**(2): p. 175-183.
20. Jonsson, G., Bechmann, R., Bamber, S., and Baussant, T. 2004. *Environ Toxicol Chem.* **23**(6): p. 1538-48.
21. Krahn, M. M., Burrows, D. G., Ylitalo, G. M., Brown, D. W., Wigren, C. A., Collier, T. K., Chan, S.-L., and Varanasi, U. 1992. *Environ Sci Technol* **26**: p. 116-126.
22. Krahn, M. M., Kittle, J., Lewey J., and MacLeod, J., William D. 1986. *Marine Environmental Research* **20**(4): p. 291-298.
23. Ruddock, P. J., Bird, D. J., McEvoy, J., and Peters, L. D. 2003. *The Science of The Total Environment* **301**(1-3): p. 105-117.
24. van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): p. 57-149.
25. Gabardo, I. T., Meniconi, M. F. G., Falcao, L. V., Vital, N. A. A., and Pereira, R. C. L. *Hydrocarbon and Ecotoxicity in Seawater and Sediment Samples of Guanabara Bay after the Oil Spill in January 2000.* in *2001 International Oil Spill Conference*. 2001.
26. Meniconi, M. F. G., Barbanti, S. M., Gabardo, I. T., and Caicedo, N. L. *Chemical Characterization of Environmental Samples after Oil Spill in Iguassu River, Parana, Brazil, July 2000.* in *International Oil Spill Conference*. 2003.
27. Meniconi, M. F. G. and Gabardo, I. T. 2002. *Environmental Forensics* **3**: p. 303-321.
28. Keith, L. H. and Telliard, W. A. 1979. *Environ Sci Technol* **13**: p. 416-423.
29. FEEMA, *Qualidade De Agua Da Baia De Guanabara.* , in *Programa de Despoluição da Baia de Guanabara - Programas Ambientais Complementares*. 1998.
30. JICA, *The Study on Recuperation of the Guanabara Bay Ecosystem*, Ambiente, F.E.d.E.d.M., Editor. 1994: Rio de Janeiro, Brazil.
31. Kjerfve, B., Ribeiro, C. H. A., Dias, G. T. M., Filippo, A. M., and Quaresma, V. D. S. 1997. *Continental Shelf Research*. **17**(13): p. 1609-1643.
32. Chalaux, N., *Dinamica Costanera De Les Aportations Contaminantes Presents Als Efluentes Urbans*, in *Universidade de Barcelone*. 1995: Barcelona, Spain.
33. Hamacher, C., *Determinação De Hidrocarbonetos Em Amostras De Agua E Sedimento Da Baia De Guanabara*, in *Departamento de Quimica*. 1996, PUC-RJ: Rio de Janeiro.
34. Lima, A. L. C., *Geocronologia De Hidrocarbonetos Poliaromaticos (Pah) - Estudo De Caso: Baia De Guanabara*, in *Departamento de Quimica*. 1996, PUC-RJ: Rio de Janeiro.
35. Meniconi, M. F. G., Massone, C. G., and Scofield, A. D. L. *Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Guanabara Bay, Brazil.* in *Proceedings of the 26th Artic and Marine Oil Spill Program (AMOP)*. 2003.
36. Baumard, P., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1998. *Marine Pollution Bulletin* **36**(8): p. 577-586.
37. Baumard, P., Budzinski, H., and Garrigues, P. 1998. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(5): p. 765-776.
38. Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H., and Hansen, P. D. 1999. *Marine Environmental Research* **47**(1): p. 17-47.
39. Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., and Bellocq, J. 1998. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **47**(1): p. 77-90.

40. Pereira, W. E., Hostettler, F. D., and Rapp, J. B. 1996. *Marine Environmental Research* **41**: p. 299-314.
41. Readman, J. W., Preston, M. R., and Mantoura, R. F. C. 1986. *Marine Pollution Bulletin* **17**: p. 298-308.
42. Le Dù - Lacoste, M. and Budzinski, H. Submitted. *Anal Bioanal Chem.*
43. Ariese, F., Burgers, I., Oudhoff, K., Rutten, T., Stroomberg, G., and Vethaak, D. 1997.
44. Richardson, D. M., Gubbins, M. J., Davies, I. M., Moffat, C. F., and Pollard, P. M. 2004. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **17**(2): p. 79-85.
45. Varanasi, U., Reichert, W. L., and Stein, J. E. 1989. *Cancer Research* **49**(5): p. 1171-1177.
46. Farias, C. O., Hamacher, C., Wagener, A. D. L. R., and Scofield, A. D. L. 2008. *Organic Geochemistry* **39**: p. 289-307.
47. Azevedo, L. A., Bruning, I. M. R. D. A., and Moreira, I. 2004. *Marine Pollution Bulletin* **49**: p. 1109-1126.
48. Soclo, H. H., *Etude De La Distribution Des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Dans Les Sédiments Récents. Identification Des Sources.*, in *Sciences Chimiques*. 1986, Université Bordeaux1: Bordeaux. p. 158 pp.
49. Sicre, M. A., Marty, J. C., Saliot, A., Aparicio, X., Grimalt, J., and Albaigès, J. 1987. *Atmospheric Environment* **21**: p. 2247-2259.
50. Garrigues, P., Budzinski, H., Manitz, M. P., and Wise, S. 1995. *Polycycl. Aromat. Compd.* **7**: p. 275-284.
51. Gschwend, P. M. and Hites, R. A. 1981. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**: p. 2359-2367.
52. Soclo, H. H., Garrigues, P., and Ewald, M. 2000. *Marine Pollution Bulletin* **40**: p. 387-396.
53. Wang, Z., Fingas, M., and Page, D. S. 1999. *J. Chromatogr. A* **843**: p. 369-411.
54. Vuorinen, P. J., Keinanen, M., Vuontisjarvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., and Schiedek, D. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9): p. 479-487.

ANNEXES

ANNEXE 1

Valeurs de toxicités aiguë et chronique déterminées chez différentes espèces de poisson

HAP	Organisme	Critère d'effet	Toxicité aiguë ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Toxicité chronique ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Référence
Naphtalène	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NOEC (40j) survie	-	120	[442]
	<i>Pimephales promelas</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	1990	-	[442]
	<i>Pimephales promelas</i> (A)	CL ₅₀ (96h)	7900	-	[443]
	<i>Pimephales promelas</i> (E-L)	LOEC (30j) reproduction	-	850	[443]
	<i>Pimephales promelas</i> (E-L)	NOEC (30j) croissance	-	450	[443]
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (A)	CL ₅₀ (96h)	1600	-	[443]
	<i>Oncorhynchus gorboscha</i>	CL ₅₀ (48h)	900 – 1000	-	[444]
Acénaphthène	<i>Cyprinodon variegates</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	2400	-	[445]
	<i>Pimephales promelas</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	1600	-	[446]
Phénanthrène	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	670	-	[446]
	<i>Gambusia affinis</i>	CL ₅₀ (24h)	150	-	[2]
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (O-L)	CL ₅₀ (7j)	40	-	[447]
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (O-L)	NOEC (23j) éclosion	-	4	[447]
Anthracène	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (25j) mortalité	-	10	[163]
	<i>Lepomis macrochirus</i> (1 – 1,5 kg)	CL ₅₀ (96h)	4,5	-	[163]
	<i>Lepomis macrochirus</i>	CL ₅₀ (96h)	11,9	-	[175]
	<i>Lepomis macrochirus</i> (1 – 1,5 kg)	NOEC (200h) mortalité	-	1,2 – 15	[163]
	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (1,6j)	5,4	-	[163]
	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (9 sem) déformation	-	6,6	[448]
Fluoranthène	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (96h) mortalité	-	5,4	[163]
	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (41j) croissance	-	4,8	[449]
Pyrène	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (41j) mortalité	-	48	[449]
	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (1,3h)	25,6	-	[163]

	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (4j) mortalité	-	25,6	[163]
BaA	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (3,7j)	1,8	-	[163]
	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (5j) mortalité	-	1,8	[163]
BkF	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	CL ₅₀ (42j)	0,7	-	[450]
	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (42j) croissance	-	0,2	[450]
	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (42j) mortalité	-	0,4	[450]
BaP	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (48h)	5,6 (> sol)	-	[163]
	<i>Brachydanio rerio</i>	NOEC (28j) croissance, éclosion, mortalité	-	> 4	[449]
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NOEC (36j) morphologie	-	2,4	[451]

Voir Chapitre 1 § 2.2.2 pour la définition des NOEC et LOEC

J : juvénile, A : adulte, E : embryon, O : œuf, L : larve

« > sol » : valeur supérieure à la solubilité du composé dans l'eau.

ANNEXE 2

Principes de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple et en tandem (GC/MS et GC-MS/MS)

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur.

Principes du couplage GC-MS et GC-MS/MS

Les composés sont tout d'abord volatilisés dans l'injecteur et entraînés dans le chromatogramme le long de la colonne chromatographique par un gaz vecteur, dans le cas de cette étude, l'hélium. Après avoir été séparés, les composés arrivent dans la source du spectromètre de masse qui va permettre l'ionisation des composés. Une fois ionisés les ions (ions précurseurs) vont être fragmentés en fonction de leur stabilité (ions produits). Les ions sont ensuite séparés d'après leurs rapports masse sur charge (m/z) dans un analyseur et être détectés par un multiplicateur d'électrons dans le cas de la spectrométrie de masse simple.

Dans le cas de la spectrométrie de masse en tandem, les ions produits sont à nouveau fragmentés dans une cellule de collision en ions « fils » qui seront séparés en fonction de leurs rapports masse sur charge (m/z) dans l'analyseur et détectés par un multiplicateur d'électrons.

Dans les deux cas, on obtient donc un chromatogramme de l'extrait injecté et les spectres de masse des ions correspondant aux molécules, suffisamment volatiles et ionisables, dans la gamme de masses de l'appareil.

Les éléments importants dans un couplage GC/MS sont donc la source du spectromètre de masse qui va ioniser les molécules et l'analyseur qui va séparer les ions. Différents types de sources et d'analyseur sont commercialisés. Au cours de ces travaux de thèse, une source à impact électronique (EI) et un analyseur de masse de type quadripôle ont été utilisés.

