



**HAL**  
open science

# Optimisation du suivi de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques pendant la grossesse avec le développement et la validation de méthodes analytiques et biologiques

Stéphanie Swiha

## ► To cite this version:

Stéphanie Swiha. Optimisation du suivi de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques pendant la grossesse avec le développement et la validation de méthodes analytiques et biologiques. Gynécologie et obstétrique. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019USPCB020 . tel-02538673

**HAL Id: tel-02538673**

**<https://theses.hal.science/tel-02538673>**

Submitted on 9 Apr 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

ED 562

Département : Développement, Génétique, Reproduction, Neurobiologie et  
Vieillessement

Présentée par

**Stéphanie SWIHA**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université Paris Descartes**

---

### **Optimisation du suivi de l'exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques pendant la grossesse avec le développement et la validation de méthodes analytiques et biologiques**

---

Thèse dirigée par Mme Sophie Gil et Mme Nathalie Delaunay

**Thèse soutenue publiquement le 21 janvier 2019 devant le jury composé de :**

<b>M. François LESTREMAU</b> , Docteur, INERIS, Verneuil-en-Halatte, France	Rapporteur
<b>M<sup>me</sup> Marie-Noëlle DIEUDONNE</b> , Professeur, UVSQ, Versailles, France	Rapporteur
<b>M. Yvan VANDER HEYDEN</b> , Professeur, Vrije Universiteit Brussel, Belgique	Président du Jury
<b>M<sup>me</sup> Valérie PICHON</b> , Professeur, Sorbonne Université, Paris, France	Examineur
<b>M<sup>me</sup> Sophie Gil</b> , Professeur, Université Paris Descartes, Paris, France	Directrice de thèse
<b>M<sup>me</sup> Nathalie DELAUNAY</b> , Docteur, CNRS, Paris, France	Directrice de thèse

UMR S 1139 : Physiopathologie et pharmacotoxicologie placentaire humaine, INSERM

Laboratoire de Physiopathologie et pharmacotoxicologie placentaire humaine

Faculté de Pharmacie de Paris

4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris



## **Avertissement au lecteur**

Cette thèse est rédigée comme une succession de chapitres, dont certains sont construits sur la structure d'articles pouvant se lire indépendamment. Ceci peut donc engendrer des changements entre la langue française et anglaise ainsi que quelques redondances entre les différentes rubriques matériels et méthodes ou les introductions.



## Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier le Dim Analytics pour avoir financé ce projet de thèse qui s'est inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire des Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM) à l'ESPCI Paris et le laboratoire de Physiopathologie et Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine à la faculté de pharmacie de Paris.

Je souhaite exprimer ma gratitude au Professeur Marie-Noëlle Dieudonné ainsi qu'au Docteur François Lestremou pour avoir accepté de juger la qualité de mes travaux en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également au Professeur Yvan Vander Heyden et au Professeur Valérie Pichon pour leur implication et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit.

J'exprime ma reconnaissance à mes directrices de thèse, le Professeur Sophie Gil et le Docteur Nathalie Delaunay, pour leur soutien, leur confiance et l'aide scientifique apportée tout au long de ce doctorat. Je les remercie, notamment, pour leur encouragement, pendant les moments difficiles et de doutes, qui m'ont toujours aidé à rester motivée. Merci également pour tous vos conseils et vos corrections qui m'ont aidé à m'améliorer. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.

Je remercie le Professeur Valérie Pichon et le Docteur Thierry Fournier pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Merci pour votre disponibilité tout au long de cette thèse. Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Valérie Pichon pour m'avoir initiée et formée à la chimie analytique tout au long de mon parcours universitaire. Je vous remercie également pour tous les conseils que vous m'avez donné au cours de ces trois ans. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis.

Je souhaite également remercier le Dr. Anne-Gaël Cordier et le Dr. Pierre-François Ceccaldi ainsi que leur équipe médicale pour leur aide concernant la mise en place des prélèvements au sein de l'hôpital Antoine Béclère et l'hôpital Beaujon. Merci de m'avoir intégrée facilement au sein de vos équipes. Je remercie également Christelle Simasotchi, pour ton aide et ton implication pour les perfusions. Merci pour les discussions et les rires que nous avons partagé. Merci pour ton soutien et tes encouragements.

Je remercie Samira Aliane et Jessica Dalmasso, qui en tant que stagiaires, ont contribué à ce projet de thèse tant sur le plan analytique que sur le plan biologique. Merci pour leur aide, leur enthousiasme, et leur implication.

Je remercie tous les membres du LSABM pour leur accueil, leur conseil, leur aide et les bons moments partagés. Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Jérôme Vial pour son aide, ses conseils et ses explications concernant toute la partie statistique. Je remercie aussi le Docteur José Dugay pour son aide en chromatographie gazeuse. Je souhaite également remercier Patrick Sassi et Mélanie Cohen pour leur grande disponibilité et leur conseil en cas de problèmes et de pannes instrumentales. Merci aussi à tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires du laboratoire que j'ai pu rencontrés au cours des ces trois ans. Je remercie tout particulièrement Nolwenn, Manel, Alizée, Lorena, Maud, Porkodi, Vincent, Sara, Julien, Florine, Marine, Stan et Thomas.

Enfin, mes derniers remerciements vont à mes parents, ma sœur et mon frère pour leur patience, leur soutien et pour avoir toujours cru en moi tout au long de ce projet. Cette thèse n'aurait pas été possible sans vous...Je remercie également mes amis pour leur soutien et pour leur encouragement pendant ces trois ans.

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des publications et communications</b> .....	<b>13</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>15</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>17</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>19</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>23</b>
<b>PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>27</b>
<b>Chapitre I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et la grossesse</b> .....	<b>31</b>
<b>I.1. Les HAP</b> .....	<b>31</b>
I.1.1. Qu'est-ce que les HAP ? .....	31
I.1.2. Sources d'exposition .....	33
I.1.3. Toxicité et réglementation des HAP.....	34
I.1.4. Quelques éléments relatifs aux risques de l'exposition aux HAP .....	37
<b>I.2. Le placenta, interface entre la mère et le fœtus</b> .....	<b>38</b>
I.2.1. Le placenta à terme .....	38
I.2.2. Le trophoblaste villositaire flottant.....	40
I.2.3. La barrière placentaire.....	41
I.2.4. Les fonctions placentaires.....	42
I.2.5. Les différents modèles d'étude du placenta humain.....	48
I.2.6. Risques de l'exposition aux HAP pendant la grossesse.....	49
I.2.7. Approches utilisées dans les études épidémiologiques pour évaluer l'exposition aux HAP.....	51
<b>Chapitre II. Analyse des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les matrices biologiques humaines</b> .....	<b>57</b>
<b>Revue : Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in human biological samples</b> .....	<b>57</b>
<b>II.1. Abstract</b> .....	<b>57</b>
<b>II.2. Introduction</b> .....	<b>59</b>
<b>II.3. Methods used to quantitate PAHs in biological matrices</b> .....	<b>61</b>

II.3.1.	Background .....	61
II.3.2.	Chromatographic methods for PAH analysis .....	65
II.3.3.	Sample pretreatment.....	77
<b>II.4.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>93</b>
<b>Chapitre III. Données sur l'exposition maternelle et fœtale aux HAP par leur dosage dans différentes matrices .....</b>		<b>97</b>
<b>III.1.</b>	<b>Quantités retrouvées dans les différentes matrices.....</b>	<b>98</b>
<b>III.2.</b>	<b>Aspect biologique et corrélations.....</b>	<b>100</b>
III.2.1.	Exposition aux HAP et complications de grossesse.....	101
III.2.2.	Exposition aux HAP et nouveau-né .....	102
III.2.3.	Exposition aux HAP et hormones de reproduction .....	103
III.2.4.	Exposition aux HAP et teneur en HAP dans le lait maternel .....	103
III.2.5.	Exposition aux HAP et teneurs en HAP dans des échantillons appariés .....	104
<b>III.3.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>113</b>
<b>Objectifs de la thèse.....</b>		<b>115</b>
<b>PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....</b>		<b>117</b>
<b>Chapitre IV. Développement d'une méthode de quantification des 24 HAP réglementés dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical par LC-UV/FD .....</b>		<b>121</b>
<b>Article 1: Development of an analytical method for the simultaneous quantitation of 24 regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in maternal and umbilical cord sera.....</b>		<b>122</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>122</b>
<b>IV.2.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>124</b>
<b>IV.3.</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>126</b>
IV.3.1.	Chemicals .....	126
IV.3.2.	Apparatus and analytical conditions .....	127
IV.3.3.	SPE procedure .....	127
IV.3.4.	Optimization of the evaporation step .....	128
IV.3.5.	Optimization of the protein precipitation procedure with a design of experiment .....	128
IV.3.6.	Extraction of PAHs from maternal and umbilical cord sera .....	129
<b>IV.4.</b>	<b>Results and Discussions.....</b>	<b>129</b>

IV.4.1.	Development of the LC-DAD/FD analysis .....	129
IV.4.2.	Development of the SPE procedure .....	131
IV.4.3.	Optimization of the protein precipitation procedure by a DOE .....	139
IV.4.4.	Extraction of the 24 regulated PAHs from maternal and umbilical sera .....	142
<b>IV.5.</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>145</b>
<b>Chapitre V. Validation d'une méthode de quantification par LC-UV/FD de 22 HAP</b>		
<b>dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical .....</b>		<b>149</b>
<b>Article 2 : Validation of the analytical procedure for the determination of 22</b>		
<b>regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in maternal and umbilical cord sera .....</b>		<b>151</b>
<b>V.1.</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>151</b>
<b>V.2.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>152</b>
<b>V.3.</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>153</b>
V.3.1.	Chemicals .....	153
V.3.2.	Analysis by LC-DAD/FD .....	154
V.3.3.	Sample preparations .....	154
V.3.4.	Validation procedure .....	155
<b>V.4.</b>	<b>Results and discussion .....</b>	<b>156</b>
V.4.1.	Accuracy profiles .....	156
V.4.2.	Trueness and precision .....	169
V.4.3.	Real samples analysis .....	170
<b>V.5.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>175</b>
<b>Chapitre VI. Développement et validation d'une méthode de confirmation par</b>		
<b>GC/MS pour la quantification des 24 HAP dans le sérum maternel et le sérum de cordon</b>		
<b>ombilical</b>	<b>179</b>	
<b>VI.1.</b>	<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>181</b>
VI.1.1.	Réactifs chimiques .....	181
VI.1.2.	Système chromatographique et conditions d'analyse .....	181
VI.1.3.	Préparation d'échantillon .....	182
VI.1.4.	Validation .....	183
<b>VI.2.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>184</b>
VI.2.1.	Mise au point de la séparation .....	184
VI.2.2.	Rendements d'extraction .....	193

VI.2.3.	Validation .....	195
<b>VI.3.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>207</b>
<b>Chapitre VII. Étude de l'effet des 16 HAP US-EPA sur les fonctions de</b>		
<b>différenciations trophoblastiques, les fonctions hormonales placentaires et évaluation de</b>		
<b>leur passage transplacentaire .....</b>		
		<b>211</b>
VII.1.1.	Matériel et méthodes .....	213
VII.1.2.	Culture primaire de trophoblastes isolés à partir de placentas humains à terme .....	213
VII.1.3.	Perfusion d'un cotylédon <i>ex vivo</i> .....	221
<b>VII.2.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>223</b>
VII.2.1.	Culture primaire de trophoblastes .....	223
VII.2.2.	Etude du passage transplacentaire du mix HAP par le modèle du cotylédon <i>ex vivo</i> .....	232
<b>VII.3.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>240</b>
<b>Chapitre VIII. Développement de la quantification des HAP dans les tissus</b>		
<b>placentaires : premières expériences .....</b>		
		<b>248</b>
<b>VIII.1.</b>	<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>249</b>
VIII.1.1.	Placentas .....	249
VIII.1.2.	Réactifs chimiques .....	249
VIII.1.3.	Système chromatographique et conditions d'analyse .....	249
<b>VIII.2.</b>	<b>Préparation d'échantillon .....</b>	<b>250</b>
VIII.2.1.	Homogénéisation du placenta .....	250
VIII.2.2.	SPE .....	250
<b>VIII.3.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>251</b>
VIII.3.1.	Lyophilisation .....	251
VIII.3.2.	Sonication des échantillons .....	251
<b>Conclusions et perspectives .....</b>		
		<b>255</b>
<b>ANNEXES .....</b>		
		<b>261</b>
<b>Annexe 1 .....</b>		
		<b>262</b>
<b>Annexe 2 .....</b>		
		<b>267</b>
<b>Annexe 3 .....</b>		
		<b>268</b>
<b>Liste des figures .....</b>		
		<b>273</b>

**Liste des tableaux ..... 277**  
**Références ..... 279**



## Liste des publications et communications

### PUBLICATION SOUMISE

Stéphanie Swiha, Valérie Pichon, Thierry Fournier, Sophie Gil, Nathalie Delaunay. **Development of an analytical method for the simultaneous quantitation of 24 regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in maternal and umbilical cord sera.** *Soumise le 23 novembre 2018 (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, JPBA\_2018\_2396)*

### PUBLICATIONS EN PRÉPARATION

Stéphanie Swiha, Valérie Pichon, Thierry Fournier, Jérôme Vial, Sophie Gil, Nathalie Delaunay. **Validation of the analytical procedure for the determination of 22 regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in maternal and umbilical cord sera.**

Stéphanie Swiha, Valérie Pichon, Thierry Fournier, Sophie Gil, Nathalie Delaunay. **Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in human biological samples.**

### CONFÉRENCE

Stéphanie Swiha, Valérie Pichon, Thierry Fournier, Sophie Gil, Nathalie Delaunay. **Development of an analytical method for the simultaneous quantitation of 24 regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in maternal and umbilical cord sera.** 19<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Saint Jacques de Compostelle, Espagne, juin 2017.

### COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

Stéphanie Swiha, Valérie Pichon, Thierry Fournier, Sophie Gil, Nathalie Delaunay. **Développement d'une méthode d'analyse pour 24 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans le sérum.** 12<sup>ème</sup> Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP, Paris, France, Mars 2016.

Stéphanie Swiha, Valérie Pichon, Thierry Fournier, Sophie Gil, Nathalie Delaunay. **Development and validation of blood and placenta sample pretreatments for monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) exposure during pregnancy.** DA-PBA, 11<sup>th</sup> International Symposium on Drug analysis and 29<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Louvain, Belgique, Septembre 2018.

Stéphanie Swiha, Valérie Pichon, Thierry Fournier, Sophie Gil, Nathalie Delaunay. **Development and validation of an analytical method for the quantitation in sera and placenta of 24 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for monitoring of pregnant women exposure.** ISC 2018, 32<sup>nd</sup> International Symposium on Chromatography, Cannes-Mandelieu, France, Septembre 2018.



## Résumé

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont principalement émis par les activités humaines et représentent l'un des principaux groupes de polluants dans l'air, les sols, les eaux et les aliments. Par conséquent, ils font l'objet d'une surveillance atmosphérique, et alimentaire. Cette étude s'attache au cas particulier de la femme enceinte et son fœtus. En effet, l'exposition pendant la grossesse est à l'origine de malformations fœtales, de prématurité et de troubles pouvant survenir ensuite chez l'enfant mais aussi chez l'adulte. À ce jour, seuls quelques HAP réglementés par l'environnement ont été recherchés et quantifiés dans le sang maternel ou le sang de cordon ombilical. De plus, les données sur les performances analytiques sont souvent manquantes. Ainsi ce projet vise pour la première fois en France à développer et valider des méthodes analytiques et biologiques pour la surveillance de l'exposition aux HAP durant la grossesse.

Dans une première partie, la séparation des 24 HAP par LC/UV-FD a été développée. Ensuite, une étape de précipitation des protéines a été optimisée à l'aide d'un plan d'expérience dans le but de rompre les interactions entre les HAP et les protéines. Une étape d'extraction sur phase solide (SPE) à l'aide d'un support à base de silice greffée C18, a ensuite été optimisée pour extraire et concentrer les HAP. La nature et la proportion du solvant organique introduit dans l'échantillon ont été optimisées pour éviter l'adsorption des HAP sur les parois de la cartouche lors de l'extraction et sur les parois des flacons pendant le stockage. Les étapes de lavage et d'élution ont également été optimisées. Pour enrichir à nouveau les fractions d'élution, une étape d'évaporation a été développée en testant 2 approches : une évaporation totale ou partielle (méthode de la "dernière goutte"). L'ensemble du protocole a été appliqué avec succès à l'analyse d'un mélange de sérums maternels dopés et un mélange de sérums dopés provenant de sangs de cordons ombilicaux.

Après l'automatisation de l'étape de SPE, la seconde partie visait à valider cette procédure analytique, par l'approche des profils d'exactitude en LC/UV-FD pour les 2 types de sérums, mais aussi développer et valider une méthode de confirmation par GC/MS. Ensuite, des échantillons de sérum provenant de femmes enceintes et de sangs de cordons ombilicaux ont été analysés par LC/UV-FD et GC/MS.

Enfin, après la validation de la méthode analytique pour une solution de perfusion placentaire contenant les 16 HAP US EPA à 1  $\mu\text{M}$  final, un modèle de perfusion de cotylédon humain *ex vivo* a été utilisé afin d'étudier le transfert placentaire des HAP. En complément, des cultures cellulaires de trophoblastes humains exposées avec un mélange des 16 HAP US EPA (concentration 1  $\mu\text{M}$ ) ont été réalisées pour évaluer l'impact de l'exposition aux HAP sur les fonctions placentaires.

## Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are mainly emitted by human activities and are one of the main pollutant groups in air, soils, waters, and food. Therefore, they are subject to atmospheric, environmental and dietary monitoring. This study focuses on the particular case of exposure of pregnant women and their fetus, which are at risks. Indeed, PAH exposure can lead to fetal malformations, prematurity and even disorders in children and adult. To date, only a few PAHs regulated by US-EPA were searched and quantified in maternal or umbilical cord blood. Moreover, analytical performance data are often lacking. Hence, this study aims for the first time in France, at developing analytical and biological methods for the monitoring of PAH exposure during pregnancy.

In a first part, the simultaneous determination of the 24 regulated PAHs in sera from maternal and umbilical cord bloods was developed. First, the separation of the 24 PAHs by LC/UV-FD was optimized. Then a precipitation step of the proteins was optimized with a Design of Experiment to disrupt all the interactions between the PAHs and the proteins. A solid phase extraction (SPE) protocol, with a C18-based sorbent, was next optimized to extract and concentrate the PAHs. The nature and the proportion of an organic solvent in the sample was optimized to avoid the PAH adsorption on the cartridge and vial walls. The washing and elution steps were also optimized. To enrich again the elution fractions, an evaporation step was developed by testing 2 approaches: a total or a partial evaporation ("last drop" method). This sample pretreatment protocol was successfully applied to the analysis of spiked pooled sera from maternal and umbilical cord bloods.

After the automatization of the SPE step, the second part aimed at validating this analytical procedure by an accuracy profile approach with spiked maternal and umbilical cord sera and simultaneously developing and validating a confirmation method by GC/MS. Then, sera samples from maternal and umbilical cord bloods were analyzed by LC/UV-FD and GC/MS.

In a third part, after the validation of a spiked placental perfusion solution at 1  $\mu\text{M}$  with 16 US-EPA PAHs, an *ex vivo* human cotyledon perfusion model was carried out to

evaluate the PAH placental transfer. In addition, human trophoblast cell cultures with a spiked DMSO solution at 1  $\mu$ M with 16 US-EPA PAHs were carried out to evaluate the impact of PAH exposure on placental functions.

## Liste des abréviations

3 $\beta$ -HSD : 3 $\beta$ -hydroxystéroïd deshydrogénase/isomerase

5MCHR : 5-methylchrysene

ACE : acenaphthene

ACN: acetonitrile

ACY: acenaphthylene

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANT: anthracene

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BaA: benzo[a]anthracene

BaP: benzo[a]pyrene

BbF: benzo[b]fluoranthene

BcF: benzo[c]fluorene

BghiP: benzo[g,h,i]pyrene

BjF: benzo[j]fluorene

BkF: benzo[k]fluoranthene

BM: Breast milk

BP: boiling point

BSA : Bovine serum albumin

CHR: chrysene

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CPcdP: cyclopenta[cd]pyrene

CTEV : Cytotrophoblaste extravilleux

CTV : Cytotrophoblaste villeux

CV : Coefficient de variation

DAD: diode array detector

DaeP: dibenzo[a,e]pyrene

DahA: dibenzo[a,h]anthracene

DahP: dibenzo[a,h]pyrene

DaiP: dibenzo[a,i]pyrene

DalP: dibenzo[a,l]pyrene

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DCM: dichloromethane

DHEAS : Sulfate de déhydroépiandrostérone  
DI-SPME: Direct Immersion-Solid Phase MicroExtraction  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DOE: design of experiment  
DSK : Desmoplakine  
ECD: Electron Capture Dissociation  
EF: Enrichment Factor  
EFSA: European food safety authority  
FD : fluorescence detection  
FID: Flame Ionization Detector  
FLO: fluorene  
FLT: fluoranthene  
FS: Full Scan, fw: fresh weight  
FSH : Hormone Folliculo-stimulante  
GC/MS : Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse  
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution  
hCG : hormone chorionique gonadotrope  
hPL : Hormone placentaire lactogène  
HS-SPME : HeadSpace-Solid Phase MicroExtraction  
IcdP: indeno[1,2,3-cd]pyrene  
LC-UV/FD : Chromatographie liquide couplée à un détecteur UV et un détecteur de fluorescence  
LC : liquid chromatography  
LH : Hormone lutéinisante  
LLE: liquid liquid extraction  
LOD: Limit of detection  
LOQ: Limit of quantitation  
MeOH: methanol  
MRM: Multiple Reaction Monitoring  
MS: Maternal Serum  
MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium  
NA: not available

BM: Breast Milk  
NaOH: sodium hydroxide  
NAPH: naphthalene  
PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PDMS: Polydimethylsiloxane  
PHE: phenanthrene  
PSM : Postes de Sécurité Microbiologique  
PYR: pyrene  
QuECHERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction  
R: Recoveries  
RSD: Relative Standard Deviation  
SA : Semaine d'aménorrhée  
SCF : Comité scientifique de l'alimentation  
SD: standard deviation  
SDHA : Succinate déshydrogénase complex  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
SEC: Size Exclusion Chromatography  
SIM: Single Ion Monitoring  
SPE: Solid Phase Extraction  
SPME: Solid Phase MicroExtraction  
ST : Syncytiotrophoblaste  
SVF : Sérum de veau fœtal  
TEF-5 : Transcription enhancer factor 5  
THF: Tetrahydrofuran  
TMAH: Tetramethylammonium hydroxide  
UCS: umbilical Cord Serum  
US-EPA: United States Environmental Protection Agency  
VP : Vapor Pressure



## Introduction générale

La pollution atmosphérique est l'un des problèmes majeurs de notre société. L'air ambiant contient une diversité de composés chimiques, dont certains possèdent des effets carcinogènes et génotoxiques. Ils présentent, ainsi, une grave menace pour la santé. La famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) fait partie des substances cancérigènes et génotoxiques dans l'air ambiant, associés ou non à des particules. Les HAP de faible poids moléculaire se trouvent plus fréquemment en vapeur dans la troposphère. Ils peuvent également exister, avec les HAP de poids moléculaire élevé, dans la phase particulaire par condensation après leurs émissions. Ces HAP sont des Polluants Organiques Persistants (POP), émis par les activités humaines suite à la combustion incomplète ou la pyrolyse de matières organiques (industries, chauffage, trafic routier...). Ces polluants présentent un danger pour la santé de l'Homme. En effet, il a été démontré que l'exposition à long terme augmente le risque d'une série de cancers (sein, peau, poumons, vessie, et gastro-intestinaux). En raison de leurs effets sur la santé, de leur capacité à être transportés sur de longues distances et de leur bioaccumulation dans la matière organique, les HAP font l'objet d'une surveillance atmosphérique (directive cadre européenne 96/62/CE du 27 septembre 1996). Rappelons que les HAP sont présents dans les différentes composantes de notre environnement, mais également dans les aliments. Ainsi, l'Homme est constamment exposé à ces polluants par inhalation ou par ingestion. C'est pourquoi, 24 HAP différents sont réglementés : 16 pour l'environnement (16 HAP US-EPA) et 16 dans les matrices alimentaires (16 HAP EFSA), dont 8 sont communs à ces 2 réglementations.

Il y a donc un besoin sociétal important d'identifier et de quantifier le plus grand nombre possible de HAP dans des tissus ou fluides biologiques humains pour accroître les connaissances des effets de ces polluants sur la santé. C'est pourquoi, dans le cadre d'une collaboration entre le LSABM (Laboratoire de Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation, UMR CBI 8231, ESPCI Paris-CNRS) et le Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine, UMR S 1139, INSERM – Université Paris Descartes, un projet d'étude a été mis en place. Ce projet s'attache au cas particulier de la femme enceinte et de son fœtus, puisque ces derniers représentent une

population extrêmement sensible à la pollution environnementale et alimentaire. En effet, l'exposition aux HAP pendant la grossesse est à l'origine de pathologies (fausse couche, malformations fœtales, prématurité et retard de croissance). Suite à cette exposition fœtale, il a aussi été démontré que des troubles peuvent survenir chez l'enfant et aussi chez l'adulte. Afin d'évaluer l'exposition maternelle et fœtale aux HAP, de nombreux auteurs se sont intéressés aux adduits du benzo[a]pyrène avec l'ADN dans du sang de cordon ombilical, du sang maternel et du placenta. En revanche, peu d'études ont été menées concernant la quantification des HAP dans ces matrices et seuls les HAP réglementés par l'US-EPA étaient ciblés.

Ainsi cette étude collaborative avait pour objectif d'identifier et de quantifier pour la première fois les HAP réglementés par l'US EPA et par l'EFSA dans des sérums maternels, des sérums de cordon ombilical et des placentas. Ce travail de thèse a donc porté sur le développement des méthodes analytiques permettant cette identification et quantification des HAP dans ces différentes matrices biologiques. Le premier challenge a été de développer une étape du traitement de ces échantillons complexes tout en limitant la quantité d'échantillon nécessaire, afin de pouvoir intégrer ultérieurement des cohortes épidémiologiques, tout en conservant de bonnes sensibilités pour quantifier les HAP, à l'état de traces. Ensuite, les performances analytiques des méthodes développées ont été étudiées, aspect souvent absent dans la littérature. Cette partie a été réalisée au sein du LSABM. Puis, un autre objectif de cette thèse a été l'étude des fonctions placentaires, notamment le passage des HAP de la mère vers le fœtus mais également l'impact des HAP sur la différenciation trophoblastique et les fonctions hormonales placentaires. Cette dernière partie est réalisée au sein du laboratoire Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine et un des laboratoires de la fondation PremUp.

L'ensemble de ce travail est présenté dans ce manuscrit qui s'articule en huit chapitres. Les trois premiers chapitres bibliographiques décrivent les HAP et le placenta, interface entre la mère et le fœtus, mais également les risques d'une exposition aux HAP pendant la grossesse. Ensuite, l'état de l'art sur les méthodes analytiques utilisées dans la littérature pour la quantification des HAP dans les matrices biologiques est présenté. Enfin, le dernier chapitre de cette partie bibliographique s'intéresse plus particulièrement aux études concernant la grossesse, concernant les quantités de HAP retrouvées mais également aux corrélations biologiques établies. La partie expérimentale de ce manuscrit

est articulée autour de quatre chapitres. Le quatrième chapitre, sous la forme d'un article, présente le développement de la méthode analytique pour la quantification des 24 HAP dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical. Le chapitre cinq, également sous la forme d'un article, décrit les résultats de la validation de la méthode précédemment développée par l'approche des profils d'exactitude. Ensuite, le chapitre six concerne le développement et la validation de la méthode de quantification des HAP dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical par GC/MS. Ensuite, le chapitre sept présente deux approches biologiques pour étudier l'impact de l'exposition aux HAP sur le placenta. Ainsi, l'impact d'un mélange contenant les 16 HAP US-EPA sur les fonctions de différenciations trophoblastiques et les fonctions hormonales placentaires a été étudié. Puis, le passage transplacentaire de ces 16 HAP a été suivi. Enfin, le dernier chapitre présente les premières expériences réalisées afin de développer la méthode analytique pour la quantification des 24 HAP dans les tissus placentaires.



---

# **PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

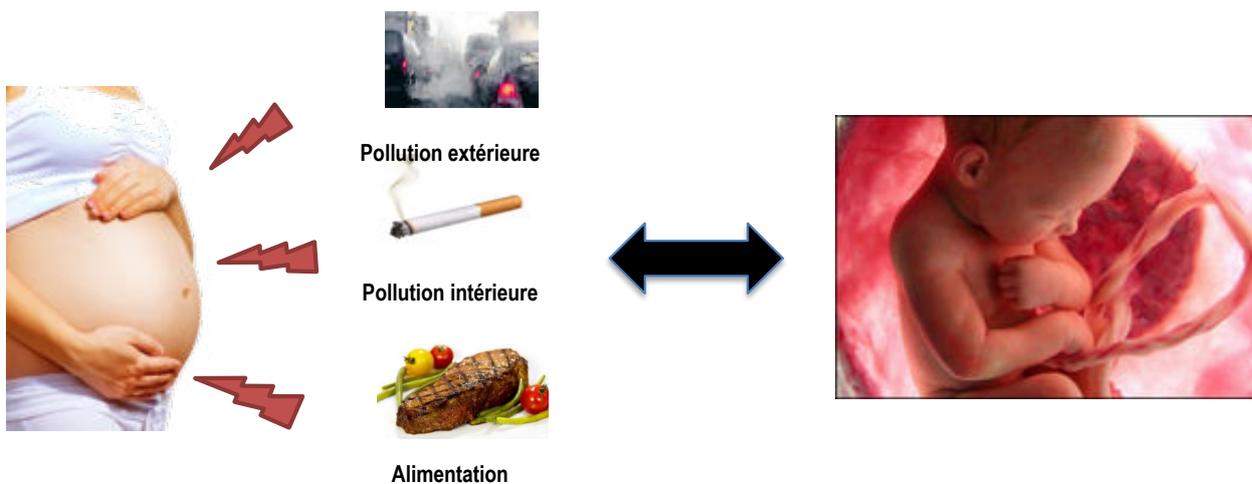
---





# Chapitre I

## LES HYDROCARBURES AROMATIQUES ET LA GROSSESSE





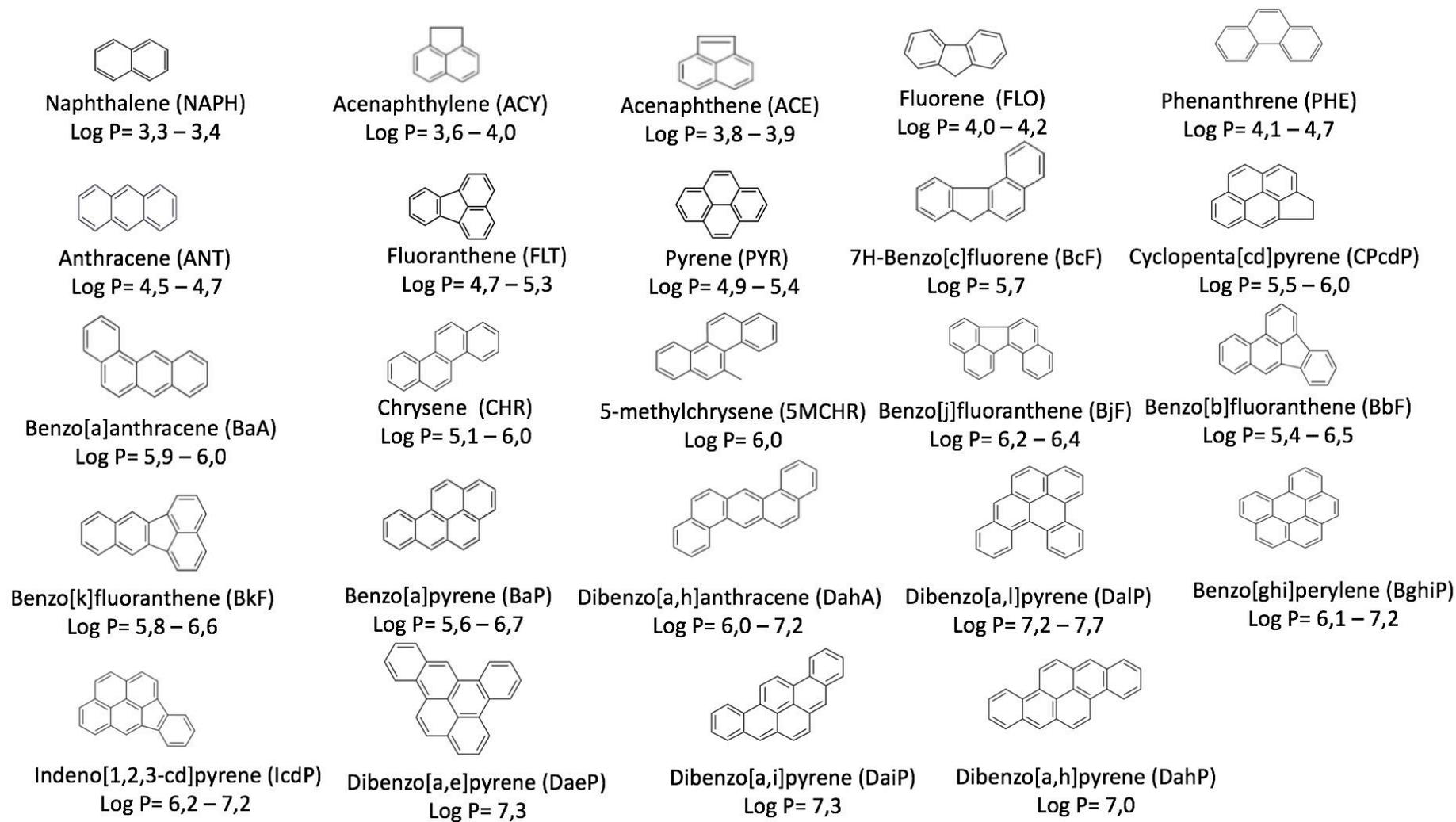
## Chapitre I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et la grossesse

### I.1. Les HAP

#### I.1.1. Qu'est-ce que les HAP ?

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules organiques composées de carbone et d'hydrogène comprenant 2 à 7 cycles benzéniques [3]. D'après la **Figure 1**, les cycles peuvent se présenter de façon linéaire comme pour le naphthalène (NAPH) et l'anthracène (ANT), angulaire comme pour le phénanthrène (PHE), le benzo[a]anthracène (BaA), le dibenzo[a,h]anthracène (DahA) ou bien encore en cluster comme pour le pyrène (PYR), le benzo[ghi]pyrène (BghiP) et le dibenzo[a,e]pyrène (DaeP). Ils peuvent être divisés en deux catégories : les HAP de faible poids moléculaire composés de moins de quatre cycles et les HAP de poids moléculaire élevé possédant quatre cycles ou plus. Les abréviations introduites dans la **Figure 1** seront utilisées tout au long du manuscrit.

Certaines propriétés des HAP sont gouvernées par leur taille et leur forme (symétrie de la structure, disposition spatiale des cycles, etc...). Ainsi, plus le nombre de cycles est important, plus l'hydrophobie de la molécule est élevée et donc son log P (mesure de la solubilité différentielle d'un composé chimique dans 2 solvants : coefficient de partage octanol-eau). La molécule s'accumulera donc d'autant plus facilement dans les organismes vivants et pénétrera les membranes biologiques. Les HAP ont des log P élevés, compris entre 3,3 et 7,7 (cf. **Figure 1**) [4-8]. Par ailleurs, les HAP se caractérisent par des températures d'ébullition et de fusion élevées, d'où leur forme solide à température ambiante et une faible pression de vapeur saturante [3]. Plus le poids moléculaire est grand, plus la pression de vapeur saturante et la solubilité dans l'eau diminuent tandis que la résistance à l'oxydation et la réduction augmentent. Les HAP de haut poids moléculaire ont des valeurs de solubilité dans l'eau à 25 °C modérées voire très faibles comprises entre  $10^{-2}$  (BaA) et  $2,6 \times 10^{-4}$  mg/L (BghiP). Seul le NAPH a une solubilité relativement élevée dans l'eau de 31,8 mg/L.

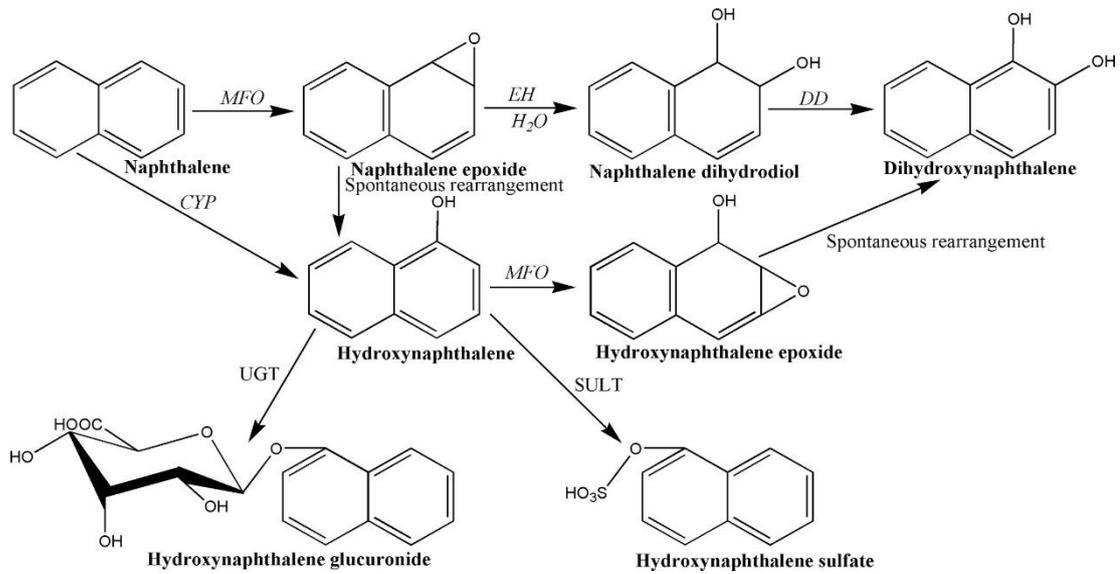


**Figure 1** : Structures chimiques et valeurs de Log P des 24 HAP réglementés [4–8].

### I.1.2. Sources d'exposition

La principale voie d'exposition aux HAP pour l'Homme, non-fumeur, est l'alimentation [9]. Les origines de la présence des HAP dans les aliments sont essentiellement environnementales et industrielles. En effet, certaines cultures, telles que le blé, le seigle et les lentilles, peuvent être polluées par l'air mais aussi indirectement par l'eau, le sol et les boues d'épurations [10–12]. Ainsi, il est possible de retrouver des HAP dans des aliments non cuisinés tels que les fruits, les légumes et les céréales [9]. En outre, le grillage, le fumage, le séchage ainsi que la torréfaction sont des procédés industriels à l'origine des HAP dans certains aliments [9]. En effet, ces procédés peuvent favoriser leur formation par l'usage de températures élevées, ou encore en mettant les aliments en contact direct avec les produits de combustion comme lors du séchage des graines pour la production d'huile [9]. Par conséquent, suite à ces différents procédés industriels, il est fréquent de trouver des HAP dans les aliments tels que les corps gras, les viandes grillées, les céréales et les produits laitiers [9].

En outre, l'Homme peut être exposé aux HAP par d'autres voies telles que l'exposition cutanée, l'inhalation de l'air ambiant pollué par les activités humaines ou par le tabagisme passif ou actif [13]. En effet, la fumée de tabac contient une variété de HAP, tels que le BaP [14]. Il est important de savoir qu'après inhalation ou ingestion, les HAP sont métabolisés par l'organisme ce qui augmente leur solubilité et par conséquent leur excrétion de l'organisme. La première phase de la transformation métabolique est une réaction d'oxydation catalysée par les enzymes cytochromes P-450 (CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1) et une hydroxylation catalysée par l'époxyde hydrolase (cf **Figure 2**) [15]. Les produits électrophiles de cette transformation, les époxydiols, sont hydrophiles et sont donc plus solubles dans l'eau. L'hydroxylation des HAP entraîne une augmentation de l'activité envers l'ADN et les protéines. En effet, ils se lient aux parties nucléophiles des macromolécules et forment des adduits. Ces adduits peuvent être à l'origine de dommages aux protéines ou de mutations de l'ADN, ce qui peut conduire à une carcinogénèse. Dans la deuxième phase, la transformation ultérieure des HAP en composés plus hydrosolubles se poursuit. L'une de ces réactions pourrait être la conjugaison au glutathion catalysée par la glutathion S-transférase. Le résultat de cette réaction est la formation du conjugué glutathion-HAP. Il existe d'autres HAP conjugués tels que les glucuronides et les sulfates.



**Figure 2:** Les voies métaboliques possibles des HAP dans le corps humain en utilisant le naphthalène comme exemple. MFO : oxydase à fonction mixte ; CYP: cytochrome P450; EH: époxyde hydrolase; DD: dihydrodiol déshydrogénase; UGT: UDP-glucuronosyltransférase; SULT: sulfotransférase [16].

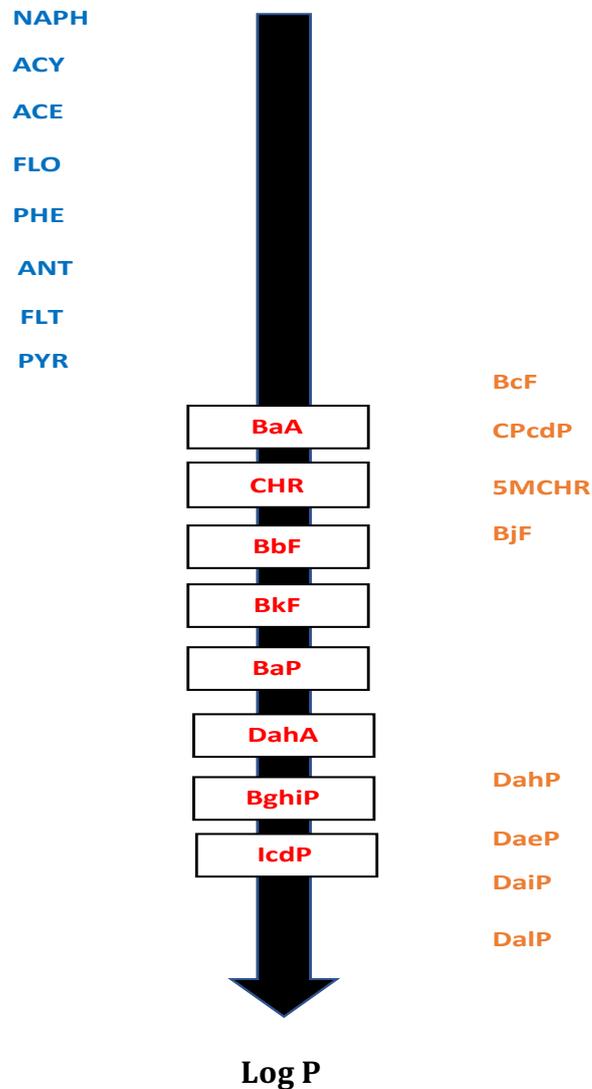
### I.1.3. Toxicité et réglementation des HAP

La surveillance de l'exposition aux HAP présente un intérêt primordial en raison de leur présence dans l'air, l'eau, les sols et l'alimentation. Cependant, les effets sur la santé de chaque HAP ne sont pas exactement les mêmes. En effet, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) classe certains HAP comme possiblement ou probablement cancérogènes pour l'Homme (groupes 1, 2A ou 2B) [17]. Parmi ceux-ci figurent le BaP (groupe 1), le NAPH, le CHR, le BaA, le BkF et le BbF (groupe 2B) [17]. Ces HAP cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques constituent donc une menace sérieuse pour la santé humaine. Ainsi, l'agence américaine pour la protection de l'environnement (US-EPA) a classé 16 HAP comme polluants prioritaires dans les échantillons environnementaux, nommés les « 16 HAP US-EPA » (cf. **Figure 3**). Ces polluants ont été sélectionnés d'après leur toxicité et leur abondance dans les échantillons environnementaux. Il est à noter qu'afin d'estimer leurs effets sur la santé, la méthodologie du facteur d'équivalence de toxicité a été mise au point par l'US-EPA [18]. En fonction de cette toxicité, de leur capacité à être transportés sur de longues distances et de leur bioaccumulation dans la matière organique, les HAP font aussi l'objet d'une surveillance atmosphérique (directive cadre européenne 96/62/CE du 27 septembre 1996).