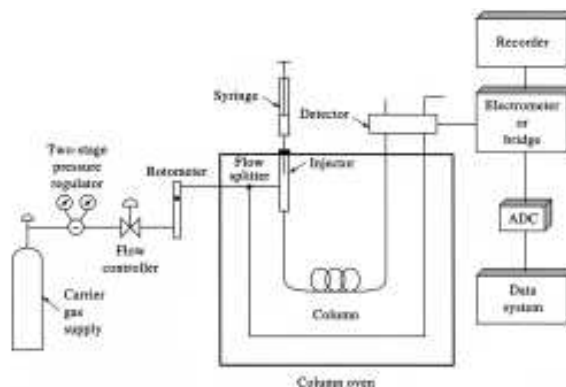


Figure A : Appareillage utilisé en chromatographie en phase gazeuse, comprenant notamment un four, une colonne, un injecteur, un détecteur et un système de traitement des données.

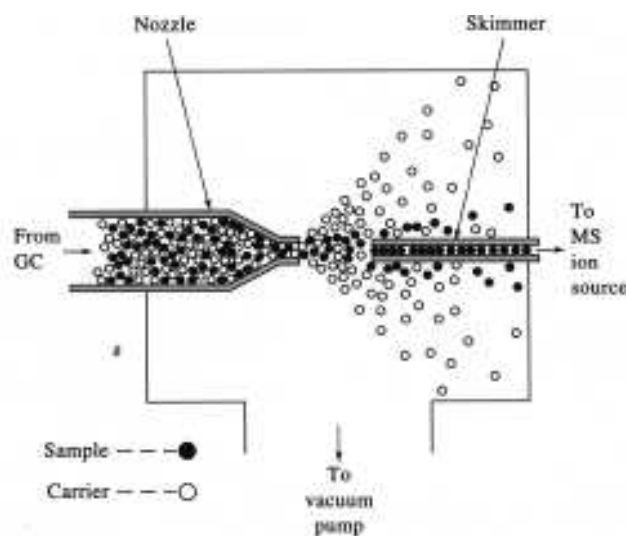


Figure B : Interface entre un chromatographe et un spectromètre de masse

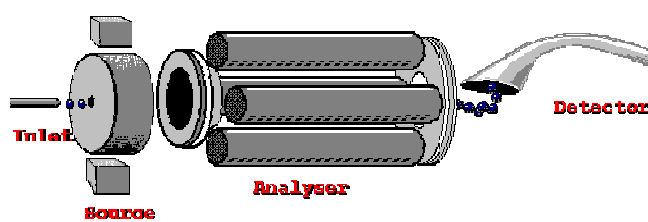


Figure C : Schéma d'un spectromètre de masse de type quadripolaire

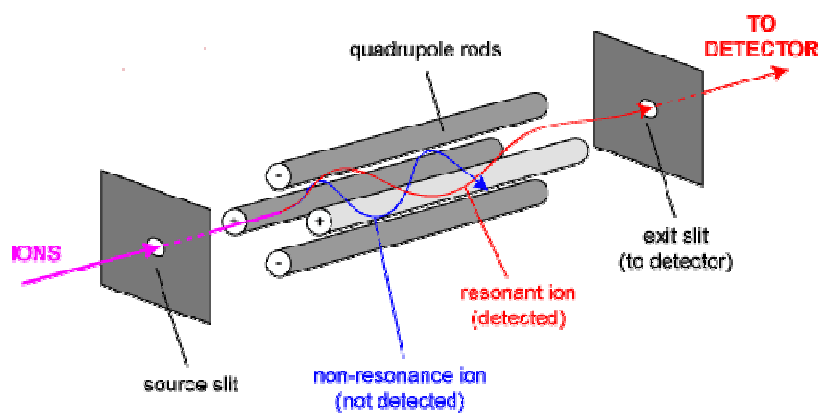


Figure D : Schéma d'un analyseur de type quadripôle

ANNEXE 3

Principes et caractéristiques de la chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse simple (HPLC/MS) et en tandem (HPLC-MS/MS)

Le principe de base de la séparation HPLC est le passage d'un liquide (phase mobile) au travers d'une colonne (support solide = phase stationnaire). L'HPLC existe sous quatre types différents: HPLC en phase inverse, HPLC d'adsorption, HPLC échangeuse d'ions et HPLC d'exclusion. La polarité de la colonne ainsi que le type de solvant ont un impact sur la séparation des molécules dû à l'environnement chimique de l'ensemble.

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera les éléments de base suivants (Figure A):

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.
- un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne RHEODYNE).
- une colonne remplie, en acier inox, de quelques centimètres de long.
- un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés, dans un mélange.

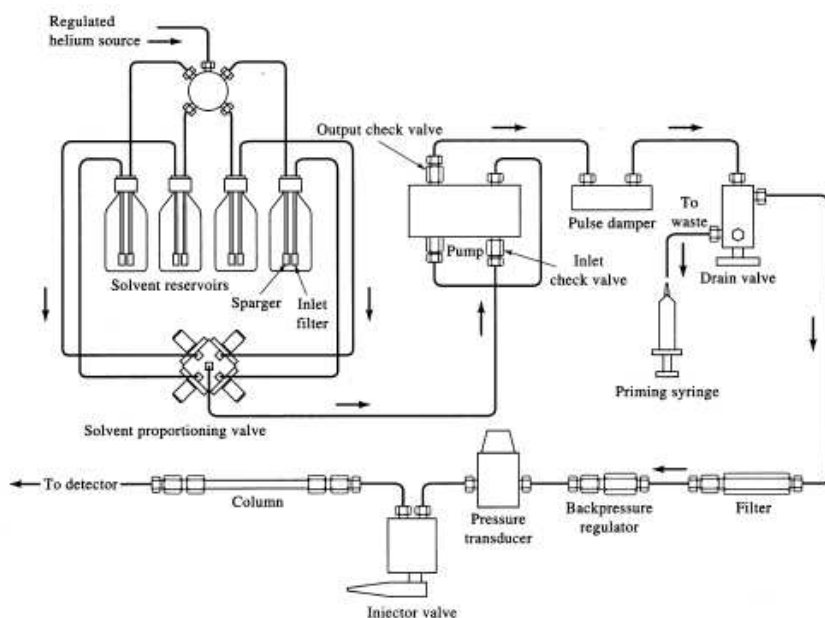


Figure A : Schéma d'un système de HPLC

Dans le cas du couplage LC/MS, le détecteur est donc un spectromètre de masse simple qui comporte trois parties fondamentales : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur.

Dans ce couplage, la difficulté résulte dans la transformation du soluté en phase liquide en un ion en phase gazeuse. Ainsi la source d'ionisation joue à la fois un rôle de désolvatation et d'ionisation auquel peut être appliquée une pression et contenant une arrivée d'azote, permettant l'introduction de l'éluat sous forme de micro-gouttelettes (spray). Ces ions sont alors transférés de la source (pression atmosphérique) vers l'analyseur (vide poussé) par l'intermédiaire d'un capillaire sous tension dans lequel ils sont plus ou moins accélérés pour provoquer leur fragmentation. Ainsi par variation de la tension du capillaire, la fragmentation peut être contrôlée. Les ions obtenus sont alors séparés d'après leur rapports masse sur charge (m/z) dans l'analyseur quadripolaire et détectés en proportion de leur nombre par un multiplicateur d'électrons.

A l'heure actuelle, la majorité des interfaces se regroupent selon deux types d'ionisation : l'ionisation électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). De techniques alternatives utilisant la photo-ionisation atmosphérique (APPI) ont vu le jour mais restent très minoritaires. L'ESI et l'APCI (Figure B) sont toutes les deux des techniques d'ionisation à pression atmosphérique et sont considérées comme des méthodes douces d'ionisation en comparaison à celle utilisée dans le couplage de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).

En ESI, la désolvatation et l'ionisation sont favorisées par la présence d'une électrode semi-cylindrique portée à un potentiel élevé. La différence de potentiel entre l'aiguille du nébuliseur et l'électrode crée un puissant champ électrique favorisant la polarisation de la surface des gouttelettes et donc la formation d'un spray. Cette méthode s'applique aux molécules de polarité moyenne à forte et sur une large gamme de poids moléculaire.

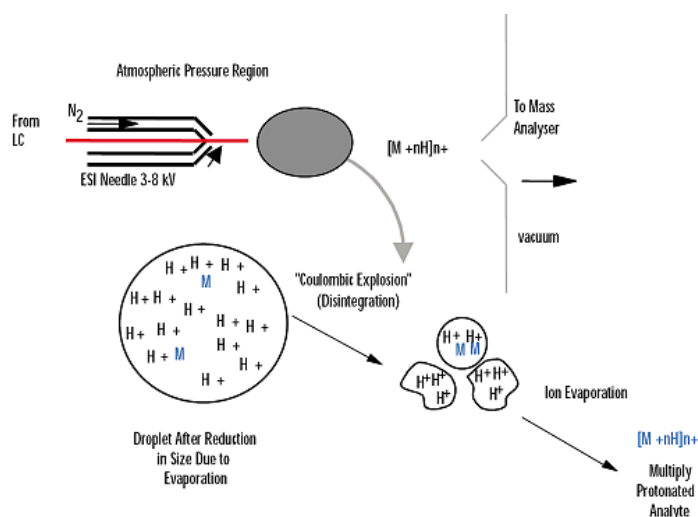


Figure B : Fonctionnement avec une ionisation ESI

En APCI, l'aiguille du nébuliseur est placée dans un cylindre chauffé (vaporiseur) permettant l'évaporation rapide des gouttelettes formées. La phase éluante LC et les composés sont alors sous forme gazeuse dans la source. Les molécules de solvants et d'azote sont alors ionisées par application d'une décharge électronique. Les analytes sont ensuite ionisés chimiquement par transfert de charge.

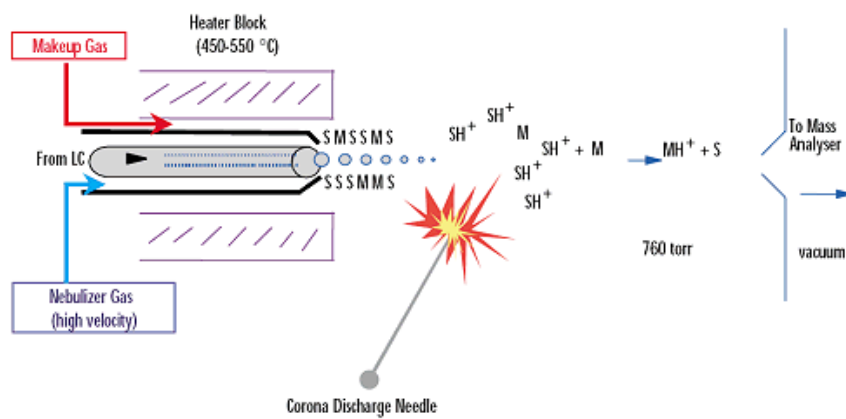


Figure C : Fonctionnement avec une ionisation APCI

ANNEXE 4

Conditions d'analyse des HAP par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Séparation chromatographique

- Chromatographe en phase gazeuse : HP GC 6890A Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- Injecteur : PTV automatique en mode splitless pulsé (25 psi, 1 min), 270 °C
- Gaz vecteur : Hélium 6.0 (Linde, Toulouse, France)
- Débit : 1 ml.min⁻¹
- Température de l'interface : 280°C
- Colonne : HP5-MS Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- 30 m x 0,25 mm Ø x 0,25 µm d'épaisseur de phase constituée de 5 % de diphénylpolysiloxane et de 95 % de diméthylpolysiloxane
- Programme de température :
 - 60 °C : 2 min
 - 60-300 °C : 10 °C.min⁻¹
 - 300 °C : 5 min
- Purge : 1 min ; 60,6 ml.min⁻¹

Détection par spectrométrie de masse

- Spectromètre de masse : HP MSD 5973 Network Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- Ionisation par impact électronique : 70 eV
- Température de la source : 150 °C
- Tension : 2 000 V
- Nombre de cycles par seconde : 1,3
- Dwell time : 50 ms

ANNEXE 5

Conditions d'analyse des métabolites de HAP par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Séparation chromatographique

- Chromatographe en phase gazeuse : HP GC 73 Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- Injecteur : PTV automatique en mode splitless pulsé (25 psi, 1,5 min), 250 °C
- Gaz vecteur : Hélium 6.0 (Linde, Toulouse, France)
- Débit : 1 ml.min⁻¹
- Température de l'interface : 280°C
- Colonne : HP5-MS Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- 30 m x 0,25 mm Ø x 0,25 µm d'épaisseur de phase constituée de 5 % de diphénylpolysiloxane et de 95 % de diméthylpolysiloxane
- Programme de température :
 - 70 °C : 2 min
 - 70-290 °C : 15 °C.min⁻¹
 - 290 °C : 10 min
- Purge : 1,5 min ; 60 ml.min⁻¹

Détection par spectrométrie de masse

- Spectromètre de masse : HP MSD 5973 Network Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- Ionisation par impact électronique : 70 eV
- Température de la source : 150 °C
- Tension : 2 000 V
- Nombre de cycles par seconde : 1,53
- Dwell time : 50 ms

ANNEXE 6

Conditions d'analyse des métabolites de HAP par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS)

Séparation chromatographique

- Chromatographe en phase gazeuse : GC 6890 Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- Injecteur : 7683 Series Agilent Technologies PTV automatique en mode pulsé (25 psi, 1,5 min), 250 °C
- Gaz vecteur : Hélium 6.0 (Linde, Toulouse, France)
- Débit de Gaz vecteur : 1,3 ml.min⁻¹
- Gaz de collision : Argon 6.0 (Linde, Toulouse, France)
- Pression du gaz de collision : 3.00 x 10⁻³ Bar
- Température de l'interface : 250°C
- Colonne : HP5-MS Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)
- 30 m x 0,25 mm Ø x 0,25 µm d'épaisseur de phase constituée de 5 % de diphenylpolysiloxane et de 95 % de diméthylpolysiloxane
- Programme de température :
 - 70 °C : 1 min
 - 70-310 °C : 10 °C.min⁻¹
 - 310 °C : 5 min
- Purge : 1,5 min ; 60 ml.min⁻¹
- Temps d'analyse total : 34 min

Détection par spectrométrie de masse en tandem

- Spectromètre de masse : RAB051 Waters Micromass® Quattro Micro™ (Waters Corporation, Manchester, UK)
- Ionisation par impact électronique : 70 eV
- Température de la source : 150 °C
- Tension : 2 000 V
- Nombre de cycles par seconde : 1,53
- Dwell time : 50 ms

ANNEXE 7

Conditions d'analyse des métabolites de HAP mono-hydroxylés par Chromatographie en phase liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS)

Séparation chromatographique

- Chromatographe en phase liquide : Waters ACQUITY UPLC™ (Waters Corporation, Manchester, UK)
- Colonne : ACQUITY BEH C₁₈ column (1.7 µm, 2.1 mm x 150 mm)
- Température de colonne : 30°C
- Phase mobile :
 - A : Acétonitrile
 - B : Eau Milli-Q
- Gradient d'élution :
 - 0 – 2 min : 60/40 (A/B)
 - 2 – 4 min : 60/40 – 80/20 (A/B)
 - 4 – 6 min : 80/20 – 60/40 (A/B)
 - 6 – 8 min : 60/40 (A/B)
- Débit de phase mobile : 0,45 ml.min⁻¹
- Durée d'analyse : 8 min
- Volume d'injection : 10 µl

Ionisation et Détection par spectrométrie de masse en tandem

- Spectromètre de masse : Waters Micromass® Quattro Premier™ (Waters Corporation, Manchester, UK)
- Ionisation par électrospray en mode négatif
- Voltage du capillaire : 3 500 V
- Tension de cône et énergies de collision : Tableau 33
- Température de la source : 90 °C
- Température du gas de désolvatation (Azote) : 400°C
- Débit du gas de désolvatation : 1 000 l.h⁻¹
- Débit du gas de collision : 90 l.h⁻¹
- Mode d'acquisition : Multiple Reaction Monitoring (MRM)
 - Inter-scan & Inter-channel : 20 & 5 ms
 - Dwell time : 50 ms

ANNEXE 8

Conditions d'analyse des métabolites primaires de HAP par Chromatographie en phase liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS)

Séparation chromatographique

- Chromatographe en phase liquide : Waters ACQUITY UPLC™ (Waters Corporation, Manchester, UK)
- Colonne : ACQUITY BEH C₁₈ column (1.7 µm, 2.1 mm x 150 mm)
- Température de colonne : 30°C
- Phase mobile :
 - A : Acétonitrile + 0,1% acide formique
 - B : Eau Milli-Q + 0,1% acide formique
- Gradient d'élution :
 - 0 – 2 min : 40/60 (A/B)
 - 2 – 6 min : 40/60 – 80/20 (A/B)
 - 6 – 8 min : 80/20 – 40/60 (A/B)
 - 8 – 10 min : 40/60 (A/B)
- Débit de phase mobile : 0,40 ml.min⁻¹
- Durée d'analyse : 10 min
- Volume d'injection : 10 µl

Ionisation et Détection par spectrométrie de masse en tandem

- Spectromètre de masse : Waters Micromass® Quattro Premier™ (Waters Corporation, Manchester, UK)
- Ionisation par électrospray en modes négatif et positif
- Voltage du capillaire : 3 500 V
- Tension de cône et énergies de collision : Tableau 46
- Température de la source : 90 °C
- Température du gas de désolvation (Azote) : 350°C
- Débit du gas de désolvation : 900 l.h⁻¹
- Débit du gas de collision : 80 l.h⁻¹
- Mode d'acquisition : Multiple Reaction Monitoring (MRM)
 - Inter-scan & Inter-channel : 20 & 5 ms
 - Dwell time : 50 ms

ANNEXE 9

Exposition Préliminaire de turbots à un mélange de HAP dissous dans la phase aqueuse en Mai 2005 (Chapitre II, § 2.3.1)

1. Dosage des HAP dans les muscles de turbots.

Tableaux A-1 : Concentrations en HAP dans les muscles de turbots mâles exposés à un mélange de HAP au cours du temps (jours). Concentrations exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0	T12h M	T1 M	T3 M	T5 M	T8 M	T10 M
Phe	30,75	209,35	205,88	196,36	106,54	47,74	17,77
Ant	32,29	130,40	150,39	164,35	104,75	16,99	8,69
Fluo	6,18	92,16	81,95	69,38	33,99	26,22	7,61
Pyr	3,46	44,99	42,38	30,87	13,93	13,41	3,91
BaA	0,29	5,49	3,73	1,75	0,43	0,33	0,17
Triph+chrys	0,90	5,62	4,71	2,97	0,78	0,73	0,37
BeP	0,44	9,65	6,88	9,20	2,15	2,96	0,70
BaP	nd	1,10	1,33	2,70	0,17	0,41	-0,05
Somme HAP	76,95	498,76	497,25	477,58	262,74	108,79	39,18
3MP	nd	nd	14,73	13,31	5,71	12,46	2,90
2MP	nd	55,15	58,37	42,56	21,83	13,80	7,30
2MA	nd	nd	27,07	17,70	6,02	8,96	4,15
9MP + 1MA	nd	nd	nd	nd	3,56	4,33	0,55
1MP	nd	nd	15,08	14,52	5,48	7,17	3,70
Somme MPhe	nd	55,15	115,25	88,08	42,61	46,72	18,60

Tableaux A-2 : Concentrations en HAP dans les muscles de turbots femelles exposées à un mélange de HAP au cours du temps (jours). Concentrations exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0	T12h F	T1 F	T2 F	T3 F	T5 F	T8 F	T10 F
Phe	30,75	198,39	124,74	110,42	132,70	112,53	48,26	16,44
Ant	32,29	148,25	79,97	65,69	85,67	52,51	14,25	12,69
Fluo	6,18	88,49	83,53	61,26	60,92	38,88	17,22	5,77
Pyr	3,46	52,13	44,19	31,82	31,62	22,55	9,55	3,14
BaA	0,29	5,47	4,45	2,14	1,62	0,57	0,58	0,08
Triph+chrys	0,90	6,58	5,48	3,50	2,81	1,34	0,82	0,10
BeP	0,44	9,52	9,46	7,53	5,62	2,23	1,53	0,88
BaP	nd	1,15	1,33	1,03	2,26	0,32	0,28	-0,05
Somme HAP	76,95	509,98	353,15	283,39	323,22	230,93	92,48	39,06
3MP	nd	20,08	17,19	22,66	11,72	4,47	8,61	1,36
2MP	nd	64,53	50,83	36,02	31,01	25,67	14,54	3,79
2MA	nd	16,65	12,67	18,18	14,75	7,79	8,61	2,65
9MP + 1MA	nd	9,76	8,39	nd	nd	4,41	3,76	0,07
1MP	nd	13,28	12,53	13,85	10,96	6,33	6,75	1,24
Somme MPhe	nd	124,30	101,61	90,72	68,45	48,67	42,27	9,10

2. Dosage des HAP dans les muscles de turbots.

Tableaux B-1 : Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de turbots mâles exposés à un mélange de HAP au cours du temps (jours). Concentrations exprimées en ng.g⁻¹ de bile.