En 2002, le comité scientifique de l'alimentation (SCF) a pu déterminer, suite à des expérimentations menées sur des animaux de laboratoire, une liste de 15 HAP, différents de la liste US-EPA, présentant des propriétés mutagènes/génotoxiques voire cancérogènes [19]. En effet, le caractère mutagénique de ces 15 HAP a été démontré *in vivo* sur des cellules somatiques d'animaux de laboratoire. Compte-tenu des résultats obtenus, ces 15 composés ont été considérés comme potentiellement dangereux pour l'Homme et ont été utilisés comme marqueurs prioritaires en matière d'évaluation des risques sanitaires à long terme consécutifs à une consommation d'aliments contaminés par ces HAP. En 2005, un comité mixte d'experts sur les additifs alimentaires (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation mondiale de la santé) a confirmé les résultats avancés par le SCF et a ajusté la liste des HAP dits prioritaires dans les aliments à 16 composés (cf. **Figure 3**). Le BcF a ainsi été ajouté à la liste précédente. Le BaP était alors utilisé comme seul marqueur de l'occurrence et de l'effet cancérogène des HAP dans l'alimentation. En 2008, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a conclu que le BaP n'était pas un marqueur suffisant de la présence de HAP dans les aliments et qu'un système de 4 HAP (BaP, CHR, BaA et BbF) voire de 8 HAP (les 8 HAP en communs avec la réglementation US-EPA : BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP et IcdP) serait l'indicateur le plus approprié de la présence des HAP dans les aliments. Cependant, l'EFSA a conclu que la somme des 8 HAP n'apportait pas beaucoup de valeur ajoutée par rapport à la somme des 4 HAP. C'est pourquoi, l'EFSA a finalement retenu la somme des 4 HAP comme indicateur le plus approprié dans les denrées alimentaires en y ajoutant le BaP pour assurer la comparabilité des nouvelles données avec celles antérieures. Ainsi, à l'heure actuelle, les concentrations maximales dans les aliments sont spécifiées dans le règlement UE n° 835/2011 de la Commission du 19 août 2011 pour le BaP et la somme des 4 HAP (cf. **Tableau 1**) [19].

En raison de leur toxicité, les HAP font aussi l'objet d'une surveillance atmosphérique (directive cadre européenne 96/62/CE du 27 septembre 1996). En France, la valeur cible pour le BaP, considéré comme traceur du risque cancérogène lié à ces polluants, est fixée à 1 ng/m<sup>3</sup> dans la fraction PM10 (particules en suspension dont le diamètre est inférieur à 10 µm) en moyenne annuelle et à 0,1 ng/m<sup>3</sup> à long terme (Décret n° 2010-1250 du 21 octobre 2010 reprenant la directive européenne du 2004/107/CE). La directive européenne 2004/107/CE impose aussi aux États Membres la surveillance

de 6 autres HAP : le BaA, le BbF, le B<sub>j</sub>F, le B<sub>k</sub>F, l'IcdP et le DahA dans l'air. Cependant, la réglementation évolue régulièrement au fur et à mesure que de nouvelles données sont disponibles.



**Figure 3:** Présentation sur une échelle de log P des 16 HAP réglementés par l'US-EPA à gauche (en bleu) et des 16 HAP réglementés par l'EFSA à droite (en orange) et au centre, des 8 HAP communs aux 2 réglementations (en rouge).

<b>Aliments</b>	<b>BaP (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b><math>\Sigma</math> 4 HAP (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>
Huiles et matières grasses (à l'exclusion du beurre de cacao et de l'huile de noix de coco) destinées à la consommation humaine directe ou à une utilisation en tant qu'ingrédient dans un aliment	2,0	10,0
Fèves de cacao et produits dérivés	5,0 *	30,0 *
Huile de coco destinée à la consommation humaine directe ou à être utilisée comme ingrédient dans un aliment	2,0	20,0
Viande fumée et produits à base de viande fumée	2,0	2,0
Chair musculaire de poisson et de produits de la pêche fumés,	2,0	12,0
Sprats fumés et conserves de sprats fumés ; mollusques bivalves (frais, réfrigérés ou congelés) ; Viande traitée thermiquement et produits carnés traités thermiquement vendus au consommateur final	5,0	30,0
Mollusques bivalves (fumés)	6,0	35,0
Préparations à base de céréales et aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	1,0	1,0
Préparations pour nourrissons et préparations de suite, y compris le lait de puériculture et le lait de suite	1,0	1,0
Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales destinés spécifiquement aux nourrissons	1,0	1,0

**Tableau 1:** Teneurs maximales autorisées en BaP et somme des 4 HAP dans les aliments d'après le règlement UE n ° 835/2011 \*  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de gras

#### **I.1.4. Quelques éléments relatifs aux risques de l'exposition aux HAP**

L'impact des HAP sur la santé humaine dépend principalement de la durée, de la voie d'exposition et de la quantité de HAP auxquelles l'homme est exposé [3]. D'autres facteurs peuvent également affecter les effets sur la santé tels que l'état de santé préexistant et l'âge. Cependant, on différencie les effets à court terme et à long terme de ces polluants sur la santé humaine.

Ainsi, une exposition aiguë aux HAP, correspondant à une exposition de quelques secondes à quelques jours, peut entraîner une altération de la fonction pulmonaire dans les cas d'asthme et d'effets thrombotiques chez les personnes atteintes d'une maladie coronarienne [20]. Cependant, il est souvent difficile de savoir si un composant, plusieurs

ou un éventuel effet cocktail est responsable de ces effets. Actuellement, la possibilité qu'ont les HAP d'induire des effets sur la santé humaine à court terme n'est pas encore clairement définie. Par ailleurs, les expositions professionnelles à des matériaux contenant des HAP provoquent des symptômes tels qu'une irritation des yeux, des nausées, des vomissements, de la diarrhée, une irritation de la peau, une inflammation, etc...[21]. L'ANT, le BaP et le NAPH sont des irritants cutanés directs responsables d'une réponse cutanée allergique chez l'animal et chez l'homme [20].

Concernant les expositions chroniques, correspondant à une exposition de quelques années, un risque accru de cancers de la peau, des poumons, de la vessie et gastro-intestinaux a été démontré [21]. L'exposition aux HAP peut provoquer des cataractes et des dommages aux reins et au foie [20]. Enfin, l'exposition chronique au NAPH conduirait à la destruction des globules rouges [22].

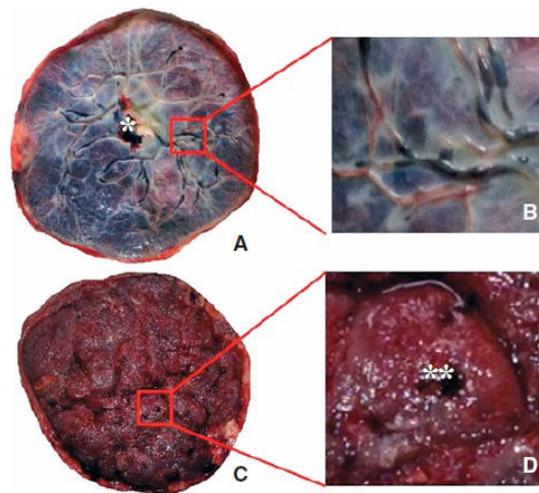
## **I.2. Le placenta, interface entre la mère et le fœtus**

Les HAP sont des molécules ubiquitaires présentes dans les différents compartiments de l'environnement. La population humaine est ainsi constamment exposée aux HAP via l'alimentation, l'air ou encore l'eau. Il est maintenant admis que l'exposition aiguë, subchronique, chronique ou professionnelle à ces polluants peut entraîner des risques sanitaires importants et le développement de pathologies. Les femmes enceintes, comme le reste de la population, sont exposées aux HAP par les différentes sources. Ils pénètrent donc l'organisme maternel et par conséquent peuvent atteindre le fœtus via le placenta. Ainsi, pour étudier leurs éventuelles conséquences sur la grossesse, il est indispensable de décrire le placenta, organe d'interface entre la mère et le fœtus.

### **I.2.1. Le placenta à terme**

Le placenta humain, organe transitoire de la grossesse, est dit hémochorial du fait que le chorion baigne directement dans le sang maternel. Il est également décidual puisqu'il entraîne une partie de la muqueuse utérine (décidue) lorsqu'il est expulsé lors de l'accouchement. On parle donc de placenta hémomonochorial, pour l'espèce humaine. Le placenta, signifiant « galette » en latin, est de forme discoïdale permettant la fixation du conceptus (embryon et ses annexes) mais aussi le maintien de la gestation grâce à de multiples échanges materno-fœtaux, la production de différentes hormones et son rôle

dans les processus immunitaires. À terme, le placenta est un disque d'environ 20 cm de diamètre et de 2 à 3 cm d'épaisseur, pesant un sixième du poids du fœtus soit environ 500 g (**Figure 4**). La plaque chorale de ce dernier est appelée face fœtale tandis que la plaque basale est appelée face maternelle. La face fœtale (choriale) est lisse, tapissée par l'amnios et relie le placenta au fœtus par le cordon ombilical. La face maternelle est recouverte par la caduque basale (tissus d'origine maternelle). Cette dernière est divisée en cotylédons qui sont délimités par des sillons non profonds. Entre ces deux plaques, le sang maternel circule dans la chambre intervillieuse où flottent les villosités choriales.

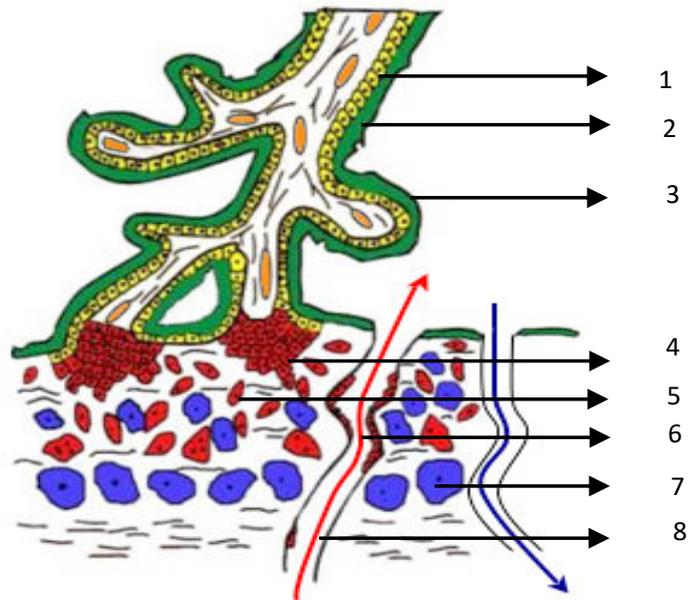


**Figure 4** : Le placenta humain à terme. A: Face fœtale: plaque chorale (l'astérisque correspond à l'insertion du cordon ombilical), B: Vaisseaux fœtaux parcourant la plaque chorale, C: Face maternelle : plaque basale, D: Cotylédon (l'astérisque correspond à l'orifice d'entrée d'une artère spiralée [23]).

### **I.2.2. Le trophoblaste villositaire flottant**

Après la phase d'implantation, le trophoblaste se différencie d'une part en cytotrophoblastes villositaires (CTV) qui assurent les échanges fœto-maternels et la fonction endocrine du placenta, et d'autre part en cytotrophoblastes extravillositaires (CTEV) permettant l'ancrage du placenta et l'adaptation de la circulation utérine [24,25].

Les villosités sont de deux types : villosités flottantes et villosités crampons (Cf. **Figure 5**). Les premières baignent librement dans la chambre intervillieuse, les secondes sont ancrées dans l'endomètre maternel. Les villosités flottantes sont constituées d'un axe mésenchymateux d'origine embryonnaire (où se trouvent les capillaires fœtaux) et sont recouvertes par les cytotrophoblastes, cellules mononucléées de type épithélial. Ces dernières fusionnent pour donner naissance à un syncytium : le syncytiotrophoblaste (ST). Cette différenciation morphologique est induite par la présence des syncytines 1 et 2, glycoprotéines permettant la fusion cellulaire trophoblastique, mais aussi, par la présence de complexes macromoléculaires fusogènes, responsables des remaniements membranaires et cytosquelettiques [26,27]. Le ST est constamment renouvelé par la fusion des cellules trophoblastiques sous-jacentes, suite à la formation de fragments apoptotiques et de leur desquamation dans la chambre intervillieuse. Ces débris syncytiaux polynucléés résultants sont éliminés dans la circulation maternelle (« syncytial knots »), ont été classés en fonction de leur taille par certains auteurs [28]. Les plus volumineux possèderaient une activité transcriptionnelle persistante [29] tandis que les plus petits, majoritaires au cours d'une grossesse normale, possèderaient des propriétés d'immunorégulation. Le renouvellement du ST à partir des CTV est un phénomène continu tout au long de la grossesse. Le ST est en contact direct avec le sang maternel dès la fin du premier trimestre de grossesse, ce qui caractérise la placentation hémochoriale. Le sang maternel arrive dans les chambres intervillieuses par l'intermédiaire des artères spiralées et repart par les veines utérines. Le ST constitue la première couche de la barrière placentaire séparant la circulation maternelle de la circulation fœtale. Il remplit des fonctions métaboliques, sécrétrices, immunomodulatrices, endocrines, d'échange et d'hémostase.

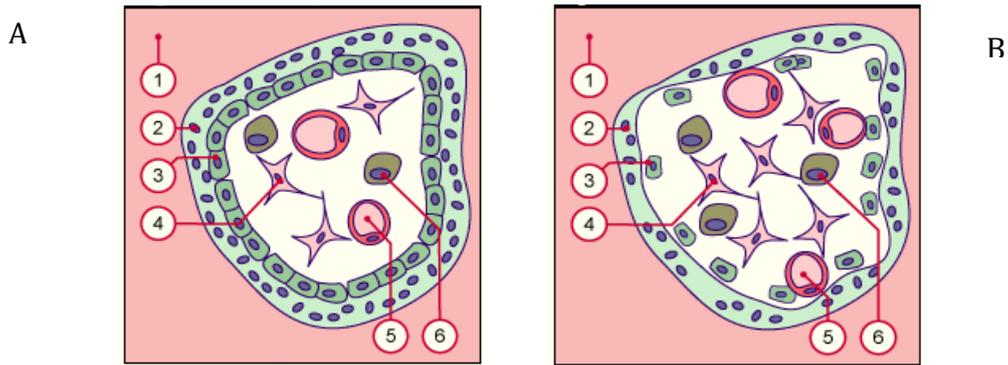


**Figure 5 :** Représentation schématique d'une villosité crampon. 1: cytotrophoblaste villex ; 2: syncytiotrophoblaste ; 3: chambre intervillieuse ; 4: colonne de cytotrophoblastes extravilloux invasifs prolifératifs ; 5: cytotrophoblastes extravilloux invasifs interstitiels ; 6: cytotrophoblastes extravilloux endovasculaires ; 7: cellules déciduales; 8: artère utérine spiralée.

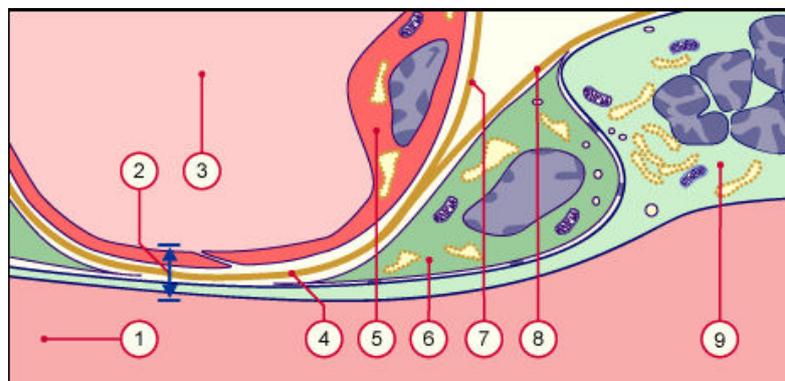
### I.2.3. La barrière placentaire

Le sang maternel est séparé du sang fœtal par la barrière placentaire de telle façon qu'ils ne se mélangent jamais. Sa constitution évolue au cours de la grossesse.

Au 5<sup>ème</sup> mois, on observe une diminution de l'épaisseur de la membrane placentaire et aussi une prolifération des vaisseaux fœtaux. L'ensemble de ces phénomènes donne lieu à une augmentation de la surface d'échange entre les deux circulations. Enfin, au cours du 6<sup>ème</sup> mois, des zones nucléées apparaissent suite à un regroupement des noyaux du ST. Ces zones nucléées sont des zones de synthèses tandis que les zones anucléées, en regard des capillaires, sont des zones d'échanges (cf. **Figure 6** et **Figure 7**)



**Figure 6** : Les villosités au premier trimestre (A) et au second trimestre de la grossesse (B). 1 : Espace intervilloux ; 2 : Syncytiotrophoblaste ; 3 : cytotrophoblaste ; 4 : Mésenchyme villositaire ; 5 : Capillaires fœtaux ; 6 : Macrophages [30].



**Figure 7** : Villosité à terme. 1 : Espace intervilloux ; 2 : barrière placentaire d'une villosité terminale ; 3 : capillaires fœtaux ; 4 : Membrane basale fusionnée ; 5 : cellules endothéliales ; 6 : cellules du cytotrophoblaste ; 7 : membrane basale du capillaire ; 8 : membrane basale du trophoblaste ; 9 : Syncytiotrophoblaste [30].

#### I.2.4. Les fonctions placentaires

La différenciation morphologique par fusion des CTV avec le ST s'accompagne aussi d'une différenciation fonctionnelle. En effet, le ST est l'unité endocrine du placenta, sécrétant de nombreuses hormones impliquées dans la physiologie de la gestation [31]. Il assure aussi les fonctions d'échange entre la mère et le fœtus. Ces fonctions sont indispensables au développement du fœtus et au déroulement de la grossesse.

##### I.2.4.1. Les fonctions endocrines du placenta

Au cours du développement placentaire, le tissu trophoblastique produit des hormones stéroïdiennes, glycoprotéiques et peptidiques. Lorsque ces dernières sont secrétées par le CTV et le CTEV, elles ont des effets autocrines et paracrines, via des

récepteurs présents dans les villosités choriales. En revanche, les hormones secrétées par le ST, dans la circulation maternelle, ont des effets endocrins [23,32,33].

#### **I.2.4.1.1. Les principales hormones glycoprotéiques**

Le ST est le siège de la sécrétion de différentes hormones protéiques, principalement l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) et l'hormone lactogène placentaire (hPL) nommée aussi hormone chorionique somatotrope (hCS).

##### *L'hormone gonadotrope chorionique (hCG)*

La sécrétion de cette hormone par le ST commence au stade blastocyste et peut être détectée dans le compartiment maternel dès le septième jour après la fécondation. La concentration maternelle de l'hCG augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic maximal vers la dixième semaine suivie d'une diminution nette au troisième mois pour rester constante jusqu'à l'accouchement. Les raisons de ce pic plasmatique maternel de hCG restent controversées. Néanmoins, cette dernière est indispensable au maintien de la grossesse et à son bon déroulement. Elle module la différenciation morphologique et fonctionnelle du cytotrophoblaste villositaire en syncytiotrophoblaste. Sa concentration élevée au début de la gestation lui permet d'assurer des fonctions similaires à la LH en transformant le corps jaune cyclique en corps jaune gravidique. Elle assure ainsi le maintien de la sécrétion de progestérone ovarienne durant les 6 premières semaines. Ensuite, l'unité fœto-placentaire prendra le relais.

##### *L'hormone lactogène placentaire (hPL)*

L'hPL est sécrétée, de manière croissante et continue, par le ST dans le compartiment maternel. La quantité de hPL est corrélée avec la masse placentaire. Cela signifie que sa concentration augmente parallèlement à la prise en masse du syncytium. Elle n'est pas indispensable à la grossesse, néanmoins, elle permet d'adapter l'organisme maternel à cette dernière. En effet, elle prépare la glande mammaire à la lactation et favorise le développement de l'insulinorésistance.

#### **I.2.4.1.2. Les hormones stéroïdiennes**

Dès la 6<sup>ème</sup> semaine de grossesse, le placenta humain est le siège d'une production d'hormones stéroïdes. Il s'agit de la progestérone et des œstrogènes, principalement l'œstradiol et l'œstriol, qui par leur structure diffusent dans l'unité fœto-maternelle.

L'augmentation de leurs concentrations maternelles circulantes exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse maternel inhibant la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone Folliculo-stimulante (FSH). A terme, cette production journalière est très importante, de l'ordre de 300 mg pour la progestérone et 40 mg pour les œstrogènes. Le placenta humain est un organe stéroïdogène incomplet dépourvu d'activité P450 17  $\alpha$ -hydroxylase-17:20 lyase (P450c17). La conversion de la progestérone en androgènes puis œstrogènes est impossible [34].

### La progestérone

Elle est sécrétée essentiellement par le corps jaune gravidique sous l'action de l'hCG. En effet, il existe une corrélation entre l'augmentation de la progestérone et celle de l'hCG et de la 17- $\alpha$ -hydroxyprogestérone, d'origine exclusivement ovarienne puisque le placenta est dénué d'activité 17 $\alpha$ -hydroxylase [35]. Dès le quatrième mois, la production de cette hormone est assurée par le placenta grâce à l'activation d'enzymes syncytiales. La progestérone est alors produite par le ST et le cytotrophoblaste à partir de cholestérol maternel. En effet, la conversion du cholestérol en pregnénolone sous l'action du cytochrome P450 scc (cholestérol side chain cleavage) codé par le gène CYP11A1 est l'étape limitante de la stéroïdogénèse. La conversion de la pregnénolone en progestérone est assurée par la 3 $\beta$ -hydroxystéroïd deshydrogénase/isomerase (3 $\beta$ -HSD) mitochondriale dont seule l'isoforme de type 1 est exprimée dans le placenta sous l'action de deux facteurs de transcription : le TEF-5 (transcription enhancer factor 5) une GATA-like protein [34]. La progestérone est l'hormone du maintien de la grossesse puisqu'elle réduit le tonus de la musculature lisse, en entraînant notamment une hypotonie de l'utérus. Elle est aussi impliquée dans la différenciation des glandes mammaires et empêche la prolactine d'intervenir sur ces dernières afin d'inhiber la lactation avant l'accouchement [36]. Elle est indépendante de la production de l'hCG et augmente parallèlement à la masse du ST.

### Les œstrogènes

La synthèse de ces hormones est réalisée à partir d'un précurseur androgène, le sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEAS), produit par les surrénales maternelles et fœtales. La production de l'oestrone E1, l'œstradiol E2 et l'oestriol E3 est possible grâce à une coopération entre le placenta et le fœtus. En effet, le DHEAS, hydroxylé dans le foie fœtal, est ensuite désulfaté par une sulfatase placentaire, transformé en androgènes par des deshydrogénases puis en œstrogènes par une aromatase syncytiale. La production oestrogénique est assurée par la LH et l'hCG, qui favorise l'activité aromatase placentaire. Les œstrogènes sont impliqués dans la différenciation du trophoblaste en CTEV et CTV. Ils permettent l'action de la progestérone en induisant l'expression des récepteurs de cette dernière dans le myomètre [37]. Les fonctions hépatiques et hypophysaires sont modulées par ces mêmes hormones.

#### **I.2.4.2. Les échanges mère-fœtus**

Le placenta est avant tout un organe d'échange permettant la croissance du fœtus. Les échanges prennent place principalement à l'interface entre le sang maternel et les villosités choriales, grâce à la présence de microvillosités. Au cours de la grossesse, le nombre et la densité des microvillosités augmentent passant de  $600 \times 10^6/\text{cm}^2$  à 14 semaines d'aménorrhée (SA) à  $1200 \times 10^6/\text{cm}^2$  à terme [38]. La connaissance des mécanismes de transfert et leur régulation permettent de comprendre les altérations de croissance fœtale. La surface d'échange du ST est considérable et estimée en fin de grossesse à  $15 \text{ m}^2$ .

Ces échanges sont importants pour apporter l'oxygène, l'eau et les nutriments indispensables à la croissance du fœtus mais permettent également d'éliminer le dioxyde de carbone et les déchets produits par le fœtus. Les quatre mécanismes différents permettant ces échanges sont : la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif et l'endocytose (cf. **Figure 8**) [39].

#### **1.2.4.2.1. La diffusion passive**

Les molécules concernées sont transférées dans le sens du gradient de concentration sans apport d'énergie. Ce transfert est défini par la première loi de Fick [23] :

$$\Theta/t = (C_M - C_F)/a$$

- $\Theta/t$  représente la quantité de molécule diffusée par unité de temps ou par taux de diffusion
- $C_M$  est la concentration de la molécule dans la circulation maternelle
- $C_F$  est la concentration de la molécule dans la circulation fœtale
- $a$  est l'épaisseur du placenta

La vitesse de transfert dépend de la concentration maternelle initiale, des propriétés physico-chimiques de la substance mais aussi du stade de développement du placenta. La diffusion de la molécule est régie par son poids moléculaire, sa lipophilie et son degré d'ionisation. Ainsi, ce mécanisme de transfert est favorable aux molécules de faibles poids moléculaires, liposolubles et non ionisées.

#### **1.2.4.2.2. La diffusion facilitée**

La diffusion facilitée ne nécessite pas d'apport d'énergie mais requiert un transporteur, présent au niveau du placenta. Il y a donc un risque de saturation du transporteur en présence de concentrations élevées de molécules à transporter. De même que pour la diffusion passive, le transfert est effectué dans le sens du gradient de concentration. Ce mécanisme favorise le passage de molécules hydrophiles. Ainsi, une partie des besoins nutritifs du fœtus, possédant un faible taux de transfert par diffusion passive, est prise en charge par diffusion facilitée, étant donné leur caractère hydrophile. A titre d'exemple, le glucose est transporté par diffusion facilitée.

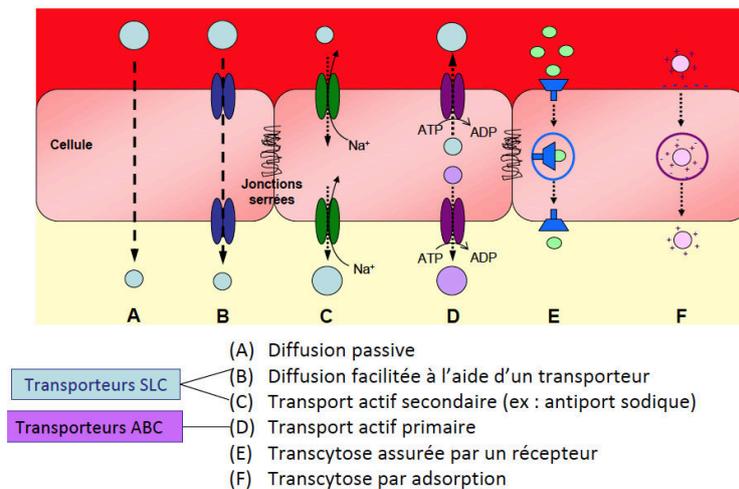
#### **1.2.4.2.3. Le transport actif**

Ce mécanisme requiert un transporteur placentaire, qui peut être saturé en présence de fortes concentrations, et nécessite également un apport d'énergie. En effet, le transfert s'effectue dans le sens contraire du gradient de concentration. En général, l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine Triphosphate) ou le gradient électrochimique de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{H}^+$ , constitue les sources d'énergie nécessaires au fonctionnement de ce mécanisme. Le

sens du transfert des molécules est déterminé par la quantité de transporteurs, l'affinité du substrat pour les transporteurs et le niveau d'activité des transporteurs.

#### 1.2.4.2.4. L'endocytose

L'endocytose est un processus de transfert limité au niveau du placenta. Il concerne essentiellement des macromolécules telles que des lipoprotéines (apport du cholestérol), la transferrine (apport du fer) ou encore les immunoglobulines G. En général, les macromolécules endocytées sont dégradées et n'arrivent pas à la circulation fœtale à l'exception des immunoglobulines G, protégées contre la dégradation.



**Figure 8:** Les différents modes de passage. Transporteurs ABC : transporteurs actifs primaires ; transporteurs SLC : transporteurs actifs secondaires

#### 1.2.4.3. Impact des substances exogènes sur le placenta

Durant sa grossesse, la femme enceinte est exposée à différentes substances exogènes ce qui peut mettre en danger sa santé et celle du fœtus. Parmi ces substances exogènes, les médicaments sont souvent cités au regard de la balance bénéfique/risque à évaluer. La femme enceinte est également exposée à bien d'autres substances exogènes, parmi lesquelles les polluants environnementaux.

Toutes ces molécules exogènes utilisent les mêmes mécanismes décrits précédemment pour traverser le placenta et éventuellement atteindre la circulation fœtale : diffusion passive, diffusion facilitée, transport actif et endocytose (cf section 4.2). Des facteurs maternels et fœtaux tels que le stade de la grossesse, le métabolisme, la distribution tissulaire et les paramètres pharmacocinétiques, peuvent affecter ces

transferts transplacentaires. De même ces molécules exogènes peuvent perturber des fonctions placentaires, se répercutant ainsi sur le développement du fœtus et éventuellement sur l'issue de la grossesse.

Il est donc important d'évaluer à la fois le transfert de ces substances exogènes et leurs répercussions sur les fonctions placentaires, tout particulièrement les fonctions endocrines.

### **I.2.5. Les différents modèles d'étude du placenta humain**

Différents modèles expérimentaux ont été développés par les chercheurs tels que les cotylédons placentaires perfusés, les lignées cellulaires cancéreuses, les explants villositaires, les fractions cellulaires et enfin les cultures primaires de trophoblastes [40]. Dans cette partie, nous avons fait le choix de présenter uniquement les deux modèles d'étude mis en œuvre au cours de cette thèse, à savoir le modèle du cotylédon perfusé pour étudier la fonction d'échange placentaire et les cultures primaires de trophoblastes pour étudier les fonctions endocrines et de différenciation du trophoblaste.

#### **I.2.5.1. Modèle du cotylédon placentaire perfusé**

Panigel *et al* étaient les premiers à avoir étudié le passage transplacentaire à partir du modèle du cotylédon placentaire perfusé [41]. Par la suite, Schneider *et al* ont détaillé les principes de ce modèle [42]. A ce jour, ce modèle de perfusion *ex vivo* est la seule méthode reproduisant les conditions physiologiques de fonctionnement *in utero* du placenta humain au troisième trimestre de la grossesse. Cette technique est basée sur le rétablissement de la double circulation materno-fœtale en contrôlant le pH, la température et les débits maternels et fœtaux. Il existe des variantes de la perfusion placentaire à partir d'un cotylédon. Nous distinguons le modèle « ouvert », sans aucune recirculation des perfusats maternels et fœtaux et le modèle « fermé » où la recirculation se fait mimant totalement la physiologie. [40]. Le circuit « ouvert » permet d'étudier la clairance d'une molécule du compartiment maternel vers le compartiment fœtal (ou inversement), tandis que le circuit « fermé » a l'avantage d'explorer le métabolisme placentaire. En général, la durée de ces perfusions varie entre 90 minutes et 6 heures, excepté dans certaines études où la perfusion a pu durer jusqu'à 48 heures [40].

Cependant certains inconvénients résident dans l'utilisation du modèle du cotylédon perfusé. Notamment, les placentas utilisés pour réaliser ces expériences sont

souvent des placentas recueillis à « terme » [40]. En effet, à ce jour, il est impossible d'utiliser ce modèle pour des termes inférieurs. Or, l'exposition aux molécules exogènes est souvent problématique pendant toute la période de la grossesse. Cette limite empêche ainsi l'extrapolation des résultats obtenus à terme.

### **I.2.5.2. Modèle de culture primaire des trophoblastes humains**

Le modèle de culture primaire peut être utilisé pour évaluer le dysfonctionnement des fonctions placentaires suite à une exposition à des molécules exogènes. Le principe consiste à réaliser une succession de digestions enzymatiques des villosités choriales, par la trypsine, suivies par des étapes de purification afin d'isoler les CTV. Ces derniers sont ensuite traités avec les molécules d'intérêt et sont mis en culture pendant plusieurs jours afin d'étudier différentes fonctions placentaires. En effet, à titre d'exemple, dans une étude sur le passage transplacentaire du formaldéhyde et l'effet de ce dernier sur les fonctions placentaires, les auteurs ont montré des différences de comportements entre les cultures traitées et non traitées concernant la différenciation et la fusion cellulaire, la fonction sécrétrice du placenta mais aussi l'apparition d'un stress oxydatif [43]. Ce modèle a l'avantage d'étudier l'impact de xénobiotiques à différents termes de la grossesse. L'inconvénient majeur de ce modèle est la non-prolifération des CTV, les conduisant, par conséquent, à leur mort cellulaire après 3 jours en culture.

La structure du placenta humain, la complexité des échanges entre la mère et le fœtus et l'importance des fonctions placentaires nous amènent à nous interroger sur les conséquences d'une exposition aux HAP pendant la grossesse. En effet, comme décrit précédemment, le placenta est le siège des échanges entre la mère et le fœtus pendant toute la grossesse. Ainsi, l'environnement maternel peut avoir des conséquences délétères sur le développement fœto-placentaire. C'est pourquoi, il est important aujourd'hui de recenser tous les risques que peuvent provoquer ces polluants sur le déroulement de la grossesse aussi bien au niveau maternel qu'au niveau fœtal.

### **I.2.6. Risques de l'exposition aux HAP pendant la grossesse**

Les chercheurs se sont intéressés aux corrélations pouvant exister entre l'exposition maternelle et/ou prénatale aux HAP et sa conséquence sur la grossesse, mais aussi sur la santé de l'enfant. Le but de cette partie n'est pas d'énumérer toutes les études épidémiologiques mais vise à citer quelques exemples sur les conséquences de

l'exposition aux HAP sur la grossesse, la croissance fœtale, les malformations fœtales et enfin les conséquences post-natales encourues.

### **I.2.6.1. Grossesse et croissance fœtale**

Des études ont montré qu'une exposition maternelle aux HAP est à l'origine de pathologies de la grossesse telles que des fausses couches, la prématurité et le retard de croissance intra-utérin. A titre d'exemple, une étude en Californie a montré une corrélation entre une exposition aux HAP durant les 6 dernières semaines avant l'accouchement et les naissances prématurées à 20-24 semaines de gestation [44]. En Inde, une corrélation entre la concentration de HAP placentaire et les accouchements prématurés a aussi été mise en évidence [45]. Dans une étude aux États Unis, le risque de prématurité était 5 fois plus élevé chez les femmes afro-américaines fortement exposées aux HAP [46]. Dans ce même travail, une exposition prénatale aux HAP a été corrélée avec un retard de croissance intra-utérin, constat également fait dans une étude menée en République Tchèque [47]. En outre, une étude chinoise a démontré que le risque d'avoir des fausses couches (mort *in utero*) était 4 fois plus élevé chez les femmes fortement exposées aux HAP et signalant des embouteillages près de leur domicile, des trajets quotidiens à pied [48].

Dans plusieurs études, des paramètres anthropométriques tels que le poids et la taille, le tour de poitrine et de la tête, l'indice pondéral ou bien encore la longueur du cordon et le poids du placenta ont été mesurés à la naissance pour évaluer le bon déroulement de la croissance fœtale. A titre d'exemple, en Pologne, Choi *et al.* ont montré qu'une exposition maternelle à ces polluants avait un impact plus important en début de grossesse [49]. Ainsi, l'exposition aux HAP au cours du premier trimestre a été corrélée avec une diminution du taux de croissance et du poids de l'enfant à la naissance mais également avec une augmentation de l'indice de céphalisation (rapport du périmètre crânien sur le poids du nouveau-né). Par ailleurs, des études en Pologne, en Corée et en Chine ont montré qu'une exposition maternelle aux HAP via une alimentation à base de viandes fumées ou bien grillées au barbecue a été corrélée avec une diminution du poids à la naissance [50–52]. En outre, une étude comparative a été réalisée en Pologne et aux États Unis et a mis en évidence une corrélation entre une exposition prénatale aux HAP et une diminution du poids à la naissance [53]. Cependant, les auteurs ont relevé une diminution 6 fois plus importante à New York aux États Unis. En Chine, le poids du

placenta et la longueur du cordon ont été inversement corrélés à la concentration en BaP dans le placenta [54]. Enfin, les concentrations en BaA, CHR et BaP dans le sang de cordon ont été corrélées avec une réduction de la taille de l'enfant à la naissance ainsi qu'une diminution de la durée de la grossesse.

### **I.2.6.2. Malformations fœtales et conséquences post-natales**

Dans la littérature, une exposition prénatale aux HAP a été corrélée avec le risque d'anomalies du tube neural [1,55]. Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre une exposition *in utero* et le développement de pathologies au cours de l'enfance. En effet, une étude aux États-Unis a montré une corrélation entre l'exposition prénatale à la fois aux fumées de cigarettes et aux HAP et la présence d'asthme chez des enfants de 5-6 ans [56]. Une autre étude en Pologne a montré une corrélation entre une exposition maternelle aux HAP en début de grossesse (20-24 semaines de grossesse) et une augmentation du risque d'infections respiratoires chez les enfants âgés de 1 an [57]. En outre, d'autres études ont montré les conséquences d'une exposition prénatale aux HAP sur le développement neurologique du nourrisson comme notamment une diminution des fonctions cognitives et motrices et du QI chez l'enfant et un risque accru de troubles du comportement [58-62].

### **I.2.7. Approches utilisées dans les études épidémiologiques pour évaluer l'exposition aux HAP**

Dans les études épidémiologiques, l'évaluation de l'exposition des femmes enceintes et potentiellement du fœtus aux HAP a été faite grâce à deux approches :

- La surveillance de l'environnement maternel, dans le but est d'estimer les expositions maternelles et prénatales à partir des mesures de concentrations atmosphériques des HAP
- La surveillance biologique qui repose sur la quantification des HAP, de leurs métabolites ou bien des adduits d'ADN dans différents milieux biologiques.

Afin d'établir des corrélations entre une exposition aux HAP et des effets au cours de la grossesse, les chercheurs utilisent des modèles mathématiques définis à la fois à partir des données mesurées (surveillance atmosphérique ou surveillance biologique) mais aussi à partir d'autres variables recensées grâce à un questionnaire telles que le sexe de l'enfant, l'âge gestationnel, l'âge de la mère, la parité, le lieu de résidence, la saison, le

tabagisme, certains paramètres socio-économiques ainsi que des données médicales concernant le nouveau-né.

La technique la plus couramment utilisée est la mesure des HAP atmosphériques dans l'environnement maternel grâce à un dosimètre personnel [46,47,49,50,52,53,56,58,62]. L'intérêt de cette méthode de mesure est qu'elle permet d'estimer l'exposition à la pollution atmosphérique en prenant en compte à la fois l'air extérieur, mais également l'air intérieur de tous les lieux visités ainsi que tous les déplacements au cours du port du dosimètre. Cependant, cette méthode de mesure présente aussi plusieurs inconvénients. Tout d'abord, uniquement 8 à 9 HAP qualifiés de semi-volatils parmi les 16 réglementés par l'US-EPA sont mesurés : PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP et IcdP. Ainsi, toutes les corrélations établies dans ces études, à partir de ces mesures, ne peuvent être généralisées pour l'ensemble des 16 HAP réglementés. De plus, ces corrélations ont toujours été établies à partir de la somme des concentrations des HAP. Enfin, ce type de mesure ne prend pas en compte les autres voies d'exposition aux HAP (inhalation, alimentation...). Il est alors impossible d'établir la contribution de chaque source d'exposition vis-à-vis des effets observés. Enfin, cette méthode de mesure permet uniquement d'estimer la dose inhalée sans toutefois déterminer de façon fiable la dose absorbée.

Ces limites liées à la surveillance environnementale des HAP ont conduit à développer également des outils de surveillance biologique de l'exposition à ces contaminants. Ainsi différents biomarqueurs d'exposition ont été utilisés, qui peuvent être classés en 2 catégories : des biomarqueurs de la dose interne (les HAP et leurs métabolites) et des biomarqueurs de la dose efficace (les adduits à l'ADN). Concernant les biomarqueurs de la dose efficace, les adduits de l'ADN permettent d'évaluer l'exposition génotoxique au plus près du site d'action toxique des HAP [1,48]. Cependant, ce choix présente certains inconvénients. Tout d'abord, les adduits sont mesurés de façon non spécifique par la technique du post-marquage [1]. Cette technique présente une très bonne sensibilité (jusqu'à  $\approx 10^8$  nucléotides) mais ne permet qu'une mesure globale des adduits. En effet, il n'est souvent pas possible de connaître la nature chimique des autres adduits mesurés. Ainsi les corrélations établies peuvent être faussées et ne pas résulter uniquement des adduits d'ADN avec des HAP. Par ailleurs, ce manque de spécificité existe également avec l'utilisation de la HPLC/FD qui permet la mesure globale des adduits de

la voie métabolique du BPDE [48]. Enfin, une autre méthode permettant une indication de la dose absorbée d'un HAP et donc de l'exposition par différentes sources consiste à doser les HAP dans le sang, les tissus biologiques ou bien les métabolites de HAP dans l'urine. Cette dernière approche est donc d'un intérêt particulier pour déterminer l'exposition globale aux HAP. Ainsi, d'après la littérature, les métabolites hydroxylés du NAPH, du FLO, du PHE, et surtout le 1-hydroxypyrene ont été utilisés dans les études épidémiologiques comme biomarqueurs d'exposition aux HAP [51,62-64]. L'inconvénient majeur de l'utilisation des métabolites comme biomarqueurs d'exposition est le choix des métabolites. Il est important de les choisir bien représentatifs de l'exposition. C'est pourquoi, les auteurs ont ciblé plusieurs métabolites urinaires. Cependant, cela ne suffit pas à garantir que les métabolites choisis soient bien représentatifs du mélange de HAP auxquelles les femmes enceintes ont été exposées dans ces études.

C'est pourquoi, la quantification des HAP non métabolisés reste le meilleur moyen de déterminer chez la femme enceinte et son fœtus les teneurs en HAP auxquelles ils sont exposés. Malheureusement, peu d'études ont été réalisées dans le cadre de cette problématique. En effet, seules 15 études à notre connaissance recensent le dosage des HAP dans des matrices en lien avec la grossesse. C'est pourquoi, à ce stade de notre recherche bibliographique, il apparaît important de s'intéresser plus en détails à ces différentes études, tout d'abord d'un point de vue analytique. Cette étude permettra de garantir la fiabilité des résultats présentés. Ainsi cette étude bibliographique plus approfondie fait l'objet du chapitre 2, sous la forme d'une revue. Elle recense les techniques analytiques mises en œuvre dans les études portant sur la grossesse mais également, afin d'élargir notre champ de connaissance, dans les autres études existantes sur la quantification des HAP dans des matrices biologiques humaines.



## Chapitre II

# ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LES MATRICES BIOLOGIQUES HUMAINES





## **Chapitre II. Analyse des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les matrices biologiques humaines**

### **Revue : Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in human biological samples**

Stéphanie Swiha<sup>1,2</sup>, Valérie Pichon<sup>1,3</sup>, Thierry Fournier<sup>2,4,5</sup>, Sophie Gil<sup>2,4,5</sup>, Nathalie Delaunay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Analytical and Bioanalytical Sciences and Miniaturization, UMR CBI 8231 CNRS – ESPCI Paris, PSL University, Paris, France

<sup>2</sup>Laboratory of Human Placenta Pathophysiology and Pharmacotoxicology, UMR-S 1139 INSERM - Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>3</sup>Sorbonne Université, Paris, France

<sup>4</sup>Université Paris Descartes, UMR-S 1139, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>5</sup>Fondation PremUP, Paris, France

#### **II.1. Abstract**

Humans are constantly exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which are ubiquitous contaminants present in environment and food. Due to their high hydrophobicity, they are accumulated in body fat tissues and biological fluids. Because of their high toxicity, they are classified by the International Agency for Research on Cancer as human carcinogen and mutagen substances. This is why they are regulated by two international institutions, the United States Environmental Protection Agency and the European Food Safety Authority, as priority pollutants. Hence, in recent years, an increased attention has been reported to the study of human PAH exposure, especially of sensitive populations as pregnant women and children. As a matter of fact, there is a genuine need to evaluate this exposure and to expand the knowledge of its impact on human health. However, PAHs exhibit a wide range of physico-chemical properties, thus rendering difficult their determination at trace levels in various complex human matrices. The scope of this review is to present and critically discuss the published literature about the biomonitoring of PAH exposure by the analysis of PAHs in various human matrices

through different sample pretreatment and chromatographic techniques for their identification and quantitation.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH exposure, pollutants, trace analysis, biological samples

## II.2. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are Persistent Organic Pollutants (POPs), emitted by human activities due to incomplete combustion or pyrolysis of organic materials (industries, heating, road traffic, etc...) but also from natural sources (volcanoes) [65,66]. PAH family is the main group of carcinogen and genotoxic substances in ambient air [67], associated or not with particles [68]. The low molecular weight PAHs are present more frequently in the troposphere while the high molecular weight PAHs are in the particulate phase due their condensation after their emissions [20].

Because of their toxicity, their ability to be transported over long distances, and to bioaccumulated in organic matter, PAHs are subject to atmospheric monitoring (European Framework Directive 96/62/EC, September 27, 1996) [20,69]. In France, the target value for Benzo[a]pyrene (BaP), considered as a tracer for the carcinogenic risk associated with these pollutants, is set at 1 ng/m<sup>3</sup> in the Particulate Matter whose diameter is smaller than 10 µm (PM10 fraction) as an annual average (Decree n 2010-1250, October 21, 2010, European Directive 2004/107/EC). Moreover, this European Directive also requires member states to monitor 6 other PAHs: benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, and dibenzo[a,h]anthracene in ambient air.

PAHs are also present in food [70,71], which constitutes the most common human exposure pathway for non-smokers [9]. Dermal exposure is also assumed to be a relevant contribution for some particular occupational exposure groups such as firefighters, coke oven, asphalt or coal workers [72–74]. Therefore, 24 PAHs are regulated: 16 in the environment by the United State Environmental Protection Agency (US-EPA) and 16 in food by the European Food Safety Authority (EFSA), 8 being common to both regulations.

After entering the body, due to their hydrophobic character, PAHs are transported to all lipid-rich tissues. Long term exposure may lead to accumulation of these pollutants in fat cells, liver, and kidney [75,76]. These carcinogenic and mutagenic substances can undergo different metabolic transformations via the production, during the phase I, of reactive electrophilic intermediates. These intermediates can bind cellular macromolecules such as proteins and nucleic acids. After the first metabolic

transformation, these reactive forms are generally conjugated to polar compounds, during the phase II, in order to facilitate their excretion in urine, bile, and feces.

These pollutants constitute an important risk for human health. Indeed, short-term exposure to PAHs has been shown to cause impaired lung function with asthmatic and thrombotic effects in people with coronary heart disease [77]. Long-term exposure increases the risk of a series of cancers (breast, skin, lung, bladder, and gastrointestinal) [78–80]. Moreover, PAHs have been recently considered as endocrine disrupters [81].

Due to the PAH toxicity mentioned above, there is a great societal need to identify and quantify biomarkers of PAH exposure in human biological tissues or fluids to increase knowledge of the health effects of these pollutants. Biomarkers are the result of the different sources of human exposure to these pollutants (food, occupational, and atmospheric exposure). The biomarkers used since many years to assess the human PAH exposure are metabolites of PAHs, particularly 1-hydroxypyrene (1-OHP), and PAH-DNA or protein adducts. In literature, many reviews and papers reported monitoring of environmental exposure of PAHs by PAH quantitation in environmental and food samples [9,22,82,83]. Others focused on PAH-DNA adducts, particularly BaP-DNA adducts, as indicators of PAH exposure and their semi-quantitation by immunochemical assays (<sup>32</sup>P-Post-labelling, ELISA, and westernblot) [84–88]. At the same time, to obtain more accurate monitoring data, authors targeted non-metabolized PAHs in different biological matrices. Therefore, the scope of this review is to give, for the first time, an overview of the various analytical techniques that can be used to identify and quantitate individually the PAHs in human biological complex samples, discussing the benefits and limitations of each technique for monitoring PAH exposure.

## II.3. Methods used to quantitate PAHs in biological matrices

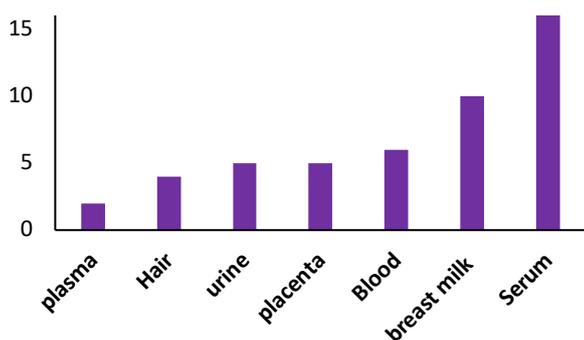
### II.3.1. Background

PAHs enter human body mainly via dietary exposure and are stored in human adipose tissues and breast milk, and are partially excreted in urine. Therefore different studies dealt with the PAH quantitation in human biological samples like placenta [45,54,89–91] and breast milk [89,92–99]. There were also studies about PAH quantitation in blood [76,89,90,100–105], plasma [76,106], serum [54,91,96,107–117], urine [72,74,118–120], follicular fluid [117] and hair [121–124] in order to study if the population is contaminated by these pollutants and from which kind of sources (dietary, work, air quality) (see **Figure 9**). In total, as far as we know, they are 41 papers dealing with this subject. In most of these studies, authors targeted only the 16 US-EPA PAHs or some of them. To date, according to our knowledge, only 2 studies targeted also EFSA PAHs. Indeed, one team quantitated the 24 regulated PAHs (US EPA and EFSA) in breast milk [92] and Pleil and coworkers quantitated 22 regulated PAHs in plasma and blood [76].

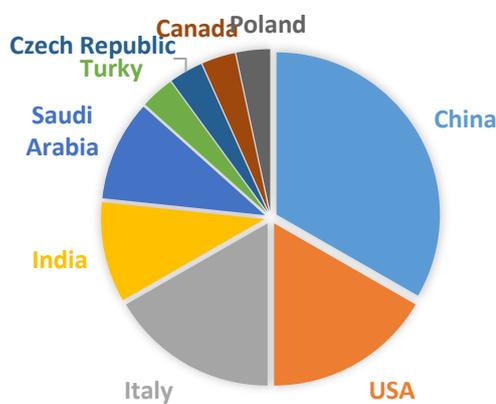
A large number of these papers focused on the impact of prenatal PAH exposure. As an example, 14 applications quantitated regulated PAHs in maternal and umbilical cord blood/serum, placenta, and breast milk [45,54,89–91,93–96,105,107,109,110,115,125]. In addition, in other studies, the association between children asthma and dietary and environmental exposure [112,113], the association between oxidative stress (DNA adducts) and PAH exposure [101,102] or the relation between PAH exposure and the child physical growth [100] were evaluated by the PAH analysis in children blood and sera. Furthermore, 9 studies estimated the PAH concentrations in blood, serum or plasma of adult population resulting from different pollution sources [103,104,106,108,111,114–117]. In addition to this, some authors analyzed non-metabolized PAHs in urine to evaluate the occupational exposure of workers [72,74,118–120]. The 4 remaining studies are dealing with the US-EPA PAH quantitation in hair, as a non-invasive matrix for PAH exposure biomonitoring [121–124].

Nowadays, most studies of the impact of PAH exposure on public health were carried out on samples from Chinese (10 articles) [90,91,96,100,103,105–107,109], Italian (5 articles) [72,99,118,119] and American [76,94,110,111,120] residents (see

**Figure 10).** They typically involved a multistep process in which the biological sample was subjected to various pretreatment steps before the analysis of the resulting extract in chromatography. The PAH determination in biological samples is quite challenging, because of the complex nature of the samples in which several PAHs with a large range of physico-chemical properties are present, such as illustrated by their log P values ranging between 3.3 and 7.7 (see **Table 1**). The following part aims to describe the analytical techniques carried out to separate, identify and quantitate PAHs in complex biological samples. Then, a detailed state-of-the-art of the sample pretreatment of human biological samples for PAH determination is reported.

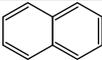
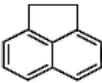
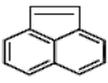
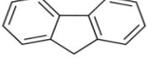
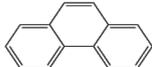
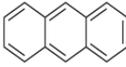
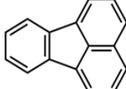
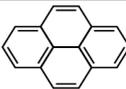
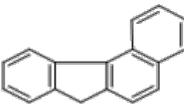
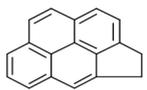
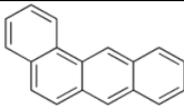
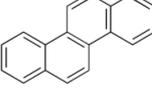
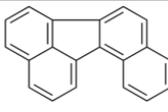


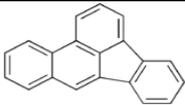
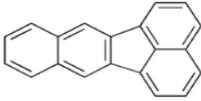
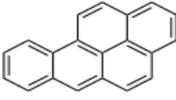
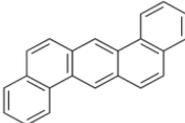
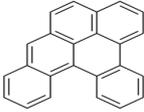
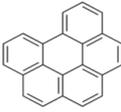
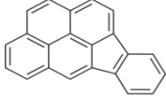
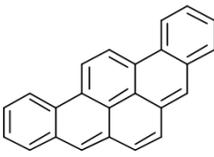
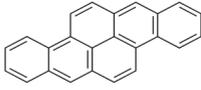
**Figure 9:** Number of papers dealing with the determination of PAHs as a function of the nature of the biological matrice



**Figure 10:** Repartition according to country of the studies dealing with the determination of PAHs in biological samples

**Table 1** : Chemical structure and partition coefficient of the twenty-four regulated PAHs. Log P values are issued from [4,5,7,126], PubChem DataBase and INERIS toxicological and environmental data sheets

Compound	Abbreviation	Structure	US EPA	EFSA	Log P
Naphthalene	NAPH		X		3.3 - 3.4
Acenaphthylene	ACY		X		3.6 - 4.0
Acenaphthene	ACE		X		3.8 - 3.9
Fluorene	FLO		X		4.0 - 4.2
Phenanthrene	PHE		X		4.1 - 4.7
Anthracene	ANT		X		4.5 - 4.7
Fluoranthene	FLT		X		4.7 - 5.3
Pyrene	PYR		X		4.9 - 5.4
7H-Benzo[c]fluorene	BcF			X	5.7
Cyclopenta[cd]pyrene	CPcdP			X	5.5 - 6.0
Benzo[a]anthracene	BaA		X	X	5.9 - 6.0
Chrysene	CHR		X	X	5.1 - 6.0
5-methylchrysene	5MCHR			X	6.0
Benzo[j]fluoranthene	BjF			X	6.2 - 6.4

Compound	Abbreviation	Structure	US EPA	EFSA	Log P
Benzo[b]fluoranthene	BbF		X	X	5.4 – 6.5
Benzo[k]fluoranthene	BkF		X	X	5.8 - 6.6
Benzo[a]pyrene	BaP		X	X	5.6 – 6.7
Dibenzo[a,h]anthracene	DahA		X	X	6.0 – 7.2
Dibenzo[a,l]pyrene	DalP			X	7.2 – 7.7
Benzo[ghi]perylene	BghiP		X	X	6.1 – 7.2
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	IcdP		X	X	6.2 – 7.2
Dibenzo[a,e]pyrene	DaeP			X	7.3
Dibenzo[a,i]pyrene	DaiP			X	7.3
Dibenzo[a,h]pyrene	DahP			X	7.0

### II.3.2. Chromatographic methods for PAH analysis

The two main analytical techniques for the determination of PAHs are High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with UV or fluorescence detection (FD) and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC/MS). Among the 42 papers, 33% of the studies used HPLC and 67% GC.

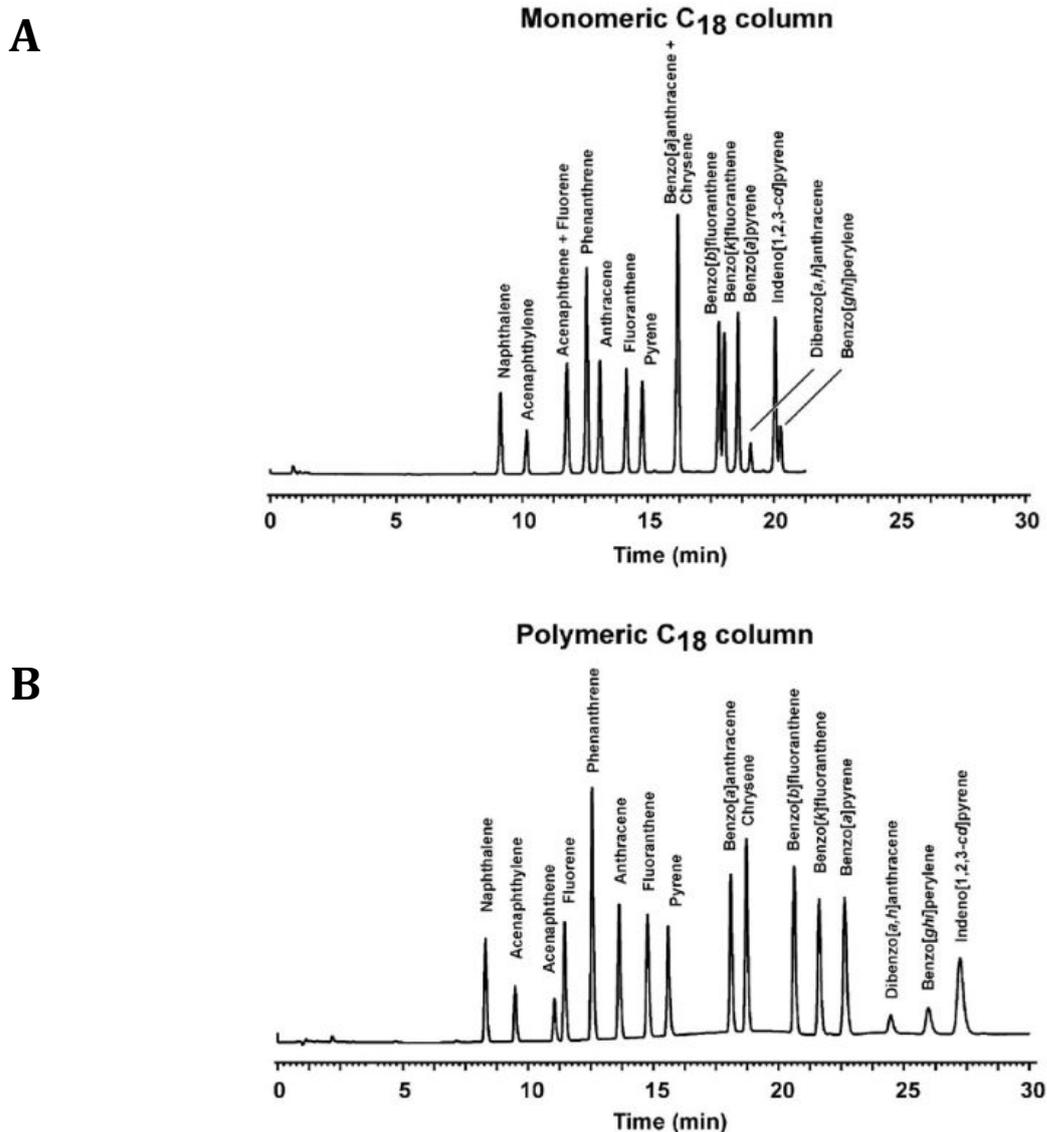
#### II.3.2.1. Liquid chromatography

Because of their hydrophobicity, reversed phase HPLC (RPLC) constitutes a method of choice for the analysis of PAHs. It offers several advantages including a shape selectivity allowing the isomer separation with some stationary phases and a good sensitivity and selectivity with FD which can be implemented for the 16 US-EPA PAHs [127].

**Table 2** presents the HPLC analysis of PAHs in human biological matrices. Only PAHs belonging to the US-EPA list were targeted. Even if it is recommended to separate PAHs on C18 bonded silica columns prepared with trichlorosilane, called “polymeric” column, in order to improve selectivity based on shape recognition [127], most of the authors used conventional C18 bonded silica columns in length, internal diameter, and particle size. As shown in **Figure 11**, the main differences between both are the resolution of 2 PAH pairs (ACE/FLO and CHR/BaA), the elution order of BghiP and IcdP, and the analysis time (21 min with the monomeric vs 28 min with the polymeric C18 stationary phase). The mobile phase was often a water-acetonitrile mixture and a gradient with a linear increase in the percentage of organic solvent from 50% to 100% was implemented [101,102,45,54,112,89,109,93]. The analysis times are generally between 35 and 75 min. It is worthwhile to notice that Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) using a stationary phase with particle size less than 2  $\mu\text{m}$  was already implemented for the PAH analysis in food and environmental matrices [128–130], but not yet in human biological matrices.

For PAH analysis in human biological samples, the detection was carried out with single [89,101,112] or multiple wavelength based ultraviolet spectrophotometers (UV) [102,104,114,116], a fluorescence detector (FD) [45,54,93,109,114], both UV and FD detectors [101,102], and both diode array detector (DAD) and mass spectrometry (MS)

with an atmospheric pressure photoionization source (APPI) in multiple reaction monitoring mode (MRM) [104]. With UV, a wavelength of 254 nm is often chosen, which does not always correspond to the maximum absorbance wavelength according to the detected PAH [89,101,102,112,114,116]. With FD, a time program of the optimal excitation and emission wavelengths for each PAH or several PAHs was often used [45,54,93,109,113,115], even if sometimes a single excitation and emission wavelengths were used [54,109].



**Figure 11:** RPLC-UV analysis of the 16 US EPA PAHs on two C<sub>18</sub>-bonded silica columns. (A) monomeric C<sub>18</sub> Zorbax ODS column (0.46 × 25 cm, 5 μm), (B) polymeric C<sub>18</sub> Pinnacle II PAH column (0.46 × 25 cm, 5 μm), Chromatographic conditions: 3 min with water-acetonitrile (50/50, v/v), followed by a 15-min linear gradient to 100% of acetonitrile and a 15 min hold at 100% acetonitrile. Flow rate: 2 mL/min; Detection: 254 nm. Adapted from [127]

**Table 2** : PAH analysis in human biological matrices by HPLC

Targeted compounds	Matrices	Column	Experimental conditions	Detection	Ref
<b>9 US-EPA PAHs:</b> ACE, ANT, PHE, FLT, NAPH, PYR, BbF, BkF, BaP	Blood	C18 Waters (4.6 x 75 mm, 3.5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 1 mL/min Injection: 20 µL Mode: Gradient	UV (254 nm) FD (λ ex, λ em) (275 nm, 330 nm: NAPH, ACE) (250 nm, 356 nm: PHE) (250 nm, 400 nm: ANT) (270 nm, 460 nm: FLT) (270 nm, 390 nm: PYR) (255 nm, 410 nm: BbF, BkF, BaP)	[101]
<b>13 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, BbF, BkF, BaP, IcdP, DahA	Blood	C18 Waters (4.6 x 75 mm, 3.5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 1 mL/min Injection: 20 µL Mode: Gradient	UV (254 nm: ACY) FD (λ ex, λ em) (275 nm, 330 nm: NAPH, FLO) (250 nm, 356 nm: PHE) (250 nm, 400 nm: ANT) (270 nm, 460 nm: FLT) (270 nm, 390 nm: PYR, BaA) (255 nm, 410 nm: BbF, BkF, BaP) (290 nm, 410 nm: DahA) (290 nm, 500 nm: IcdP)	[102]
<b>2 US-EPA PAHs:</b> CHR, BaP	Maternal blood Umbilical cord blood placenta	C18 (NA)	Mobile phase: ACN Flow: 1 mL/min Injection: 10 µL Mode: Isocratic	UV (254 nm)	[89]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Whole blood	Acquity BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7µm)	Mobile phase: H <sub>2</sub> O/MeOH (80/20) and ACN/MeOH (90/10) Flow : 0.4 mL/min Injection : NA Mode : Gradient	DAD (205 to 350 nm) MS (MRM mode)	[104]

Targeted compounds	Matrices	Column	Experimental conditions	Detection	Ref
<b>5 US-EPA PAHs:</b> BaA, CHR, BbF, BaP, DahA	Placenta Maternal umbilical serum	and C18 (4.6 x 300 mm, 5 µm)	Waters Symmetry TM Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 1.5 mL/min Injection: 20 µL Mode: Gradient	FD (λ ex, λ em) (290 nm, 430 nm)	[54]
<b>9 US-EPA PAHs:</b> ANT, FLT, PYR, BaA, BkF, BbF, BaP DahA, BghiP	Maternal umbilical serum	and cord NA	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 1 mL/min Injection: 20 µL Mode: Gradient	FD (λ ex, λ em) (345 nm, 425 nm)	[109]
<b>9 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, FLT, PYR, BaA, BaP	Serum	Pinnacle PAH (4.6 x 250 mm, 5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 2 mL/min Injection : NA Mode : Gradient (NA)	UV (254 nm)	[112]
<b>9 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, FLT, PYR, BaA, BaP	Serum	Pinnacle PAH (4.6 x 250 mm, 5 µm)	-	FD (NA)	[113]
<b>1 US-EPA PAH:</b> NAPH	Serum	Shimadzu SIL-10 VP (NA)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O (NA) Flow: 1mL/min Injection: NA Mode: isocratic	UV (254 nm)	[114]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Breast milk	Zorbax C18 XDB (4.6 x 250 mm, 5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 1 mL/min Injection: NA Mode: Gradient	FD (λ ex, λ em) 260 nm, 352 nm, 260 nm, 420 nm 260 nm, 460 nm	[115]

Targeted compounds	Matrices	Column	Experimental conditions	Detection	Ref
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Serum	Vydac 218TP54 C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O (75/25) Flow: 1 mL/min Injection: 50 µL Mode: isocratic	UV (254 nm)	[116]
<b>14 US-EPA PAHs:</b> ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Breast milk	A C18 Envirosep-PP (125 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 0.6 mL/min Injection: 20 µL Mode: Gradient	FD (λ ex, λ em) (252 nm, 402 nm : ACE) (238 nm, 398 nm: FLO, PHE, ANT) (268 nm, 398 nm: FLT, PYR) (300 nm, 466 nm: BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP)	[93]
<b>13 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA	Placenta	C18 Waters (4.6 x 75 mm, 3.5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 1 mL/min Injection: NA Mode: Gradient	UV (254 nm: ACY) FD (λ ex, λ em) (275 nm, 330 nm: NAPH, FLO) (250 nm, 356 nm: PHE) (250 nm, 400 nm: ANT) (270 nm, 460 nm: FLT) (270 nm, 390 nm: PYR, BaA) (255 nm, 410 nm: BbF, BkF, BaP) (290 nm, 410 nm: DahA) (290 nm, 500 nm: IcdP)	[45]
<b>15 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Hair	Inertsil ODS-P (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 1 mL/min Injection: 20 µL Mode: Gradient	FD (λ ex, λ em) (280 nm, 340 nm: NAPH, ACE, FLO) (250 nm, 400 nm: PHE) (286 nm, 433 nm: ANT) (331 nm, 392 nm: FLT, PYR) (264 nm, 407 nm: BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP) (294 nm, 482 nm : IcdP)	[121]

Targeted compounds	Matrices	Column	Experimental conditions	Detection	Ref
<b>15 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Hair	Zorbax eclipse PAH (100 mm x 2.1 mm, 3.4 µm)	Mobile phase: ACN/H <sub>2</sub> O Flow: 0,4 mL/min Injection: NA Mode: Gradient	FD (λ ex, λ em) (215 nm, 330 nm: NAPH) (220 nm, 325 nm: ACE, FLO) (250 nm, 380 nm: PHE, ANT) (280 nm, 440 nm: FLT) (270 nm, 390 nm: PYR, BaA, CHR) (260 nm, 420 nm: DahA, BghiP) (250 nm, 500 nm: IcdP)	[122]

FD: Fluorescence Detection, LOD: Limit Of Detection, NA: not available

### II.3.2.2. Gas chromatography

Authors implemented GC in 32 articles to identify and quantitate the US-EPA and EFSA PAHs in human biological matrices **Table 3**. Only 2 applications reported the quantitation of 24 [92] or more PAHs [110]. As mentioned in **Table 3**, the most widely used column was a non-polar column with 5% phenyl or with an arylene technology equivalent to a 5% phenyl column (DB-5, HP 1, HP 5, RTX-5SILMS, DB-5MS, VF-5MS, CD-5MS, and ZB-5MS). This technology leads to a low bleeding and an improved thermal stability even at high temperatures ( $\geq 300^{\circ}\text{C}$ ) [82]. However, it is well known that the main inconvenient is the co-elution of isomers, especially the 3 isomeric groups: CPcdP / BaA/ CHR, BbF / BjF / BkF, and DahA / IcdP and a loss in sensitivity for the heavy PAHs, especially dibenzopyrenes [131]. In case of co-elution, the authors reported the sum of grouped PAHs, which lead to data with a lack of consistency. To prevent from this phenomenon, stationary phases of greater polarity could be used. Only 3 studies involved a more polar column (VF-XmS, Rxi-PAH). It is worthwhile to notice that fast GC and comprehensive two-dimensional GC has already been implemented for the analysis of the 16 US EPA PAHs or the 16 EFSA PAHs [82], to increase the selectivity and improve the separation of the critical pairs of isomers, but not yet in human biological matrices.

PAH detection following GC separation was most widely achieved by MS quadrupole analyzers and ionization with electron impact (EI) (see **Table 3**). In this ionization mode, PAHs are stable compounds that mainly produce the molecular ions  $[\text{M}-\text{H}]^+$  or  $[\text{M}-2\text{H}]^+$  with little fragmentation [132]. The single ion monitoring mode (SIM) acquisition mode is preferred to the full-scan mode (FS) to improve sensitivity. Among the 32 studies, 30 ones used GC hyphenated with MS, 1 with a flame ionization detector (FID) and 1 with both FID and electron capture detector (ECD). In addition, only 2 applications were reported in literature with a triple quadrupole in the multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode [92,96]. It is worthwhile to notice that other analyzers such as ion trap has already been implemented for the PAH analysis in food and environmental matrices in order to increase the sensitivity, but not yet in human biological matrices [82]. In addition, the application of GC with atmospheric pressure laser ionization for PAHs analysis in environmental samples [133] has not been reported yet in biological analysis.

The choice of the injection conditions is also a key factor in GC to limit the discrimination of the heaviest PAHs. Even if the combination of programmed temperature vaporization and larger volume injection was described as the best combination for the analysis of both the light and heavy PAHs in order to obtain the best sensitivity, most of the authors performed splitless injection [45,72,74,76,90-92,94,95,100-103,105-108,111,118,119].

In conclusion, most of the authors preferred to carry out the PAH analysis by GC/MS rather than LC-UV/FD. Indeed, the MS detector can help the analyst to ensure the identification of the compounds. However, despite the sensitivity of the MS detector, it is important to remind that a matrix effect can be present because of the co-extracted compounds from samples that can lead to a wrong estimation of the PAH concentration (bad ionization). Hence, some authors used both techniques allowing both quantitation and confirmation thanks to the orthogonality of their separation mechanisms [101,102].

**Table 3:** PAHs analysis in human biological samples by GC

Targeted compounds	Matrices	Column	Detection Mode	Ref
<b>13 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP	Urine	VF-Xms (30 m x 0.25 mm, 0.10 µm)	MS (SIM)	[72]
<b>4 US-EPA PAHs:</b> NAPH, PHE, PYR, BaP	Urine	DB 5 (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS (SIM)	[74]
<b>21 regulated PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BfF, BbF, BkF, BaP, IcdP, BghiP, DahA, DalP, DaeP, DaiP, DahP	Plasma Blood	Rtx-5SILMS (60 m x 0.25 mm, 0.25µm)	MS (SIM)	[76]
<b>13 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP	Plasma	DB 5 (30 m x 0.25 mm, 0.25µm)	MS (SIM)	[106]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, IcdP, DahA	Blood	DB 5 (30 m x 0.25 mm, 0.25µm)	MS (SIM)	[100]
<b>9 US-EPA PAHs:</b> ACE, ANT, PHE, FLT, NAPH, PYR, BbF, BkF, BaP	Blood	HP-5 (50 m x 0.2 mm, 0.33 µm)	MS (FS)	[101]
<b>13 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, BbF, BkF, BaP, IcdP, DahA	Blood	HP-5 (50 m x 0.2 mm, 0.33 µm)	MS (FS)	[102]
<b>16 US-EPA PAHs</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Blood	CD 5MS (30 m x 0.32 mm, 0.25µm)	MS (FS)	[103]
<b>15 US-EPA PAHs :</b> ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Placenta Breast Milk Umbilical cord blood	HP-5 (30 m x 0.32 mm, 0.25µm)	MS (SIM)	[90]
<b>7 US-EPA PAHs:</b> BaA, BaP, BbF, BkF, CHR, DahA, IcdP	Umbilical cord blood	DB 5 MS (30 m x 0.25 mm, 0.25µm)	MS (SIM)	[105]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, IcdP, DahA	Maternal serum and Umbilical cord serum Breast Milk	-	MS (SIM) ECD	[96]

Targeted compounds	Matrices	Column	Detection Mode	Ref
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, IcdP, DahA	Umbilical cord serum	-	MS (SIM)	[107]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, IcdP, DahA	Blood	HP-5 (50 m x 0.2 mm, 0.33 µm)	FID	[108]
<b>55 PAHs of which 8 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, IcdP, DahA	Maternal and umbilical cord serum	-	MS*	[110]
<b>15 US-EPA PAHs:</b> ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Maternal serum Umbilical cord serum Placenta	DB 5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS (SIM)	[91]
<b>16 US-EPA PAHs :</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Serum	HP-1 or HP-5 (12 m x 0.2 mm, 0.33 µm)	MS (SIM)	[111]
<b>16 US-EPA PAHs :</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Serum	-	MS (FID)	[115]
<b>24 regulated PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, 5MCHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP, DaIP, DaeP, DaiP, DahP	Breast milk	Rxi-PAH (40 m x 0.18 mm, 0.07 µm)	MS (MRM)	[92]
<b>13 US-EPA PAHs:</b> FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Breast milk	ZB-5MS (30 m x 0.32 mm, 0.25 µm)	MS (SIM)	[94]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Breast milk	VF-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS*	[95]
<b>1 US-EPA PAH:</b> NAPH	Breast milk	DB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS (MRM)	[97]

Targeted compounds	Matrices	Column	Detection Mode	Ref
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Breast milk	Rtx-CLPesticides2	MS (SIM)	[98]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Breast milk	VF-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS (microSIS)	[99]
<b>13 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA	Serum	HP 5 (30 m x 0.32 mm, 0.25 µm)	MS (FS)	[45]
<b>5 US-EPA PAHs:</b> BaP, ACE, PHE, PYR, CHR	Follicular Fluid Serum	-	MS*	[117]
<b>8 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR	Urine	VF-Xms (30 m x 0.25 mm, 0.10 µm)	MS (SIM)	[118]
<b>13 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP	Urine	VF-Xms (30 m x 0.25 mm, 0.10 µm)	MS (SIM)	[119]
<b>2 US-EPA PAHs:</b> NAPH, PHE	Urine	DB 5 (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS (SIM)	[120]
<b>15 US-EPA PAHs:</b> ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Hair	HP 5 MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS*	[123]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Hair	DB 5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS*	[100]
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Maternal blood Umbilical cord blood Placenta	HP 5 MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS*	[125]

Targeted compounds	Matrices	Column	Detection Mode	Ref
<b>16 US-EPA PAHs:</b> NAPH, ACE, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BghiP, DahA, IcdP	Umbilical cord blood	-	SIM	[134]

BM: Breast Milk, ECD: Electron Capture Dissociation, FID: Flame Ionization Detector, FS: Full Scan, fw: fresh weight, LOD: Limit Of Detection, LOQ: Limit Of Quantification, MRM: Multiple Reaction Monitoring, MS: Maternal Serum, NA: Information not available, RSD: Relative Standard Deviation, SIM: Single Ion Monitoring, MS\*: Mode of detection not reported

### II.3.3. Sample pretreatment

The PAHs determination in complex biological media such as serum, blood, plasma, urine or even tissues is challenging because other sample components are present and may interfere with the PAH detection, especially when the targeted compounds are at trace-level in the ng/ml range. This is why a sample pretreatment is necessary to extract PAHs. Nevertheless, this step is challenging as PAHs have a large range of physico-chemical properties and as other matrix components are also unavoidably co-extracted and thus can interfere during the analysis step. Moreover, the presence of lipophilic interferents such as lipids and triglycerides can adversely affect the extraction, identification, and quantitation of the PAHs. It was also demonstrated that PAHs, in particular heavy PAHs, interact with the most abundant serum protein, albumin [135,136]. Thus, it is necessary to disrupt these interactions and to remove as much as possible the interferents from the final extract.

**Table 4** presents the sample pretreatment steps reported in literature to extract PAHs from different biological matrices.

#### II.3.3.1. Sample pretreatment for human biological liquid matrices.

##### II.3.3.1.1. Blood, plasma, and serum

LLE is the most commonly used technique as the first sample pretreatment step to extract PAHs. Blood, plasma, and serum volumes range from 1 to 12 ml. The most frequently used extraction solvent was n-hexane [76,89,91,100,101,105] despite its toxicity. However, other solvents, especially for the PAH extraction from serum, were used such as cyclohexane [54], DCM [110], or mixtures of n-hexane/diethylether (1/1, v/v) [112–114] and DCM/n-hexane [107]. Some authors carried out several successive LLEs, often 3, to improve the extraction yields and reach values between 73% and 122% [100–102,105,107,110,91]. Recoveries higher than 100% can be explained by a possible matrix effect because of a non-sufficient clean-up of the sample. In only few studies, the extract was injected in chromatography directly after the LLE and evaporation steps, but informations about the analytical performances were missing [76,112–114]. This single step led to good recoveries for the quantitation of 9 US-EPA PAHs (the less hydrophobic) in serum, ranged from 87 to 97%, and determined with serum samples spiked at 0.1 and 1 mg/L [113].

However LLE was generally followed by a clean-up of the extract by SPE [100–102,105,110,91] using C18-bonded silica [90,100–102,105], bare silica [89–91] or silica/alumina [110]. After LLE, a partial evaporation is often carried out to reduce the volume of the pooled extracts leading to percolation volume between 0.5 and 3 ml. The approach adopted by all the authors to clean up the samples after the LLEs is a retention of the lipids content present on the matrix on the sorbent. Therefore, the most used percolation medium is n-hexane [89,90,90,100–103,105], DCM [110] and DCM/n-hexane mixture [107]. PAHs can be next eluted with a mixture of n-hexane/DCM (1/1, v/v) [90,100–102,105,107] or n-hexane [89]. Finally, the SPE elution fraction is evaporated under a nitrogen flow to concentrate the PAHs but also to replace the eluting solvent by a solvent adapted to the chromatographic analysis. The final volume of the extracts ranged from 80 µl [103] to 0.5 ml [101] while the initial volume of the sample ranged from 1 to 12 mL. These volumes lead to enrichment factors (EFs) up to 18.8 [100]. Thus, the combination of LLE and SPE allowed to achieve extraction recoveries of the 16 US-EPA PAHs from umbilical cord serum between 89 and 122% with RSDs below 11.4% and EFs up to 4.9 [107]. LODs ranging from 0.01 to 0.91 ng/mL were obtained. In this study, authors found mean PAH concentrations between 0.3 and 152 ng/g of lipid in umbilical cord serum. It is worthwhile noticing that authors quantitated PAHs under the LOD. Another explanation can be that the value used for converted the results in this study is not adequate.

Between LLE and SPE, an additional purification step can be introduced. As an example, Zhang *et al.* cleaned the extracts obtained after LLE with Size Exclusion Chromatography (SEC) before a SPE purification on a silica/alumina-based (2:1) sorbent [91]. They targeted 15 US-EPA PAHs and obtained extraction recoveries ranged from 77 (ACY d8) to 113% (PHE d10) with RSD values below 26%. Unfortunately, the obtained LODs/LOQs and the studied concentrations were not available. Authors found mean PAH concentration of 1290 ng /g of lipid for the sum of the 15 US-EPA PAHs in maternal serum and 1150 ng /g of lipid for the sum of the 15 US-EPA PAHs in umbilical cord serum. A study demonstrated that the mean lipid content in 283 maternal sera was  $7.33 \pm 1.86$  g/L [137]. Using this value for the lipid content, it is therefore possible to convert the data reported in this study: authors found mean PAH concentration of 9.5 ng/mL for the sum

of the 15 US-EPA PAHs in maternal serum and 8.4 ng/mL for the sum of the 15 US-EPA PAHs in umbilical cord serum.

It is worthwhile noticing that a saponification of the lipids present in the blood samples before the LLEs with n-hexane and the SPE on C18 sorbent was carried out by some authors [100,101,105,134]. It was performed in a 0.4 M NaOH ethanolic solution at 60°C during 30 min [100,101,105,134]. This approach led to good recoveries for the quantitation of 7 US-EPA PAHs (the most hydrophobic) in umbilical cord blood, ranged from 78 to 106% with EFs up to 2.1 and LODs in real samples between 0.03 and 0.09 ng/mL [105]. Unfortunately, no data about the studied concentrations were available. However, authors found mean PAH concentrations in umbilical cord blood ranged from 0.1 ng/mL (BaA) to 111.8 ng/mL (BbF+BbK). Moreover, Xu *et al.* obtained also good recoveries for the quantitation of the 16 US-EPA PAH. Indeed, to determine the recoveries, they used spiked calf serum at three levels of concentration (10, 20 and 50 ng/mL). They obtained recoveries ranged from 78 to 110% with EFs up to 2.2 and LODs in calf serum between 0.01 and 0.07 ng of PAH/g of cal serum. Authors found median PAH concentrations in umbilical cord blood ranged from 0.02 ng/mL (DahA) to 3.94 ng/mL (IcdP). About the 2 other studies where the 16 US-EPA PAHs were targeted, a lack of information regarding the analytical performances as RSDs and LODs/LOQs can be noted. Compared to the other works related to blood without the saponification step, the obtained extraction yields are similar with similar LODs [107]. This is why, it is difficult to conclude if this additional step allowed the elimination of some interferences and the decrease in the matrix effect that can be responsible of an overestimation of the extraction recoveries.

SPE can also be used alone as an alternative approach to LLE to extract the PAHs from blood, plasma or serum prior to their chromatographic analysis [96,103,106,109,111]. It requires a lower volume of solvent and simple less-time consuming manipulations. Indeed, 1 [109] or 2 mL [96,103,106,111] of blood, plasma or serum were percolated on an apolar sorbent, C18-bonded silica when this information is given [96,103,106]. Elution was achieved with hexane-DCM (1/1) [88,103,106], acetonitrile-butylchloride (45/55) [111] or ethyl acetate [109]. The SPE step was followed by an analysis with either GC/MS [96,103,106,111] or LC/FD [109]. Unfortunately, in

some of these papers, several analytical data are missing, such as the nature of the SPE sorbent [109,111], the enrichment factors [96,111], the extraction yields in real samples [111], and the LOQs in the biological matrices [96,111]. With this approach, Song *et al.* targeted the 16 US-EPA PAHs in blood, and the recovery values were between 67 and 88% with RSDs below 16% and EFs up to 5.7 [103]. LODs in plasma ranged from 84 to 114 ng/g of plasma were obtained. Authors found mean PAH concentrations between  $42 \pm 31$  and  $4653 \pm 3129$  ng/g of plasma. The obtained SD values showed a large dispersion of PAH concentrations in real samples. Moreover, according to the results, it seems that the authors quantified concentrations below the LODs. In addition, Chen *et al.* targeted 9 US-EPA PAHs in maternal and umbilical cord serum and obtained recoveries between 91% and 100% with RSD values lower than 13% and EFs up to 10. LODs between 0.05 and 0.10 ng/mL were obtained. They determined the performances of their analytical method with serum samples spiked with PAH concentrations between 1 and 10 ng/mL. Authors found geometric mean PAH concentrations ranged from 16 to 70 ng/g of lipid and from 22.9 to 68.4 in maternal and umbilical cord serum respectively. Using the value of  $7.33 \pm 1.86$  g/L for the lipid content, authors found geometric mean PAH concentrations ranged from 0.1 ng/mL to 0.5 ng/mL and from 0.22 ng/mL to 0.5 ng/mL in maternal and umbilical cord serum respectively. To conclude about LLEs and SPE, some authors added to the sample, especially with serum, some formic or hydrochloric acid, or some isopropanol or methanol before LLE or SPE, to enhance the extraction step efficiency [91,103,107,112,114]. In all cases, high extraction recovery values were obtained with this strategy, but it is impossible to determine if this strategy was more efficient than the classical one or if the recoveries were higher due to matrix effect because no study about the matrix effect was carried out.