	T0	T12h	T1	T2	T3	T4	T5	T8	T10
1-OHN	81,80	56,16	42,17	27,66	20,12	31,51	44,17	9,67	15,89
2-OHN	50,78	167,17	111,99	154,37	59,82	102,54	121,07	153,00	303,44
2-OHBi	18,35	14,31	8,47	39,99	2,85	6,75	4,47	4,94	17,29
9-OHFe	48,46	59,71	54,62	68,36	19,80	39,07	31,36	48,86	130,02
4-OHPhe	0,00	5,58	3,26	5,81	9,14	10,70	10,54	25,31	40,03
9-OHPhe	1,17	6,89	11,11	35,94	61,04	54,25	46,36	45,14	62,20
3-OHPhe	1,45	25,41	77,21	335,85	209,14	315,08	322,77	730,43	1027,39
1-OHPhe	5,70	52,33	206,61	504,22	407,70	534,33	524,96	880,76	1287,48
2-OHPhe	3,88	16,25	57,94	207,78	210,92	283,80	326,47	548,27	794,92
1-OHP	16,00	2203,19	9692,97	13381,62	20963,66	28919,03	28558,40	16172,14	19127,69
1-OHC	2,78	5,97	46,36	185,94	283,95	330,60	494,98	200,04	252,11
3-OHBaP	2,18	24,70	541,19	887,46	3699,74	3909,50	4958,57	1659,18	1694,59

Tableaux B-2 : Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de turbots femelles exposées à un mélange de HAP au cours du temps (jours). Concentrations exprimées en ng.g⁻¹ de bile.

	T0	T12h	T1	T2	T3	T4	T5	T8	T10
1-OHN	81,80	100,32	68,32	78,96	36,72	36,61	42,71	17,92	19,86
2-OHN	50,78	96,46	79,72	172,06	42,65	69,63	112,79	255,75	245,12
2-OHBi	18,35	6,73	11,50	2,84	0,64	4,62	5,53	21,52	25,11
9-OHFe	48,46	51,42	42,88	61,17	21,61	32,14	33,36	96,76	119,39
4-OHPhe	nd	1,73	3,06	6,61	9,71	14,84	12,32	34,74	49,45
9-OHPhe	1,17	4,66	6,42	48,82	44,30	46,94	90,02	115,77	108,87
3-OHPhe	1,45	18,77	37,44	206,41	294,46	324,03	317,91	819,88	1036,41
1-OHPhe	5,70	39,76	116,96	387,61	320,89	663,27	640,29	1092,12	1341,09
2-OHPhe	3,88	15,81	23,47	154,11	186,20	239,11	359,26	652,40	840,63
1-OHP	16,00	3126,33	6281,25	11266,96	16940,34	26883,96	26624,99	17760,02	13739,91
1-OHC	2,78	12,79	25,47	46,12	135,41	346,72	345,82	133,69	143,62
3-OHBaP	2,18	50,24	160,30	281,01	3004,84	3469,20	4047,93	1111,38	793,27

ANNEXE 10

**Exposition Préliminaire de turbots à un mélange de HAP dissous dans la phase aqueuse
en Janvier 2006 (Chapitre II, § 2.3.1)**

Tableau A : Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de turbots exposés à un mélange de HAP durant 7 jours. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de bile (n=3)

Composés	T0	T3	T7
4-OHPhe	0 ± 0	165 ± 19	287 ± 33
9-OHPhe	12 ± 1	656 ± 76	1 770 ± 206
3-OHPhe	15 ± 2	1474 ± 172	3 152 ± 367
1-OHPhe	57 ± 7	6 630 ± 773	9 865 ± 1150
2-OHPhe	39 ± 5	1 440 ± 168	2 096 ± 244
1-OHP	160 ± 13	154 758 ± 12 381	208 880 ± 167 10
1-OHC	28 ± 3	287 ± 33	426 ± 50
3-OHBaP	22 ± 3	1 752 ± 245	2 540 ± 356

ANNEXE 11

**Exposition Préliminaire de turbots à un mélange de HAP dissous dans la phase aqueuse
en Juillet 2006 (Chapitre II, § 2.3.2)**

1. Dosage des HAP dans l'eau des aquariums

Tableaux A-1 : Concentrations en HAP dans l'eau des aquariums de turbots non exposés au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.l⁻¹ d'eau.

	T0 C	T1 C	T2 C	T3 C	T4 C	T10 C
Naph	269	148	198	12	nd	nd
Phe	34	35	14	9	6	7
Ay	2	3	2	2	3	11
Ae	4	7	4	1	1	1
Fe	9	11	6	2	2	2
Ant	nd	6	1	nd	1	1
Fluo	23	26	12	5	5	6
Pyr	11	11	3	4	2	4
BaA	2	2	1	nd	nd	nd
triph+chrys	16	16	5	1	1	3
BbF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BkF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BeP	nd	1	nd	nd	nd	nd
BaP	16	20	8	nd	1	2
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	3	2	1	nd	1	nd
SOMME HAP	388	287	256	35	21	37

Tableaux A-2 : Concentrations en HAP dans l'eau des aquariums de turbots exposés au mélange de HAP au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.l⁻¹ d'eau.

	T0 M	T1 M	T2 M	T3 M	T4 M	T10 M	Bac de décontamination
Naph	133	60 118	37 512	22 684	20 307	200	nd
Phe	38	12 516	6 855	5 408	7 045	6 130	14
Ant	14	8 411	4 658	3 195	4 373	3 499	nd
Fluo	38	12 077	4 399	2 824	3 908	2 656	9
Pyr	15	4 955	1 594	1 091	1 432	1 148	7
triph+chrys	81	6 483	1 640	1 030	1 052	499	nd
BaP	49	11 684	3 686	2 352	3 188	2 149	nd
SOMME HAP	368	116 244	60 344	38 584	41 305	16 281	30

Tableaux A-3 : Concentrations en HAP dans l'eau des aquariums de turbots exposés au sédiment naturel au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.l⁻¹ d'eau.

	T0 S	T1 S	T2 S	T3 S	T4 S	T10 S	Bac de décontamination
Naph	169	13	151	151	151	117	38
Phe	75	77	23	68	14	13	8
Ay	1	3	5	3	3	3	1
Ae	6	6	5	7	2	2	1
Fe	4	20	6	19	4	3	2
Ant	54	7	7	8	4	5	2
Fluo	103	57	19	59	11	11	18
Pyr	35	26	8	27	4	4	30
BaA	1	5	1	4	nd	nd	1
triph+chrys	41	25	12	18	3	2	5
BbF	nd	12	1	4	nd	nd	1
BkF	nd	nd	nd	3	nd	nd	nd
BeP	2	6	nd	nd	nd	nd	1
BaP	46	12	14	13	7	5	3
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	4	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	2	nd	nd	nd
SOMME HAP	538	275	250	386	204	164	111

Tableaux A-4 : Concentrations en HAP dans l'eau des aquariums de turbots exposés aux éluutriats de pétrole au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.l⁻¹ d'eau.

	T0 P	T1 P	T2 P	T3 P	T4 P	T10 P	Bac de décontamination
Naph	4 504	901	676	721	563	141	33
Phe	15 382	3 076	2 307	2 461	1 923	481	7
Ay	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1
Ae	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1
Fe	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2
Ant	5 835	1 167	875	467	486	122	2
Fluo	6 689	1 338	736	535	557	139	15
Pyr	5 629	1 126	619	450	469	117	25
BaA	3 235	647	356	259	270	67	nd
triph+chrys	14 991	2 998	1 649	1 199	1 249	312	4
BbF	1 091	218	120	87	91	23	1
BkF	366	73	40	29	31	8	nd
BeP	2 243	449	247	179	187	47	1
BaP	6 879	1 376	757	550	573	143	3
Per	786	157	86	63	65	16	nd
IP	263	53	29	21	22	5	nd
DaA+DaC	467	93	70	37	39	10	nd
BP	924	185	139	74	77	19	nd
SOMME HAP	69 285	13 857	8 706	7 134	6 602	1 651	94

2. Dosage des HAP dans les muscles des turbots

Tableaux B-1 : Concentrations en HAP dans les muscles des turbots non exposés au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 C	T1 C	T2 C	T3 C	T4 C	T10 C
Naph	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2MN	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1MN	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ay	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ae	0,88	0,56	0,81	0,26	0,85	0,55
Fe	2,06	1,56	2,17	0,74	2,07	2,11
Phe	24,39	19,95	31,02	30,73	30,81	19,27
3MP	0,58	0,04	0,63	0,14	0,78	19,73
2MP	0,49	0,11	0,66	0,14	0,92	1,93
2MA	0,43	nd	nd	nd	nd	2,24
9MP + 1MA	0,37	0,2	0,45	0,19	0,64	1,4
1MP	0,38	0,14	0,66	0,14	0,7	1,53
Ant	3,88	3,73	5,57	17	4,41	2,62
Fluo	6,75	5,05	6,8	2,09	8,9	2,68
Pyr	4,66	3,48	3,46	1,25	2,67	0,95
BaA	0,69	0,28	0,39	0,09	0,22	nd
triph+chrys	nd	nd	nd	nd	nd	1,56
Mchrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BbF + BkF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BeP	1,17	1,07	1,14	0,28	0,65	nd
BaP	0,24	nd	nd	nd	nd	nd
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	44,72	35,68	51,36	52,44	50,58	29,74
somme MHAP	2,25	0,49	2,4	0,61	3,04	26,83