Cloud Point Extraction method (CPE) was also implemented to extract 5 US-EPA PAHs (BaA, CHR, BbF, BaP, and DahA) from maternal and umbilical cord sera [54]. CPE follows the principles of 'green chemistry' because it uses small amounts of non-toxic organic surfactants. Triton X-100 was chosen as non-ionic surfactant with sodium chloride and cyclohexane to extract PAHs [35]. Extraction yields ranged from 92 to 111%, with RSDs inferior to 10% and LODs in serum between 0.25 and 2.5 ng/mL were obtained with serum samples spiked at 3 different concentrations (0.8, 1.5 and 3 ng/mL). In this work, no PAH was detected in maternal and umbilical cord blood. However, this technique

is safe and cheap, but surfactant leads to a strong UV absorbance and even fluorometric signals if it contains double bonds, such as Triton. Therefore, the choice of the surfactant is a key parameter.

Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction (QuEChERS) was also used to extract PAHs from biological matrices [115]. It allowed the extraction of the 16 US-EPA PAHs in blood serum. The QuEChERS kit contained 6 mg of magnesium sulfate and 1.5 g of sodium acetate while the dispersive Solid Phase Extraction (dSPE) kit contained 25 mg of primary and secondary amines, 25 mg of end-capped octadecylsilane, and 150 mg of magnesium sulfate. Before the extraction procedure, the serum was diluted with water. The extraction recoveries were between 82 and 92%, with RSDs from 5 to 15%. No data about the studied concentrations and the obtained LODs/LOQs were given. PAH concentrations in the blood samples were between 1 and 407 ng/mL. Finally, this strategy seems promising but, once again, no study about the matrix effect was carried out.

It can be noticed that blood samples can also be stored on paper. In that case, the sample pretreatment is different as illustrated by Provatas *et al.* [104]. To quantitate the 16 US-EPA PAHs in avian dried blood spots, after punching the spot from the card, an extraction with a mixture of MeOH and 0.1 M formic acid was performed to lyse blood cells. The supernatant was cleaned by SPE with a zirconia-based sorbent to remove phospholipids. High recoveries between 60 and 104% with RSD lower than 3% were obtained, with spiked samples at 1ng/mL. PAH concentrations ranged from 68.1 and 133.1 ng/g of blood were reported.

Solid-Phase microextraction (SPME) was also used for the assessment of PAH exposure by quantitation of PAHs in serum [108], since it is automated, user-friendly and requires no organic hazardous solvents. The direct immersion method (DI-SPME), where the fiber is directly immersed in the samples, was used. The determination of the 16 US-EPA PAHs in serum was carried out after a proteolytic digestion and direct immersion solid phase microextraction (DI-SPME) with a PDMS fiber (100- $\mu$ m) [108]. The first step aimed to cut the lipoproteins into peptides with the proteinase K before the analyte extraction. Two parameters were tested to improve the final recoveries: the protease concentration and the digestion time. The best conditions were the use of 190  $\mu$ g of

protease per ml of serum and a digestion time of 60 min. The SPME conditions were 60 min of extraction followed by washing steps with a NaCl solution and water before a thermal desorption at 270°C during 5 min. Recoveries ranged from 80 to 99% with LODs in blood between 2.1 and 30.4 ng/mL were obtained for spiked real samples ranged from 88 and 177 ng/mL.

To conclude about the sample pretreatment of blood, plasma and serum, SPE alone as a pretreatment step seems to be the best choice. Indeed, it requires a lower volume of solvent and simple less-time consuming manipulations. Moreover, this technique can be automatized. Although few available informations, authors obtained similar extraction recoveries and LODs in real matrix to those obtained with other techniques.

### **II.3.3.1.2. Urine**

The sample pretreatment of urine required 0.5 to 0.7 mL, as shown in **Table 4**. The headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) was carried out for the assessment of PAH exposure by analysis of non-metabolized analytes in urine before a GC-MS analysis [72,74,118–120]. Authors tested different parameters: nature and thickness of the fiber coating, extraction temperature, extraction time, desorption temperature, desorption time, ionic strength, and sample agitation [74,119,120]. They added NaCl to increase the ionic strength of the sample so that the solubility of the analytes decreases, facilitating their transfer to the gas phase [74,119]. They all worked with a 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS) fiber and similar extraction (60 min at 70°C-80°C) and desorption conditions (between 10 and 20 min at 250-270°C). In 2 studies, authors targeted 13 US-EPA PAHs among the 16 ones and obtained good extraction recoveries and LODs in urine. Thus, Campo *et al.* proposed an extraction during 60 min at 80°C with a 100 µm PDMS fiber and a desorption during 10 min at 250°C in the GC injection port, for the quantitation of 13 US-EPA PAHs [119]. LOQs under 0,023 ng/L in urine were obtained, with extraction recoveries between 83 and 116% for NAPH and BaP, respectively, and RSDs ranging from 3 to 32%, determined with urine samples spiked at 3 different concentrations for each PAH (between 0.01 and 0.4 ng/mL) [119]. Similar extraction recoveries and LOQs were obtained for the same 13 US-EPA PAHs, with the

same protocol, in their other study [72]. In the other studies, extraction recoveries are missing and the authors targeted 2 or 4 PAHs (cf. **Table 4**). Nevertheless, the main disadvantage of SPME is its reduced extracted amounts due to the small volume of polymer coating on the fiber.

### **II.3.3.1.3. Breast milk**

The sample pretreatment of breast milk required 1 mL [97] to 45 mL [94]. The PAH extraction requires generally 2 steps as for blood, serum, and plasma. The first one is the isolation and measurement of fat. For this step, two approaches were carried out. The first one was successive LLEs with different solvents such as DCM [95], mixture of DCM/MeOH/NaCl solution [95], n-hexane [89], ACN [90], ethyl acetate [92]. The second one involved saponification followed by a LLE with cyclohexane [93] or a Soxhlet extraction in acetone/DCM (1/1) plus a clean-up on Florisil sorbents [96]. After evaporation of the extract and resuspension, a second purification and extraction step is involved such as SEC [95] [96], LLE with DCM/ACN (3:1, v/v) plus SPEs on C18 and Florisil sorbents [94], or SPE on C18-bonded [93] or bare silica [89,90,92]. Finally, in all these approaches, the extract is evaporated prior to its analysis with an adequate chromatographic system. Only one study implemented the QuEChERS approach (6 mg of magnesium sulfate and 1.5 g of sodium acetate while the dSPE extraction kit contained 25 mg of primary and secondary amines, 25 mg of end-capped octadecylsilane, and 150 mg of magnesium sulfate) to extract the 16 US EPA-PAHs from breast milk.

As an example, Madhavan *et al.* targeted 15 US-EPA PAHs and obtained recoveries between 81 (ACY) and 126% (BaP) with RSDs under 15% [90]. EFs between 5 and 8 were reported. LODs ranged from 0.012 to 0.05 ng/g of milk (fresh weight) were obtained. Mean PAH concentrations between 1.3 and 133 ng/g of lipids were found in breast milk samples. Similarly, Santonica *et al.* obtained recoveries between 75 (BaP) and 133% (FLT) for 15 US-EPA PAHs with 2 successive SPE steps implementing apolar and polar sorbents. [93] Very high EF values were reached, between 337 and 599, and good LODs between 0.02 and 0.04 ng/g fat were obtained. but requiring a high initial sample volume of 45 mL [94]. Only FLO, PHE, FLT and PYR were detected with mean PAH concentrations ranged from 0.05 to 0.50 ng/mL in milk samples. Finally, the 16 US-EPA PAHs were studied by Del Bubba *et al.*, and the recoveries obtained after SEC and evaporation were between 42

(NAPH) and 101% (DahA) with RSDs under 19% [95]. LOQs were similar to those obtained by Santonica *et al.* and were between 0.011 and 0.032 ng/g of milk. In this study, BaP, IcdP, DahA, and BghiP were not detected in milk samples. Mean PAH concentrations ranged from 0.1 to 7.0 µg/kg of milk were found. For the approaches with QuECHERS [115] or Soxhlet extraction [96], similar recoveries, ranged from 66% to 97%, were obtained. Unfortunately, for this 2 works, LODs/LOQs were not given. To conclude, the most interesting study was carried out by Pulkrabova *et al.*. Indeed, they targeted the 24 regulated PAHs and they obtained good recoveries ranged from 70 to 110% with RSD values up to 30% and EFs up to 44. LOQs in breast milk between 0.03 and 0.1 ng/g of lipid were obtained. Analytical performance data were obtained with cow milk samples spiked at 0.03 and 0.3 ng of PAH/g of lipid. In this work, CPcdP, 5MCHR, DalP, DaeP, DaiP and DahP were not detected. However, in all these works, it is difficult to compare the different results because authors expressed the LODs/LOQs in different units. Thus, it is complicated to determine the best approach to obtain the best recoveries with the lowest LODs/LOQs. Moreover, the targeted concentration range is often missing.

#### **II.3.3.2. Sample pretreatment of placenta**

The sample pretreatment of placenta required 0.5 [54] to 10 g of tissues [89]. As illustrated in **Table 4**, the first step to extract PAHs from placenta was, in most of the cases, a tissue homogenization in a solution using a salt [90], and/or ethanol-NaOH mixture followed by a saponification in ethanol/2 N NaOH (9:1) during 90 min [125] or 2 h [45,89] or KOH [54]. Two studies [90,91] implemented a soxhlet extraction in DCM [91] or in n-hexane/DCM (2/8) [90]. After saponification, the extract was next evaporated and purified with either LLEs with n-hexane which can be followed by a clean-up step on C18 bonded [45,54,125] or on bare [89] silica. This approach was successful as it led to high recoveries for 13 US EPA-PAHs, ranged from 76 to 96% with LODs in placenta between 0.02 and 0.08 ng/mL, determined with spiked sample extracts at 10-20 ng/mL [45]. Authors found in real samples mean PAH concentrations ranged from  $8.8 \pm 5.8$  to  $468 \pm 105.4$  ng/ml. Unfortunately, FLO, BaA and BghiP were not detected in all the samples. Dong *et al.* carried out the same procedure for the quantitation of the 16 US-EPA and obtained similar recoveries, but no analytical data were reported about LODs in placenta and the studied concentrations.

About the Soxhlet extraction, the extract was then purified either by LLEs with n-hexane [90] or on SEC column packed with Bio-beads S-X3 followed by SPE with silica-alumina [91]. With SEC and SPE, the recoveries of the 15 US-EPA PAHs were between 77 and 113% with high RSD values of about 26% [91]. LOQs in placenta between 3 and 64 ng/g of lipid were obtained. In addition, authors found PAH concentrations of 673 ng/g of lipid for the sum of the 15 US-EPA PAHs. It is difficult to compare this result with the previous one because of the different units used. However, soxhlet extraction is time consuming, the analytes are held at high temperature for a long time and temperature-sensitive PAHs may be destroyed. Moreover, large quantities of solvents are wasted, and additional concentration and clean-up steps are necessary. To conclude, the sample pretreatment of placenta was quite similar to the procedure used for blood, serum and plasma, namely a succession of LLEs and SPEs, after the homogenization step (saponification or Soxhlet extraction).

### **II.3.3.3. Sample pretreatment of hair samples**

Hair analysis can be performed to investigate the exposure or consumption of various substances. It is generally assumed that xenobiotics are incorporated from blood into hair bulb during hair synthesis. Therefore, there is an accumulation of molecules along hair shaft during hair growth. Depending on hair length, analysis of one specimen provides information concerning up to several months, making this matrix particularly adapted to the assessment of chronic exposure.

As far we know, 4 papers are dealing with the quantitation of PAHs in hair samples. About the sample preparation, in general, a first step to clean hair sample is necessary to remove external contamination such as residues of hair care products, sweat, sebum and dust typically present on hair and that lead to increased analytical noise. Solvent used for hair decontamination should remove external impurities as completely as possible but not extract molecules from the hair matrix. Hexane [121,122] or Triton and mixture of hexane/DCM (3/2,v/v) [123] were commonly used to carry out this step.

After this decontamination step, a hydrolysis step with NaOH was performed. Thus, Toriba and coworkers extracted 16 US-EPA PAHs by LLE with n-hexane followed by an evaporation step before sample injection in HPLC/FD. Obtained recoveries ranged between 41 and 90%. Extraction recovery for naphthalene was lower due to the loss of

this PAH during the evaporation step despite the addition of DMSO to avoid it. However, low LODs between 0.08 and 1.2 ng/mL in the extracts were obtained. In this study, recoveries were determined with hair sample extracts spiked at 70 and 350 pg/mg. PAH concentrations ranged between 0.2 and 628 pg/mg of hair were found in real hairs.

In addition, Yamamoto and coworkers extracted 15 US-EPA PAHs with another approach. They extracted PAHs by in-tube SPME, after a decontamination step and a hydrolysis step. In-tube SPME enables the convenient automation of the extraction process, not only reducing analysis time, but providing better precision and sensitivity than manual off-line techniques. In this work, the in-tube SPME device consisted in a CP-Sil 19CB (14% cyanopropyl phenyl methylsilicone) capillary column (60 cm × 0.32 mm × 1 µm) placed between the injection loop and the injection needle of the autosampler. This sample pretreatment protocol led to extraction recoveries ranged between 70 and 113% with SD lower than 7% and LOQs between 1.7 and 96 pg/mg were obtained. Unfortunately, the detection of IcdP was impossible. In this study, recoveries were determined with hair sample extracts spiked between 0.05 and 0.5 ng/mL.

Only one study implemented a different approach, without decontamination and hydrolysis steps, using of a Soxhlet extraction of the 16 US-EPA PAHs with an acetone/n-hexane mixture [124]. Unfortunately, no data about the analytical performances of the sample pretreatment was available to compare the results with the other studies. One more time, the authors used different units to express the obtained results rendering the comparisons difficult. In conclusion, the sample pretreatment of hair samples seems to be simpler than the other matrices because it often only requires a simple solvent extraction after the decontamination and hydrolysis steps.

**Table 4:** sample pretreatment to extract the PAHs from different human biological samples

Targeted compounds	Matrices	Sample pretreatment	Analytical performances	Studied concentration (ng/mL)	Ref
<b>BLOOD/PLASMA/SERUM</b>					
<b>21 regulated PAHs</b>	Blood (1 mL) Plasma (1.5 mL)	LLE (hexane)	LOQ <sub>Plasma</sub> : 0.04 - 0.66 ng/mL	0.06 - 0.18	[76]
<b>13 US-EPA PAHs</b>	Plasma (2 mL)	SPE (C18) + SPE (Florisil)	R <sub>plasma</sub> : 79 - 98% EF <sub>plasma</sub> : 3.2 - 3.9 LOD <sub>Plasma</sub> : 1 - 5 ng/g lipid	-	[106]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Blood (2 mL)	Saponification + 3 LLE (n-hexane) + SPE (C18)	R <sub>blood</sub> : 78 - 94% EF <sub>blood</sub> : 15.6 - 18.8	5, 10, 20	[100]
<b>9 US-EPA PAHs</b>	Blood (2 mL)	Saponification + 3 LLE (n-hexane) + SPE (C18)	R <sub>blood</sub> : 73 - 94% EF <sub>blood</sub> : 2.9 - 3.8	-	[101]
<b>9 US-EPA PAHs</b>	Blood (2 mL)	3 LLE (n-hexane) + SPE (C18)	R <sub>blood</sub> : 73 - 94% EF <sub>blood</sub> : 2.9 - 3.8 RSD <sub>blood</sub> : 3.6 - 7.1% LOD <sub>blood</sub> : 0.008 - 0.05 ng/mL	5-20	[102]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Blood (2 mL)	SPE (apolar)	R <sub>blood</sub> : 67 - 88% EF <sub>blood</sub> : 4.4 - 5.7 RSD <sub>blood</sub> : < 16% LOD <sub>blood</sub> : 82 - 114 ng/g	-	[103]
<b>15 US-EPA PAHs</b>	Umbilical blood (5 mL)	LLE (n-hexane) + SPE (silica)	LOD <sub>UCB</sub> : 0.012 to 0.025 ng/g (fw)	-	[90]
<b>3 PAHs of which 2 US-EPA PAHs</b>	Maternal and Umbilical blood (2 mL)	3 LLE (n-hexane) + SPE (silica)	LOD <sub>blood</sub> : 0.01-0.05 ng/mL	-	[89]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Blood (paper spots)	LLE (MeOH/ formic acid (2:98)) + SPE (zirconia)	R <sub>blood</sub> : 63 - 104% RSD <sub>blood</sub> : 0.48 - 2.40%	1-100	[104]

Targeted compounds	Matrices	Sample pretreatment	Analytical performances	Studied Concentration (ng/mL)	Ref
<b>BLOOD/PLASMA/SERUM</b>					
<b>7 US-EPA PAHs</b>	Umbilical cord blood (2 mL)	Saponification + 3 LLE (n-hexane) + SPE (C18)	R <sub>blood</sub> : 78 - 106% EF <sub>blood</sub> : 1.6 - 2.1 LOD <sub>blood</sub> : 0.03 - 0.09 ng/mL	-	[105]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Umbilical cord blood (2 mL)	Saponification + 3 LLE (n-hexane) + SPE (C18)	R <sub>calf serum</sub> : 78 - 110% EF <sub>blood</sub> : 1.6 - 2.2 LOD <sub>calf serum</sub> : 0.01 - 0.07 ng/g of calf serum	10, 20 and 50	[134]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Maternal and umbilical cord serum (1-2 mL)	SPE (C18) + SPE (Florisil)	R <sub>serum</sub> : 71 - 126%	-	[96]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Umbilical cord serum (2 mL)	3 LLE (DCM/n-hexane (1:1, v/v)) + SPE (silica)	R <sub>serum</sub> : 89 - 122% EF <sub>serum</sub> : 3.5 - 4.9 RSD: ≤11.4% LOD <sub>UCS</sub> : 0.013 - 0.912 ng/mL	-	[107]
<b>5 US-EPA PAHs</b>	Maternal and umbilical cord serum (1 mL)	Triton 5% X-100 + NaCl + 2 LLE (cyclohexane)	R <sub>serum</sub> : 92 - 111% RSD <sub>serum</sub> : < 10% LOD <sub>serum</sub> : 0.25- 2.5 ng/mL	0.8, 1.5 and 3	[54]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Serum (3.8 mL)	digestion (proteinase K) + DI-SPME	R <sub>serum</sub> : 80 - 99% LOD <sub>Blood</sub> : 2.1 - 30.4 ng/mL	88-177	[108]
<b>9 US-EPA PAHs</b>	Maternal and umbilical cord serum (1 mL)	SPE (apolar)	R <sub>serum</sub> : 91 - 100% EF <sub>serum</sub> : 9.14 - 9.98 RSD <sub>serum</sub> : 2.9 - 12.7% LOD <sub>serum</sub> : 0.05 - 0.10 ng/mL	-	[109]
<b>55 PAHs of which 16 US-EPA PAHs</b>	Maternal and umbilical cord serum (NA)	3 LLE (DCM) + SPE (silica/alumina)	LOD <sub>MS/UCS</sub> : 0.77 - 1.74 ng/mL	-	[110]

Targeted compounds	Matrices	Sample pretreatment	Analytical performances	Studied Concentration (ng/mL)	Ref
<b>BLOOD/PLASMA/SERUM</b>					
<b>15 US-EPA PAHs</b>	Maternal serum (4-5 mL) Umbilical cord serum (8-12 mL)	3 LLE (n-hexane) + SEC (Bio-beads S-X3) + SPE (silica-alumina (2:1))	R <sub>serum</sub> : 77 - 113% RSD: < 26% LOQ <sub>MS/UCS</sub> : 3-64 ng/g lipid	-	[91]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Serum (2 mL)	SPE (apolar)	-	-	[111]
<b>12 PAHs of which 9 US-EPA PAHs</b>	Serum (0.5 mL)	LLE (hexane:diethylether (1:1))	-	-	[112]
<b>12 PAHs of which 9 US-EPA PAHs</b>	Serum (0.5 mL)	LLE (hexane: diethylether (1:1))	R <sub>serum</sub> : 87 - 97%	100-1000	[113]
<b>1 US-EPA PAHs</b>	Serum (0.5 mL)	LLE (hexane: diethylether (1:1))	R <sub>serum</sub> : 89 - 96% EF <sub>serum</sub> : 0.45 - 0.48 LOD <sub>serum</sub> : 20 ng/mL	-	[114]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Serum (0.5 or 5 mL)	Triton X-100 + NaCl +precipitation (ACN)	-	250-500	[116]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Serum (0.5 mL)	QuEACHERS (0.5 g)	R <sub>serum</sub> : 80 - 92% RSD <sub>serum</sub> : 5 - 15%	-	[115]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Maternal blood and umbilical cord blood (2 mL)	Homogenization in physiological saline solution + ethanol/ 2 N NaOH (9:1) + 3 LLE (n-hexane) + SPE (C18)	R <sub>blood</sub> : 87 - 109% EF <sub>blood</sub> : 26.1-32.7 LOD: 1 ng/mL	-	[125]
<b>URINE</b>					
<b>13 US-EPA PAHs</b>	Urine (0.6 mL)	HS-SPME	R <sub>urine</sub> : 83 - 116% RSD <sub>urine</sub> : 5 - 25% LOQ <sub>urine</sub> : 0.002 - 0.025 ng/mL	-	[72]
<b>4 US-EPA PAHs</b>	Urine (0.7 mL)	HS-SPME	RSD <sub>urine</sub> : < 8.5% LOD <sub>urine</sub> : 0.0003 - 0.05 ng/mL	0.25-25	[74]
<b>8 US-EPA PAHs</b>	Urine (0.5 mL)	HS-SPME	LOD <sub>urine</sub> : 2- 30 ng/mL	-	[118]

Targeted compounds	Matrices	Sample pretreatment	Analytical performances	Studied Concentration (ng/mL)	Ref
<b>URINE</b>					
<b>13 US-EPA PAHs</b>	Urine (0.6 mL)	HS-SPME	R <sub>urine</sub> : 83 - 116% RSD <sub>urine</sub> : 3.2 - 32.9% LOQ <sub>urine</sub> : 2.28 - 22.8 ng/L	-	[119]
<b>2 US-EPA PAHs</b>	Urine (0.7 mL)	HS-SPME	RSD <sub>urine</sub> : 25 - 26% LOD <sub>urine</sub> : 0.40 ng/L	-	[120]
<b>BREAST MILK</b>					
<b>15 US-EPA PAHs</b>	Breast milk (5 mL)	LLE (n-hexane) + SPE (silica)	R <sub>BM</sub> : 81 - 126% EF <sub>BM</sub> : 5.1 - 7.9 RSD <sub>BM</sub> : < 15.4 % LOD <sub>BM</sub> : 0.012 - 0.025 ng/g milk	-	[90]
<b>3 PAHs of which 2 US-EPA PAHs:</b>	Breast milk (2 mL)	3 LLE (n-hexane) + SPE (silica)	-	-	[89]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Breast milk (1-3 g)	soxhlet extraction (acetone/DCM (1/1) + SPE (Florisil) + SEC (Bio-beads S-X3)	R <sub>BM</sub> : 66 - 94%	-	[96]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Breast milk (5 mL)	QuEACHERS	R <sub>BM</sub> : 74 - 97%	-	[115]
<b>14 US-EPA PAHs</b>	Breast milk (2 g)	Saponification + LLE (cyclohexane) + SPE (C18)	LOD <sub>BM</sub> : 0.02 - 0.04 ng/g fat	-	[93]
<b>13 US-EPA PAHs</b>	Breast milk (45 mL)	LLE (hexane) + 2 LLE (ACN/DCM, 3:1) + SPE (C18) + SPE (Florisil)	R <sub>BM</sub> : 75 - 133% EF <sub>BM</sub> : 337.5 to 598.5 RSD <sub>BM</sub> : 9 - 11% LOD <sub>BM</sub> : 0.02 - 0.04 ng/g fat	-	[94]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Breast milk (10 g)	LLE (CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH/NaCl) + 2 LLE (CHCl <sub>3</sub> ) + SEC (Bio-Beads ®S-X3)	R <sub>BM</sub> : 42 - 101% RSD <sub>BM</sub> : 7.6 - 19% LOQ <sub>BM</sub> : 0.011 - 0.032 ng/g milk	0.05-1 µg/Kg milk	[95]

Targeted compounds	Matrices	Sample pretreatment	Analytical performances	Studied Concentration (ng/mL)	Ref
<b>BREAST MILK</b>					
<b>24 regulated PAHs</b>	Breast milk (10 mL)	LLE (ethyl acetate) + SPE (silica)	R <sub>BM</sub> : 70 - 110% RSD <sub>BM</sub> : 13 - 30% EF <sub>BM</sub> : 28 to 44 LOQ <sub>BM</sub> : 0.03 - 0.1 ng/g lipid	0.03 - 0.3 ng/g lipid	[92]
<b>PLACENTA</b>					
<b>15 US-EPA PAHs</b>	Placenta (3 g)	soxhlet extraction (n-hexane/DCM) + 2 LLE (n-hexane)	R <sub>placenta</sub> : 71 - 99% EF <sub>placenta</sub> : 87.5 - 123.1 RSD <sub>placenta</sub> : < 10.5% LOD <sub>placenta</sub> : 0.01 - 0.05 ng/mL	-	[90]
<b>3 PAHs of which 2 US-EPA PAHs</b>	Placenta (10 g)	Homogenization in physiological saline solution + ethanol/2 N NaOH (9:1) + 3 LLE (n-hexane) + SPE (silica)	LOD <sub>placenta</sub> : 0.01 - 0.05 ng/mL	-	[89]
<b>5 US-EPA PAHs</b>	Placenta (0.5 g)	2 LLE (propan-2-ol) + SPE (C18)	R <sub>placenta</sub> : 88 - 99% RSD <sub>placenta</sub> : < 20% EF <sub>placenta</sub> : 0.88 - 1.1 LOD <sub>placenta</sub> : 0.18 - 4.33 ng/mL	8, 15, 30	[54]
<b>15 US-EPA PAHs</b>	Placenta (4-5 g)	soxhlet extraction (DCM) + SEC (Bio-beads S-X3) + SPE (silica-alumina (2:1))	R <sub>placenta</sub> : 77 - 113% RSD <sub>placenta</sub> : < 26% LOQ <sub>placenta</sub> : 3-64 ng/g lipid	-	[91]
<b>13 US-EPA PAHs</b>	Placenta (5 g)	Homogenization in physiological saline solution + ethanol/ 2 N NaOH (9:1) + 3 LLE (DCM/n-hexane) + SPE	R <sub>placenta</sub> : 76 - 96% EF <sub>placenta</sub> : 15.2 - 19.2 LOD <sub>placenta</sub> : 0.02 - 0.08 ng/mL	10-20	[45]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Placenta (5-10 g)	Homogenization in physiological saline solution + ethanol/ 2 N NaOH (9:1) + 3 LLE (n-hexane) + SPE (C18)	R: 87 - 109% EF <sub>placenta</sub> : 43.5 - 55 LOD: 1 ng/mL	-	[125]
<b>HAIR</b>					
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Hair (50 mg)	Decontamination (hexane) + hydrolysis (NaOH + TMAH) + LLE (n-hexane)	R <sub>hair</sub> : 41 - 90% LOD <sub>Hair</sub> : 0.08 - 1.2 ng/mL	70-350 pg/mg	[121]

Targeted compounds	Matrices	Sample pretreatment	Analytical performances	Studied Concentration (ng/mL)	Ref
<b>HAIR</b>					
<b>15 US-EPA PAHs</b>	Hair (10 mg)	Decontamination (hexane) + hydrolysis (2.5 M NaOH, 2h) + in tube SPME	R <sub>hair</sub> : 70.1 – 113.3% SD <sub>hair</sub> : < 7% LOQ <sub>Hair</sub> : 1.7 - 96 pg/mg	0.05-0.5	[122]
<b>15 US-EPA PAHs</b>	Hair (25 mg)	Decontamination (triton X, hexane/DCM, 3/2, v/v) + hydrolysis (NaOH + TMAH) + LLE (hexane/DCM, 3/2, v/v)	R <sub>hair</sub> : 80 – 110%	0.8 ng/mg	[123]
<b>16 US-EPA PAHs</b>	Hair (2-3 g)	Sohxhlet (Acetone/n-hexane)	-	-	[124]

ACN: Acetonitrile, BM: Breast milk, DCM: Dichloromethane, EF: Enrichment Factor, DI-SPME: Direct Immersion-Solid Phase MicroExtraction, DMSO: Dimethylsulfoxide; HS-SPME: HeadSpace-Solid Phase MicroExtraction, LOD: Limit of detection, LOQ: Limit of quantification, LLE: Liquid-liquid extraction, MeOH: methanol, MS: Maternal Serum, NaOH: sodium hydroxide, PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PBS: Phosphate Buffered Saline, PDMS: Polydimethylsiloxane, R: Recoveries, RSD: Relative Standard Deviation, SEC: Size Exclusion Chromatography, SPE: Solid phase extraction, SPME: Solid Phase MicroExtraction, TMAH : Tetramethylammonium hydroxide, UCS: Umbilical Cord Serum, QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction

## II.4. Conclusion

Following the state-of-the-art made on the PAH analysis in human biological samples, a discussion can be opened. First, in some papers, it is difficult to know if the study was carried out with whole blood or serum due to an abuse of language by the authors, whereas the sample preparation differs according to the matrix. As an example, it is important in whole blood to disrupt the interactions between PAHs and white blood cells.

Second, it is sometimes difficult or even impossible to compare the results of different studies. Indeed, different units are used to express the amount of PAHs: ng/g of lipids or mass/volume unit such as in  $\mu\text{g}/\text{L}$  and no explanations are given to justify this or that choice. It seems that authors using the PAH quantity as a function of the lipid quantity want to reduce the matrix effect since there is an inter-individual variability and also a variability related to the nature of the matrix as the rate of lipids, triglycerides, and cholesterol is not the same in maternal and umbilical cord blood [138].

Finally, until now, even if all the publications have a section about the method validation, unfortunately, some relevant analytical data are always missing. Indeed, no rigorous validation such as the study of the matrix effect and the determination of the accuracy profile was made. Moreover, a full validation must give the concentration ranges of the calibration curves, the number of levels and repetitions used, the inter- and intra-day repeatability, the limits of quantitation and/or detection, the yields of all the analytical treatment and the manner of proceeding to quantitate PAHs in real samples without contaminations. As an example, it is often difficult to know if the limits of detection and quantitation are instrumental (injection of a standard solution) or those of a spiked matrix. In addition, for the statistical processing, some authors attribute a value of  $1/2$  of the LOD when the recovered quantity is less than the LOD, which is quite surprising from a chemical analytical point of view.

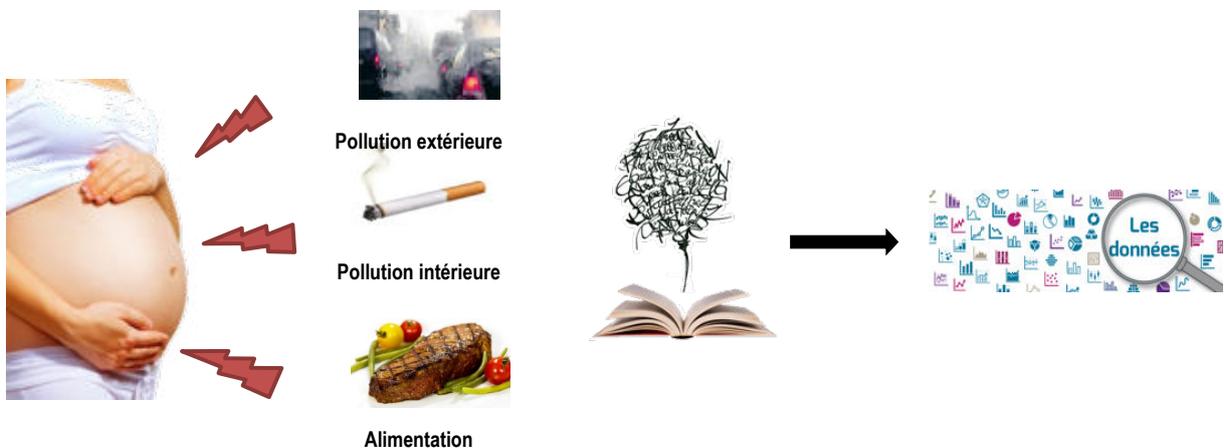
This review demonstrates that the monitoring of human PAH exposure, assessed by the analysis of PAHs, was reported since many years and was carried out in numerous human matrices, such as blood, plasma, serum, urine, breast milk, hair, and placenta. This

variety of complex samples and the large physico-chemical properties of the targeted analytes make these analyses very challenging, especially the sample pretreatment. It usually includes concentration and/or purification steps to extract and preconcentrate the target analytes from the sample matrix and is time-consuming and fastidious. The most used techniques are the LLE and/or SPE. These techniques led to good recoveries and low limits of detection/quantitation when they are given. However, their main drawback is the lack of information concerning the method validation, raising doubts about the proposed protocol and the obtained results.

Till today, the need to strengthen the knowledge about these pollutants is still increasing. As a matter of fact, the biomonitoring is incomplete because authors mainly focused on the quantitation of the 16 US EPA-PAHs. Indeed, only one paper dealt with 22 regulated PAHs in blood and plasma and another with all the 24 regulated PAHs in breast milk.

# Chapitre III

## DONNÉES SUR L'EXPOSITION MATERNELLE ET FOETALE AUX HAP PAR LEUR DOSAGE DANS DIFFÉRENTES MATRICES





### **Chapitre III. Données sur l'exposition maternelle et fœtale aux HAP par leur dosage dans différentes matrices**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la quantification des HAP non métabolisés reste le meilleur moyen de déterminer chez la femme enceinte et son fœtus les teneurs en HAP auxquelles ils sont exposés. Malheureusement, peu d'études ont été réalisées dans le cadre de cette problématique. D'après la littérature et à notre connaissance, seules 17 études portent sur la quantification des HAP au cours de la grossesse, dans différentes matrices. Ces études ont été principalement menées en Chine [90,91,96,105,107,109,125], mais aussi en Inde [45,89], en Arabie Saoudite [54], en Égypte [115], aux États-Unis [94,110], en République Tchèque [92] et en Italie [93,95]. À ce jour, il n'y a eu aucune étude réalisée en France. Dans ces travaux, les auteurs ont déterminé les HAP présents dans différentes matrices telles que le sang maternel, le sang de cordon ombilical [54,89,90,96,105,107,109,110,115], le placenta [45,54,89-91,125] ainsi que le lait maternel [89,90,93-96,115]. Cependant, les HAP ciblés étaient uniquement ceux réglementés par l'US-EPA excepté une étude où les 24 HAP réglementés ont été ciblés [92]. La partie qui suit porte sur le recensement des concentrations de HAP retrouvées pour chaque étude. Ainsi, cette étape de la recherche bibliographique est importante afin d'évaluer le niveau de sensibilité dont on aura besoin lors du développement des méthodes analytiques destinées à la quantification des HAP. Malgré le manque de données sur les performances analytiques souvent présent dans ces études et l'absence de validation, comme cela a été souligné dans le chapitre précédent, nous essayerons dans cette section de faire ressortir les conclusions communes suite aux différentes études réalisées, même si nous ne pouvons pas assurer la fiabilité des résultats avancés.

### III.1. Quantités retrouvées dans les différentes matrices

Le **Tableau 2** présente un récapitulatif des différentes études réalisées avec l'origine des échantillons prélevés, les HAP ciblés, le nombre d'échantillons analysés, les différentes matrices évaluées et les teneurs déterminées en HAP ainsi que les LODs/LOQs dans la matrice, quand ces dernières étaient disponibles. Dans la majorité de ces études, les auteurs exprimaient les concentrations de HAP dans le sérum ou le sang en ng/g de lipides. Afin de pouvoir comparer les études entre elles, les résultats obtenus ont été convertis en ng/mL, de façon arbitraire, grâce à une étude où il a été reporté que la teneur en lipides ( $n = 234$ ) chez la femme enceinte était en moyenne de 7,33 g/L de sérum [137]. Ainsi, afin d'avoir un ordre de grandeur des concentrations retrouvées, cette valeur a été utilisée pour le sang et le sérum maternel et de cordon ombilical, pour toutes les études dont les résultats nécessitaient une conversion. Les résultats nécessitant une conversion sont marqués d'un astérisque dans le **Tableau 2**. En outre, les auteurs ont souvent exprimé les concentrations retrouvées dans leurs échantillons réels en moyenne avec un écart type. Cet écart type était souvent très important en raison de la dispersion des concentrations de HAP pouvant exister d'un individu à un autre ou de la différence de la concentration en lipides. Il nous a donc semblé plus judicieux de reporter la moyenne ainsi que la gamme et la médiane des concentrations mesurées pour chaque HAP dans chaque étude, lorsque ces informations étaient disponibles.

D'après ce tableau, concernant les concentrations mesurées dans le sérum ou le sang, dans la majorité des études, les HAP de faibles poids moléculaires (2 à 4 cycles), allant du NAPH au PYR, présentaient des teneurs plus élevées que le reste des HAP [90,90,107,109,110,125], en particulier le PHE [90,96,134], le NAPH [96,107,110] et le PYR [96,107]. En outre, les teneurs des HAP possédant 5 cycles ou plus mais appartenant uniquement à la liste US-EPA ont souvent été reportées comme inférieures aux LODs [45,54,96,107,110,115] ou les HAP ont été peu détectés [107,115]. Cependant dans certaines études, les teneurs de ces HAP étaient élevées, notamment pour le DahA [54,105,109], le BkF [54,105,109,134] et l'IcdP [105,125,134]. Enfin, pour la majorité de ces études, les concentrations moyennes de HAP retrouvées dans le sang ou le sérum maternel ainsi que celui de cordon ombilical sont du même ordre de grandeur. En effet, des concentrations moyennes comprises entre 0,1 et 6 ng/mL ont été mesurées, au sein de toutes ces études. Par ailleurs 3 études présentent des résultats légèrement différents.

Ainsi, dans l'étude réalisée par Yin *et al.*, suite au calcul, les concentrations moyennes mesurées dans le sérum de cordon semblent être plus faibles que celles de toutes les autres études d'un facteur 10 à 100 (comprises entre 0,002 et 0,7 ng/mL). Cependant, il est difficile de prendre en compte les concentrations mesurées dans cette étude car elles semblent toutes être inférieures à la LOD fournie (0,01-0,9 ng/mL). Il est donc possible que la valeur que nous avons choisie pour réaliser les conversions soient fausses et ne permettent pas de comparer cette étude avec les autres. Concernant cette dernière, il n'est pas clairement indiqué si c'est la LOD dans la matrice ou bien la LOD instrumentale sans étape d'enrichissement de l'extrait. En outre, dans l'étude réalisée par Guo *et al.*, les concentrations mesurées dans les sérums de cordons ombilicaux, notamment pour les HAP de haut poids moléculaire, étaient légèrement plus élevées que dans les autres études et pouvaient atteindre une moyenne de 40 ng/mL. Enfin, dans l'étude réalisée par Zhang *et al.*, il est difficile de comparer les résultats car seule la concentration moyenne de la somme des 15 HAP ciblés est fournie. Cependant, cette valeur est du même ordre de grandeur que celles (concentration moyenne de la somme des HAP) fournies dans les autres études [90,96,134].

D'après le **Tableau 2**, seules 6 études ont ciblé entre 2 et 16 HAP US-EPA dans le placenta. Il est souvent difficile de comparer les résultats d'une étude à une autre en raison des différentes unités utilisées : concentrations mesurées en µg/kg de tissus humide [54,125], en ng/mL [45,89] ou en ng/g de lipides [90,91]. Cependant, on note que les conclusions établies pour le sérum ou le sang sont applicables au placenta. Ainsi, les HAP de faibles poids moléculaires (NAPH au PYR) présentent les teneurs les plus élevées dans certaines études [45,90], notamment le PHE [45,90]. En outre, certains HAP de haut poids moléculaire (BaA et BghiP) n'ont pas été détectés dans l'étude réalisée par Singh *et al* [45]. Par ailleurs, pour certaines études, les HAP possédant 5 cycles (CHR, BbF et DahA) ou plus présentaient les concentrations les plus élevées dans les échantillons réels [89,125]. Comme évoqué précédemment pour le sang et le sérum, les résultats obtenus dans l'étude réalisée par Zhang *et al.* sont difficilement comparables avec les autres études. Concernant l'étude réalisée en Inde par Madhavan *et al.* il est également difficile de confronter les résultats obtenus aux autres études, étant donné le nombre réduit de HAP ciblés (CHR et BaP) [89]. Néanmoins, en se basant sur le nombre réduit d'études

réalisées avec cette matrice, des concentrations comprises entre 1 et 386 ng/g de lipides, entre 0,2 et 13,1 g/kg de tissus ou encore entre 9 et 374 ng/mL ont été obtenues.

Enfin, dans 9 études, les HAP ont été quantifiés dans le lait maternel. Les chercheurs ont également utilisé différentes unités afin d'exprimer les résultats obtenus, comme évoquées précédemment pour le placenta. On retrouve donc des concentrations exprimées en ng/g de lipides [90,92,94,96], en ng/mL [89] et également en µg/kg de lait [93,95,115]. Les HAP retrouvés avec les concentrations les plus élevées étaient les HAP de faible poids moléculaires tels que le NAPH [95,115], ACY [95,115] PHE [92,94,96]. Enfin, dans cette matrice, plusieurs études ont signalé des concentrations inférieures aux LODs pour les HAP suivants : BbF et BkF [94], BaP [94–96], DahA [94–96], BghiP [94–96] et IcdP [94–96,115]. Des concentrations moyennes comprises entre 0,1 et 45,1 µg/kg de lait et 1,3 et 786 ng/g de lipides ont été reportées. Les concentrations obtenues sont donc très variables d'une étude à une autre, rendant encore une fois compliqué l'estimation d'une fourchette de concentrations attendues.

Ainsi, quelle que soit la matrice, il semble que des résultats différents sont obtenus. En effet, dans certaines études les HAP de faible poids moléculaire se retrouvent aux concentrations les plus élevées alors que les HAP de haut poids moléculaire sont rarement quantifiables ou détectables alors que dans d'autres études ces derniers sont retrouvés à des concentrations élevées. Il est donc possible de se demander si cette différence est en lien avec l'origine de la pollution dans chaque étude ou bien un effet discriminant de la méthode analytique utilisée.

### **III.2. Aspect biologique et corrélations**

Toutes les études recensées dans le **Tableau 2** ont été réalisées avec des objectifs différents, afin de définir les risques d'une exposition aux HAP pendant la grossesse. Les auteurs ont pour cela essayé d'établir des corrélations entre les concentrations en HAP trouvées dans les différentes matrices et certaines observations. Ainsi, il est possible de regrouper ces études selon six grands axes. Cette section décrit pour chaque axe, le but et les conclusions établies par les auteurs.

### III.2.1. Exposition aux HAP et complications de grossesse

Deux équipes ont cherché à corrélérer une exposition aux HAP et certaines complications de grossesse.

Ainsi, l'étude menée par Singh *et al.* recense les concentrations de 13 HAP US-EPA dans 60 échantillons de tissus placentaires provenant de 31 accouchements prématurés et 29 accouchements à terme, afin d'établir une possible corrélation entre les concentrations de HAP et les accouchements prématurés [45]. Parmi ces HAP, seul le FLO et le BaA n'ont pas été détectés (cf **Tableau 2**). Les teneurs en BbF et FLT étaient significativement plus élevées dans les tissus placentaires issus d'accouchements prématurés. Ainsi il y a une possible corrélation entre des concentrations de HAP élevées dans les tissus placentaires et les accouchements prématurés.