Tableaux B-2: Concentrations en HAP dans les muscles des turbots exposés au mélange de HAP au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 C	T1 M	T2 M	T3 M	T4 M	T10 M
Naph	nd	57,74	1,46	nd	nd	nd
2MN	nd	nd	nd	nd	nd	1,12
1MN	nd	nd	nd	nd	nd	0,79
Ay	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ae	0,88	1,62	2,1	nd	nd	nd
Fe	2,06	8,03	7,94	nd	nd	2,04
Phe	24,39	4733,25	2340,49	1506,5	794,45	355,99
3MP	0,58	269,37	nd	1,81	nd	nd
2MP	0,49	nd	nd	1,93	nd	nd
2MA	0,43	nd	nd	0,31	nd	nd
9MP + 1MA	0,37	nd	nd	2,52	nd	nd
1MP	0,38	nd	nd	1,37	nd	nd
Ant	3,88	2424,89	1622,82	1154,51	486,75	248,97
Fluo	6,75	4762,77	650,93	923,05	341,31	65,34
Pyr	4,66	648,69	73,13	170,96	318,98	13,76
BaA	0,69	nd	nd	10,09	7,07	nd
triph+chrys	nd	54,19	9,37	nd	nd	1,66
Mchrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BbF + BkF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BeP	1,17	nd	nd	2,01	1,41	nd
BaP	0,24	48,47	6,48	2,93	2,05	nd
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	44,72	12739,65	4714,72	3770,05	1952,02	687,76
somme MHAP	2,25	269,37	0	7,94	0	1,91

Tableaux B-3: Concentrations en HAP dans les muscles des turbots exposés au sédiment naturel au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 S	T1 S	T2 S	T3 S	T4 S	T10 S
napht	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2MN	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1MN	nd	nd	nd	nd	nd	nd
acénaphthylène	nd	0,88	nd	0,16	nd	nd
acénaphtène	0,88	1,22	0,33	2,21	0,67	nd
fluorène	2,06	2,58	1,12	3,89	1,75	0,57
phe	24,39	148,24	18,13	18,36	16,35	8,03
3MP	0,58	0,99	nd	0,72	0,07	nd
2MP	0,49	1,47	nd	0,77	0,07	nd
2MA	0,43	0,41	0,01	0,23	nd	nd
9MP + 1MA	0,37	1,71	0,16	0,78	0,11	0,01
1MP	0,38	0,97	0,06	0,75	0,15	nd
ant	3,88	51,42	4,08	4,47	2,95	1,97
fluo	6,75	60,74	7,5	5,7	4,11	24,25
pyr	4,66	19,19	7,46	6,46	3,73	1,35
BaA	0,69	13,28	3,79	0,48	0	0
triph+chrys	nd	nd	nd	1,74	1,1	0,43
Mchrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BbF + BkF	nd	nd	nd	1,72	nd	nd
BeP	1,17	0,96	1,35	1,1	0,73	0,89
BaP	0,24	11,99	4,13	1,29	1,43	0
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	44,72	310,5	47,89	47,58	32,82	37,49
somme MHAP	2,25	5,55	0,23	3,25	0,4	0,01

Tableaux B-4: Concentrations en HAP dans les muscles des turbots exposés aux éluviats de pétrole au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 P	T1 P	T2 P	T3 P	T4 P	T10 P
Naph	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2MN	nd	6,83	2,71	nd	2,83	nd
1MN	nd	8,69	2,9	nd	3,46	nd
Ay	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ae	0,88	1,71	3,26	4,49	3,52	nd
Fe	2,06	11,58	15,74	15,32	14,14	4,7
Phe	24,39	164,55	181,45	197,24	94,25	21,16
3MP	0,58	25,67	19,36	64,61	74,41	1,2
2MP	0,49	34,45	24,14	23,85	12,13	1,14
2MA	0,43	10,09	9,16	29,85	14,26	0,51
9MP + 1MA	0,37	36,87	35,69	6,98	22,05	1,66
1MP	0,38	21,84	14,71	44,82	9,53	1,05
Ant	3,88	68,56	70,95	59,59	20,95	5,22
Fluo	6,75	101,28	33,44	24,31	7,3	3,19
Pyr	4,66	34,69	6,43	6,64	5,15	1,56
BaA	0,69	4,69	1,21	0,81	1,16	nd
triph+chrys	nd	29,25	10,36	5,74	5,05	2,61
Mchrys	nd	2,93	nd	nd	2,51	nd
BbF + BkF	nd	0,68	1,02	0,49	nd	nd
BeP	1,17	5,05	1,33	0,45	0,57	nd
BaP	0,24	9,94	3,28	0,65	0,4	nd
Per	nd	nd	1,45	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	44,72	431,98	329,92	315,73	152,49	38,44
somme MHAP	2,25	147,37	108,67	170,11	141,18	5,56

3. Dosage des HAP dans les foies des turbots

Tableaux C-1 : Concentrations en HAP dans les foies des turbots non exposés au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 C	T1 C	T2 C	T3 C	T4 C	T10 C
Naph	26	21	24	17	28	nd
2MN	27	13	21	10	13	nd
1MN	21	8	11	6	15	nd
Ay	1	2	1	nd	1	nd
Ae	nd	14	10	10	16	2
Fe	23	25	24	17	30	5
Phe	110	109	162	160	167	53
3MP	4	4	6	3	7	1
2MP	5	4	7	3	8	2
2MA	1	1	nd	1	nd	1
9MP + 1MA	2	2	3	3	3	1
1MP	4	4	5	3	6	1
Ant	4	3	4	49	5	17
Fluo	10	8	12	22	18	2
Pyr	4	4	3	3	5	1
BaA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
triph+chrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Mchrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BbF + BkF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BeP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BaP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	178	186	240	277	271	80
somme MHAP	65	35	53	28	52	6

Tableaux C-2 : Concentrations en HAP dans les foies des turbots exposés au mélange de HAP au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 M	T1 M	T2 M	T3 M	T4 M	T10 M
Naph	26	1 542	39	38	38	240
2MN	27	55	17	16	18	65
1MN	21	39	10	10	11	49
Ay	1	nd	5	1	1	4
Ae	nd	nd	25	28	20	12
Fe	23	48	38	42	38	17
Phe	110	14 004	3 190	2 648	1 113	210
3MP	4	nd	3	4	13	2
2MP	5	nd	4	6	16	2
2MA	1	nd	1	2	nd	6
9MP + 1MA	2	nd	6	8	10	2
1MP	4	nd	1	3	7	2
Ant	4	6 085	1 477	1 090	225	104
Fluo	10	5 876	2 135	1 496	471	12
Pyr	4	641	138	84	27	2
BaA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
triph+chrys	nd	21	19	15	11	nd
Mchrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BbF + BkF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BeP	nd	nd	nd	4	3	nd
BaP	nd	4	7	3	2	nd
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	178	28 221	7 073	5 448	1 950	602
somme MHAP	65	95	42	50	74	128

Tableaux C-3 : Concentrations en HAP dans les foies des turbots exposés au sédiment naturel au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 S	T1 S	T2 S	T3 S	T4 S	T10 S
Naph	26	82	34	20	37	nd
2MN	27	36	14	13	15	nd
1MN	21	28	9	9	10	nd
Ay	1	nd	5	nd	6	1
Ae	nd	6	22	17	24	5
Fe	23	8	27	37	30	8
Phe	110	106	209	278	233	59
3MP	4	2	4	8	5	2
2MP	5	4	5	10	5	2
2MA	1	6	1	1	1	7
9MP + 1MA	2	2	5	8	5	1
1MP	4	2	3	6	3	2
Ant	4	42	38	48	42	24
Fluo	10	21	25	48	28	6
Pyr	4	9	4	9	4	2
BaA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
triph+chrys	nd	nd	nd	nd	nd	1
Mchrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BbF + BkF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BeP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BaP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	178	272	364	456	405	105
somme MHAP	65	80	40	53	44	14

Tableaux C-4 : Concentrations en HAP dans les foies des turbots exposés aux éluutriats de pétrole au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de poids sec.

	T0 P	T1 P	T2 P	T3 P	T4 P	T10 P
Naph	26	265	29	36	133	295
2MN	27	1 075	14	27	432	510
1MN	21	812	9	26	320	368
Ay	1	12	4	nd	8	14
Ae	nd	27	25	36	32	41
Fe	23	138	45	80	87	58
Phe	110	857	362	468	448	208
3MP	4	191	21	47	87	5
2MP	5	247	37	62	109	13
2MA	1	77	6	14	27	127
9MP + 1MA	2	316	81	147	143	13
1MP	4	144	22	44	73	3
Ant	4	310	54	80	106	68
Fluo	10	297	77	151	47	6
Pyr	4	73	10	20	25	2
BaA	nd	10	nd	nd	3	nd
triph+chrys	nd	97	93	88	33	5
Mchrys	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BbF + BkF	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BeP	nd	15	10	nd	6	nd
BaP	nd	4	3	nd	nd	nd
Per	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DaA+DaC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
somme HAP	178	2 105	711	959	928	697
somme MHAP	65	2 863	190	368	1 190	1 038

4. Dosage des métabolites de HAP dans la bile des turbots

Tableaux D-1 : Concentrations en métabolites de HAP (OHHAP) dans la bile des turbots non exposés au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de bile (n=5 poissons).