En outre, Dong *et al.* ont cherché à examiner, pour la première fois, la répartition des HAP dans des échantillons appariés de sang maternel, de placenta et de sang de cordon ombilical et étudier une possible relation avec des complications de grossesse [125]. Les 16 HAP US-EPA ont été ciblés dans 64 triplets d'échantillons collectés en Chine dont 18 provenaient de femmes enceintes en bonne santé et 46 de patientes présentant des complications de grossesse. Les HAP prédominants chez ces femmes enceintes étaient des composés de masse moléculaire élevée. Dans le groupe témoin, la quantité totale des HAP de haut poids moléculaire était significativement plus élevée dans le sang maternel que dans le sang du cordon ombilical, ce qui suggère que le placenta peut réduire le transfert des HAP chez les femmes enceintes en bonne santé. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé pour les HAP de faible poids moléculaire ou dans le groupe de patientes présentant des complications de grossesse. De plus, dans le groupe témoin, la concentration de la somme des 16 HAP dans le placenta était supérieure à celle dans le sang maternel et le sang du cordon ombilical. Les auteurs ont donc conclu que la diminution du transfert des HAP de la mère au fœtus peut résulter en partie de l'accumulation des HAP dans le placenta. Cependant, il est difficile d'évaluer la qualité des résultats fournis dans cette étude. En effet, les concentrations mesurées pour certains HAP (cf **Tableau 2**) sont parfois inférieures à la LOD fournie, même s'il n'est pas clairement indiqué si cette LOD correspond à la LOD instrumentale (injection d'un standard) ou à la LOD dans la matrice (prise en compte du traitement de l'échantillon).

### III.2.2. Exposition aux HAP et nouveau-né

L'influence de l'exposition aux HAP sur différents paramètres du nouveau-né mesurés à la naissance a été évaluée dans 3 études.

Ainsi, Al-Saleh *et al.* ont recherché 5 HAP (BaA, CHR, BbF, BaP et DahA) dans le sérum maternel, le sérum de sang de cordon et le placenta [54]. Le but de cette étude était également de déterminer les dommages de l'ADN liés à cette exposition. De plus, le 1-hydroxypyrrène et le 8-OHdG ont été mesurés dans l'urine maternelle. Cette étude a été réalisée sur 103 échantillons. Les HAP recherchés n'ont pas été détectés dans le sang maternel ni dans le sang de cordon ombilical, mais dans le placenta (cf **Tableau 2**). Il a été démontré qu'il existait une corrélation entre une concentration élevée en BaP dans le placenta et une diminution du poids, et de l'épaisseur du placenta et également de la longueur du cordon ombilical. Enfin, il a été également démontré qu'il n'y avait aucune corrélation entre l'exposition aux HAP et les dommages de l'ADN. En outre, l'impact d'une exposition prénatale aux HAP sur le poids du nourrisson a également été étudié en recherchant 9 HAP dans 81 paires de sérum maternel et de cordon ombilical [109]. Cependant, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence.

Guo *et al.* ont eux évalué le risque de l'exposition prénatale aux HAP en mesurant 7 HAP dans des échantillons de sang de cordon provenant de Guiyu (n=103) mais aussi de Chaonan (n=80), 2 régions polluées en Chine [105]. Les auteurs ont noté que les concentrations dans les échantillons provenant de Guiyu étaient plus élevées que celles mesurées dans les échantillons de Chaonan (cf **Tableau 2**). Ils ont trouvé une corrélation entre la concentration en BaA et la taille du nouveau-né. En outre, une corrélation a aussi été mise en évidence entre la concentration de CHR et de BaP et l'âge gestationnel.

Par ailleurs, seule une étude a évalué les corrélations possibles entre l'exposition prénatale aux HAP et certains facteurs de croissances (IGF-1 et IGFBP-3). Les 16 HAP réglementés par l'US-EPA ainsi que les polybromodiphényléthers (PBDE) ont été recherchés dans des échantillons de sang de cordon provenant de Guiyu (n= 101) et de Chaon (n=53) [134]. Les auteurs ont démontré qu'il existait une corrélation entre les concentrations sanguines en HAP et en PBDE et les expressions géniques d'IGF1 et IGFBP-3 chez les nouveau-nés.

### III.2.3. Exposition aux HAP et hormones de reproduction

L'impact de l'exposition environnementale aux HAP sur les hormones de reproduction a été étudié par Yin *et al.* [107]. Ainsi, ils ont dosé 16 HAP dans 120 échantillons de sérum de cordon en Chine. Cette étude a permis de mettre en évidence qu'il existait une corrélation négative entre l'exposition aux HAP et les concentrations d'œstradiol et l'hormone antimüllérienne dans les sérums de cordon tandis qu'il existait une corrélation positive entre cette exposition et la concentration de l'hormone folliculostimulante.

### III.2.4. Exposition aux HAP et teneur en HAP dans le lait maternel

Enfin, certains auteurs ont cherché à quantifier les HAP dans des échantillons de lait maternel.

En effet, Santonicola *et al.* ont recherché 14 HAP dans le lait maternel de femmes italiennes afin de comparer leurs teneurs avec celles de préparations pour nourrissons [93]. Les auteurs ont relevé que la concentration moyenne totale de HAP était significativement plus élevée dans les échantillons de lait maternel que dans les échantillons pour nourrissons.

Par ailleurs Kim *et al.* ont aussi quantifié 13 HAP dans le lait de 12 femmes non fumeuses vivant aux Etats-Unis. Parmi les 13 HAP, seuls le FLO, le PHE, le FLT et le PYR étaient détectables et quantifiables. Les doses journalières moyennes calculées par ingestion du lait par les nourrissons ont été comparées aux doses dues à l'inhalation de polluants atmosphériques. L'ingestion de lait représentait de 47,9 à 81,4% de la dose totale de HAP chez le nourrisson. Cependant, les doses quotidiennes moyennes totales calculées de PHE et de PYR provenant de l'ingestion et de l'inhalation combinées (12,2 à 110,3 ng/kg/jour, respectivement) étaient 3 fois plus faibles que les doses connues pour avoir des effets sur la santé.

En outre, Del Bubba *et al.* ont développé une méthode pour l'extraction simultanée des HAP et des matières grasses totales et leur détermination dans le lait maternel. Ils ont ainsi cherché 16 HAP US-EPA dans 10 échantillons. Aucune corrélation n'a été établie entre les concentrations de HAP et les concentrations des matières grasses.

Enfin, une étude menée en République Tchèque a évalué l'existence d'une relation entre la pollution atmosphérique dans les zones résidentielles et les concentrations de HAP dans le lait maternel humain [92]. Le protocole analytique développé par les auteurs a été appliqué à l'analyse de 324 échantillons prélevés sur des femmes non-fumeuses au cours de deux périodes d'échantillonnage (été et hiver) dans deux zones résidentielles de la République Tchèque présentant des niveaux de pollution atmosphériques différents. Sur 24 HAP ciblés, 17 ont été détectés (5MCHR, CPcdP, DalP, DaeP, DaiP et DahP non détectés). Le PHE, le FLO, le PYR et le FLT étaient les composés présents avec les concentrations les plus importantes dans les échantillons, dont les concentrations moyennes étaient respectivement 13,8; 1,8; 0,9; 2,0 ng/g lipides. Le PHE et le FLT étaient les composés les plus détectés. Enfin, au cours des deux périodes d'échantillonnage dans les deux zones, des concentrations plus élevées ont été mesurées dans les échantillons prélevés en hiver.

### **III.2.5. Exposition aux HAP et teneurs en HAP dans des échantillons appariés**

Dans plusieurs études, les auteurs ont quantifié les HAP dans des échantillons appariés afin de tenter de mettre en évidence leur passage transplacentaire : lait maternel/sérum maternel/sérum de cordon, placenta/ sérum maternel/ sérum de cordon, sang maternel/ lait maternel.

A partir d'échantillons provenant d'une population chinoise, Yu *et al.* ont recherché 15 HAP US-EPA dans le placenta, le lait maternel et le sang de cordon ombilical afin de comparer les teneurs en HAP retrouvées chez les femmes enceintes vis-à-vis des teneurs présentes dans leur alimentation mais également des teneurs inhalées [90]. Il a été mis en évidence qu'il existait des corrélations entre les concentrations de HAP de faible poids moléculaire dans le lait maternel, le placenta et le sang de cordon ombilical, confirmant ainsi un transfert sélectif des HAP de la mère au fœtus. Cependant, la dose interne de HAP n'était pas proportionnelle aux quantités introduites par l'apport alimentaire quotidien. En outre, les doses ingérées de HAP, comprises entre 3 et 102 ng/kg/jour, plus élevées que les doses inhalées, comprises entre 0,1 et 8,5 ng/kg/jour, sont de 3 à 4 fois inférieures à celles recommandées. Les auteurs en ont donc conclu qu'il est peu probable que ces doses présentent un risque pour la santé des femmes enceintes.

Ainsi, Tsang *et al* ont cherché à déterminer les concentrations de polluants organiques persistants dont les 16 HAP US-EPA dans le lait maternel (n=29), le sérum maternel (n=21) et le sérum de cordon ombilical (n=21) à Hong Kong [96]. Ainsi, les auteurs ont noté que les concentrations dans le lait maternel étaient plus élevées que celles du sérum maternel et de cordon ombilical.

Par ailleurs, dans le but d'évaluer le passage transplacentaire des HAP dans 285 échantillons appariés de sérum maternel (n=95), sérum de cordon ombilical (n=95) et de placenta (n=95), une étude à Shanghai a été réalisée [91]. Ainsi, 15 HAP US-EPA ont été dosés dans ces échantillons. Les rapports entre les concentrations de HAP dans le sérum du cordon ombilical et dans le sérum maternel (F/M) et les concentrations dans le placenta et dans le sérum maternel (P/M) des échantillons appariés ont été calculés pour caractériser le mécanisme de transfert de chaque HAP. La majorité des ratios F/M étaient proches de 1 suggérant un équilibre entre les deux compartiments. De plus, grâce aux différents ratios calculés, les auteurs ont montré que les HAP de faible poids moléculaire, et par conséquent avec des valeurs de Log P moins importantes, étaient plus susceptibles de passer de la mère au fœtus via le placenta.

En outre, Sexton *et al.* ont recherché 55 HAP dans le sérum de femmes enceintes vivant au Texas et dans le sérum de cordon ombilical [110]. Parmi ces HAP ciblés, nous nous sommes intéressés aux résultats obtenus pour les 16 HAP US-EPA. Cette étude met en évidence que les concentrations obtenues dans les échantillons de sang de cordon sont plus élevées que celles des échantillons de sang maternel.

Enfin, dans une étude menée en Égypte pour quantifier 16 HAP US-EPA dans des échantillons de sérum et de lait maternel, les résultats ont montré que les HAP de haut poids moléculaire (4-6 cycles) étaient les plus dominants dans tous les échantillons de sang. Concernant le lait maternel, les HAP les plus abondants étaient l'ACY, le DahA et l'ACE (cf. **Tableau 2**).

### Chapitre III.

**Tableau 2:** Les différentes données des études réalisées pour évaluer l'impact de l'exposition aux HAP pendant la grossesse

Pays	HAP ciblés	Matrices (nombre d'échantillons)	Teneurs des HAP retrouvés			LOD/LOQ	Réf
Chine, Pékin	<b>15 HAP US-EPA :</b> ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Lait maternel (n=40) Placenta (n=40) Sang cordon ombilical (n=40)	<b>Moyenne (min, médiane, max)</b>			LOD Lait maternel : 0,012-0,025 ng/g de lait  LOD Sang cordon : 0,012-0,025 ng/g de sang  LOD Placenta : 0,029-0,061 ng/g de tissu	[90]
			<b>Lait maternel</b> (ng/g de lipides) ACY : 5,3 (ND, 2,1, 29,4) ACE : 36,6 (ND, 25,0, 143) FLO : 53,5 (ND, 31,4, 252) PHE : 13,3 (ND, 85,7, 591) ANT : 14,4 (2,3, 9,4, 84,6) FLT : 50,9 (6,91, 35,5, 212) PYR : 36,5 (4,93, 28,4, 151) BaA : 4,0 (ND, 3,2, 17,5) CHR : 7,4 (ND, 5,1, 58,1) BbF : 20,5 (ND, 12,2, 84,6) BkF : 8,6 (ND, 3,9, 35,3) BaP : 1,8 (ND, 1,5, 8,13) DahA : 6,4 (ND, 2,3, 87,0) BghiP : 1,26 (ND, 0,5, 5,09) IcdP : 2,5 (ND, 0,7, 19,3) <b>Σ15HAP : 278 (47,2, 278, 1668)</b>	<b>Placenta</b> (ng/g de lipides) ACY : 70,4 (10, 73,6, 165) ACE : 22,5 (ND, 26,0, 67,5) FLO : 170 (62,7, 166, 370) PHE : 336 (136, 291, 657) ANT : 23,4 (ND, 17,6, 100) FLT : 106 (49,6, 100, 249) PYR : 67,9 (ND, 68,8, 141) BaA : 16,9 (1,0, 17,1, 47,7) CHR : 25,1 (ND, 22,2, 82,8) BbF : 24,2 (1,3, 22,0, 50,2) BkF : 9,0 (ND, 7,4, 23,1) BaP : 6,9 (ND, 4,2, 28,3) DahA : 8,4 (0,8, 2,3, 50,7) BghiP : 2,7 (ND, 2,8, 6,0) IcdP : 1,0 (ND, 0,6, 3,8) <b>Σ15HAP : 890 (329, 819, 1780)</b>	<b>Sang de cordon ombilical</b> (ng/mL *) ACY : 1,2 (ND, 0,6, 5,0) ACE : 0,6 (ND, 0,4, 3,1) FLO : 2,7 (ND, 1,6, 12,8) PHE : 5,6 (ND, 3,4, 22,3) ANT : 0,9 (0,04, 0,6, 2,9) FLT : 2,1 (ND, 1,0, 8,6) PYR : 1,7 (0,1, 0,8, 8,7) BaA : 0,5 (ND, 0,2, 4,0) CHR : 0,9 (ND, 0,5, 5,4) BbF : 1,6 (ND, 0,05, 14,1) BkF : 0,6 (ND, ND, 5,8) BaP : 0,1 (ND, ND, 1,5) DahA : 0,1 (ND, ND, 1,7) BghiP : 0,08 (ND, ND, 0,9) IcdP : 0,04 (ND, ND, 0,8) <b>Σ15HAP : 18,7 (0,6, 10,0, 70,5)</b>		
Chine	<b>9 HAP US-EPA :</b> ANT, FLT, PYR, BaA, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP	Sérum maternel (n=80) Sérum de cordon ombilical (n=80)	<b>Moyenne géométrique (médiane, max)</b>			LOD sang maternel : 0,05-0,10 ng/ml	[109]
			<b>Sang maternel</b> (ng/ml *) ANT : 0,5 (0,6, 6,5) FLT : 0,2 (ND, 6,5) PYR : 0,2 (ND, 3,6) BaA : 0,2 (ND, 4,5) BbF : 0,1 (ND, 7,4) BkF : 0,2 (0,2, 2,9) BaP : 0,2 (ND, 1,5) DahA : 0,3 (ND, 2,9) BghiP : 0,1 (ND, 6,5)	<b>Sang de cordon ombilical</b> (ng/ml *) ANT : 0,4 (ND, 2,3) FLT : 0,5 (0,3, 9,5) PYR : 0,3 (ND, 4,1) BaA : 0,3 (ND, 1,0) BbF : 0,1 (ND, 4,1) BkF : 0,5 (ND, 1,5) BaP : 0,1 (ND, 0,7) DahA : 0,4 (ND, 3,6) BghiP : 0,2 (ND, 5,1)			
Chine	<b>7 HAP US-EPA :</b> BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, IcdP, DahA	Sang de cordon ombilical (n=183)	<b>Moyenne géométrique (25 th, 75 th)</b>			LOD sang cordon : 0,03-0,09 ng/ml	[105]
			<b>Sang de cordon ombilical</b> (Guiyu, ng/mL) BaA : 0,8 (0,1, 2,1) CHR : 1,6 (0,8, 2,5) BbF+BkF : 2,0 (28,5, 90,5) BaP : 2,1 (0,4, 7,2) DahA : 12,3 (7,4, 23,2) IcdP : 15,4 (4,4, 30,6) <b>Σ7HAP : 108,1 (70,8-189,0)</b>	<b>Sang de cordon ombilical</b> (Chaonan, ng/mL) BaA : 0,4 (0,1, 1,5) CHR : 1,1 (0,3, 2,9) BbF+BkF : 40,1 (20,2, 91,8) BaP : 1,6 (0,4, 2,9) DahA : 11,6 (6,4, 18,3) IcdP : 13,6 (6,2, 23,0) <b>Σ7HAP : 79,4 (54,8, 135,5)</b>			

Pays	HAP ciblés	Matrices (nombre d'échantillons)	Teneurs des HAP retrouvés		LOD/LOQ	Réf
Inde	<b>13 HAP US-EPA:</b> NAPH, ACY, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BkF, BbF, BaP, DahA, BaA, BghiP	Placenta (n=60)	<b>Moyenne ± écart-type</b>		LOD <sub>placenta</sub> : 0,01-0,04 ng/ml	[45]
			<b>Placenta (accouchement prématuré, ng/mL)</b> NAPH: 374,3 ± 75,9 ACY: 99,1 ± 46,7 FLO: ND PHE: 468,6 ± 105,4 ANT: 33,2 ± 11,2 FLT: 325,9 ± 45,1 PYR: 187,2 ± 84,9 BaA: ND BkF: 11,3 ± 7,2 BbF: 61,9 ± 12,4 BaP: 13,9 ± 7,1 DahA: 15,3 ± 11,3 BghiP: ND	<b>Placenta (accouchement à terme, ng/mL)</b> NAPH: 246,9 ± 47,6 ACY: 58,7 ± 42,5 FLO: ND PHE: 377,8 ± 79,5 ANT: 25,8 ± 8,1 FLT: 208,6 ± 21,9 PYR: 296,4 ± 91,6 BaA: ND BkF: 29,9 ± 22,3 BbF: 23,8 ± 7,0 BaP: 8,8 ± 5,8 DahA: 22,0 ± 17,1 BghiP: ND		
Chine	<b>16 HAP US-EPA:</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Sang de cordon ombilical (n=154)	<b>Médiane (25 th, 75 th)</b>		LOD <sub>serum fetal</sub> : 0,01-0,07 ng/g	[134].
			<b>Sang de cordon ombilical (Guiyu, ng/mL)</b> NAPH: 0,2 (0,2, 0,3) ACE: 0,3 (0,1, 0,8) ACY: 0,6 (0,3, 1,4) FLO: 0,2 (0,1, 0,3) ANT: 0,1 (0,02, 0,2) PHE: 2,2 (1,5, 3,5) FLT: 0,1 (0,04, 0,2) PYR: 0,1 (0,05, 0,2) BaA: 0,1 (0,03, 0,1) CHR: 0,1 (0,06, 0,3) BbF: 2,1 (1,5, 2,8) BkF: 1,8 (1,2, 2,5) BaP: 0,2 (0,1, 0,3) DahA: 0,02 (0,01, 0,04) IcdP: 3,9 (2,2, 6,94) BghiP: 1,7 (0,7, 3,1) <b>Σ16HAP: 14,4 (10,4, 19,2)</b>	<b>Sang de cordon ombilical (Chaon, ng/mL)</b> NAPH: 0,2 (0,16, 0,21) ACE: 0,1 (0,1, 0,3) ACY: 0,3 (0,2, 0,5) FLO: 0,2 (0,1, 0,3) ANT: 0,02 (0,01, 0,3) PHE: 1,5 (0,7, 2,2) FLT: 0,05 (0,03, 0,09) PYR: 0,04 (0,01, 0,2) BaA: 0,04 (0,02, 0,09) CHR: 0,12 (0,08, 0,16) BbF: 1,8 (1,3, 2,5) BkF: 1,5 (1,1, 2,4) BaP: 0,2 (0,08, 0,2) DahA: 0,02 (0,01, 0,03) IcdP: 3,9 (2,1, 5,6) BghiP: 1,6 (0,6, 2,9) <b>Σ16HAP: 10,1 (7,9, 13,4)</b>		

Pays	HAP ciblés	Matrices (nombre d'échantillons)	Teneurs des HAP retrouvés				LOD/LOQ	Réf
Arabie Saoudite	<b>5 HAP US-EPA :</b> BaA, CHR, BbF, BaP, DahA	Sérum maternel (n=1543) Sérum de cordon ombilical (n=1543) Placenta (n=1543)	<b>Moyenne (25 th, médiane, maximum)</b>				LOD placenta : 0,3-8,7 µg/Kg tissus LOD sang : 0,3-2,5 ng/ml	[54]
			<b>Sang maternel</b> BaA : ND CHR : ND BbF : ND BaP : ND DahA : ND	<b>Sang de cordon ombilical</b> BaA : ND CHR : ND BbF : ND BaP : ND DahA : ND	<b>Placenta (µg/Kg de tissus)</b> BaA: 0,2 (ND, ND, 3,8) CHR : 6,6 (ND, 5,7, 88,0) BbF: 13,1 (0,5, 0,8, 18880) BaP: 2,8 (ND, 0,113, 13454) DahA: 9,2 (ND, 0,2, 4066,0)			
Etats-Unis	<b>55 HAP dont 16 HAP US-EPA :</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Sang maternel (n=35) Sang de cordon ombilical (n=35)	<b>Moyenne géométrique ± écart-type géométrique</b>				LOD injection directe : 0,8-1,3 ng/ml ou 2 ng/mL	[110].
			<b>Sang maternel (ng/mL)</b> NAPH : 1,5 ± 1,3 ACE : 0 ± 3,5 ACY : ND FLO : 0,1 ± 4,1 ANT : 0 ± 3,1 PHE : 0,5 ± 2,4 FLT : 0,1 ± 3,3 PYR : 0,1 ± 3,3 BaA : ND CHR : ND BbF : ND BkF : ND BaP : ND DahA : ND IcdP : ND BghiP : ND	<b>Sang de cordon ombilical (ng/mL)</b> NAPH : 1,5 ± 1,6 ACE : 0 ± 3,1 ACY : ND FLO : 0,3 ± 1,9 ANT : 0,1 ± 2,9 PHE : 0,9 ± 3,1 FLT : 0,1 ± 2,1 PYR : 0,1 ± 2,6 BaA : ND CHR : ND BbF : ND BkF : ND BaP : ND DahA : ND IcdP : ND BghiP : ND				
Chine	<b>15 HAP US-EPA :</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Sérum maternel (n=95) Sérum de cordon ombilical (n=95) Placenta (n=95)	<b>Moyenne (médiane)</b>				LOD placenta : 3-64 ng/g lipides LOD sérum : 0,02-0,5 ng/ml	[91]
			<b>Sérum maternel (ng/mL*)</b> <b>Σ15HAP : 9,5 (8,9)</b>	<b>Sérum de cordon ombilical (ng/mL*)</b> <b>Σ15HAP : 8,4 (2,8)</b>	<b>Placenta (ng/g lipides)</b> <b>Σ15HAP : 673 (4,9)</b>			
Inde	<b>3 HAP dont 2 HAP US-EPA :</b> CHR, et BaP,	Sang maternel (n=24) Sang de cordon ombilical (n=24) Placenta (n=20) Lait maternel (n=20)	<b>Médiane (min, max)</b>				LOD Sérum, placenta, lait : 0,01-0,05 ng/ml	[89]
			<b>Sérum maternel (ng/mL)</b> CHR : 120 (5,730) BaP : 40 (2, 107)	<b>Sérum de cordon (ng/mL)</b> CHR : 950 (21,2830) BaP : 100 (5, 410)	<b>Placenta (ng/mL)</b> CHR : 70 (2, 421) BaP : 60 (0,5, 338)	<b>Lait maternel (ng/mL)</b> CHR : 90 (2, 250) BaP : 262 (41, 383)		

Pays	HAP ciblés	Matrices (nombre d'échantillons)	Teneurs des HAP retrouvés			LOD/LOQ	Réf
Chine	<b>15 HAP US-EPA :</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Sérum maternel (n=21) Sérum de cordon ombilical (n=21) Lait maternel (n=29)	<b>Moyenne (min, max)</b>			-	[96]
			<b>Sérum maternel</b> (ng/ml *) NAPH : 2,4 (1,1, 5,3) ACY : 0,3 (0,03, 1,7) ACE : 0,7 (0,2, 1,7) FLO : 1,1 (0,3, 4,1) ANT : 0,4 (0,07, 1,2) PHE : 1,1 (0,2, 2,6) FLT : 0,9 (0,3, 3,6) PYR : 1,1 (0,3, 4,9) BaA : 0,5 (ND, 1,2) CHR : 0,5 (ND, 1,7) BbF + BkF : 0,1 (ND, 0,3) BaP : ND DahA : ND IcdP : ND BghiP : ND <b>Σ16HAP : 10,7(ND, 5,3)</b>	<b>Sérum cordon ombilical</b> (ng/mL*) NAPH : 2,6 (1,3, 6,7) ACY : 0,2 (0,03, 0,6) ACE : 0,6 (0,08, 1,7) FLO : 0,7 (0,07, 1,7) ANT : 0,3 (0,06, 1,3) PHE : 1,4 (0,3, 3,3) FLT : 0,7 (0,2, 1,6) PYR : 0,7 (0,1, 3,2) BaA : 0,6 (ND, 1,2) CHR : 0,7 (ND, 2,6) BbF + BkF : 0,2 (ND, 1,2) BaP : ND DahA : ND IcdP : ND BghiP : ND <b>Σ16HAP : 8,5(ND, 6,7)</b>	<b>Lait maternel</b> (ng/g de lipides) NAPH : 786 (318, 1477) ACY : 60 (23, 124) ACE : 83 (33, 268) FLO : 90 (24, 454) PHE : 361 (149, 801) ANT : 58 (16, 201) FLT : 158 (44, 430) PYR : 187 (42, 501) BaA : 47 (ND, 140) CHR : 79 (ND, 233) BbF + BkF : 66 (ND, 240) BaP : ND DahA : ND BghiP : ND IcdP : ND, <b>Σ16HAP : 1981 (ND, 1477)</b>		
Chine	<b>16 HAP US-EPA :</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Sérum cordon ombilical (n=98)	<b>Médiane (25 th, 75 th)</b>			LOD : 0,01-0,9 ng/ml	[107]
			<b>Sérum cordon</b> (ng/mL*) NAPH : 0,23 (0,16, 0,22, 0,3) ACE : 0,01 (0,004, 0,007, 0,01) ACY : 0,002 (0,001, 0,002, 0,002) FLO : 0,02 (0,008, 0,01, 0,02) ANT : 0,04 (0,02, 0,04, 0,06) PHE : 0,06 (0,02, 0,04, 0,08) FLT : 0,1 (0,03, 0,07, 0,14) PYR : 0,71 (0,12, 0,52, 1,11) BaA : 0,05 (0,01, 0,03, 0,07) CHR : 0,07 (0,02, 0,04, 0,09) BbF : 0,04 (0,02, 0,04, 0,06) BkF : 0,02 (0,005, 0,014, 0,02) BaP : 0,08 (0,04, 0,08, 0,11) DahA : 0,03 (ND, 0,02, 0,03) IcdP : 0,05 (0,02, 0,04, 0,07) BghiP : 0,2 (0,06, 0,14, 0,4) <b>Σ16HAP : 1,5 (0,7, 1,20, 1,96)</b>				

Pays	HAP ciblés	Matrices (nombre d'échantillons)	Teneurs des HAP retrouvés	LOD/LOQ	Réf
Etats-Unis	<b>13 HAP US-EPA:</b> FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Lait maternel (n=12)	<p><b>Moyenne (min, médiane, max)</b></p> <p><b>Lait maternel (ng/g lipides)</b></p> <p>FLO: 3,3 (1,1, 3,0, 6,6)            ANT: ND            PHE :12,8 (6,3, 11,8, 22,7)            FLT: 1,8 (1,1, 1,6, 2,9)            PYR: 1,3 (0,7, 1,1, 3,0)            BaA: ND            CHR: ND            BbF: ND            BkF: ND            BaP: ND            DahA: ND            IcdP: ND            BghiP: ND</p>	LOD, <sup>lait:</sup> 0,02-0,04 ng/g lipides	[94]
Italie	<b>14 HAP US-EPA:</b> ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Lait maternel (n=14)	<p><b>Moyenne (min, max)</b></p> <p><b>Lait maternel (µg/Kg lait)</b></p> <p>ACE: 4,1 (ND, 30,9)            FLO: 3,4 (ND, 31,9)            ANT: 39,1 (ND, 89,6)            PHE: 10,0 (ND, 75,52)            FLT: 7,3 (ND, 73,4)            PYR: 24,5 (ND, 83,4)            BaA: 0,3 (ND, 1,8)            CHR: 0,8 (ND, 3,9)            BbF: 0,8 (ND, 3,0)            BkF: 6,3 (ND, 42,8)            BaP: 0,8 (ND, 1,8)            DahA: 4,4 (0,1, 19,1)            IcdP: 7,8 (ND, 50,5)            BghiP: 5,2 (ND, 37,2)  <b>Σ14HAP: 114,9 (40,9, 259,9)</b></p>	-	[93]

Pays	HAP ciblés	Matrices (nombre d'échantillons)	Teneurs des HAP retrouvés		LOD/LOQ	Réf
Italie	<b>16 HAP US-EPA:</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Lait maternel (n=10)	<b>Moyenne (min, max)</b>		LOQ lait : 0,01-0,03 µg/Kg lait	[95]
			<b>Lait maternel (µg/Kg lait)</b>			
			NAPH: 4,7 (ND, 8,9) ACE: 2,8 (ND, 5,9) ACY: 7,0 (ND, 14,2) FLO: 1,1 (ND, 5,4) ANT: 0,6 (ND, 5,0) PHE: 0,6 (ND, 1,8) FLT: 0.250 (ND, 1,3) PYR: 0,6 (ND, 5,0) BaA: 1,0 (ND, 4,5) CHR: ND BbF: 0.560 (ND, 4,2) BkF: 0,1 (ND, 1,0) BaP: ND DahA: ND IcdP: ND BghiP: ND			
Égypte	<b>16 HAP US-EPA:</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Lait maternel (n=44) Sérum (n=44)	<b>Moyenne (min, max)</b>		-	[115]
			<b>Lait maternel (µg/Kg lait)</b>	<b>Sang (ng/ml)</b>		
			NAPH: 22,1 (15,4, 28,8) ACE: 30,0 (20,2, 44,6) ACY: 45,1 (40,7, 49,5) FLO: 0,4 (0,05, 0,6) ANT: 3,0 (0,1, 8,8) PHE: 0,7 (0,002, 10,9) FLT: 1,5 (0,2, 3,2) PYR: ND BaA: 0,4 (0,004, 1,7) CHR: 0,1 (0,007, 0,3) BbF: 0,1 (0,0007, 0,26) BkF: 0,04 (0,008, 0,1) BaP: 7,9 (0,3, 15,4) DahA: 42,7 (17,9, 64,8) IcdP: ND BghiP: 0,3 <b>Σ16HAP: 154,3 (95,2, 229,2)</b>	NAPH: ND ACE: 7(1, 10), ACY: ND FLO: 143 (1, 954) ANT: ND PHE: ND FLT: 304 (3, 593) PYR: ND BaA: 0,4 (0,004, 1,7) CHR: 36 (36, 37) BbF: 309 (1, 1434) BaP: ND DahA: 407 (114, 579) BghiP: ND <b>Σ16HAP : 1120 (156,3, 3610)</b>		

Pays	HAP ciblés Chapitre III.	Matrices (nombre d'échantillons)	Teneurs des HAP retrouvés						LOD/LOQ	Réf
			Moyenne (min, médiane, max)							
Chine	<b>16 HAP US-EPA:</b> NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, IcdP, BghiP	Placenta (n=64) Sang maternel (n=64) Sang de cordon (n=64)	Sang maternel (ng/mL)		Sang cordon ombilical (ng/mL)		Placenta (ng/mL)		LOD : 1 ng/ml	[125]
			Contrôle	Cas d'étude	Contrôle	Cas d'étude	Contrôle	Cas d'étude		
			NAPH : 1,5 (0,1, 0,4, 6,4)	NAPH : 2,8 (0,1, 2,0, 19,2)	NAPH : 4,8 (0,07, 4,3, 16,4)	NAPH : 3,3 (0,1, 2,7, 9,7)	NAPH : 0,3 (0,04, 0,3, 1,8)	NAPH : 0,5 (0,03, 0,2, 2,9)		
			ACE : 0,1 (ND, 0,1, 0,4)	ACE : 0,1 (0,01, 0,2, 9,4)	ACE : 0,1 (0,02, 0,1, 0,3)	ACE : 0,3 (0,03, 0,1, 1,1)	ACE : 0,2 (ND, 0,04, 2,0)	ACE : 0,4 (ND, 0,02, 4,3)		
			ACY : 0,1 (ND, 0,03, 0,2)	ACY : 0,1 (ND, 0,07, 6,0)	ACY : 0,1 (0,01, 0,1, 0,4)	ACY : 0,2 (0,01, 0,07, 1,1)	ACY : 0,1 (ND, 0,01, 2,5)	ACY : 0,4 (ND, 0,01, 0,6)		
			FLO : 0,1 (ND, 0,1, 0,3)	FLO : 0,2 (ND, 0,2, 1,1)	FLO : 0,2 (ND, 0,2, 0,8)	FLO : 0,3 (0,03, 0,2, 1,8)	FLO : 0,1 (0,08, 0,04, 1,4)	FLO : 0,2 (ND, 0,03, 1,8)		
			ANT : 0,1 (ND, 0,03, 0,8)	ANT : 0,3 (0,01, 0,04, 10,1)	ANT : 0,5 (0,01, 0,3, 1,3)	ANT : 0,9 (0,01, 0,2, 5,6)	ANT : 0,1 (ND, 0,03, 0,6)	ANT : 0,2 (ND, 0,03, 1,8)		
			PHE : 0,1 (0,02, 0,1, 0,4)	PHE : 0,6 (0,02, 0,2, 3,2)	PHE : 0,2 (0,1, 0,1, 0,4)	PHE : 0,4 (0,07, 0,2, 2,2)	PHE : 0,7 (0,02, 0,2, 3,2)	PHE : 1,1 (0,04, 0,4, 5,7)		
			FLT : 1,2 (0,1, 0,2, 8,3)	FLT : 2,4 (0,1, 1,2, 7,5)	FLT : 2,6 (0,06, 0,2, 13,1)	FLT : 3,4 (0,03, 2,1, 13,1)	FLT : 0,4 (ND, 0,2, 2,2)	FLT : 0,6 (0,01, 0,1, 5,3)		
			PYR : 0,1 (ND, 0,04, 1,3)	PYR : 0,7 (ND, 0,2, 13,2)	PYR : 0,3 (ND, 0,2, 2,1)	PYR : 0,9 (ND, 0,2, 8,0)	PYR : 0,3 (ND, 0,06, 3,4)	PYR : 0,8 (ND, 0,05, 12,5)		
			BaA : 0,2 (ND, 0,1, 1,0)	BaA : 0,5 (ND, 0,3, 5,1)	BaA : 0,4 (0,02, 0,3, 1,3)	BaA : 0,7 (0,01, 0,5, 3,9)	BaA : 0,3 (ND, 0,01, 2,7)	BaA : 0,8 (ND, 0,09, 9,0)		
			CHR : 0,1 (ND, 0,1, 0,4)	CHR : 0,4 (ND, 0,1, 8,6)	CHR : 0,2 (ND, 0,2, 0,8)	CHR : 0,3 (ND, 0,2, 1,8)	CHR : 0,2 (ND, 0,05, 8,0)	CHR : 0,6 (ND, 0,05, 13,5)		
			BbF : 0,7 (0,04, 0,2, 4,2)	BbF : 1,7 (0,1, 1,0, 20,3)	BbF : 1,23 (0,08, 0,2, 3,1)	BbF : 1,5 (0,05, 0,9, 7,6)	BbF : 2,4 (0,03, 1,0, 11,5)	BbF : 1,3 (0,05, 0,3, 8,9)		
			BkF : 0,1 (0,01, 0,1, 0,5)	BkF : 0,6 (0,2, 0,2, 10,3)	BkF : 0,1 (0,01, 0,1, 0,7)	BkF : 0,2 (0,01, 0,1, 0,8)	BkF : 3,0 (ND, 0,3, 13,1)	BkF : 1,4 (ND, 0,1, 13,3)		
			BaP : 3,8 (0,03, 0,6, 16,8)	BaP : 3,4 (0,08, 2,1, 17,2)	BaP : 3,4 (0,05, 2,6, 10,2)	BaP : 4,0 (0,05, 2,6, 16,2)	BaP : 3,5 (0,2, 1,7, 12,4)	BaP : 1,3 (0,03, 0,3, 12,9)		
			DahA : 2,1 (0,1, 0,8, 9,5)	DahA : 4,0 (0,1, 3,1, 10,2)	DahA : 2,7 (0,1, 1,9, 7,7)	DahA : 4,1 (0,3, 2,7, 15,4)	DahA : 5,4 (0,1, 3,8, 16,3)	DahA : 3,4 (0,01, 2,9, 9,6)		
			IcdP : ND (0,04, 3,8, 18,2)	IcdP : ND (0,02, 1,4, 15,1)	IcdP : ND (0,03, 3,3, 12,9)	IcdP : ND (0,03, 2,4, 18,2)	IcdP : ND (ND, 3,3, 9,1)	IcdP : ND (ND, 0,4, 12,0)		
			<b>Σ16HAP : 16,0 (3,9, 15,1, 30,8)</b>	<b>Σ16HAP : 21,5 (1,1, 21,5, 40,4)</b>	<b>Σ16HAP : 20,7 (4,7, 17,9, 42,5)</b>	<b>Σ16HAP : 24,7 (8,0, 23,6, 46,3)</b>	<b>Σ16HAP : 20,9 (0,7, 20,4, 60,1)</b>	<b>Σ16HAP : 15,0 (0,4, 8,4, 62,1)</b>		

LOD : Limite de détection, LOQ : limite de quantification Max : maximum, min : minimum, ND : Non détecté, 25th : premier quartile, 75th : troisième quartile

### **III.3. Conclusion**

Dans ces différentes études, il est difficile de comparer les concentrations retrouvées. En effet, les unités ne sont pas toujours les mêmes et les méthodes mises en œuvre pour quantifier ces HAP sont différentes. Cependant, on peut tout de même tirer certaines conclusions. Tout d'abord, il semblerait que les HAP de faibles poids moléculaires possédant entre 2 à 4 cycles présentent souvent les concentrations les plus élevées dans les différentes matrices. Ainsi, le NAPH, le PHE et le PYR semblent être 3 HAP, retrouvés à des teneurs importantes, suite à une exposition à un cocktail de HAP. De plus, concernant les HAP de haut poids moléculaire, ces derniers sont souvent non détectés ou peu détectés dans les échantillons réels. Enfin, ces études ont tout de même mis en évidence un passage transplacentaire des HAP de la mère vers le fœtus étant donné que ces polluants sont bien détectés et quantifiés dans le sérum/sang maternel et le sérum/sang de cordon ainsi que dans le placenta. Enfin, l'inconvénient majeur concerne le nombre de HAP ciblés. En effet, comme évoqué précédemment, les auteurs se sont intéressés uniquement aux HAP réglementés par l'US-EPA sauf dans une seule étude où la quantification des 24 HAP réglementés dans le lait maternel a été réalisée [92]. A ce jour, il existe donc un réel manque de connaissances concernant le BcF, le CPcdP, le 5MCHR, le BjF, le DaIP, le DaeP, le DaiP et enfin le DahP. Par ailleurs, notons que les auteurs se sont également beaucoup concentrés sur les aspects biologiques et les corrélations potentielles entre les quantités de HAP détectées et les facteurs biologiques et/ou sociologiques décrivant peu les performances des méthodes analytiques mises en œuvre.



## Objectifs de la thèse

L'espèce humaine est inévitablement exposée à différents types de polluants, parmi lesquels la classe des HAP représente un véritable fléau de par leur toxicité et les conséquences sur la reproduction. Ainsi dans le Chapitre I, nous avons montré que différentes approches ont été adoptées dans les études épidémiologiques afin d'évaluer l'exposition maternelle et fœtale aux HAP. En effet, un grand nombre d'auteurs s'est intéressé à une mesure des HAP atmosphériques dans l'environnement maternel ou bien encore aux dosages des adduits du BaP avec l'ADN dans le sang du cordon ombilical, le sang maternel et le placenta. En revanche, peu d'études ont été menées concernant la quantification des HAP dans ces différentes matrices. De même, seuls les HAP réglementés par l'US-EPA ont été recherchés, mise à part une étude ciblant les 24 HAP réglementés dans des échantillons de lait maternel. A notre connaissance, le B<sub>j</sub>F, le 5-MCHR, le B<sub>c</sub>F, le CPcdP, le Da<sub>1</sub>P, le DaeP, le DaiP et le DahP n'ont jamais été ciblés dans le cadre de cette problématique. De plus, nous avons reporté que ces études ont souvent été menées dans des villes de pays fortement pollués tels que la Chine ou encore l'Inde. A ce jour, il n'y a donc aucune étude relative au suivi de l'exposition aux HAP pendant la grossesse par la quantification des 24 HAP réglementés dans des échantillons biologiques en France.

Le chapitre II a ensuite évalué les méthodes analytiques mises au point pour quantifier ces polluants dans des matrices biologiques humaines. Dans toutes ces études, le manque de données concernant les performances analytiques (facteurs d'enrichissement ou rendement d'extraction, LOD/LOQ dans la matrice, gamme de concentration étudiée ...) et leur validation, ainsi que les différentes unités utilisées (ng/g de lipides, µg/kg de tissus ou liquide, ng/mL), rendent délicates l'évaluation de la qualité et la comparaison des résultats reportés.

Ainsi, l'état de l'art réalisé au sein des Chapitres I à III a mis en évidence qu'il persiste encore un besoin sociétal important de quantifier le plus grand nombre possible de HAP dans des échantillons en lien avec la grossesse. En effet, il est nécessaire d'accroître les connaissances des effets de ces polluants sur la santé de la femme enceinte et de son fœtus. C'est pourquoi, dans le cadre d'une collaboration entre le LSABM

(Laboratoire de Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation, UMR 8231, CNRS) et le Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine, UMR S 1139, INSERM, une thèse a été mise en place.

L'objectif de cette thèse était donc, dans un premier temps, de développer deux méthodes de quantification et complémentaires pour l'analyse de 24 HAP différents (les 16 réglementés par l'US-EPA et les 16 réglementés par l'EFSA) dans le sérum maternel, le sérum de cordon ombilical et le placenta. Étant donné l'utilisation d'échantillons biologiques précieux, un autre point innovant était de développer des protocoles analytiques nécessitant des volumes réduits d'échantillons afin de pouvoir intégrer des cohortes épidémiologiques. Une part importante de ce projet de recherche a été consacrée à l'évaluation des performances analytiques des méthodes développées, ce qui est souvent absent dans la littérature. Cette partie analytique du projet a été réalisée au sein du LSABM. Ensuite, un autre objectif de cette thèse était l'étude des fonctions placentaires, notamment le passage des HAP de la mère vers le fœtus mais également l'impact des HAP sur la différenciation trophoblastique et les fonctions d'échange et hormonales placentaires. Cette dernière partie a été réalisée au sein du laboratoire L3PH et de la plateforme Placentech de la fondation PremUp.

---

## PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

---



**VALIDATION**



**Chapitre IV**  
DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE  
QUANTIFICATION DES 24 HAP  
RÉGLÉMENTES DANS LE SÉRUM MATERNEL ET LE  
SÉRUM DE CORDON OMBILICAL PAR LC-UV/FD



## **Chapitre IV. Développement d'une méthode de quantification des 24 HAP réglementés dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical par LC-UV/FD**

Ce chapitre, sous la forme d'un article, présente le développement d'une méthode analytique destinée à la quantification des 24 HAP réglementés dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical, par LC-UV/FD.

Ce travail visait à développer pour la première fois la détermination simultanée de ces 24 HAP à partir de faibles volumes (100 µL) de sérums, avec une préparation d'échantillon permettant de réduire autant que possible la quantité de solvants utilisés. La séparation et la quantification a été réalisée par LC-UV/FD, sur une colonne C18 polymérique, afin d'obtenir la meilleure résolution possible entre les isomères de HAP. Ensuite, différents paramètres régissant la procédure SPE ont été étudiés, avec une phase stationnaire de silice C18, afin d'optimiser les rendements d'extraction des 24 HAP appartenant à une gamme de polarité étendue (valeurs de log P comprises entre 3,3 et 7,7). Ainsi, la nature et la proportion du solvant organique ajouté dans l'échantillon, le volume et la nature du solvant d'élution ont été étudiées. L'utilisation d'un solvant aromatique a été proposée pour minimiser la perte des HAP les plus volatils au cours de l'étape d'évaporation. Enfin, pour rompre toutes les interactions entre les HAP et les protéines présentes dans les sérums, une étape de précipitation préalable au traitement SPE a été optimisée grâce à un plan d'expérience. Le protocole final conduit à des rendements d'extraction compris entre 27 et 57% et entre 34 et 69% pour tous les HAP dans les sérums de sang maternel et de sang de cordon ombilical respectivement, avec des écarts types inférieurs à 11%. Des limites de quantification comprises entre 0,2 et 3,1 µg/L pour les HAP fluorescents et entre 7,0 et 14,5 µg /L pour ACY et BjF (détection UV) dans les échantillons réels. Ces LOQs sont proches des concentrations attendues dans les échantillons biologiques.

# **Article 1: Development of an analytical method for the simultaneous quantitation of 24 regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in maternal and umbilical cord sera**

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, submitted in November 2018

Stéphanie Swiha<sup>1,2</sup>, Valérie Pichon<sup>1,3</sup>, Thierry Fournier<sup>2,4,5</sup>, Sophie Gil<sup>2,4,5</sup>, Nathalie Delaunay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Analytical and Bioanalytical Sciences and Miniaturization, UMR CBI 8231 CNRS – ESPCI Paris, PSL University, Paris, France

<sup>2</sup>INSERM U1139, Faculté de Pharmacie, Paris, France

<sup>3</sup>Sorbonne Université, Paris, France

<sup>4</sup>Université Paris Descartes, UMR-S 1139, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>5</sup>Fondation PremUP, Paris, France

Corresponding author: Nathalie Delaunay, [nathalie.delaunay@espci.fr](mailto:nathalie.delaunay@espci.fr)

Corresponding author institution: LSABM, UMR CBI 8231 CNRS – ESPCI Paris, PSL University, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 05, France.

## **IV.1. Abstract**

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons are mainly produced by human activities and contaminate air, soils, waters, and food. Pregnant women and their fetus, a highly fragile population, are exposed to these PAHs and subjected to possible serious health risks. Therefore, the PAH determination in maternal and umbilical cord sera is necessary but is challenging since they have a wide range of polarity and are present at trace level. This work aimed at developing for the first time the simultaneous determination of the 24 regulated PAHs from low volumes (100  $\mu$ L) of maternal and umbilical cord sera, with a sample pretreatment reducing as much as possible the amount of used solvents. The separation of the 24 PAHs by liquid chromatography coupled with diode array and fluorescence detections was first optimized. Concerning the sample pretreatment, the SPE protocol on C18-based sorbent was optimized by studying the effect of the nature and the proportion of the organic solvent added in the sample on extraction recoveries. The

effects of the washing and elution conditions on recoveries were next studied and the evaporation step carefully controlled in order to limit the loss of the most volatile PAHs. Then, to disrupt all the interactions between the PAHs and the proteins present in the sera, a precipitation step prior to the SPE treatment was optimized thanks to a design of experiments. The final sample handling procedure led to extraction yields between 27 and 57% and between 34 and 69% for all PAHs in sera from maternal and umbilical cord bloods, respectively, with standard deviation values inferior to 11%. Limits of quantitation between 0.2 to 3.1 µg/L for the fluorescent PAHs in spiked real samples were obtained, which are close to the expected concentrations in biological samples.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons; maternal serum; umbilical cord serum; solid phase extraction; liquid chromatography

## IV.2. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are persistent organic pollutants that are emitted naturally or produced by human activities, due to incomplete combustion or pyrolysis of organic materials (industries, road traffic, heating...) [141]. They are present in the environment (air, soil, waters...), but also in food, leading to a constant exposure of humans [142–144]. They are carcinogens and genotoxic substances. After entering the human body, due to their hydrophobic properties, PAHs are transported to all lipid-rich tissues. This is why a long term exposure may lead to their accumulation in adipose tissue, liver, and kidney [75,76]. They can undergo different metabolic transformations resulting to the formation of reactive electrophilic intermediates able to bind cellular macromolecules such as proteins and nucleic acids. It is now well established that these pollutants are a danger to human health. Indeed, short-term exposure to PAHs has been shown to cause impaired lung function in asthmatics and thrombotic effects in people with coronary heart disease. Long-term exposure increases the risk of a series of cancers (breast, skin, lung, bladder, and gastrointestinal). Moreover, an exposure during pregnancy can lead to fetal malformations, prematurity and even disorders in children and adults [1,48,145].

Therefore, 24 different PAHs are regulated: 16 by the United State Environmental Protection Agency (US-EPA) and 16 by the European Food Safety Authority (EFSA), 8 of them belonging to both regulations. The 24 regulated PAHs belong to a wide range of polarity as stated by Log P values reported in **Figure S 1- Annexe 1** thus rendering their determination in biological samples particularly difficult. Focusing on the determination of PAHs in blood, in most of the cases, only the US-EPA PAHs were targeted except Pleil and coworkers who quantitated also 6 EFSA PAHs [76]. Typical blood, plasma, and serum used volumes range from 1 to 12 mL, which are quite large values, limiting the access to epidemiological cohort samples. The most used technique for sample pretreatment consists in extracting the PAHs by liquid-liquid extraction (LLE), n-hexane being the most frequently used solvent [76,89,91,100,101,105]. However, other solvents were used such as cyclohexane [54], dichloromethane (DCM) [110], or mixtures of n-hexane/diethylether (1/1, v/v) [112,114] or DCM/n-hexane (1/1, v/v) [107]. One of the main LLE drawbacks is the large used solvent volumes, since they can reach 10 mL as an example [91,114].

Moreover, this method is time consuming as it involves several successive LLE steps, often 3, to improve the extraction yields [100–102,105,107,110,91]. Most of the time, the LLE steps were followed by Solid-Phase Extraction (SPE) using C18-bonded silica, silica or silica/alumina [8,89–91,102,103,107,110] to improve the clean-up of the sample extract by removing matrix interferences that could disturb the PAH quantitation.

SPE can also be used alone as an alternative approach to LLE to extract the PAHs from blood, plasma or serum prior to their chromatographic analysis [96,103,106,109,111]. It requires a lower volume of solvent and simple less-time consuming manipulations. Indeed, 1 [109][26] or 2 mL [96,106,111] of blood, plasma or serum were percolated on an apolar sorbent, C18-bonded silica when this information is given [96,103,111]. Elution was achieved with hexane-DCM (1/1) [88,103,106], acetonitrile-butylchloride (45/55) [111] or ethyl acetate [109]. The SPE step was followed by an analysis with either gas chromatography coupled to mass spectrometry [96,103,106,111] or liquid chromatography coupled to a fluorescence detection (LC-FD) [109]. Unfortunately, in some of these papers, several analytical data are missing, such as the nature of the SPE sorbent [109,111], the enrichment factors [96,111], the extraction yields in real samples [111] and the limits of quantitation (LOQs) in the biological matrices [96,111]. Nevertheless, these data are necessary to be sure that the presented results are consistent. In all these studies, between 7 and 16 PAHs were targeted and they only belong to the US-EPA list [96,103,106,109,111]. Concerning the detected concentrations of PAHs in blood, plasma or serum, they were most often normalized with lipid content and reported as ng/g lipid. A study demonstrated that the mean lipid content in 283 maternal sera was  $7.33 \pm 1.86$  g/L [137]. Using this value for the lipid content, it is therefore possible to convert the data reported in each study in the same unit and then to compare them, with the hypothesis that all the reported values are consistent.

The highest mean values were observed by Song et al. with up to 37  $\mu\text{g/L}$  of benzo[a]anthracene (BaA) in the blood of heavy-taste food consumers and a minimum mean value of 0.3  $\mu\text{g/L}$  of pyrene (PYR) in the blood of Chinese non-smokers [103]. Similar values, between 0.05 and 2.7  $\mu\text{g/L}$ , were determined for each of 13 US-EPA PAHs in blood plasma collected from Hong Kong residents [106]. These values are in accordance with the ones determined in sera of autopsied people in Tennessee, where the sum of the concentrations of 13 US-EPA PAHs varied between 0.1 and 12  $\mu\text{g/L}$  [111]. Focusing on

both maternal and cord sera, there are two Chinese studies reported values between 0.1 and 2.5  $\mu\text{g/L}$  for 11 of the 16 US-EPA PAHs (the 5 other US-EPA PAH concentrations were below the LOQs) [96] and between 0.1 and 9.5  $\mu\text{g/L}$  for the 9 targeted US-EPA PAHs [109]. This gives an idea of the PAH concentrations that one can expect in these kinds of samples.

Due to the above-mentioned PAH toxicity and the lack of consistent data of contamination level in the literature, especially for the PAHs regulated in food, there is still a great societal need to identify and quantify human PAH exposure thanks to their determination in biological tissues or fluids to increase knowledge of their health effects, especially on at-risk populations such as pregnant women and their fetus. Therefore, the objective of this study is to develop a simple and low solvent consuming sample preparation step able to extract simultaneously the 24 regulated PAHs from maternal and umbilical cord sera. One of the challenges of this work is to obtain the best possible sensitivity from low volumes of sera in order to access to precious samples from epidemiological cohorts. For this, a protocol involving protein precipitation, SPE, and evaporation-redissolution before PAH analysis was developed. The key parameters of each sample pretreatment step were optimized. At last, to highlight the potential of the developed method, the extraction yields and LOQs were determined in both real spiked maternal and umbilical cord sera.

### **IV.3. Materials and methods**

#### **IV.3.1. Chemicals**

HPLC grade methanol, acetonitrile (ACN), propan-2-ol, and tetrahydrofuran (THF) were supplied by Carlo Erba (Val de Reuil, France). High purity water was dispensed by a milli-Q purification system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). The PAH standards were supplied by Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France): acenaphthylene (ACY) 99%, cyclopenta[cd]pyrene (CPcdP) 99%, benzo[c]fluorene (BcF) 97%, benzo[j]fluorene (BjF) 99.7%, dibenzo[a,l]pyrene (DalP) 99.8%, dibenzo[a,e]pyrene (DaeP) 99.8%, dibenzo[a,h]pyrene (DahP) 99%, dibenzo[a,i]pyrene (DaiP) 99% at 10 mg/L in ACN and a standard mixture of the 16 US-EPA PAHs at 100 mg/L in ACN. A stock solution mixture containing 100  $\mu\text{g/L}$  of each PAH was prepared in ACN and stored at 4°C until further use. An aqueous solution containing 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) was purchased from Thermofisher Scientific (Villebon-Courtaboeuf,

France). A synthetic serum was prepared from Earle's balanced salt solution containing albumin at 25 g/L and spiked with a mixture of 16 representative PAHs at 4 µg/L for each PAH in ACN.

#### IV.3.2. Apparatus and analytical conditions

The LC- diode array detector (DAD)/FD analyses were performed using an Agilent 1200 series system (Agilent Technologies, Massy, France) that was controlled by the Chemstation software. The separation was performed on a Pursuit PAH column (100 x 2.1 mm, 3 µm, Agilent Technologies) maintained at 35°C with a column oven (Croco-cil, Interchim, Montluçon, France). Samples were analyzed using a linear gradient elution with water (A) and a mixture of MeOH/ACN (6/4, v/v) (B). The gradient started at 50% of B and increased to 90% of B in 27 min, held for 13 min, and increased to 100% of B in 1 min, held for 10 min, and finally returned to initial composition within 1 min and let 10 min to equilibrate the system. The flow-rate was set at 0.2 mL/min and the injection volume was 5 or 10 µL. ACY, CPcdP, B<sub>j</sub>F, and indeno[1,2,3-cd]pyrene (IcdP) were quantified by UV, at 230 nm for both ACY and CPcdP, 240 nm for B<sub>j</sub>F, and 300 nm for IcdP. For the other PAHs, a time program of the excitation and emission wavelengths was performed, and they were quantified with FD. The wavelengths are reported in **Table 5**.

#### IV.3.3. SPE procedure

The SPE cartridges were Hypersep (25 mg of trifunctional octadecyl non-end-capped silica, 40-63 µm, 60 Å, 520 m<sup>2</sup>/g, 21-23% carbon, ThermoFisher Scientific), Versaplate (25 mg of trifunctional octadecyl end-capped silica, 40 µm, 60 Å, 500 m<sup>2</sup>/g, 17.4% carbon, Agilent Technologies) and BondElut SPEC (30 mg of trifunctional octadecyl non-end-capped silica, 70 Å, 220 m<sup>2</sup>/g, 7% carbon, Agilent Technologies). The first SPE developments were carried out by percolating ultra-pure water spiked at 5 µg/L with PAHs on the Hypersep cartridges. Except when it is mentioned, the protocol was as follows: the cartridge was conditioned with 300 µL each of THF, MeOH, and H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v). After percolating 100 or 200 µL of a H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v) mixture spiked with PAHs, a washing step with 100 µL of H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v) was carried out and the cartridge was next dried. Finally, the PAHs were eluted with 300 µL of THF. The elution fraction was diluted with water to obtain a THF/ H<sub>2</sub>O mixture (1/1, v/v) before injection in LC-DAD/FD system or subjected to evaporation.

#### **IV.3.4. Optimization of the evaporation step**

To enrich the SPE elution fraction, the optimization of an evaporation step was carried out by evaporating 200  $\mu\text{L}$  of THF spiked with 5  $\mu\text{g/L}$  of 20 PAHs to dryness or partially when 10 or 40  $\mu\text{L}$  of an aromatic solvent (xylene, trimethylbenzene, or toluene) were added to THF. For both approaches, after the evaporation step, the extract was recovered with 35, 100 or 150  $\mu\text{L}$  of ACN before its injection in LC-DAD/FD (5  $\mu\text{L}$ ).

#### **IV.3.5. Optimization of the protein precipitation procedure with a design of experiment**

The optimization of the protein precipitation parameters was performed with a design of experiment (DOE). The DOE was constructed with two levels for the percentage of ACN and heating and three levels for the percentage of SDS. The DOE was realized with an Earle's balanced salt solution containing albumin at 25 g/L (synthetic serum) and spiked at 4  $\mu\text{g/L}$  with 16 PAHs (acenaphthene (ACE), fluorene (FLO), phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), fluoranthene (FLT), PYR, BcF, chrysene (CHR), 5-methylchrysene (5MCHR), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), dibenzo[a,h]anthracene (DahA), DalP, DaeP, and DahP) to prevent from wasting precious sera samples. For these experiments, only 16 PAHs among the 24 were selected in order to cover the whole range of hydrophobicity, except the less hydrophobic compounds, naphthalene (NAPH) and ACY because of their higher LOQs. All samples were introduced in 2 mL Protein Lobind tubes (Eppendorf, Montesson, France). The denaturation and the precipitation of the albumin were carried out by adding an aqueous solution containing 10% of SDS (w/v) to achieve a final concentration of 0.1 or 0.2%. Some samples were next heated at 60°C during 25 min. Then, different volumes of ACN were added to obtain a final content of 50 or 70% (v/v) and samples were vortexed. Finally, a centrifugation at 4500 rpm at 4°C during 30 min was carried out and the supernatants were collected. Before SPE, as the samples already contained 700  $\mu\text{L}$  of ACN, a dilution with water to achieve a final content of 50% of ACN in the sample was implemented. After conditioning the SPE cartridge, 400  $\mu\text{L}$  of the diluted supernatant were percolated. A washing step with 100  $\mu\text{L}$  of H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v) was done and the cartridge was dried. Finally, the PAHs were eluted with 300  $\mu\text{L}$  of THF and a partial evaporation with the addition of 40  $\mu\text{L}$  of toluene and a recovered volume of 35  $\mu\text{L}$  of ACN was performed before injection in LC-DAD/FD system (5  $\mu\text{L}$ ). The measured responses

were the PAH extraction recoveries. The data treatment was performed using JMP 10.0 (S.A.S Institute Inc, Cary, NC, USA) software.

### **IV.3.6. Extraction of PAHs from maternal and umbilical cord sera**

#### **IV.3.6.1. Sample collection and storage**

Biological samples were obtained following informed written patient consent and approval from our local ethics committee (CPP 2015-Mai-13909). Cord and maternal blood were collected with harmonized procedures from patients delivered in Obstetric Units of Paris' Hospitals. Sera were obtained after blood centrifugation at 3000 rpm during 15 min and stored at -20°C in Protein Lobind tubes.

#### **IV.3.6.2. Sera pretreatment procedure**

100 µL of maternal or umbilical cord serum were spiked at 10 µg/L with each PAH except at 20 µg L<sup>-1</sup> for CPcdP and IcdP. A solution containing 10% of SDS was next added to achieve a final concentration of 0.2% (w/v). Sample was vortexed and 233 µL of ACN were added. A centrifugation at 4500 rpm during 30 min at 4°C was carried out. 300 µL of supernatant were then collected and 120 µL of water were added to obtain a final content of 50% of ACN (v/v). 400 µL of this sample were percolated on SPE cartridge. A washing step with 100 µL of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), a drying and an elution with 300 µL of THF were implemented. 40 µL of toluene were added to the elution fraction that was next vortexed and evaporated. The final extract was suspended in 100 µL of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) before injection in LC-DAD/FD system (10 µL).

## **IV.4. Results and Discussions**

### **IV.4.1. Development of the LC-DAD/FD analysis**

To ensure a good quantitation of the 24 PAHs, the development of an analytical method was first required. An Agilent Pursuit PAH (100 x 2.1 mm, 3 µm) column containing a polymeric C18-bonded silica stationary phase was chosen instead of a classical monomeric one as it has a shape selectivity towards PAHs [29]. Considering the wide polarity range of the 24 targeted PAHs with log P values from 3.3 up to 7.7 (see **Figure S 1- Annexe 1**) [4,7,8,126], different temperatures (30 and 35°C), mobile phases (ACN and water, MeOH and water, MeOH plus ACN and water), and gradients were evaluated. The first separations were carried out at 30 and 35°C with a binary gradient with water and ACN. It started at 50% of ACN and increased to 80% in 34 min and to

100% in 20 min, and held for 20 min. This gradient led to a low resolution between DahA and DalP, the critical pair to resolve, with a value of 0.9 at 30°C (in UV at 220 nm), and no resolution at all at 35°C. Therefore, a ternary gradient with water, ACN, and MeOH was tested and successfully optimized (see **Figure S 2- Annexe 1**). It led to 24 fully resolved peaks in 54 min with the lowest resolution value of 1.2 in UV at 220 nm and 1.0 in FD. The FD detection schedule was optimized by studying the excitation and emission fluorescence spectra of each PAH. Nevertheless, some compromises were necessary as it is only possible to change the wavelengths when the time gap between two peaks is sufficient. **Table 5** presents the LOQ values (defined as the concentration level that gives a signal to noise ratio of 10) determined with the optimized fluorescence schedule. They ranged from 0.1 to 1.5 µg/L for an injection volume of 10 µL. It is worthwhile to notice that no values are given for 4 PAHs (ACY, CPcdP, BjF, and IcdP) in FD. Indeed, ACY and CPcdP do not fluoresce while BjF have a poor fluorescence. Concerning IcdP, its quantification in UV was preferred because the resolution was insufficient to change the excitation and emission wavelengths in order to better detect it in FD. The LOQs were also determined in UV, at the maximal absorption wavelength of each PAH (see **Table 5**), and are comprised between 0.7 and 15.9 µg/L. As expected, except ACY, CPcdP, BjF, IcdP and ANT, these LOQ values are significantly better in FD than in UV, by factors of 1.8 to 63. This is why FD was used for quantitation of all these PAHs. For ANT, LOQs in UV and FD are very close and FD was chosen in order to exploit its specificity for the analysis of real samples. It can also be noticed that the obtained LOQs for these standard solutions are close to the expected concentrations in sera already determined in literature thus indicating that the sample pretreatment method does not necessitate to provide a high enrichment factor. This should favor the possibility of using reduced sample volumes, which is often required by cohort leader.

**Table 5:** LOQs ( $S/N=10$ ) in  $\mu\text{g/L}$  obtained with fluorescence and UV detections and estimated by injecting 10  $\mu\text{L}$  of a solution of PAHs at 1, 5, and 20  $\mu\text{g/L}$  in ACN-water (1/1, v/v).

Compounds	$\lambda_{\text{UV}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}$ (nm)	LOQ <sub>FD</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ <sub>UV</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )
NAPH	220	269, 327	1.2	2.2
ACY	230	-	-	2.1
ACE	230	227, 315	0.5	2.3
FLO	260	227, 315	1.1	13.2
PHE	250	250, 364	0.4	1.5
ANT	250	250, 364	0.9	0.7
FLT	230	234, 454	0.9	4.8
PYR	240	237, 388	0.2	0.9
BcF	230	237, 388	0.3	8.0
CPcdP	230	-	-	6.8
BaA	275	265, 376	1.5	8.7
CHR	270	265, 376	0.1	6.3
5MCHR	270	265, 376	0.2	5.5
BjF	240	-	-	4.9
BbF	260	290, 440	0.3	4.6
BkF	240	290, 440	0.1	5.7
BaP	260	290, 440	0.2	4.5
DahA	295	292, 428	0.3	3.6
DalP	315	292, 428	0.4	6.7
BghiP	285	292, 428	0.3	15.9
IcdP	300	-	-	9.3
DaeP	310	280, 404	0.8	5.7
DaiP	240	390, 439	0.4	6.2
DahP	310	260, 456	0.4	2.0

#### IV.4.2. Development of the SPE procedure

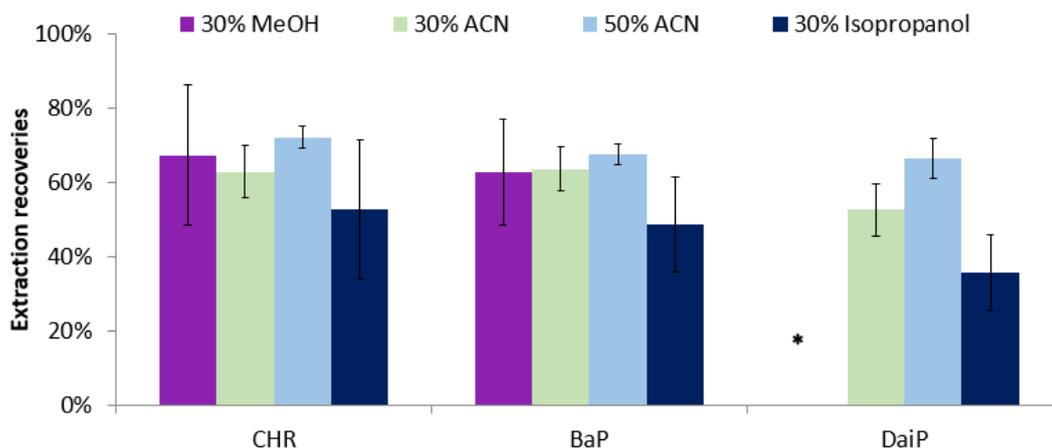
In order to determine PAHs at trace level in sera that are complex biological samples, a purification and extraction by SPE on C18-bonded silica-based sorbent was optimized in order to remove as much as possible matrix components.

##### IV.4.2.1. Choice of the percolation solvent

The solubility of some PAHs is very low in aqueous solutions, particularly for the high molecular weight PAHs. This can induce their adsorption on the vial or cartridge walls and consequently their loss and then the underestimation of their concentration in samples. The strategy to avoid their adsorption consists in adding some organic solvent in the sample. Moreover, the treatment of serum samples as envisaged in this study, generally required a first precipitation step usually carried out in organic solvent that will also prevent the risk of loss of PAHs by adsorption to proteins. Therefore, the critical parameters are the solvent nature and its proportion to add in the sample without reducing too much the breakthrough volume of the lowest molecular weight PAHs. Preliminary experiments were performed by percolating water containing 30% of MeOH, ACN or isopropanol and spiked with CHR, BaP, and DaiP, i.e. three PAHs selected to be representative of some of the most hydrophobic targeted ones. For the washing step, an ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) mixture was chosen to remove some potential interferents that could be present latter in real samples since it has a slightly higher eluent strength than the percolation media. A volume of 100 µL of this solution was introduced to limit the risk of reaching the breakthrough volume of the most polar PAHs. For the elution step, one has to select a solvent able to disrupt the interactions between the analytes and the sorbent with a volume as low as possible to either lead to the best enrichment factor or to limit the time of the potential subsequent evaporation step. In literature, mixtures of hexane-DCM (1/1) [96,106] and ACN-butyl chloride (55/45) [111] or ethyl acetate [109] were used. We preferred to avoid the halogenated organic solvent and it is well-known that THF has an elution strength similar to that of ethyl acetate. Kiss and coworkers demonstrated that elution with THF or DCM gave similar extraction recoveries [146]. Therefore, THF was selected, with an elution volume of 300 µL. **Figure 12** shows the resulting average extraction recoveries obtained with this SPE protocol, percolating 100 µL of hydro-organic mixtures (7/3, v/v) spiked at 5 µg/L with the three PAHs on 25 mg of a C18-bonded silica (Hypersep). It appears that the DaiP concentration in the elution fraction was below the LOQ whereas it was not the case with ACN and isopropanol. MeOH appears as too polar to ensure the solubilization of this highly hydrophobic PAH (log P(DaiP) = 7.3), leading to its adsorption on the vial or cartridge walls. Therefore, MeOH was removed for the end of the study.

An ANOVA test ( $\alpha = 5\%$ ) demonstrated that the recoveries of the 3 PAHs obtained after percolating them in 30% of ACN or isopropanol were not significantly different.

Nevertheless, ACN led to lower standard deviation (SD) values than isopropanol and was thus preferred. Its proportion in the sample was next increased up to 50% to favor the PAH solubility, especially for the most hydrophobic ones. It appears in **Figure 12** that the obtained extraction recoveries did not significantly change for CHR and BaP (ANOVA test,  $\alpha = 5\%$ ), but increase for DaiP. Therefore, for the rest of the development of the SPE step, a content of 50% of ACN was added in the percolation media.



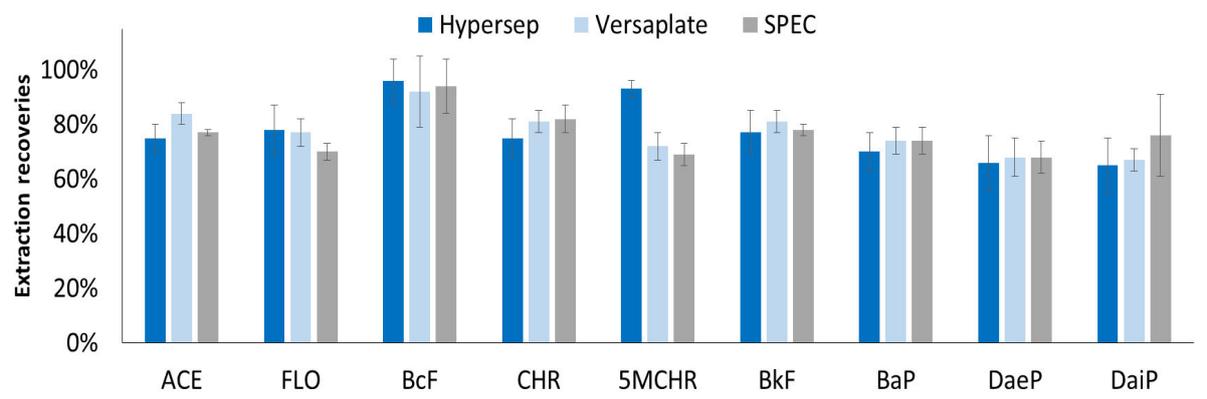
**Figure 12:** Effect of the nature and the volume of organic solvent (30% or 50%) introduced in spiked water on the extraction recoveries. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 100  $\mu\text{L}$  of water containing 30 or 50% of the organic studied solvent and spik with 5  $\mu\text{g/L}$  of each PAH, washing with 100  $\mu\text{L}$  of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), and elution with 300  $\mu\text{L}$  of THF, dilution of the THF extract with water (THF/H<sub>2</sub>O, v/v, 1/1) (n = 3). \* not quantifiable PAH

#### IV.4.2.2. Choice of the eluting solvent

As previously mentioned, the choice of the elution solvent is important. Therefore, at this stage of the study, another solvent with a higher elution strength ( $\epsilon_0$ ), ACN, was evaluated for the desorption of the retained PAHs on the cartridge. The experiments were performed with a spiked ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) mixture solution and the same washing condition described in section IV.3.3 (n= 3). It was observed that ACN did not allow the elution of DaiP and led to not significantly different extraction recoveries for CHR, and lower ones (47%) for BaP (ANOVA test,  $\alpha = 5\%$ ) compared to THF (68%). Therefore, THF was the best choice as eluting solvent and the results were in good agreements with the  $\epsilon_0$  values of ACN ( $\epsilon_0 = 3.1$ ) and THF ( $\epsilon_0 = 3.7$ ), which give a measure of their elution strength on a C18-based sorbent [147].

#### IV.4.2.3. Comparison of three different SPE sorbents

In order to select a C18-based sorbent favoring the PAH extraction and leading to the best recoveries, 3 SPE cartridges containing 25 or 30 mg of C18-bonded silica from different suppliers that mainly differ by their carbon content were evaluated (see section IV.3.3) by applying the optimized conditions. For these experiments, 9 PAHs among the 24 were selected in order to cover the whole range of hydrophobicity, except the less hydrophobic compounds, NAPH and ACY, because of their higher LOQ (see Table 1). After conditioning the SPE sorbents, 200  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (1/1, v/v) spiked with the 9 PAHs (5  $\mu\text{g}/\text{L}$  each) were percolated. After the washing with 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{ACN}/\text{water}$  (1/1) and drying steps, PAHs were eluted with 300  $\mu\text{L}$  of THF. Results are reported in **Figure 13**. High extraction recoveries between 65% and 98% were obtained. An ANOVA test ( $\alpha = 5\%$ ) demonstrated that the recoveries obtained on the 3 sorbents for each PAH were not significantly different. The single exception was for 5MCHR, which has a significantly higher extraction recovery with the Hypersep cartridge. Therefore, the Hypersep cartridge was preferred for the end of the study.



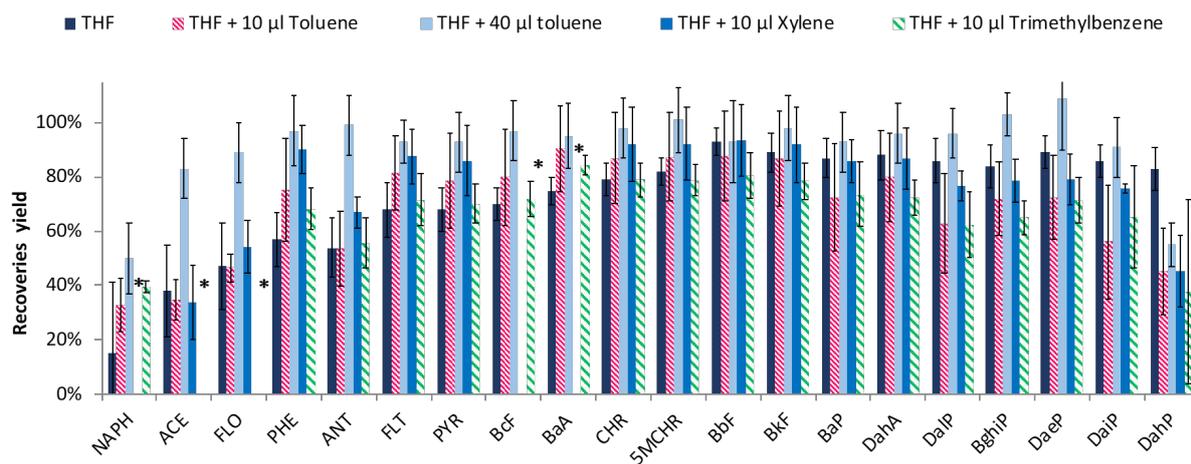
**Figure 13:** Comparison of the extraction recoveries obtained using three different SPE sorbents. SPE procedure: percolation of 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  sample (1/1, v/v) spiked with 5  $\mu\text{g}/\text{L}$  of each PAH, washing with 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1, v/v) and elution with 300  $\mu\text{L}$  of THF ( $n = 3$ ).

#### IV.4.2.4. Study of the evaporation step

At this stage of the study, the SPE elution fraction had never been evaporated before its LC analysis. The introduction of an evaporation step was next evaluated to improve the enrichment factor and the method sensitivity, but this step can also induce some loss of the most volatile PAHs. To evaluate this risk, 200  $\mu\text{L}$  of THF was spiked with 20 PAHs and was evaporated to dryness and further reconstituted in 50  $\mu\text{L}$  of ACN before

analysis. Results are reported in Figure 3. This evaporation step led to the partial loss of the 5 most volatile PAHs (NAPH, ACE, FLO, PHE, and ANT). Their recoveries ranged from 15% (NAPH) to 54% (ANT) with SD values up to 20%. For the other PAHs, the losses were lower, and the recoveries were higher than 70%. To improve the recoveries of the most volatile PAHs, a small volume of an aromatic solvent, having a low volatility and able to develop  $\pi$ - $\pi$  interactions with PAHs was added in the extract before starting the evaporation and the evaporation was stopped before a complete drying in order to trap all PAHs in this small residual volume of the aromatic solvent, this volume being controlled thanks to the shape of the used vials. For these experiments, 3 aromatic solvents were selected: toluene (boiling point (BP): 110.6°C, vapor pressure (VP): 0.29 KPa), xylene (BP: 144.4°C, VP: 0.8 KPa), and trimethylbenzene (BP: 175°C, VP: 0.18 KPa). First, 10  $\mu$ L of each aromatic solvent was added in 200  $\mu$ L of THF spiked at 5  $\mu$ g/L with each PAH. The evaporation was stopped before dryness (last drop) and the extract was diluted with 50  $\mu$ L of ACN before analysis. **Figure 14** presents the obtained results. With xylene, the quantitation of NAPH, BcF, and BaA was not possible because of the presence of co-eluting peaks in the chromatogram due to xylene and its impurities. There was a similar problem with trimethylbenzene, which prevents from the quantitation of ACE and FLO. Therefore, toluene was selected. Nevertheless, 10  $\mu$ L of toluene were not sufficient to ensure high recoveries for NAPH, ACE, FLO, and ANT. Then, the effect of the addition of 40  $\mu$ L of toluene was evaluated. In that case, the recoveries for the 5 most volatile PAHs were improved: about 50% for NAPH, 60% for DahP, and above 80% for all the other PAHs. Only DahP has a lower recovery than without the addition of an aromatic solvent. The addition of 40  $\mu$ L of toluene in the SPE extract before its evaporation was then selected to limit the loss of most of the PAHs.

Then, different volumes of ACN (50, 100, and 150  $\mu$ L) were tested for the dilution of the extracts after the evaporation of the SPE extract and before its injection in LC. According to the ANOVA test ( $\alpha = 5\%$ ), the extraction yields were similar for all the tested volumes except for DahP (data not shown) for which a volume of 150  $\mu$ L of ACN gave higher extraction recoveries (87%). Therefore, 150  $\mu$ L of ACN was selected for the optimization of the next step.

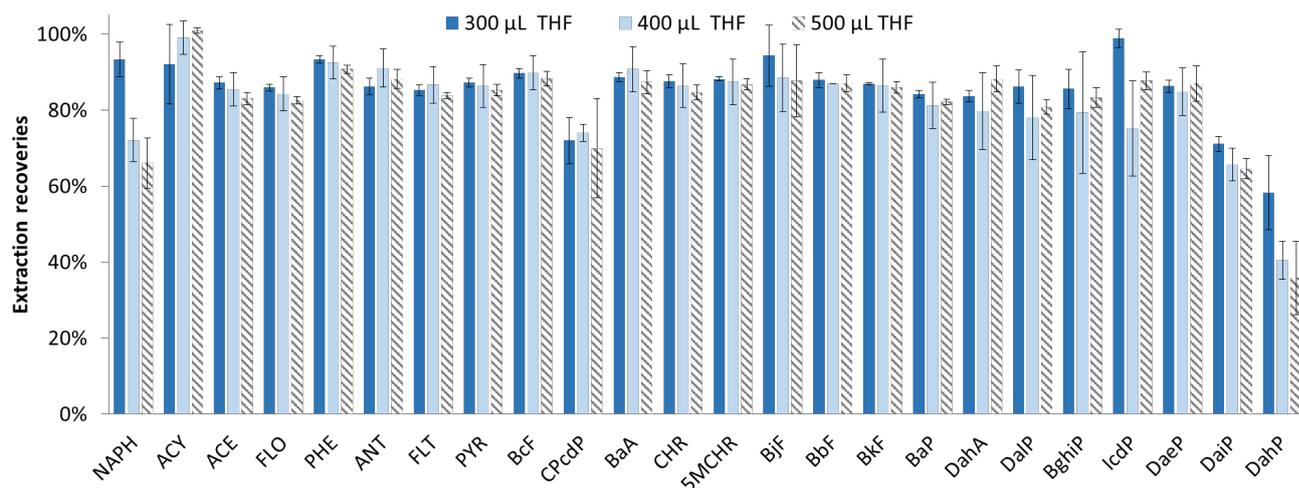


**Figure 14:** Effect of the nature and the volume of the aromatic solvent added in 200  $\mu\text{L}$  of THF and spiked with 5  $\mu\text{g/L}$  of each PAH on extraction recoveries. The extract was recovered in 50  $\mu\text{L}$  of ACN before analysis ( $n = 3$ ). \*not quantifiable PAHs

#### IV.4.2.5. Optimization of the elution volume

As described previously, 2 elution solvents were tested, ACN and THF, and THF was preferred. At this stage, 300  $\mu\text{L}$  of THF were used for the elution but it is important to ensure that this volume is sufficient to elute the most hydrophobic PAHs from the SPE cartridge. This is why an increase in the elution volume was studied. Thanks to the previous optimization of the evaporation step resulting in an improvement of the enrichment factor (EF), it was possible to do it keeping the same spiking level for the 24 PAHs (5  $\mu\text{g/L}$  each except ACY, CPcdP, BjF and IcdP at 50  $\mu\text{g/L}$ ). Three volumes of THF were tested: 300, 400 and 500  $\mu\text{L}$  and

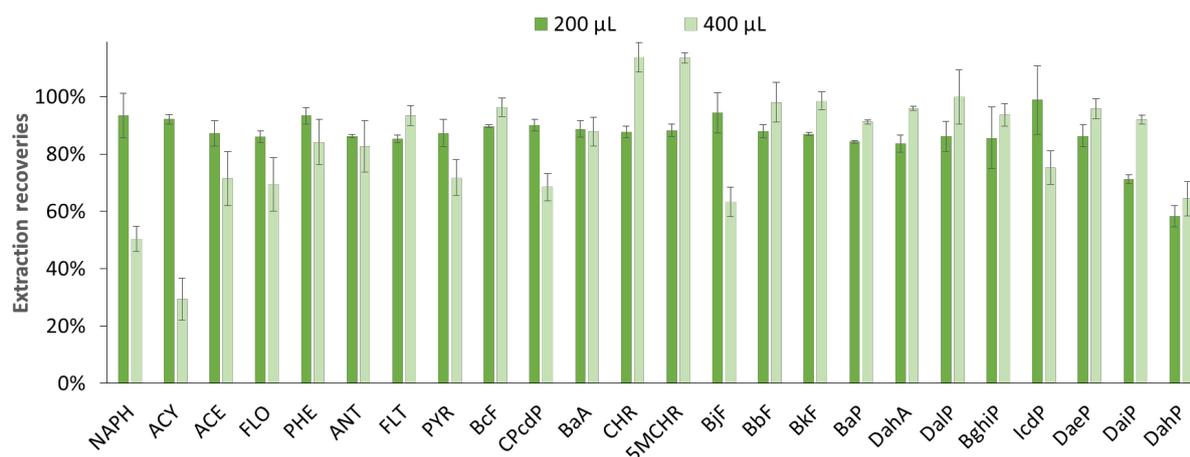
**Figure 15** presents the obtained recoveries. An ANOVA test ( $\alpha = 5\%$ ) demonstrated that they are not significantly different except for NAPH and IcdP. NAPH is the most polar and the most volatile PAH and its recovery decreases when the elution volume increases. This cannot be due to a problem of desorption from the SPE cartridge but rather to the subsequent evaporation step that takes a longer time, leading to an increasing loss of this volatile compound. For IcdP, there is a decrease in the recovery with the increase in the elution volume. This unexpected result for this highly hydrophobic compound may be also due to the evaporation step. Indeed, with a higher elution volume to evaporate, the compound may adsorb on the entire walls of the vials and may become more difficult to recover within a resuspension volume of 150  $\mu\text{L}$  of ACN even after vortexing. This is why a volume of 300  $\mu\text{L}$  of THF was finally selected.



**Figure 15:** Optimization of the SPE elution volume. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 200 µL of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) spiked with 5 µg/L of each PAH except ACY, CPcdP, BjF, and IcdP at 50 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), elution with THF, and partial evaporation (addition of 40 µL of toluene in the elution fraction). The extract was recovered with 150 µL of ACN before analysis (n = 3).