	T0 C	T1 C	T2 C	T3 C	T4 C	T10 C
1-OHN	15 ± 11	7 ± 5	11 ± 4	27 ± 26	19 ± 33	88 ± 27
2-OHN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	3 ± 3	7 ± 10	10 ± 6
2-OHBi	4 ± 3	1 ± 1	2 ± 0	3 ± 1	11 ± 9	13 ± 4
9-OHFe	11 ± 5	4 ± 3	15 ± 3	15 ± 14	56 ± 6	62 ± 35
4-OHPHE	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	2 ± 2	nd	Nd
9-OHPHE	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	nd	12 ± 5
3-OHPHE	2 ± 1	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 3	nd	28 ± 12
1-OHPHE	4 ± 4	2 ± 1	3 ± 1	2 ± 2	nd	22 ± 6
2-OHPHE	3 ± 3	3 ± 1	2 ± 1	3 ± 4	nd	29 ± 4
1-OHP	48 ± 40	148 ± 45	20 ± 9	36 ± 30	75 ± 41	133 ± 48
1-OHC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-OHBaP	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tableaux D-2 : Concentrations en métabolites de HAP (OHHAP) dans la bile des turbots exposés au mélange de HAP au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de bile (n=5 poissons).

	T0 M	T1 M	T2 M	T3 M	T4 M	T10 M
1-OHN	15 ± 11	347 ± 172	1139 ± 473	12130 ± 5937	23062 ± 3746	9884 ± 2450
2-OHN	1 ± 0	79 ± 44	252 ± 145	1522 ± 909	2938 ± 592	1414 ± 298
2-OHBi	4 ± 3	11 ± 5	13 ± 0	85 ± 1	151 ± 20	58 ± 12
9-OHFe	11 ± 5	191 ± 89	78 ± 52	129 ± 41	240 ± 28	139 ± 40
4-OHPhe	2 ± 1	57 ± 46	139 ± 85	756 ± 50	1357 ± 148	857 ± 167
9-OHPhe	2 ± 2	114 ± 12	654 ± 53	2814 ± 1092	4896 ± 1058	1996 ± 494
3-OHPhe	2 ± 1	126 ± 59	613 ± 201	5520 ± 4890	10539 ± 6441	7355 ± 1397
1-OHPhe	4 ± 4	709 ± 233	3734 ± 744	12260 ± 11568	23676 ± 10817	16661 ± 7361
2-OHPhe	3 ± 3	251 ± 179	502 ± 193	3934 ± 967	7180 ± 1361	5476 ± 814
1-OHP	48 ± 40	19231 ± 5120	50929 ± 4668	101885 ± 10103	178626 ± 32918	79038 ± 9041
1-OHC	nd	38 ± 22	64 ± 12	1203 ± 174	2192 ± 442	913 ± 169
3-OHBaP	nd	156 ± 62	298 ± 180	10171 ± 637	16958 ± 6041	7527 ± 2976

Tableaux D-3 : Concentrations en métabolites de HAP (OHHAP) dans la bile des turbots exposés sédiment naturel au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de bile (n=5 poissons).

	T0 S	T1 S	T2 S	T3 S	T4 S	T10 S
1-OHN	15 ± 11	34 ± 9	146 ± 6	51 ± 14	112 ± 7	177 ± 36
2-OHN	1 ± 0	2 ± 1	13 ± 1	15 ± 7	102 ± 8	59 ± 4
2-OHBi	4 ± 3	8 ± 2	208 ± 238	12 ± 7	36 ± 1	208 ± 54
9-OHFe	11 ± 5	50 ± 4	115 ± 65	95 ± 44	75 ± 2	168 ± 11
4-OHPhe	2 ± 1	16 ± 1	38 ± 11	nd	19 ± 2	70 ± 18
9-OHPhe	2 ± 2	9 ± 2	38 ± 23	24 ± 2	47 ± 8	57 ± 26
3-OHPhe	2 ± 1	7 ± 4	26 ± 1	40 ± 11	207 ± 12	180 ± 60
1-OHPhe	4 ± 4	12 ± 3	47 ± 12	60 ± 31	260 ± 14	155 ± 22
2-OHPhe	3 ± 3	11 ± 9	33 ± 9	37 ± 6	279 ± 17	167 ± 19
1-OHP	48 ± 40	72 ± 32	127 ± 83	503 ± 152	5105 ± 591	3960 ± 769
1-OHC	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-OHBaP	nd	nd	nd	14 ± 9	nd	4 ± 3

Tableaux D-4 : Concentrations en métabolites de HAP (OHHAP) dans la bile des turbots exposés aux éluviats de pétrole au cours du temps. Concentrations moyennes exprimées en ng.g⁻¹ de bile (n=5 poissons).

	T0 P	T1 P	T2 P	T3 P	T4 P	T10 P
1-OHN	15 ± 11	144 ± 21	221 ± 229	720 ± 389	3089 ± 2144	947 ± 498
2-OHN	1 ± 0	27 ± 3	45 ± 47	274 ± 87	902 ± 293	429 ± 226
2-OHBi	4 ± 3	63 ± 30	17 ± 17	82 ± 56	122 ± 46	166 ± 115
9-OHFe	11 ± 5	179 ± 62	128 ± 65	1867 ± 915	3325 ± 478	1327 ± 1073
4-OHPhe	2 ± 1	13 ± 9	17 ± 15	17 ± 11	41 ± 19	27 ± 14
9-OHPhe	2 ± 2	14 ± 0	27 ± 26	64 ± 28	219 ± 90	92 ± 33
3-OHPhe	2 ± 1	12 ± 2	11 ± 1	321 ± 185	431 ± 191	503 ± 215
1-OHPhe	4 ± 4	29 ± 1	58 ± 31	443 ± 110	1214 ± 477	513 ± 132
2-OHPhe	3 ± 3	33 ± 5	34 ± 27	335 ± 75	603 ± 133	468 ± 228
1-OHP	48 ± 40	669 ± 38	1351 ± 895	7907 ± 223	11415 ± 1697	16248 ± 4927
1-OHC	nd	21 ± 20	7 ± 10	146 ± 81	407 ± 47	39 ± 96
3-OHBaP	nd	nd	57 ± 51	953 ± 328	5550 ± 2718	200 ± 223

ANNEXE 12

**Etude du suivi de la contamination chez la limande en Estuaire de Seine
(Chapitre II, § 2.4.1)**

1. Teneurs en HAP dans les muscles de limandes

Tableau A-1 : Teneurs en HAP dans les muscles de limandes en ng.g⁻¹ de poids sec pour les 4 campagnes d'échantillonnage et pour les différents groupes de limandes (analyse effectuée sur des lots de 10 limandes par groupe). 1^{ère} partie.

		Naph	2MN	1MN	Ay	Ae	Fe	Phe	3MP	2MP	2MA	9MP + 1MA	1MP	Ant	Fluo	Pyr
Campagne de Mars 2005	FA ES	nd	0,02	0,15	0,58	0,22	0,35	1,08	0,13	3,75	nd	0,13	0,19	0,46	0,55	0,35
	MA ES	nd	nd	0,11	0,21	0,27	0,66	1,33	0,21	6,21	0,08	0,17	0,17	0,33	0,71	0,07
	FJ ES	nd	1,19	1,12	0,83	0,55	0,82	2,59	0,63	0,93	0,12	0,92	0,50	0,42	1,32	1,41
	MJ ES	1,31	2,80	2,36	0,51	0,70	1,08	2,35	0,24	10,41	nd	0,52	0,33	0,28	0,96	0,99
	FA G	nd	0,43	0,43	0,83	0,40	1,10	2,30	0,53	8,86	0,09	0,55	0,30	0,83	0,93	0,40
	MA G	nd	0,29	0,30	0,36	0,35	0,88	1,65	0,15	7,96	0,11	0,21	0,21	0,48	0,86	0,34
	MJ G	nd	1,16	0,95	0,53	0,50	0,89	2,51	0,39	11,31	0,13	0,59	0,49	0,66	1,28	1,15
Campagne de Septembre 2005	FA ES	1,28	0,51	0,32	0,50	1,27	0,90	2,88	0,48	0,65	0,07	0,65	0,32	0,25	2,22	2,84
	MA ES	0,12	0,08	0,04	0,42	nd	0,41	2,78	0,56	0,74	0,13	0,69	0,55	0,35	2,53	2,87
	FJ ES	nd	nd	nd	0,70	nd	0,36	5,93	0,61	1,16	0,27	0,87	0,64	0,91	2,04	2,72
	MJ ES	0,41	nd	nd	0,70	nd	0,49	10,90	1,39	1,67	0,50	1,77	0,96	0,60	3,81	5,97
	FA G	1,26	0,59	0,33	0,29	1,24	1,35	4,34	0,90	1,20	0,16	1,28	1,07	0,27	2,34	3,79
	MA G	1,60	1,08	0,63	nd	nd	nd	3,35	0,80	1,00	0,21	1,02	0,59	0,50	1,66	2,30
	FJ G	nd	nd	nd	0,50	nd	0,35	6,34	1,23	1,75	0,19	1,41	1,13	0,79	2,51	3,14
Campagne de Mars 2006	FAES	nd	nd	0,16	1,34	2,97	7,22	62,02	4,00	5,18	0,82	2,67	2,71	1,75	15,89	5,42
	FAG	nd	0,22	0,39	1,25	2,56	5,43	44,16	2,49	3,42	nd	1,78	1,68	1,23	9,77	3,91
	MAG	nd	0,49	0,67	0,72	2,12	4,54	34,27	1,69	2,27	nd	1,17	1,27	0,95	6,47	5,20
	FJG	nd	0,77	0,87	0,66	nd	5,40	26,48	1,15	1,39	0,23	0,83	0,74	0,79	5,45	9,81
	MJG	nd	nd	0,16	0,37	nd	3,96	69,75	4,65	6,32	nd	3,29	3,29	1,53	23,36	9,02
Campagne de Septembre 2006	FJ G	nd	2,71	2,20	nd	3,15	1,65	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	MJ G	nd	1,88	1,42	2,41	1,27	0,94	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	FA G	nd	nd	nd	0,82	2,28	1,38	1,89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,57	2,61
	FJ ES	0,37	2,35	2,20	3,51	4,07	2,10	0,95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	MJ ES	1,00	1,98	1,72	3,22	2,08	1,38	nd	nd	nd	nd	0,21	nd	nd	nd	nd
	FA ES	nd	2,97	2,83	3,34	0,77	1,06	0,35	nd	nd	nd	nd	nd	0,22	nd	0,59
	MA ES	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,68	3,54

Tableau A-2 : Teneurs en HAP dans les muscles de limandes en ng.g⁻¹ de poids sec pour les 4 campagnes d'échantillonnage et pour les différents groupes de limandes (analyse effectuée sur des lots de 10 limandes par groupe). 2nd partie.