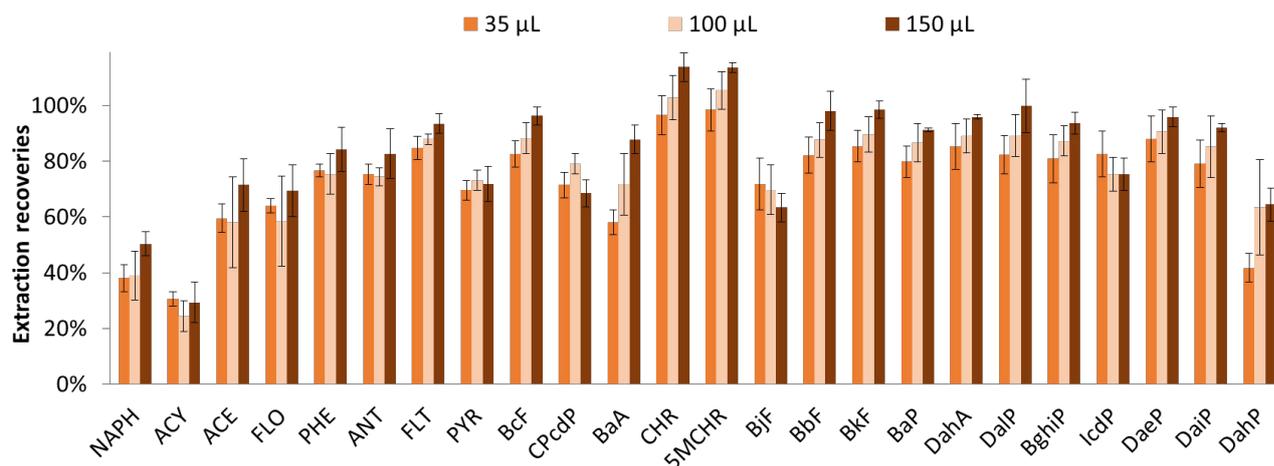
#### IV.4.2.6. Improvement of the enrichment factor

At this stage of the study, almost all the parameters of the pretreatment steps were optimized except the sample volume and the final volume of solvent to recover the extract after the evaporation just before analysis. Both are key parameters for the recoveries and enrichment factors of the SPE procedure, that have to be as high as possible to detect the PAHs present at trace levels in real samples. The loading volume was first increased from 200 to 400 µL. The obtained extraction recoveries are presented in **Figure 16**. For the first 4 less hydrophobic PAHs, a dramatic decrease was observed. Indeed, a loading volume of 400 µL followed by a washing volume of 100 µL may exceed their breakthrough volumes. For the other PAHs, the obtained extraction recoveries were quite similar and SD values were between 2 and 17% for both conditions. As the aim of this study was to quantify the 24 regulated PAHs at trace levels, a compromise had to be made and a loading volume of 400 µL was chosen to favor the enrichment factor.



**Figure 16:** Optimization of the SPE percolation volume. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 200 µL or 400 µL of ACN/H<sub>2</sub>O sample (1/1, v/v) spiked with 5 µg/L of each PAH except for ACY, CPcdP, BjF, and IcdP at 50 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), elution with 300 µL of THF and partial evaporation (addition of 40 µL of toluene in the elution fraction). The extract was recovered with 150 µL of ACN before analysis (n = 3).

The volume needed for recovering all the PAHs after the evaporation and before analysis was finally studied. For this, 3 volumes of ACN were tested: 35, 100, and 150 µL. According to the results presented in **Figure 17** and the ANOVA test ( $\alpha = 5\%$ ), the extraction recoveries were not significantly different. To improve LOQs, the injection volume of 5 µL used for all the injection achieved for the development of the SPE procedure was increased to 10 µL, which prevents from the use of 35 µL as volume use to dilute the final extract after the evaporation step. Therefore, a volume of 100 µL was selected. However, an injection volume of 10 µL of PAHs in ACN induced a peak deformation for the first eluted PAHs. Therefore, the 100 µL of ACN was replaced by the addition of 50 µL of ACN for resuspension followed by 50 µL of H<sub>2</sub>O. Finally, the optimized SPE protocol with spiked pure media, at this stage, was : percolation of 400 µL of H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v), washing with 100 µL of H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v), drying, elution with 300 µL of THF, addition of 40 µL of toluene in the elution fraction, partial evaporation (last drop), and dilution of the extract with 100 µL of H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v) before analysis.



**Figure 17:** Optimization of the resuspension volume after evaporation before LC analysis. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 400 µL of ACN/H<sub>2</sub>O sample (1/1, v/v) spiked with 5 µg/L of each PAH except for ACY, CPcdP, BjF, and IcdP at 50 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), elution with 300 µL of THF, and partial evaporation (addition

#### IV.4.3. Optimization of the protein precipitation procedure by a DOE

Previous results were obtained for spiked pure media. Nevertheless, the analysis of real sera is targeted. Before the SPE extraction of the PAHs, it is necessary to proceed first to the precipitation of the proteins contained in the sera. The traditional approach involving the addition of an organic solvent, as previously mentioned, but also of a surfactant, the addition of ACN and SDS, was studied in detail [148–151]. Indeed, this step had to be optimized to minimize PAHs losses that may occur due to their potential interactions with the serum proteins. The percentage of ACN, the SDS concentration, and temperature may affect these interactions. A DOE-based approach was selected to study the potential effects and interactions of these 3 factors and determine the optimum precipitation conditions.

According to literature and the conventional protocols used for protein precipitation, the low and high levels for the ACN content was fixed at 50 and 70% (v/v), respectively [148,149], the three levels of SDS were fixed at 0, 0.1, and 0.2% (v/w) [150], and the precipitation was carried out at 25°C (room temperature) for 2 min or at 60°C during 25 min [151]. **Table 6** presents the coded and non-coded values for each factor. The experiments were next carried out with 16 PAHs representative of the log P range of the 24 targeted ones (except for NAPH and ACY, the less hydrophobic compounds because of their higher LOQs) and, it is worthwhile to notice it, with a synthetic serum (Earle's

balanced salt solution containing albumin at 25 g/L). Indeed, to carry out this DOE with sera, 4.5 mL (300  $\mu$ L x 15 experiments) would have been necessary whereas sera are highly precious samples.

The considered responses were the recoveries of the 16 PAHs and these data are reported in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.-Annexe 1**. A polynomial model was used to identify the factors impacting the PAH recoveries during the protein precipitation step. Using a classical least-squares multiple linear regression, the model coefficients were estimated to evaluate factor effects. Coefficient significance was evaluated using a t-test comparing the coefficient estimate to its standard-deviation obtained from the repeated experiments and the results are presented in **Figure S 3-Annexe 1**. A factor or an interaction was considered as significant with a 5% risk of the first kind if the value of  $P > t$  was lower than 0.05. First, the change from 50 to 70% of ACN had no significant effect for all the studied PAHs except for FLO. It seems then that 50% of ACN are sufficient to disrupt the PAH-protein interactions. Similarly, the SDS content had no significant effect on the PAH recoveries. Considering temperature, a negative effect on PAH recoveries was observed for all the PAHs except DahP. Moreover, the interaction between SDS content and temperature had also a significant negative effect for 11 of the 16 studied PAHs. Finally, the interaction between the SDS content and ACN percentage had a negative significant effect for 7 PAHs.

**Table 6:** 2x2x3 factorial design with the different factors studied for their potential impact on the PAH recoveries during the protein precipitation (test with a synthetic serum: Earle's balanced salt solution containing albumin at 25 g L<sup>-1</sup> spiked with 16 PAHs at 4 µg/L each).

Order	Coded values			Experimental values		
	[ACN]	Precipitation conditions	[SDS]	[ACN] (% v/v)	Precipitation conditions	[SDS] (% w/v)
1	+1	+1	3	70%	25 min at 60°C	0.2
2	+1	+1	1	70%	25 min at 60°C	0
3	+1	+1	1	70%	25 min at 60°C	0
4	-1	-1	2	50%	2 min at 25°C	0.1
5	+1	-1	2	70%	2 min at 25°C	0.1
6	+1	-1	3	70%	2 min at 25°C	0.2
7	+1	-1	3	70%	2 min at 25°C	0.2
8	-1	-1	3	50%	2 min at 25°C	0.2
9	-1	+1	1	50%	25 min at 60°C	0
10	-1	+1	1	50%	25 min at 60°C	0
11	+1	-1	1	70%	2 min at 25°C	0
12	+1	+1	2	70%	25 min at 60°C	0.1
13	-1	+1	2	50%	25 min at 60°C	0.1
14	-1	+1	3	50%	25 min at 60°C	0.2
15	-1	-1	1	50%	2 min at 25°C	0

The Derringer's desirability function was next used to determine the precipitation conditions giving rise to the highest PAH recoveries. Each response was transformed on a scale between 0 (corresponding to the most undesirable value) and 1 (representing the value that most fulfilled the requirements). The value of each transformed response was called "desirability value". The global desirability was calculated by multiplying all the individual desirability values. Finally, this global desirability was maximized to determine the predicted optimum (see **Figure S 4-Annexe 1**): the coded values of the predicted optimum were (1, -1, 3), which correspond to 70% of ACN (v/v), 0.2% of SDS (w/v), and precipitation done at room temperature for 2 min. This optimum corresponded to one of the experimental points tested during the DOE, for which it appeared that the obtained

PAH recoveries are very close to the ones obtained with another experimental condition using the same content of ACN (70%) and no heating, but with only 0.1% of SDS. Therefore, both experimental conditions were tested again, but with the 24 PAHs at a spiking level of 10 µg/L. For the predicted optimum, extraction recoveries were between 28 and 82% with SD values lower than 16%, in agreement with the predicted recoveries, whereas for the other experimental condition, they were between 33% and 81% with SD values lower than 14%. An ANOVA test ( $\alpha = 5\%$ ) demonstrated that the extraction recoveries were not significantly different for both conditions (data not shown). Therefore, the predicted optimum by the DOE was preferred.

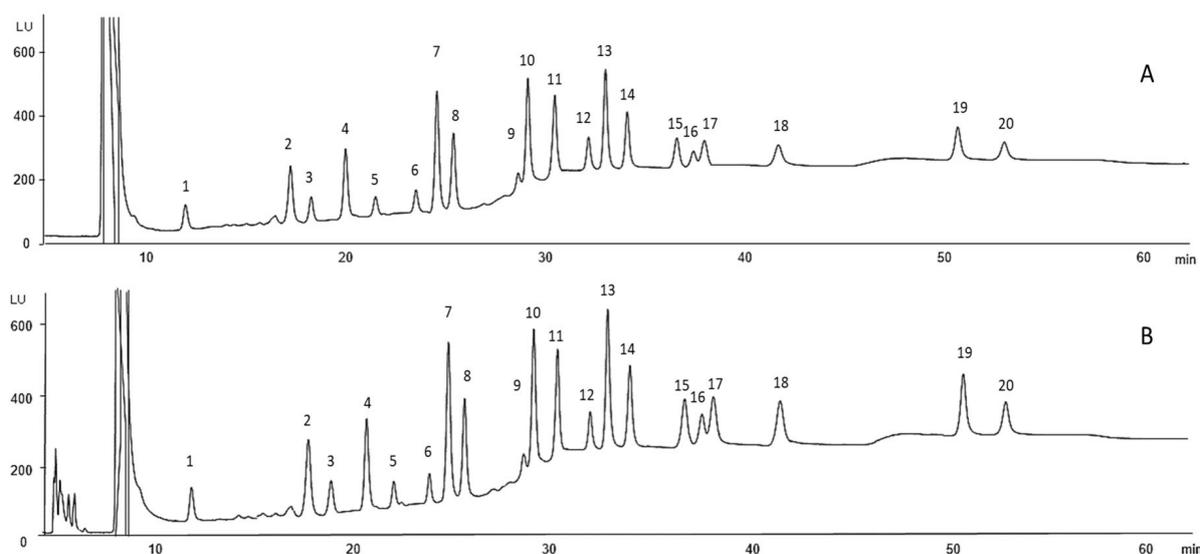
#### **IV.4.4. Extraction of the 24 regulated PAHs from maternal and umbilical sera**

After the optimization of the different steps of the sample handling with spiked pure media and a synthetic serum, the extraction efficiency of this procedure was evaluated in real biological fluids for the 24 PAHs by spiking pooled maternal and umbilical cord sera at 10 µg/L for each PAH except for CPcdP, B<sub>j</sub>F and IcdP at 20 µg/L. 100 µL of pooled maternal and sera were used for each experiment carried out in triplicate. The protein precipitation was made by adding 233 µL of ACN plus 0.2% SDS. 300 µL of the supernatant were taken and water was added to decrease the ACN proportion from 70 to 50%. 400 µL of this mixture were percolated through the SPE cartridge and were recovered after elution and evaporation in 100 µL of H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v) before analysis. **Figure 18** shows the resulting chromatograms and **Table 7** the calculated extraction recoveries.

It is worthwhile to notice that the pooled sera were also analyzed without spiking to evaluate the potential presence of endogenous PAHs and correct the resulting extraction recoveries, but no PAHs were detected in this pooled sample. Extraction recoveries were between 27 and 57% for maternal sera and between 34 and 69% for umbilical cord sera, with SD values lower than 11% thus highlighting the reliability of the developed method applied to complex samples. These recoveries are quite inferior to the ones obtained with spiked pure media (between 24 and 82%, **Table 7**), but for which no precipitation was involved. This may also result from a matrix effect. Moreover, the extraction recoveries for maternal sera are lower than those obtained with umbilical cord

sera, especially for BaA to DahP. Therefore, the matrix effect seems to be different for both kinds of sera. Unfortunately, it was not possible to quantitate CPcdP and IcdP, because some impurities co-eluted with them. This is why it is possible to conclude that the developed whole sample pretreatment led to good extraction recoveries for 22 of the 24 regulated PAHs.

The whole sample pretreatment led to ratio between the sample volume and the final extract volume of 0.95. Considering the extraction recoveries, enrichment factors ranged from 0.3 to 0.5 and from 0.3 to 0.7 for maternal and umbilical cord sera, respectively. This led to LOQs in sera between 0.2 and 3.1  $\mu\text{g/L}$  for the 20 fluorescent PAHs and between 7.0 and 14.5  $\mu\text{g/L}$  for the 2 other PAHs (calculation for a signal to noise ratio equal to 10). They are close to the expected concentrations in real samples [76,96,103,106,109–111,145]. The optimized sample handling, separation, and detection steps require a total analysis time of 1h40 and the SPE and analytical steps can be automated. After validation, it should allow the analysis of a large number of real samples.



**Figure 18:** LC/UV/FLD chromatograms of the extracted maternal (A) and umbilical cord (B) pooled sera spiked with 24 PAHs at 10  $\mu\text{g/L}$  except CPcdP and IcdP at 20  $\mu\text{g/L}$ . Other conditions: see section 2.2. 1, NAPH ; 2, ACE ; 3, FLO ; 4, PHE ; 5, ANT ; 6, FLT ; 7, PYR ; 8, BcF ; 9, BaA ; 10, CHR ; 11, 5MCHR ; 12, BbF ; 13, BkF ; 14, BaP ; 15, DahA ; 16, DalP ; 17, BghiP ; 18, DaeP ; 19, DaiP ; 20, DahP.

**Table 7** : Extraction recoveries and SD ( $n = 3$ ) of 24 PAHs in spiked ACN-H<sub>2</sub>O mixture, maternal and umbilical cord pooled sera. Precipitation step: 0.2 % of SDS and 70% of ACN. SPE (Hypersep cartridge): percolation of 400  $\mu$ L of spiked sample with 10  $\mu$ g/L of each PAH except for CPcdP, BjF and IcdP at 20  $\mu$ g/L, washing with 100  $\mu$ L of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), elution with 300  $\mu$ L of THF and partial evaporation (addition of 40  $\mu$ L of toluene in the elution fraction). The extract was further recovered with 100  $\mu$ L of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v). NQ: Non-quantifiable.

PAH	Spiked ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v)	SD (%)	Spiked maternal serum	SD (%)	Spiked umbilical cord serum	SD (%)
NAPH	27%	13%	46%	11%	47%	11%
ACY	24%	5%	31%	2%	34%	2%
ACE	35%	10%	40%	7%	48%	4%
FLO	38%	7%	40%	5%	48%	4%
PHE	47%	5%	45%	10%	51%	2%
ANT	51%	4%	39%	5%	53%	2%
FLT	64%	5%	52%	8%	62%	5%
PYR	66%	9%	57%	6%	68%	9%
BcF	62%	7%	53%	5%	64%	4%
CPcdP	64%	6%	NQ	-	NQ	-
BaA	55%	5%	51%	4%	68%	2%
CHR	67%	7%	55%	3%	69%	3%
5MCHR	71%	8%	51%	6%	64%	4%
BjF	71%	2%	41%	6%	60%	2%
BbF	68%	7%	51%	3%	69%	5%
BkF	69%	8%	51%	4%	67%	4%
BaP	68%	8%	48%	3%	65%	4%
DahA	74%	9%	46%	2%	68%	7%
DalP	70%	6%	33%	1%	66%	10%
BghiP	82%	8%	40%	1%	59%	3%
IcdP	75%	6%	NQ	-	NQ	-
DaeP	77%	9%	37%	2%	61%	4%
DaiP	72%	8%	28%	1%	54%	5%
DahP	67%	8%	27%	2%	47%	3%

## **IV.5. Conclusions**

The analysis of the 24 regulated PAHs by LC-DAD/FD was developed. Then, different parameters governing the SPE procedure were studied to optimize the extraction recoveries on C18 silica of the 24 PAHs belonging to a large range polarity (log P values between 3.3 and 7.7). The use of an aromatic solvent was proposed to minimize the loss of the most volatile PAHs during the evaporation step. A DOE was used to optimize the protein precipitation conditions. The performances of the whole sample pretreatment were determined for a reduced volume of 100  $\mu\text{L}$  of maternal sera and umbilical cord bloods. The LOQs obtained for both matrices were between 0.2 and 3.1  $\mu\text{g/L}$  for the fluorescent PAHs and between 7.0 and 14.5  $\mu\text{g/L}$  for ACY and BbF (UV detection). The next step will consist in validating this method, which will allow its use for the analysis of numerous real samples. The consistency of the resulting data will enable to carry out epidemiologic studies.

## **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the Région Ile-de-France and the DIM Analytics for their financial support.



## **Chapitre IV**

VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE QUANTIFICATION  
PAR LC-UV/FD DE 22 HAP  
DANS LE SÉRUM MATERNEL ET LE SÉRUM DE  
CORDON OMBILICAL



## **Chapitre V. Validation d'une méthode de quantification par LC-UV/FD de 22 HAP dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical**

Dans le chapitre précédent, une procédure analytique pour la quantification des 22 HAP réglementés dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical a été développée. Pour ce faire, une séparation des 24 HAP en LC/UV-FD a été optimisée sur une colonne de silice C18 polymérique. Ensuite, différents paramètres régissant la procédure SPE ont été étudiés afin d'optimiser les rendements d'extraction sur un support de silice greffé C18 des 24 HAP appartenant à une plage de polarité étendue (valeurs de log P comprises entre 3,3 et 7,7). L'utilisation d'un solvant aromatique a été proposée pour minimiser la perte des HAP les plus volatils au cours de l'étape d'évaporation. Un plan d'expérience a été utilisé pour optimiser les conditions de précipitation des protéines. Les performances du traitement de l'échantillon ont été déterminées pour un volume réduit de 100  $\mu$ L de sérum maternel et de sang de cordon ombilical. Seuls 22 HAP ont été quantifiés. Les LOQs obtenues de 22 HAP pour les deux matrices étaient comprises entre 0,2 et 3,1 ng/mL pour les HAP fluorescents et entre 7,0 et 14,5 ng/mL pour ACY et BjF (détection UV).

Ainsi, ce chapitre, rédigé sous forme d'article, présente la validation de la procédure analytique développée dans le chapitre précédent. La méthode développée a été validée sur 3 jours par l'approche des profils d'exactitude. Les limites d'acceptabilité ont été fixées selon les comportements des différents HAP afin d'obtenir les LOQs les plus basses possibles. Ainsi, pour le sérum maternel, 4 groupes de limites d'acceptabilité ont été distingués ( $\pm 60\%$ ,  $\pm 80\%$ ,  $\pm 80\%-30\%$  et  $\pm 80\%-50\%$ ) tandis que 5 groupes ont été déterminés pour le sérum de sang de cordon ombilical ( $\pm 40\%$ ,  $\pm 60\%$ ,  $\pm 80\%$ ,  $\pm 80\%-30\%$  et  $\pm 80\%-50\%$ ). Des LOQs comprises entre 0,5 et 20 ng/mL et 0,2 et 16 ng/mL ont été respectivement obtenues pour le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical. Ce protocole validé a été mis en œuvre pour la quantification de 22 HAP dans 20 échantillons de sérums maternel et de sérum de cordon ombilical confondus.



## **Article 2 : Validation of the analytical procedure for the determination of 22 regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in maternal and umbilical cord sera**

Stéphanie Swiha<sup>1,2</sup>, Valérie Pichon<sup>1,3</sup>, Thierry Fournier<sup>2</sup>, Sophie Gil<sup>2</sup>, Nathalie Delaunay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratory of Analytical and Bioanalytical Sciences and Miniaturization, UMR CBI 8231 CNRS – ESPCI Paris, PSL Research University, Paris, France*

<sup>2</sup>*Laboratory of Human Placenta Pathophysiology and Pharmacotoxicology, UMR-S 1139 INSERM- Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France*

<sup>3</sup>*UPMC, Sorbonne Université, Paris, France*

### **V.1. Abstract**

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons are ubiquitous contaminants, mainly emitted by human activities, present in environment and food. Pregnant woman and her fetus, a population at risk, are exposed to PAHs and subjected to possible serious health risks. Their determination in maternal and umbilical cord sera is therefore required. In our previous work, for the first time, an analytical method to quantify simultaneously 22 regulated PAHs at low concentrations in maternal and umbilical cord sera was developed. The sample handling was based on protein precipitation followed by solid phase extraction with C18-based silica. Analysis were performed by high performance liquid chromatography coupled to diode array and fluorescence detection. This analytical procedure was here validated for maternal and umbilical cord sera for quantitation of 22 PAHs using the total error approach and accuracy profiles for the first time. The aim of this validation was to obtain the lower limits of quantitation (LOQs) to quantitate PAHs, at  $\mu\text{g/L}$  levels, in sera samples. Using the accuracy profile as a decision tool, 5 different groups of acceptance limits were defined, according to the PAH behavior and the matrix: 40%, 60%, 80%, 80%-30% and 80%-50%. It led to LOQs between 0.5 and 20 ng/mL and between 0.2 and 16 ng/mL in maternal and umbilical cord sera, respectively. This procedure was then applied to determine the PAH concentrations in 20 altogether maternal and umbilical cord sera, from caesarian delivery.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons, maternal serum, umbilical cord serum, solid phase extraction, validation, accuracy profile, total error approach.

## V.2. Introduction

Pollution is one of the major problems of our society. Ambient air contains a variety of chemical compounds, some of them having carcinogenic and genotoxic effects and thus representing a serious threat to health. The Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) family is one of the group of carcinogens and genotoxic substances in air [67], associated or not with particles [68]. These PAHs are Persistent Organic Pollutants, emitted by human activities due to incomplete combustion or pyrolysis of organic materials (industries, road traffic, heating...) [4,5]. Consequently, they are present in the environment (air, soil, water...), but also in food, leading to constant exposure of humans [142–144]. It is now well established that these pollutants affect human health. Moreover, an exposure during pregnancy can lead to fetal malformations, prematurity, and even disorders in children and adult [1,48,145].

Therefore, 24 PAHs are regulated: 16 by the United State Environmental Protection Agency (US-EPA) and 16 by the European Food Safety Authority (EFSA), 8 of them belonging to both regulations. The 24 regulated PAHs have a wide range of polarity rendering their determination in biological samples particularly difficult. Concerning the PAH quantitation in maternal and umbilical cord sera, the majority of the studies targeted only the US-EPA PAHs, except Pleil and coworkers who quantitated also 6 EFSA PAHs [76]. The PAHs were mostly extracted from blood, plasma or serum by liquid-liquid extraction (LLE) with n-hexane [76,89,91,100,101,105]. To remove the interferences present in the matrix, that could disturb the PAH quantitation, LLE was often followed by a clean-up step with Solid-Phase Extraction (SPE) using C18-bonded silica, silica or silica/alumina [8,89–91,102,103,107,110]. However, as an alternative approach to LLE, authors used also SPE alone [96,103,106,109,111]. Unfortunately, in some of these papers, analytical performance data such the nature of the SPE sorbent [109,111], the enrichment factors [96,111], the extraction yields in real samples [111], the limits of quantitation (LOQs) in the biological matrices [96,111] and especially validation of the analytical procedure were often lacking. Nevertheless, these data are necessary to be sure that the obtained results are consistent.

Therefore, we developed and optimized in a previous work a method to quantitate 22 regulated PAHs (16 US-EPA PAHs and 14 EFSA PAHs) [152]. For the first time, the

simultaneous determination of the 22 regulated PAHs from low volumes (100  $\mu$ L) of maternal and umbilical cord sera, with a sample pretreatment reducing as much as possible the amount of used solvents was carried out. The sample pretreatment involved protein precipitation, SPE, and evaporation-redissolution steps before PAH analysis by LC-DAD/FD. The final sample handling procedure led to extraction yields between 27 and 57% and between 34 and 69% in sera from maternal and umbilical cord bloods, respectively, with standard deviation values inferior to 11%. Limits of quantitation between 0.2 to 3.1  $\mu$ g/L for the fluorescent PAHs in spiked real samples were obtained, which are close to the expected concentrations in biological samples.

This paper focuses, for the first time, on the validation of this analytical method for the quantitation of 22 regulated PAHs in maternal and umbilical cord sera. The SPE step was automatized. The total error approach, including accuracy profiles, which allows to combine systematic and random errors throughout the analytical procedure, was performed. Moreover, an indication of the performance of the individual assays was given. This validation will allow to evaluate the risk associated with the use of the developed analytical procedure during routine analyses of real samples. The validated analytical protocol was applied to 20 real samples, altogether, of maternal and umbilical cord sera, from caesarian delivery.

### **V.3. Materials and methods**

#### **V.3.1. Chemicals**

HPLC grade methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), and tetrahydrofuran (THF) were supplied by Carlo Erba (Val de Reuil, France). High purity water was dispensed by a milli-Q purification system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). The PAHs standard: acenaphthylene (ACY) 99%, cyclopenta[cd]pyrene (CPcdP) 99%, benzo[c]fluorene (BcF) 97%, benzo[j]fluorene (BjF) 99.7%, dibenzo[a,l]pyrene (DaIP) 99.8%, dibenzo[a,e]pyrene (DaeP) 99.8%, dibenzo[a,h]pyrene (DahP) 99%, dibenzo[a,i]pyrene (DaiP) 99% at 10 mg/L in acetonitrile and a standard mixture of the 16 US-EPA PAHs at 100 mg/L in acetonitrile were supplied by Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). An aqueous solution containing 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) was purchased from Thermofisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). The SPE cartridges used were: Hypersep from ThermoFisher Scientific (Villebon, Coutaboeuf,

France) packed with 25 mg of trifunctional octadecyl unendcapped (particle size: 40-63  $\mu\text{m}$ , pore size: 60  $\text{\AA}$ , surface area: 520  $\text{m}^2/\text{g}$ , carbon: 21.23%).

### V.3.2. Analysis by LC-DAD/FD

The LC-DAD/FD analyses were performed using a liquid chromatograph (LC) 1200 series (Agilent Technologies, Massy, France) system equipped with a binary pump, an auto sampler, a diode array detector (DAD), a fluorescence detector (FD) and was controlled by a Chemstation software. The chromatographic separation was performed on a Pursuit PAH column (100 x 2.1 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies) maintained at 35°C with a column oven (Croco-cil, Interchim, Montluçon, France). Samples were analyzed using a linear gradient elution with water (A) and a mixture of MeOH/ACN (6/4, v/v) (B). The gradient started at 50% of B and increased to 90% of B in 27 min, held for 13 min, and increased to 100% of B in 1 min, held for 10 min, and finally returned to initial composition within 1 min and let 10 min to equilibrate the system. The flow-rate was set at 0.2  $\text{mL min}^{-1}$  and the injection volume was 10  $\mu\text{L}$ . ACY and BjF were quantified by UV. For the other PAHs, a time program of the excitation and emission wavelengths was performed, and they were quantified with FD. The wavelengths and the obtained LOQs are reported in **Table S 2\_Annexe 2**.

### V.3.3. Sample preparations

#### V.3.3.1. Sample collection

Biological samples were obtained following informed written patient consent and approval from our local ethics committee (CPP 2015-Mai-13909). Cord and maternal blood were collected with harmonized procedures from patients delivered in Obstetric Units of Paris' Hospitals. Sera were obtained after blood centrifugation at 3000 rpm during 15 min and stored at -20°C in Protein Lobind tubes.

#### V.3.3.2. Precipitation of the sera samples

Before the SPE procedure, the protein precipitation step was performed on sera samples. 100  $\mu\text{L}$  of sera samples from pooled maternal and umbilical cord bloods were spiked at different concentration with 10  $\mu\text{L}$  of a stock solution containing the 22 PAHs in ACN. Samples were spiked also with an aqueous solution containing 10% of SDS to achieve final concentration of 0.2% (w/v). Samples were vortexed and 233  $\mu\text{L}$  of ACN were added. The mixes were centrifuged at 4500 rpm during 30 min at 4°C. Supernatants were

collected and 300  $\mu\text{L}$  of each sample were diluted with 120  $\mu\text{L}$  of water to obtain a final ACN content of 50%.

#### **V.3.3.3. Solid Phase extraction procedure**

A C18 sorbent was used to clean the samples. The SPE step was fully automatized using the GX271 liquid handler system (Gilson, Villiers le Bel, France). The conditioning step involved the activation of the cartridge with 300  $\mu\text{L}$  of THF followed by 300  $\mu\text{L}$  of MeOH and 300  $\mu\text{L}$  of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v). After percolation of 400  $\mu\text{L}$  of the diluted supernatant, the cartridge was rinsed with 100  $\mu\text{L}$  of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) followed by a drying step. Elution was performed using 300  $\mu\text{L}$  of THF. The elution fraction was saved in conical vials with capacity of 300  $\mu\text{L}$  in order to facilitate the evaporation step. Then, 40  $\mu\text{L}$  of toluene was added and this fraction was dried under nitrogen stream according to the "last drop" method. Finally, the extract was reconstituted by adding 50  $\mu\text{L}$  of ACN, followed by 50  $\mu\text{L}$  of H<sub>2</sub>O. 10  $\mu\text{L}$  of the reconstituted sample was injected into the LC/DAD-FD system.

#### **V.3.4. Validation procedure**

##### **V.3.4.1. Calibration samples**

Calibration samples were prepared at 4 levels of concentration for each PAH in ACN/H<sub>2</sub>O mixture (1/1, v/v) with concentrations ranging from 0.2 to 200 ng/mL. The calibration samples were prepared only the first day and were reinjected the 2 other days of validation, since it was observed that these PAH solutions are stable during months when they are stored at 4°C.

##### **V.3.4.2. Validation samples**

The different stock standard solutions were diluted in ACN to obtain validation working solutions containing the 22 PAHs with a concentration 10 times greater than the desired final spiking concentration in sera samples. 100  $\mu\text{L}$  of each sera sample were next spiked with 10  $\mu\text{L}$  of the appropriate validation working solution to obtain concentration ranging from 0.5 to 200 ng/mL for maternal sera and from 0.2 to 160 ng/mL for umbilical cord sera. These spiked sera were treated as described above (protein precipitation, SPE, evaporation and redissolution before LC/DAD-FD analysis). For each level of concentration, 3 sera samples were prepared. They were prepared and injected the first day of validation and injected again the 2 other days of validation in order to limit as much

as possible the used amount of sera. In total, 12 validation injections for each kind of serum at 4 concentration levels were carried out. Finally, the concentrations of each PAH in the validation samples were determined using an affine regression mode calibration and were used to determine trueness and precision of the measurements.

## **V.4. Results and discussion**

### **V.4.1. Accuracy profiles**

The aim of this work was to validate, for the first time, by the accuracy profile approach, the analytical procedure for the determination of 22 regulated PAHs in maternal and umbilical cord sera by LC-DAD/FD. Another important aspect was to determine the lower LOQs as possible to quantify PAHs, present at  $\mu\text{g/L}$  levels, in real samples [76,96,103,106,109–111,145]. The validation establishes, based on experimental results, if the performances of the method are compliant with its requirement. The accuracy profile method uses tolerance interval and guarantees that a defined proportion ( $\beta$ ) of future measurements obtained with the analytical procedure will be included within expectation limits. The minimum probability  $\beta$  was set at 80%. This statistical approach was already applied in various contexts [153–158]. For example, a method for Ceftiofur quantitation in complex biological matrices was validated using this approach [159]. The authors showed that the acceptability limits could reach 60% depending on the analyzed matrix. These previous studies and the lack of validation in the literature for the PAH quantitation in biological fluids led us to apply this approach to the sample handling plus LC-DAD/FD method for the PAH quantitation in serum samples from maternal and umbilical cord bloods.

First, the extraction recoveries of the 22 PAHs for the whole sample pretreatment including the protein precipitation, the automatized SPE, the evaporation and the redissolution steps were determined by spiking pooled maternal and umbilical cord sera at 10  $\mu\text{g/L}$  for each PAH except for B<sub>j</sub>F at 20  $\mu\text{g/L}$ . 100  $\mu\text{L}$  of pooled sera were used for one experiment, each experiment was repeated 3 times, and the pooled sera were also analyzed without spiking to evaluate the potential presence of PAHs and correct the resulting extraction recoveries. In the pooled maternal and umbilical cord sera used to determine the PAH extraction recoveries, PHE was detected at 5 ng/mL and its area was subtracted from the obtained area in spiked pooled sera samples. The analytical

procedure carried out with a blank (ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) solution) demonstrated that the presence of PHE was also observed with the same amount and that resulted from the chemicals used for the sample pretreatment, probably the toluene.

**Table 8** shows the obtained extraction recoveries. They are between 17 and 82% for maternal sera and between 21 and 87% for umbilical cord sera with SD lower than 17%. The extraction recoveries for maternal sera are lower than those obtained with umbilical cord sera, especially for FLT to DahP. This can be explained by a different matrix effect for both kinds of sera. Indeed, the studied PAHs have a large range of polarity with values of Log P between 3.3 and 7.7, which led to different behaviors along the sample handling steps [152]. We previously demonstrated that the most polar PAHs were partially lost during the evaporation step while the most hydrophobic PAHs adsorbed on the walls of all the used contents.

**Table 8**: Extraction recoveries and standard deviations (SD) ( $n = 3$ ) of 22 PAHs for spiked maternal and umbilical cord pooled sera. Precipitation step: 0.2 % of SDS and 70% of ACN. Automatized SPE (Hypersep cartridge): percolation of 400  $\mu$ L of spiked sample with 10  $\mu$ g/L of each PAH except for B<sub>j</sub>F at 20  $\mu$ g/L, washing with 100  $\mu$ L of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), elution with 300  $\mu$ L of THF and partial evaporation (addition of 40  $\mu$ L of toluene in the elution fraction). The extract was further recovered with 100  $\mu$ L of ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v).

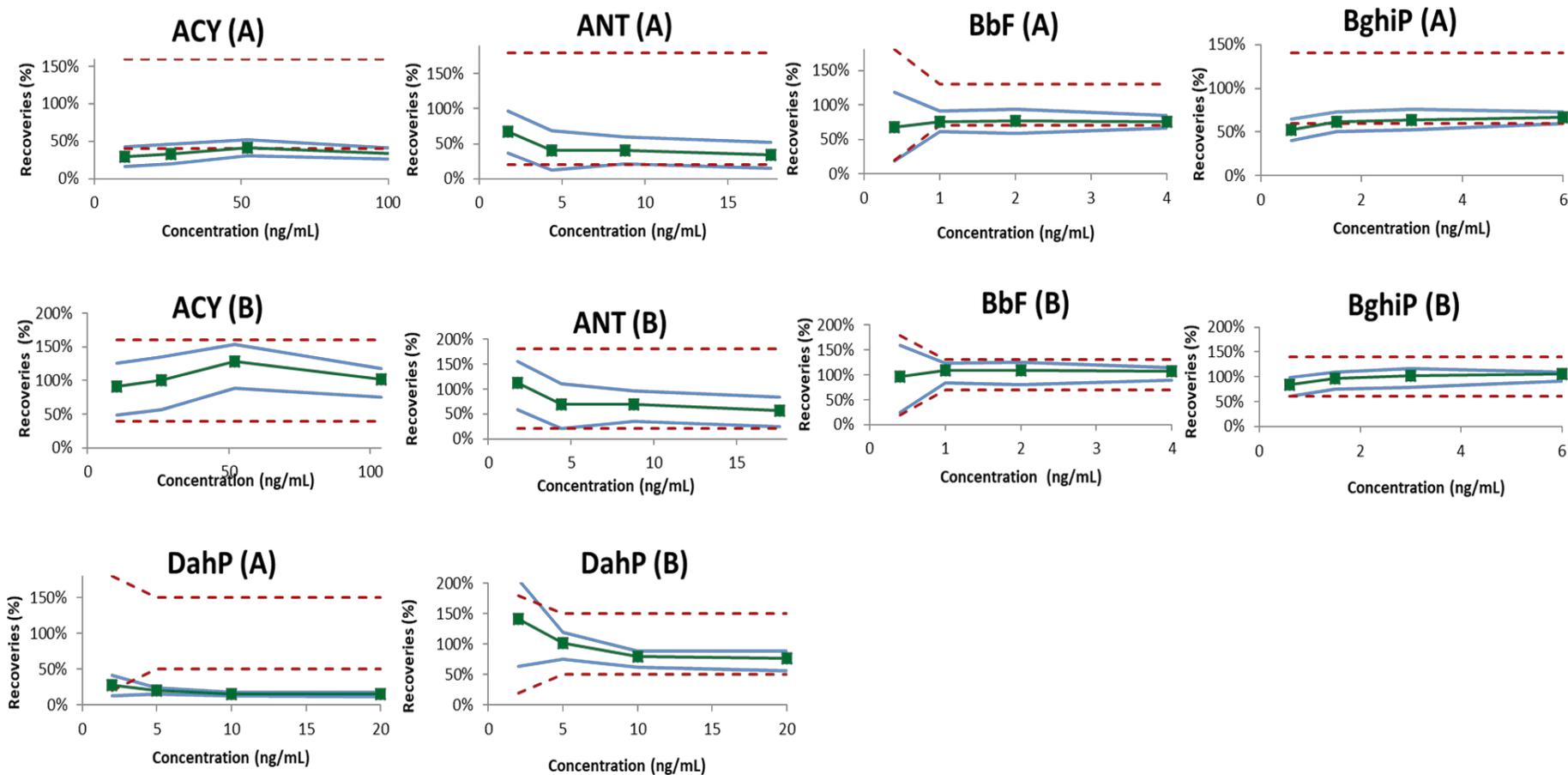
PAHs	Spiked maternal serum	SD (%)	Spiked umbilical cord serum	SD (%)
NAPH	25%	9%	31%	10%
ACY	37%	4%	34%	5%
ACE	58%	7%	47%	16%
FLO	53%	4%	47%	11%
PHE	62%	5%	80%	7%
ANT	82%	17%	62%	10%
FLT	60%	7%	77%	10%
PYR	55%	4%	67%	10%
B <sub>c</sub> F	61%	15%	85%	4%
B <sub>a</sub> A	65%	10%	75%	5%
CHR	69%	7%	82%	7%
5MCHR	57%	5%	82%	5%
B <sub>j</sub> F	65%	6%	87%	7%
B <sub>b</sub> F	60%	4%	77%	4%
B <sub>k</sub> F	62%	4%	79%	8%
B <sub>a</sub> P	60%	4%	67%	4%
DahA	44%	8%	72%	7%
DalP	46%	4%	72%	8%
BghiP	37%	8%	66%	7%
DaeP	58%	4%	57%	6%
DaiP	18%	3%	46%	3%
DahP	17%	4%	21%	6%

The goal of this study was to validate the analytical procedure for the 22 PAHs with the best LOQs, despite their different behaviors. Moreover, there is no regulation about the acceptance limits for PAH quantitation in biological matrices. This is why, in this work,

the acceptance limits were set according to the behavior of the compounds. Since the limit of quantitation of an analytical procedure is given by the intersection between the accuracy profile and the acceptance limits, it was necessary to construct first the accuracy profiles and then to determine the acceptance limits. If there was no intersection, the first level of concentration, used for the validation study and selected to be close to the analytical instrument LOS ( $S/N = 10$ ), was selected as the LOQ of the PAH for the validated analytical method. Acceptance limits up to 80% and the use of different acceptance limits over the entire dosing range if it was necessary for achieving better LOQs were tolerated.

Hence, the validation was carried out for 3 days and the validation samples were spiked at concentrations ranging from 0.5 to 200 ng/mL for maternal sera and from 0.2 to 160 ng/mL for umbilical cord sera. For each PAH and each kind of serum, the accuracy profile was obtained by plotting on the one hand the upper  $\beta$  tolerance and on the other hand, the lower  $\beta$  tolerance calculated at each concentration level. This profile defines a region where each future result generated by the analytical procedure has 80% chance to fall. The accuracy profiles of each compound were plotted using an affine calibration, as it was the calibration model leading to the best accuracies over the entire dosing range. Moreover, it facilitated the use of our analytical procedure for the analysis of a large number of sera samples in routine. The obtained extraction recoveries (**Table 8**) were used as corrective factors to correct the obtained recoveries of each PAH in the validation samples injected in LC/DAD-FD. Without any correction, it was of course impossible to validate the method with the selected values of acceptance limits. However, it is important to notice that the use of a corrective factor led to an increase in the interval ( $\beta$  expectation tolerance limits). As illustrated in **Figure 19** for some PAHs (ACY, ANT, BbF, BghiP and DahP), a systematic bias was observed and has a different value according to the PAH (extraction recoveries below 100%). Moreover, a variation of this systematic bias with the concentration was observed. This bias corresponded to small variations of the recoveries between the samples used to determine the average extraction recovery values given in **Table 8** and the validation samples.

All the PAH accuracy profiles, correcting by the extraction recoveries, are shown **Figure 20** for both kinds of serum. The analytical procedure is valid as long as the  $\beta$  interval (blue plain lines) is included between both green plain lines that symbolized the acceptance limits. It appears on **Figure 20** that the 22 PAHs have very different accuracy profiles. Therefore, it was necessary to distinguish different kinds of behavior and to create different groups with the idea to do for each PAH and each kind of serum the best compromise between sensitivity and accuracy. **Table 9** presents the different groups that can be determined for each kind of serum.