		BaA	triph+C	Mchry	BbF + BkF	BeP	BaP	Per	IP	DaA + DaC	BP	somme HAP	somme MHAP
Campagne de Mars 2005	FA ES	0,10	nd	nd	0,24	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03	0,06	4,14	4,37
	MA ES	0,16	0,02	nd	0,84	0,03	nd	0,01	0,01	0,03	0,02	4,70	6,95
	FJ ES	0,24	0,16	nd	0,30	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,05	8,80	5,41
	MJ ES	0,27	nd	nd	0,43	0,05	0,02	0,01	0,04	0,02	0,06	9,08	16,66
	FA G	0,33	0,03	nd	0,45	0,01	0,01	0,02	0,04	0,01	0,00	7,69	11,19
	MA G	0,25	0,06	nd	0,40	0,14	0,00	0,01	0,01	0,03	0,02	5,84	9,23
	MJ G	0,50	0,15	nd	0,58	0,13	0,09	0,04	0,10	nd	0,09	9,20	15,02
Campagne de Septembre 2005	FA ES	0,52	1,36	nd	0,35	0,42	0,20	0,08	0,09	0,13	nd	15,29	3,00
	MA ES	0,18	0,69	nd	0,70	0,31	0,21	nd	nd	nd	nd	11,57	2,79
	FJ ES	0,14	0,57	nd	1,23	0,41	0,20	0,13	nd	nd	nd	15,34	3,55
	MJ ES	0,38	0,79	nd	1,32	0,52	0,41	nd	nd	nd	nd	26,30	6,29
	FA G	0,21	1,38	nd	nd	0,20	0,11	nd	nd	nd	nd	16,78	5,53
	MA G	0,21	0,34	nd	0,91	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10,87	5,33
	FJ G	0,25	0,38	nd	1,18	0,23	nd	nd	nd	nd	nd	15,67	5,71
Campagne de Mars 2006	FAES	0,23	nd	0,83	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	96,84	16,37
	FAG	0,06	nd	0,79	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	68,37	10,77
	MAG	0,10	nd	0,78	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	54,37	8,34
	FJG	nd	nd	0,81	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	48,59	6,79
	MJG	0,16	nd	0,73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	108,15	18,44
Campagne de Septembre 2006	FJ G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,80	4,91
	MJ G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,62	3,30
	FA G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,55	nd
	FJ ES	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11,00	4,55
	MJ ES	0,10	0,10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7,88	3,91
	FA ES	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,33	5,80
	MA ES	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,36	nd

2. Teneurs en HAP dans les foies de limandes

Tableau B-1 : Teneurs en HAP dans les foies de limandes en ng.g⁻¹ de poids sec pour les 4 campagnes d'échantillonnage et pour les différents groupes de limandes (analyse effectuée sur des lots de 10 limandes par groupe). 1^{ère} partie.

		Naph	2MN	1MN	Ay	Ae	Fe	Phe	3MP	2MP	2MA	9MP + 1MA	1MP	Ant	Fluo	Pyr
Campagne de Mars 2005	FAG	5,62	5,35	2,87	0,92	8,63	2,26	9,33	nd	nd	1,58	nd	0,29	nd	0,53	0,6
	MAG	1,61	3,93	2,04	0,72	6,29	0,67	5,75	nd	nd	1,04	nd	nd	nd	0,77	0,77
	MJG	0,02	14,34	11,76	0,84	7,55	2,11	8,84	0,23	nd	6,2	nd	nd	nd	0,7	0,85
	FJES	5,43	7,8	4,03	3,55	9,55	3,17	12,15	0,16	0,32	5,31	nd	1,01	nd	1,35	1,74
	MJES	0,82	3,58	2	1,03	9,63	2,81	9,92	nd	nd	2,66	nd	0,34	nd	0,91	2,18
	FAES	nd	3,19	1,61	0,65	5,66	0,22	4,73	nd	nd	0,89	nd	nd	nd	0,42	0,48
	MAES	3,17	4,53	2,39	0,77	6,79	1,02	6,56	nd	nd	1,16	nd	nd	nd	1,05	1,01
Campagne de Septembre 2005	FAG	6,29	4,64	2,53	0,73	6,9	2,18	7,91	0,18	nd	1,31	0,02	1,73	nd	0,7	0,69
	MAG	5,03	4,25	2,3	0,65	5,66	1,35	6,05	nd	nd	1,03	nd	1,35	nd	1,24	1,13
	MJG	5,75	15,09	12,19	0,81	7,36	3,25	10,02	0,98	0,48	6,19	nd	1,88	nd	1,56	1,51
	FJG	1,81	11,3	9,21	0,64	5,77	1,98	7,19	0,41	nd	4,78	nd	1,36	nd	0,81	0,86
	FJES	24,93	15,81	8,62	5,76	15,47	8,51	23,65	2,37	3,51	9,06	1,34	5,12	1,51	4,65	4,75
	MJES	3,19	3,46	1,98	0,86	7,98	2,86	8,84	0,18	nd	2,27	0,12	1,88	nd	1,14	2,11
	FAES	22,61	10,96	6,22	1,29	11,32	5,32	15,18	1,4	1,46	2,42	0,91	3,21	0,33	4,4	3,76
	MAES	16,99	8,81	4,97	1,08	9,51	4,05	12,26	0,91	0,86	1,97	0,56	2,61	0,17	3,39	2,92
Campagne de Mars 2006	FAES	4,79	3,61	4,02	6,04	nd	9,37	18,96	3,18	4,55	36,68	1,15	2,45	-0,62	3,2	3,35
	FAG	6,03	5,21	5,36	4,61	nd	8,86	20,48	4,86	1,95	2,71	50,56	0,62	0,28	4,75	3,21
	MAG	11,34	12,9	8,24	3,55	nd	7,44	18,71	4,65	4,63	37,11	0,57	1,95	0,57	5,47	4,65
	FJG	12,94	9,83	7,54	5,36	nd	12,34	33,05	3,57	3,71	24,35	0,44	3,85	0,9	6,05	4,84
	MJG	11,98	8,78	5,11	5,74	nd	12,9	32,35	4,3	4,21	15,34	1,26	2,5	0,78	5,48	6,55
Campagne de Septembre 2006	FJG	11,92	9,1	6,41	6,03	nd	12,36	32,38	3,81	3,8	27,22	1,01	3,67	0,42	5,61	4,21
	MJG	12,51	9,61	6,97	4,27	nd	11,15	29,47	2,93	3,26	31,15	0,8	2,26	0,89	4,97	4,76
	FAG	7,03	6,12	5,19	4,45	nd	8,4	21,54	5,47	3,58	40,36	0,45	2,1	0,32	3,72	3,45
	FJES	15,4	12,13	7,85	4,27	nd	11,35	34,25	5,46	7,09	58,24	0,82	1,54	0,94	5,16	3,82
	MJES	22,88	13,66	8,29	5,3	nd	11,78	40,77	4,71	5,74	30,97	1,2	2,02	1,2	5,49	4,48
	FAES	10,25	9,06	6,26	3,9	1,06	7,66	22,17	4,7	6,14	57,27	1,34	2,34	0,73	4,72	4,42
	MAES	9,5	5,26	5,48	6,57	nd	10,72	20,94	3,77	3,73	24,85	0,75	2,76	nd	5,8	4,23

Tableau B-2 : Teneurs en HAP dans les foies de limandes en ng.g⁻¹ de poids sec pour les 4 campagnes d'échantillonnage et pour les différents groupes de limandes (analyse effectuée sur des lots de 10 limandes par groupe). 2nd partie.

		BaA	triph+ Chrys	M- Chrys	BbF + BkF	BeP	BaP	Per	IP	DaA+ DaC	BP	somme HAP	somme MHAP
Campagne de Mars 2005	FAG	nd	nd	nd	1,14	0,98	0,58	nd	nd	nd	nd	30,59	10,09
	MAG	nd	nd	nd	1,23	1,06	0,64	nd	nd	nd	nd	19,51	7,01
	MJG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20,91	32,53
	FJES	nd	nd	nd	7,61	nd	nd	nd	nd	nd	nd	44,55	18,63
	MJES	nd	nd	nd	2,5	1,04	0,68	nd	nd	nd	nd	31,52	8,58
	FAES	nd	nd	nd	1,11	0,95	0,58	nd	nd	nd	nd	14,8	5,69
	MAES	nd	nd	nd	1,33	1,14	0,69	nd	nd	nd	nd	23,53	8,08
Campagne de Septembre 2005	FAG	nd	nd	nd	0,92	0,78	0,46	nd	nd	nd	nd	27,56	10,41
	MAG	nd	nd	nd	1,11	0,95	0,58	nd	nd	nd	nd	23,75	8,93
	MJG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	30,26	36,81
	FJG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19,06	27,06
	FJES	nd	nd	nd	12,34	nd	nd	nd	nd	nd	nd	101,57	45,83
	MJES	nd	nd	nd	2,07	0,86	0,56	nd	nd	nd	nd	30,47	9,89
	FAES	nd	nd	nd	2,22	1,9	1,16	nd	nd	nd	nd	69,49	26,58
	MAES	nd	nd	nd	1,87	1,6	0,97	nd	nd	nd	nd	54,81	20,69
Campagne de Mars 2006	FAES	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	45,09	55,64
	FAG	nd	nd	4,51	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	48,22	75,78
	MAG	1,09	nd	2,82	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	52,82	72,87
	FJG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	75,48	53,29
	MJG	nd	nd	4,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	75,78	45,55
Campagne de Septembre 2006	FJG	nd	nd	3,18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	72,93	58,21
	MJG	nd	2,04	nd	2,14	3,04	nd	nd	nd	nd	nd	75,22	56,98
	FAG	nd	nd	4,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	48,9	67,49
	FJES	nd	nd	3,32	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	75,2	96,43
	MJES	0,78	nd	2,59	5,78	5,01	nd	nd	nd	nd	nd	103,47	69,19
	FAES	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	54,9	87,11
	MAES	nd	nd	4,02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	57,14	50,63

3. Teneurs en métabolites de HAP dans la bile de limandes

Tableau C : Teneurs en métabolites de HAP dans la bile de limandes en ng.g⁻¹ de bile pour les 4 campagnes d'échantillonnage et pour les différents groupes de limandes (analyse effectuée sur des lots de 10 limandes par groupe).

		1-OHN	2-OHN	2-OHBi	9-OHFe	4-OHPhe	9-OHPhe	3-OHPhe	1-OHPhe	2-OHPhe	1-OHP	1-OHC	3-OHBaP	OHHAP
Campagne de Mars 2005	FJ ES	86	15	11	16	27	10	9	27	18	21	17	7	264
	MJ ES	60	10	6	16	1	3	12	5	2	11	9	12	147
	MA ES	82	4	6	63	5	7	8	24	7	238	9	5	458
	MJ G	135	24	57	86	17	38	19	36	30	53	53	14	562
	FA G	103	5	3	7	5	6	12	6	6	31	9	6	199
	MA G	88	27	30	74	7	11	10	18	11	20	16	12	324
Campagne de Septembre 2005	FJ ES	35	4	9	35	5	7	6	6	4	78	9	9	207
	MJ ES	56	9	10	77	5	12	3	3	6	89	nd	nd	270
	FA ES	79	2	2	37	6	1	1	1	2	93	1	3	228
	MA ES	21	1	6	25	2	3	1	nd	3	93	2	4	161
	FJ G	12	1	1	3	1	nd	nd	1	1	23	nd	nd	43
	MJ G	127	12	14	22	nd	6	nd	7	16	22	1	1	228
	FA G	19	nd	2	7	1	1	nd	1	1	25	3	nd	60
	MA G	20	1	1	5	1	2	nd	1	2	13	nd	nd	46
Campagne de Mars 2006	FA ES	94	nd	266	202	39	118	46	103	47	245	200	nd	1 360
	MA ES	57	nd	106	276	nd	64	23	nd	nd	112	nd	nd	638
	FJ G	44	14	46	145	8	27	13	11	12	63	nd	nd	383
	MJ G	130	30	36	107	15	45	14	28	16	30	nd	nd	451
	FA G	14	12	24	72	3	23	nd	16	7	28	nd	nd	199
	MA G	27	20	33	172	5	27	nd	12	10	48	8	nd	362
Campagne de Septembre 2006	FA ES	126	6	66	42	nd	nd	4	20	11	435	nd	nd	710
	MA ES	144	23	138	106	nd	nd	38	89	43	60	nd	nd	641
	MJ ES	42	14	205	40	nd	nd	20	30	34	25	nd	nd	410
	FJ ES	20	14	371	25	nd	nd	17	42	44	24	nd	nd	557
	FJ G	37	9	87	29	nd	nd	11	24	19	16	nd	nd	232
	MJ G	40	9	136	15	nd	nd	16	86	18	nd	nd	0	320
	FA G	13	5	142	26	nd	nd	7	22	13	17	nd	nd	245
	MA G	61	3	48	33	nd	nd	5	18	9	93	nd	nd	270

ANNEXE 13

Etude du suivi de la contamination dans la Baie de Guanabara (Brésil)
(Chapitre II, § 2.4.2)

Tableau A : Teneurs en métabolites de HAP dans la bile de poissons échantillonnés dans la Baie de Guanabara sur les sites de Dentro M et P, Botofago et Boa Viagem en Février, Mars et Avril 2006. Concentrations exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de bile (moyenne \pm écartype)

Sites	Dentro - Paqueta island			Dentro - Paqueta island	Boa Viagem	Dentro - Refinery	Boa Viagem	Botafogo
	<i>Genidens genidens</i>			<i>Micropogonias furnieri</i>		<i>Cyclichthys spilostylus</i>		<i>Ctenosciana gracilicirrhus</i>
Espèces								
Date	Février 2006 (n = 3)	Mars 2006 (n = 2)	Avril 2006	Mars 2006	Avril 2006	Mars 2006 (n = 2)	Avril 2006 (n = 3)	Avril 2006
1-OHN	0,9 \pm 1,3	1,1 \pm 1,0	1,2	18,9	3,4	0,3 \pm 0,2	1,3 \pm 1,1	2,5
2-OHN	15,4 \pm 2,9	3,8 \pm 1,2	nd	2,2	nd	0,3 \pm 0,04	0,7 \pm 0,4	1,9
2-OHBi	33,7 \pm 1,0	15,9 \pm 8,6	nd	10,3	nd	1,2 \pm 0,2	1,9 \pm 2,9	10,0
9-OHFe	19,1 \pm 5,3	11,8 \pm 0,3	nd	6,3	nd	0,8 \pm 0,3	2,9 \pm 6,5	8,5
4-OHPhe	3,8 \pm 1,9	0,8 \pm 1,1	1,5	2,2	nd	0,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,3	0,7
9-OHPhe	nd	1,1 \pm 1,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-OHPhe	nd	nd	nd	nd	nd	0,3 \pm 0,5	3,9 \pm 4,1	nd
1-OHPhe	36,1 \pm 26,9	13,2 \pm 2,8	7,5	18,0	nd	3,4 \pm 1,4	7,6 \pm 5,3	nd
2-OHPhe	19,6 \pm 13,7	14,2 \pm 3,3	nd	5,7	nd	1,3 \pm 0,05	3,3 \pm 3,0	5,2
1-OHP	11,6 \pm 3,8	11,5 \pm 4,2	2,8	10,1	9,2	7,4 \pm 1,5	27,2 \pm 5,3	20,0
1-OHC	1,2 \pm 2,3	1,1 \pm 2,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-OHBaP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
OHPhe	59,5 \pm 39,8	29,3 \pm 8,8	8,9	26,0	nd	5,2 \pm 2,1	14,9 \pm 6,7	5,9
OHHAP	141,4 \pm 38,9	74,5 \pm 0,6	12,9	73,7	12,6	15,2 \pm 1,2	48,8 \pm 12,5	48,7

RESUME

Afin d'étudier la santé d'un écosystème marin et le potentiel toxique d'une contamination telle que celle liée à la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), il est nécessaire, outre de connaître les niveaux de contamination du milieu, de pouvoir accéder à la fraction toxique à laquelle les organismes aquatiques ont été exposés et de connaître les effets toxiques des contaminants incriminés. L'exposition et la contamination des organismes aquatiques aux HAP ont généralement été évaluées par le dosage des HAP bioaccumulés dans les tissus. Or, cette approche est critiquable si l'on tient compte des capacités de biotransformation des organismes, notamment des vertébrés, et des propriétés toxiques des produits de transformation formés. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'étudier les phénomènes de bioaccumulation et de biotransformation des HAP chez les organismes marins via l'étude des métabolites de HAP. Un effort de validation de biomarqueurs pertinents pour évaluer la génotoxicité des HAP en lien avec la contamination chimique des tissus et la production de métabolites est nécessaire.

Des méthodes de dosage des métabolites de HAP dans les matrices biologiques ont tout d'abord été mises au point. Ces outils analytiques sensibles, innovants et performants ont ensuite été appliqués lors d'expositions de poissons à des HAP via différentes voies de contamination en milieu contrôlé. Ils ont permis une meilleure connaissance des phénomènes de biotransformation des HAP. Enfin, des études de terrain ont été réalisées, notamment dans le cadre de l'étude de la contamination de la Baie de Seine, montrant l'applicabilité du dosage des métabolites de HAP dans l'évaluation de l'exposition des organismes aux HAP en milieu naturel. Dans le cadre d'une approche intégrée chimie/biologie, ces travaux ont permis d'apporter une contribution dans le transfert méthodologique des biomarqueurs de génotoxicité des HAP pour des applications en surveillance de l'Atlantique Nord et notamment dans la Manche.

Mots-clés : HAP, métabolites, poisson, surveillance environnementale, biotransformation, GC/MS, GC-MS/MS, UPLC-MS/MS

ABSTRACT

In order to study the health of a marine ecosystem and the toxic potential of a contamination such as that related to the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), it is necessary, in addition to the determination of environmental contamination levels, to have access to the fraction for aquatic organisms have been exposed to and to identify the toxic effects of the contaminants. The exposure and contamination of aquatic organisms to PAHs have generally been evaluated by the quantification of bioaccumulated PAHs in tissues. However, this approach is criticable when taking into account the biotransformation capabilities of organisms such as vertebrates and the toxic properties of biotransformation products. In this way, the aim of this study is to study PAH bioaccumulation and biotransformation phenomena through the PAH metabolites study. An effort for the validation of relevant biomarkers to evaluate the link between the genotoxicity of PAHs, PAHs body burden and PAH metabolites production, is necessary.

Analytical techniques to quantify PAH metabolites in biological matrices have first been set up. Then, these sensible, innovating and powerful analytical tools have been applied to the study of fish exposures to PAHs through different contamination sources in controlled conditions. This allowed to have a better understanding of PAH biotransformation phenomena. Finally, field studies have been led, notably to study the contamination of the Seine bay, demonstrating the applicability of the quantification of PAH metabolites to evaluate the exposure and the contamination of organisms to PAHs in natural environment. Within the framework of an integrated approach chemistry/biology, this work led to a contribution in the methodological transfer of biomarkers of PAH genotoxicity for biomonitorings in the North Atlantic and in particular in the English Channel.

Keywords : PAH, metabolites, fish, environmental survey, biotransformation, GC/MS, GC-MS/MS, UPLC-MS/MS