**Figure 19:** Comparison of accuracy profiles using linear regression mode in pooled umbilical cord sera for a representative PAH of each group of acceptance limits without correction (A) or with correction (B) of the obtained extraction recoveries for the validation samples. The dots represent the obtained extraction recoveries of the validation samples with or without correction, the green plain lines are the accuracy, the blue plain lines are the  $\beta$  expectation tolerance limits and the dashed curves represent the acceptance limits

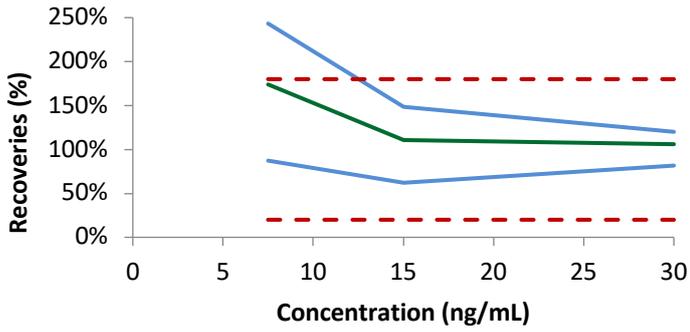
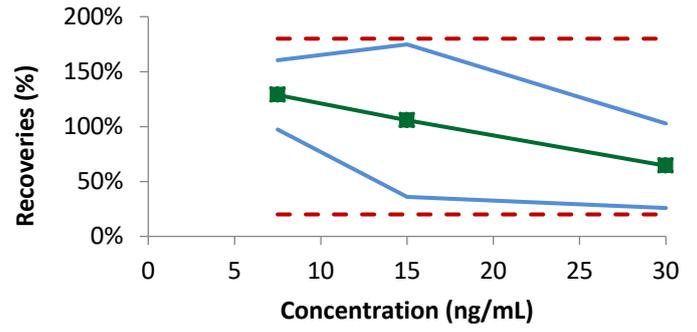
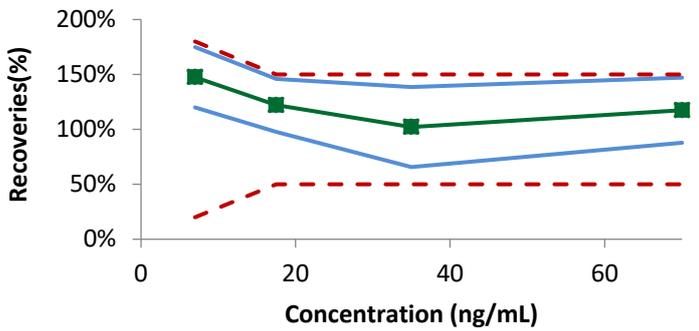
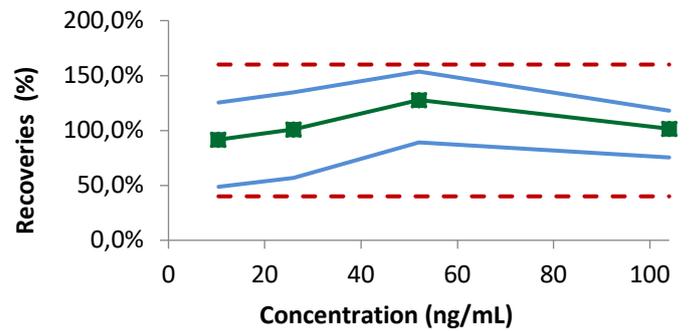
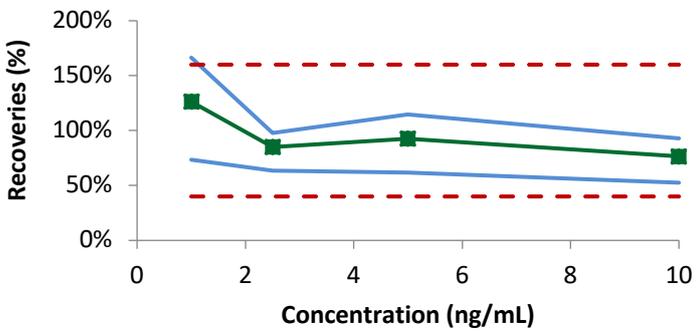
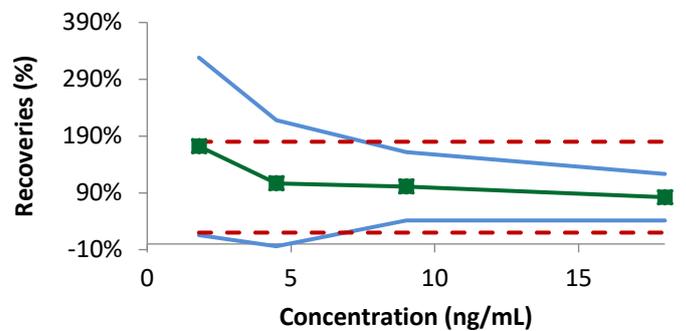
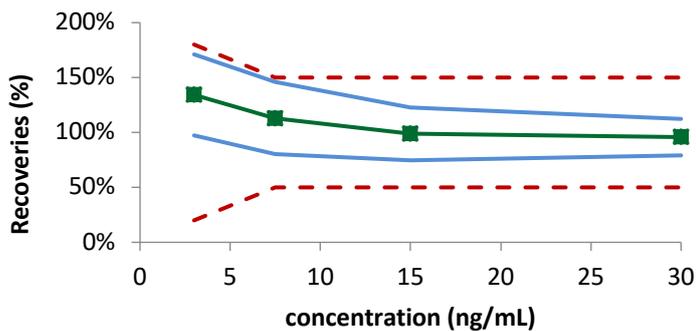
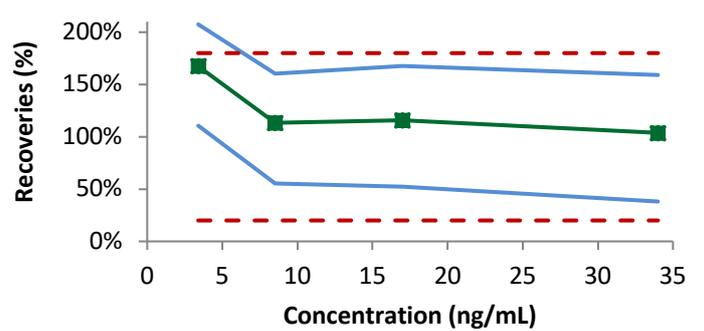
**Table 9** : Different groups of acceptance limits for each sera (80%-30%: 80% for low concentrations-30% for high concentrations, 80%-50%: 80% for low concentrations-50% for high concentrations)

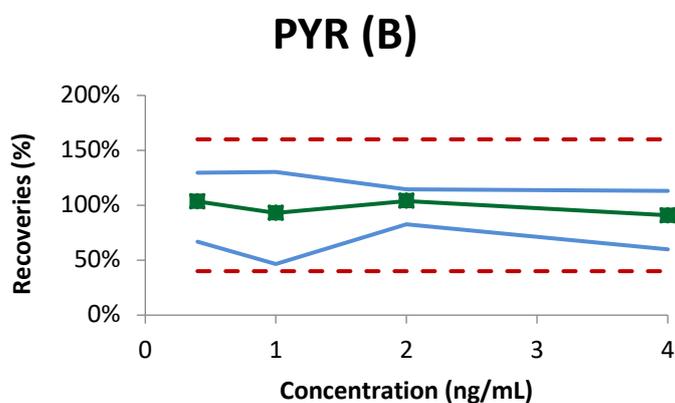
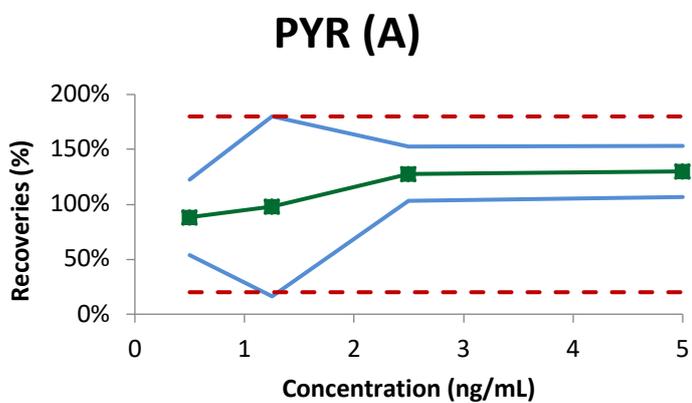
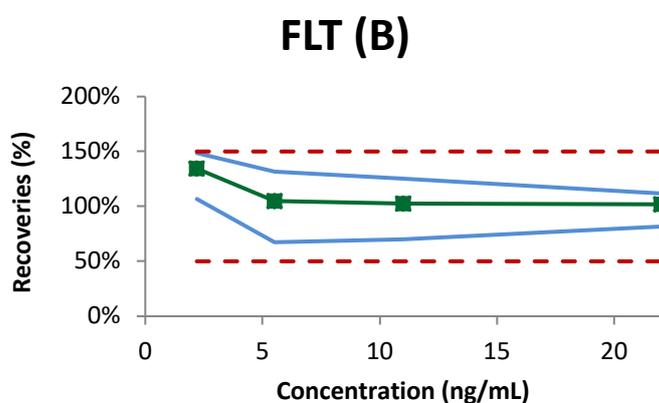
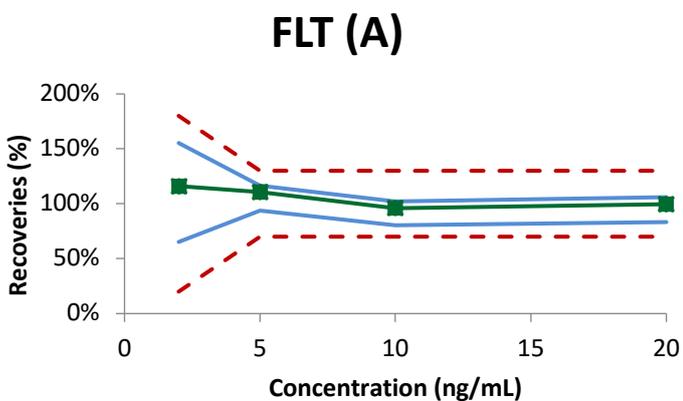
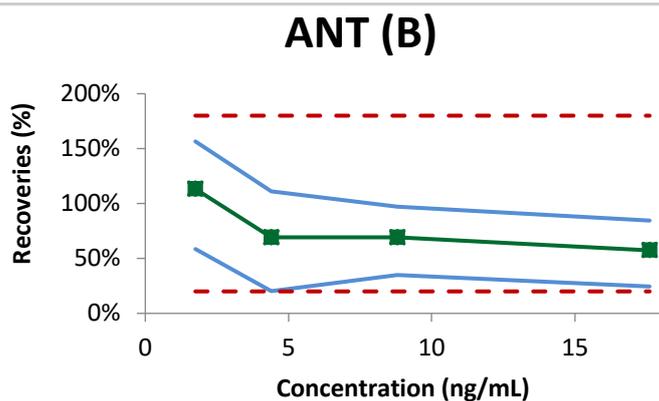
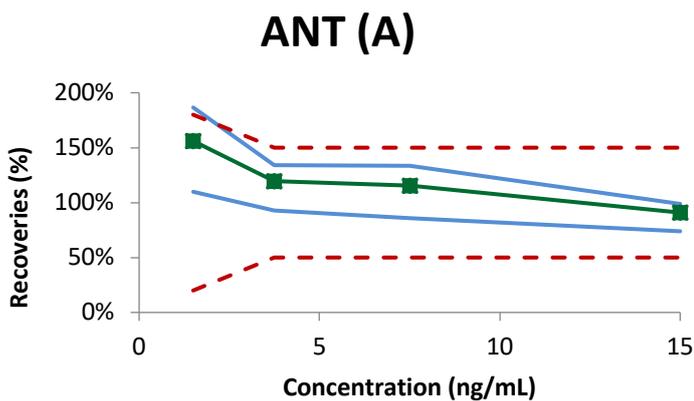
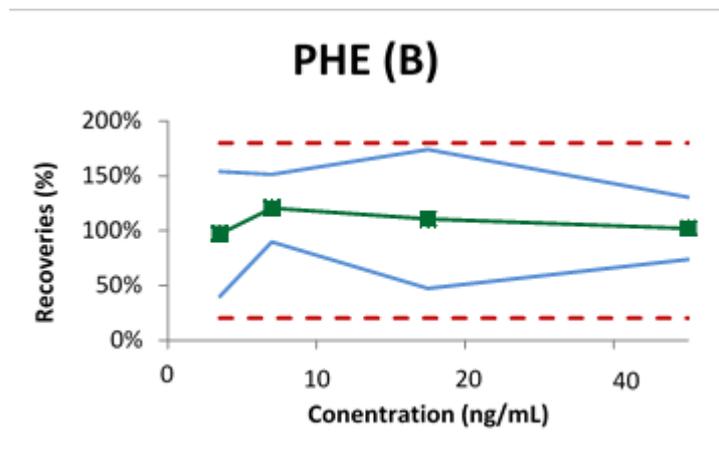
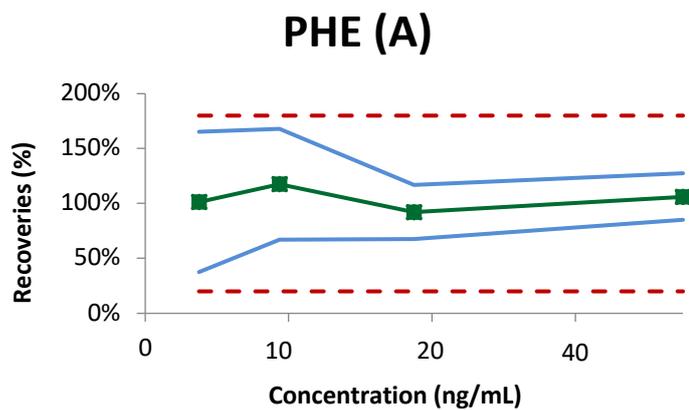
Acceptance limits	Maternal serum	Umbilical cord serum
40%	-	BcF, BaA, BjF, DalP, BghiP, DaeP, DaiP
60%	ACE, BghiP	ACY, FLT, PYR
80%	NAPH, PHE, PYR, BjF, BbF, DahP	NAPH, ACE, FLO, PHE, ANT DahA
80%-30%	FLT, BaA, CHR, BkF, DahA	CHR, 5MCHR, BbF and BkF
80%-50%	ACY, FLO, ANT, BcF, 5MCHR, BaP, DalP, DaeP, DaiP	BaP ,DahP

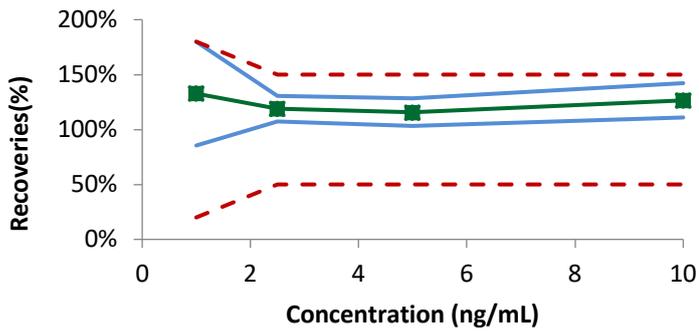
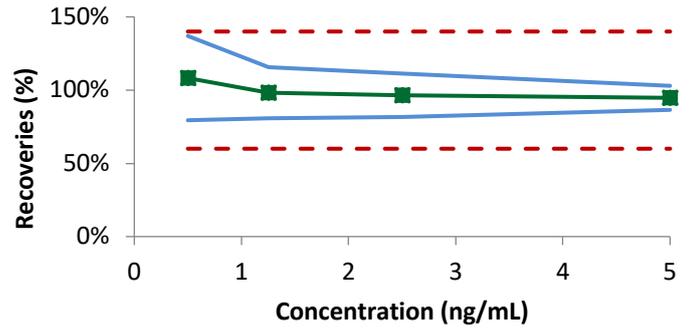
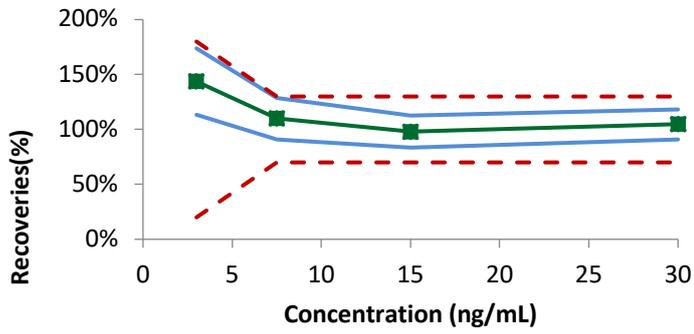
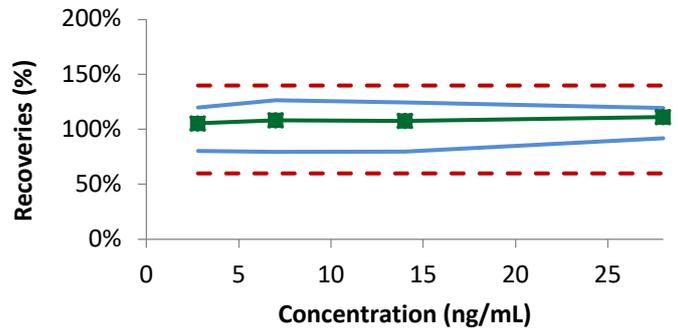
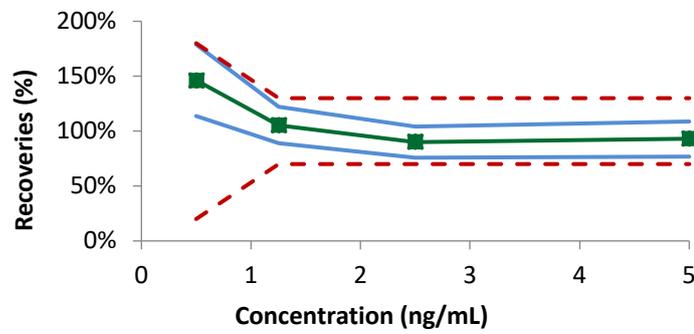
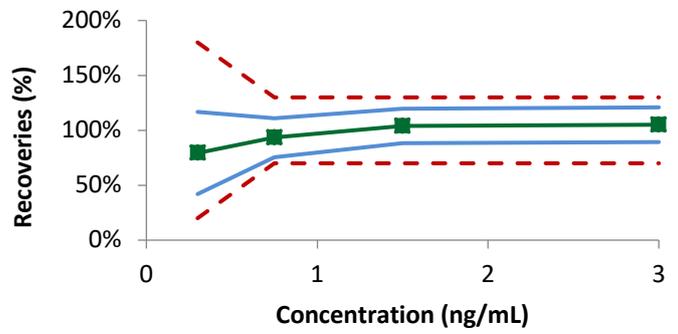
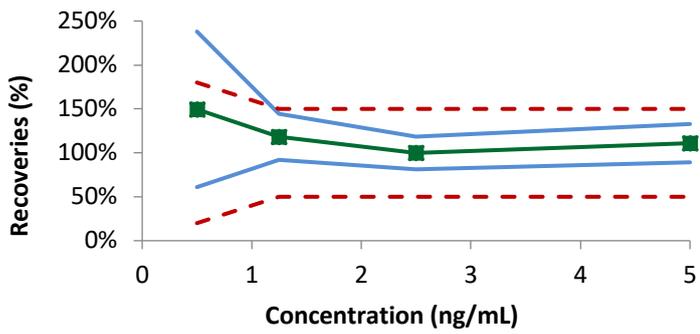
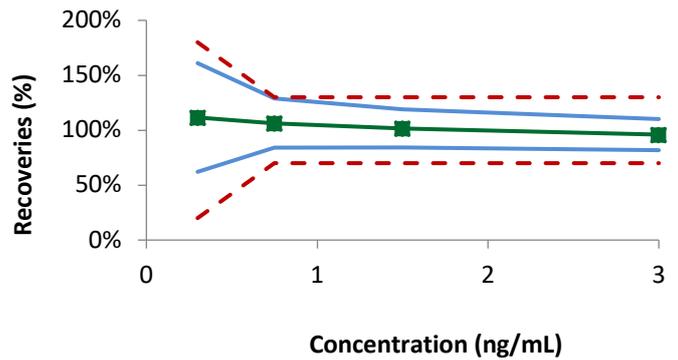
As illustrated **Figure 20** and concerning the maternal sera, 4 groups of acceptance limits can be distinguished. According to **Figure 20 and Table 9**, the acceptance limit of ACE and BghiP was at  $\pm 60\%$ . For NAPH, PHE, PYR, BjF, BbF and DahP, the acceptance limits were at  $\pm 80\%$ . In addition, for 14PAHs (ACY, FLO, FLT, BcF, BaA, CHR, 5MCHR, BkF, BaP, DahA, DalP, DaeP, DaiP) because of high variabilities at low concentrations and smaller ones at high concentrations, the acceptance limits were not constant in the whole studied range of concentrations, as presented in **Figure 20**. Therefore, we defined a first group: the first group with ACY, FLO, ANT, BcF, 5MCHR, BaP, DalP, DaeP and DaiP with acceptance limits at  $\pm 80\%$  for the low concentrations and at  $\pm 50\%$  for the high concentrations. A second group contained the other PAHs among the 14 previously mentioned with acceptance limits at  $\pm 80\%$  for the low concentrations and at  $\pm 30\%$  for the high concentrations. A similar approach was used the umbilical cord sera and, 5 groups of acceptance limits were created, as shown in **Figure 20 and Table 9**. The acceptance limits of NAPH, ACE, FLO, PHE, ANT and DahA were fixed at  $\pm 80\%$ . This can be explained by the higher volatility of these PAHs and their losses during the evaporation step. The acceptance limits of ACY, FLT and PYR were fixed at  $\pm 60\%$ . The acceptance limits for BcF, BaA, BjF, DalP, BghiP, DaeP and DaiP were set at  $\pm 40\%$ , only because they have a higher detection sensitivity. For the other PAHs, 2 groups can be next distinguished: a first one with BaP and DahP with acceptance limits at  $\pm 80\%$  for the low concentrations and at  $\pm 50\%$  for the high concentration a second one with CHR, 5MCHR, BbF, and BkF with acceptance limits at  $\pm 80\%$  for the low concentrations and at  $\pm 30\%$  for the high concentrations.

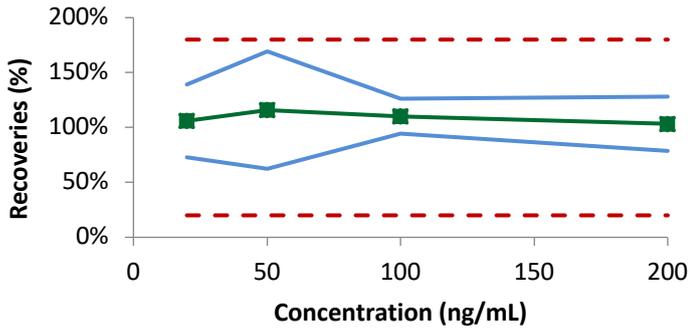
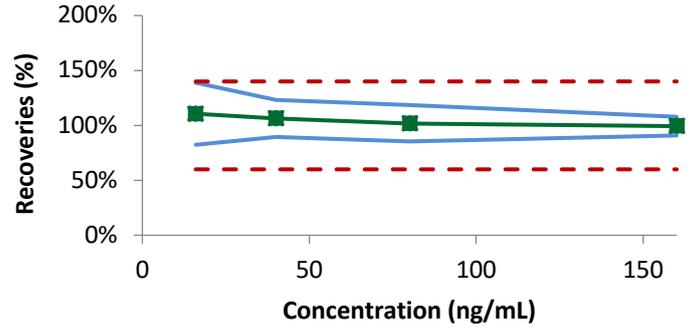
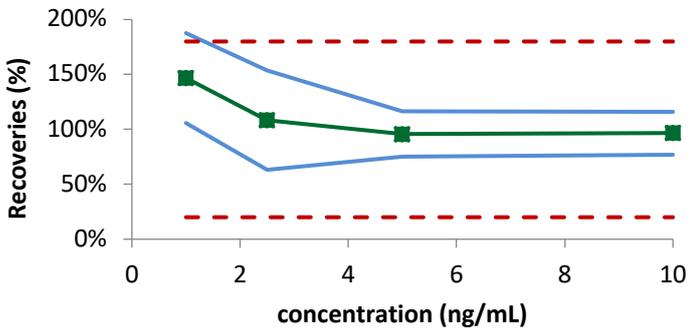
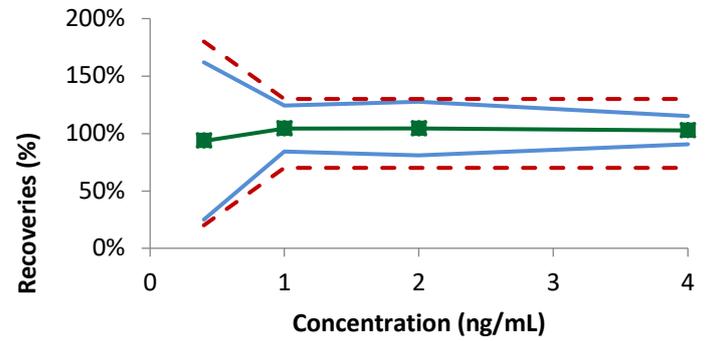
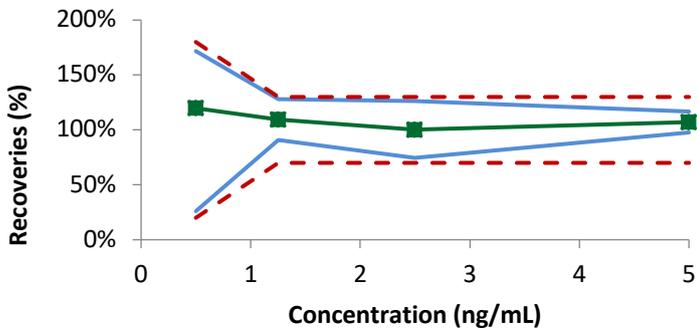
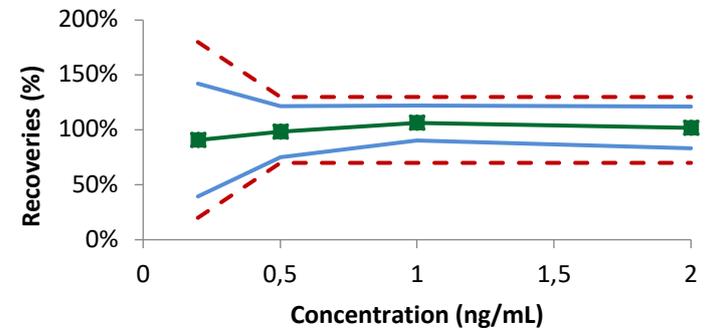
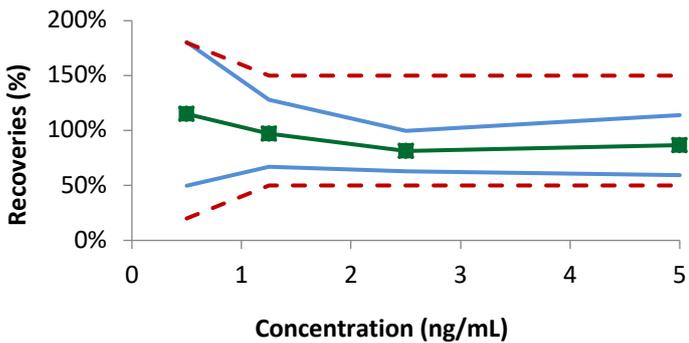
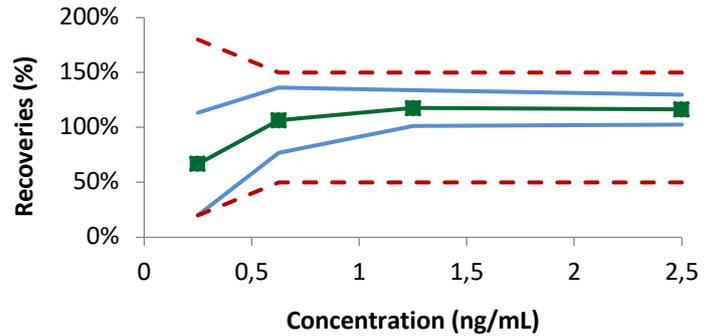
Finally, with the defined acceptance limits, the lowest and highest limits of quantitation of the analytical procedure was 0.5 and 20 ng/mL in maternal sera and 0.2

and 16 ng/mL in umbilical cord sera, respectively. The worst LOQs were obtained for the 7 most polar PAHs (from NAPH to FLT) but also for the most hydrophobic one (DahP). These results can be explained by the losses of the most polar PAHs during the evaporation step. For DahP, it was probably because of its adsorption on the walls of the vial leading to its loss during the resuspension after the evaporation step. Both phenomena led to lower recoveries for these PAHs and consequently induced higher LOQ values in matrices. In addition, bad LOQ values were also obtained for BbF because of its low sensitivity in UV. As shown in **Figure 20**, the accuracy profiles in the two tested matrices did not cross the upper limit of acceptance in the tested concentrations range. Therefore, the upper limits of the analytical procedure correspond to the highest concentration tested for each matrix and each PAH. They ranged from 5 to 200 ng/mL and from 2 to 160 ng/mL in maternal and umbilical cord sera, respectively.

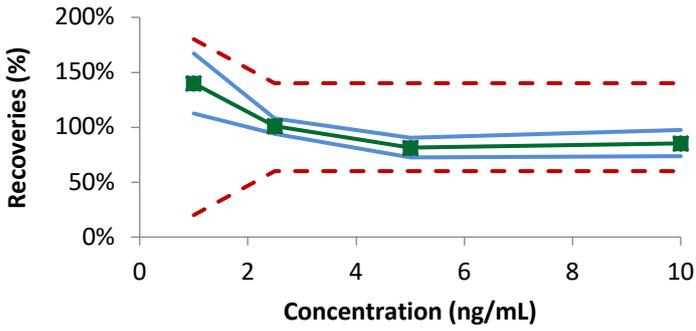
**NAPH (A)****NAPH (B)****ACY (SM)****ACY (SC)****ACE (A)****ACE (B)****FLO (A)****FLO (B)**



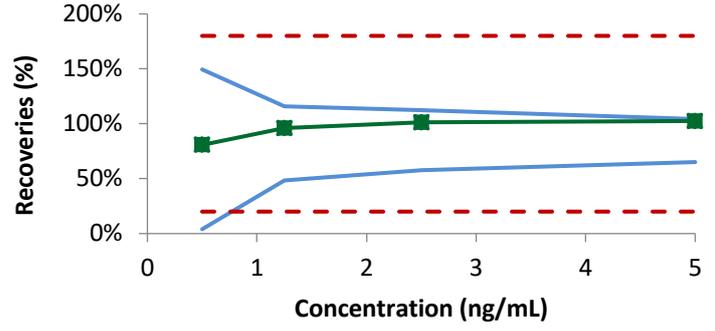
**BcF (A)****BcF (B)****BaA (A)****BaA (B)****CHR (A)****CHR (B)****5MCHR (A)****5MCHR (B)**

**BjF (A)****BjF (B)****BbF (A)****BbF (B)****BkF (A)****BkF (B)****BaP (A)****BaP (B)**

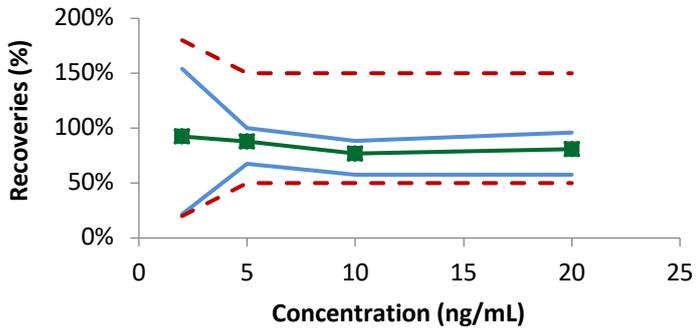
**DahA (A)**



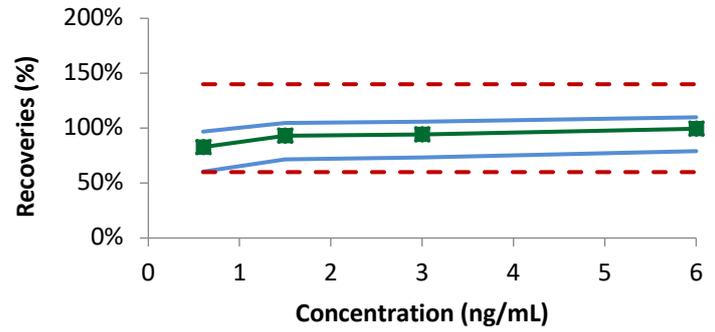
**DahA (B)**



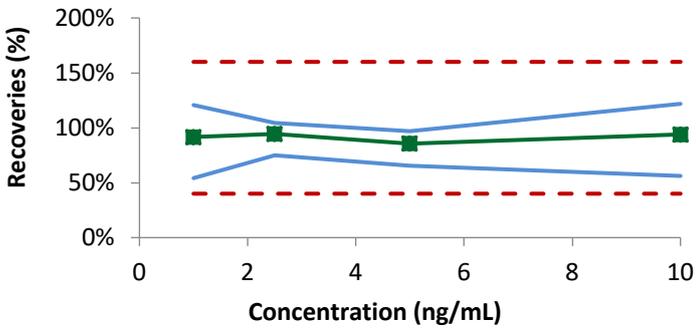
**DaIP (A)**



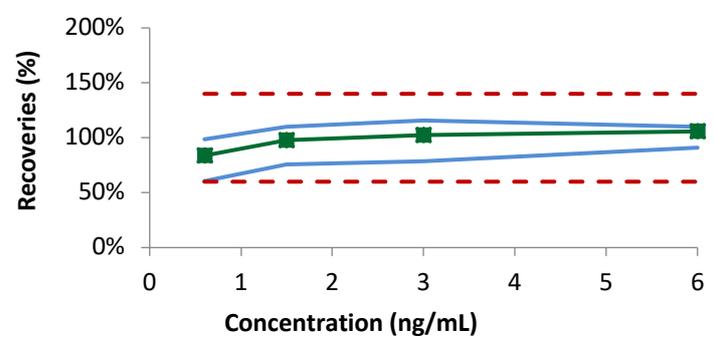
**DaIP (B)**



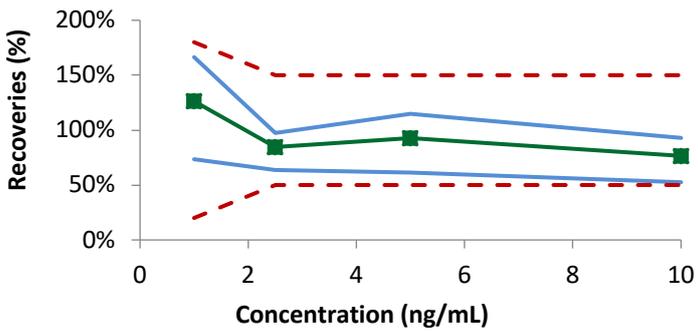
**BghiP (A)**



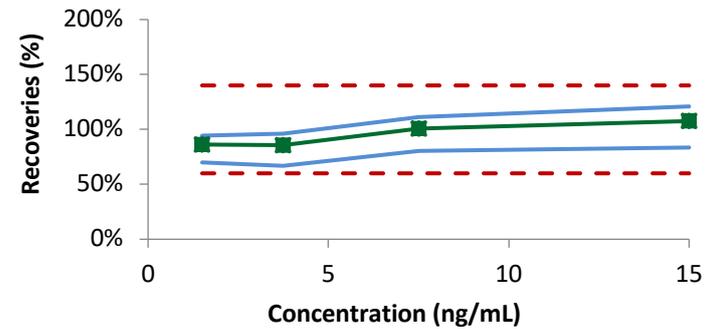
**BghiP (B)**

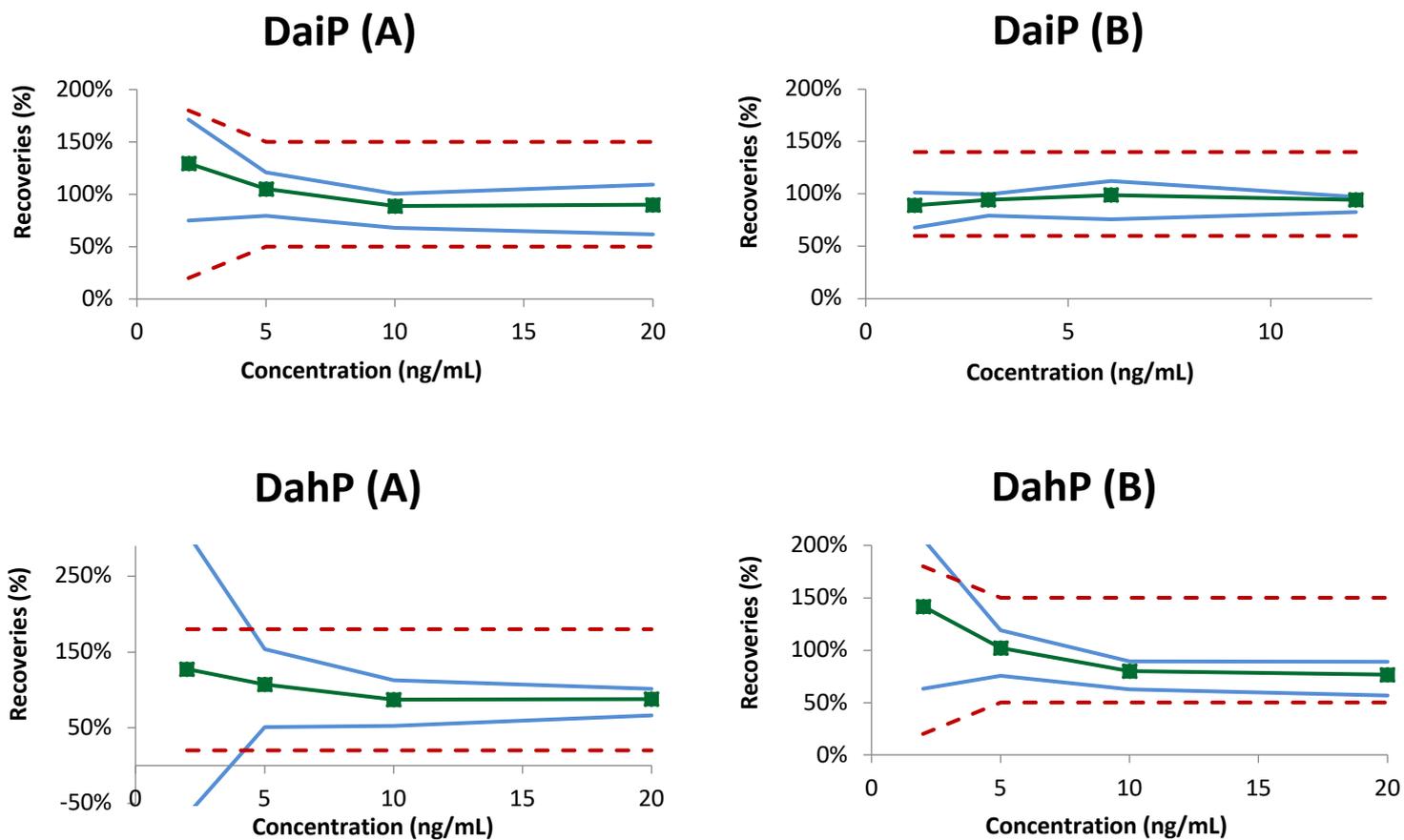


**DaeP (A)**



**DaeP (B)**





**Figure 20** : Accuracy profiles using linear regression mode in (A) maternal serum and (B) umbilical cord serum for 22 regulated PAHs. The dots represent the obtained extraction recoveries of the validation samples after correction, the green plain lines are the accuracy, the blue plain lines are the  $\beta$  expectation tolerance limits and the dashed curves represent the fixed acceptance limits.

#### V.4.2. Trueness and precision

The evaluation of trueness and intermediate precision, corresponding to the precision in the same laboratory, under different conditions such as different days, were required. The combination of trueness and precision is called total error. Therefore, the systematic error was checked by the trueness, which refers to the closeness of agreement between the theoretical concentration and the average back calculated concentration in validation samples. The trueness was expressed in terms of recovery (%) for each concentration level of the validation standards for the two matrices and each PAH, as illustrated in **Figure 20** (green plain line) and **Table 10** gives the relative bias for each PAH in each matrix at each studied concentration. As illustrated in **Figure 20**, the relative biases for the three highest concentration levels for each PAH in the two matrices were satisfying (acceptable values for our requirements). Indeed, the aim was to have the lowest LOQ as possible, even if the bias is higher. Nevertheless, the relative biases were higher for the most polar PAHs, certainly because of their losses during the evaporation step, leading to more variability. Moreover, for the first level of calibration, the relative biases were higher. According to **Table 10**, these relative biases can reach 74% and 72%, for the first level of calibration, in maternal and umbilical cord sera, respectively. In maternal sera, they were higher for almost all the PAHs except B<sub>j</sub>F and B<sub>ghi</sub>P whereas, for umbilical cord sera, they were higher only for the most polar PAHs (NAPH, ACE, FLO, and FLT) and for DahP.

Then the precision of the method, expressed in terms of RSD values, was determined for the two matrices and for each compound (**Table 10**). Repeatability and intermediate precision values for the 3 highest concentration levels were acceptable with values distributed between 4.9 % and 18.4% from FLT to DaiP, with one exception (27% for the intermediate precision of the second calibration level for PYR). Nevertheless, for the most polar PAHs (from NAPH to ANT) and for DahP, the most hydrophobic one, repeatability and intermediate precision values were higher, such as up to 72.8% for DahP.

#### **V.4.3. Real samples analysis**

Altogether, twenty maternal and umbilical sera samples from caesarian delivery and from Obstetric Units of Paris' Hospitals were analyzed with the validated procedure. Unfortunately, no PAH was detected, probably because of the hemodilution after the perfusion.

**Table 10** : Detailed results of validation by the total error approach in maternal and umbilical cord sera

PAHs	Sera from maternal bloods					Sera from umbilical cord bloods				
	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)
NAPH	7.5	74.0	31.9	31.9	12.5-30	7.5	28.7	16.5	16.5	7.5-30
	15	10.7	27.5	27.7		15	5.5	35.5	41.9	
	30	6.0	13.0	13.0		30	-35.7	40.5	40.5	
ACY	7	55.9	7.1	10.7	7-70	10.4	8.4	29.0	29.8	10.4-104
	17.5	29.0	13.4	13.4		26	0.9	29.0	27.6	
	35	8.0	24.1	24.1		52	27.7	17.9	17.9	
	70	24.1	17.0	17.1		104	-1.8	15	15.0	
ACE	1	26.3	10.0	17.7	1.1-10	1.8	72.0	16.0	44.5	7-18
	2.5	-15.2	11.7	6.8		4.5	7.0	22.2	52.3	
	5	-7.2	14.0	11.9		9	1.2	12.5	29.9	
	10	-23.5	18.8	10.0		18	7.7	11.2	25.3	
FLO	3	42.3	6.5	14.4	3-30	3.4	67.4	8.8	16.5	6.4-34
	7.5	19.9	12.3	17.3		8.5	13.6	18.8	28.2	
	15	4.6	16.4	16.5		17	15.6	14.2	27.9	
	30	1.5	11.7	11.7		34	3.8	3.8	28.9	
PHE	5	1.4	27.0	37.5	5-50	5	3.5	4.7	27.2	5-50
	12.5	17.5	23.2	27.3		12.5	28.6	14.8	16.7	
	25	-7.9	18.2	18.2		25	18.0	18.0	31.6	
	50	6.2	13.4	13.4		50	8.8	12.4	16.8	
ANT	1.5	56.6	6.9	13.7	1.9-15	1.75	13.2	27.9	21.6	1.8-17.6
	3.75	19.5	12.2	12.2		4.4	30.9	35.5	16.2	
	7.5	15.3	12.7	14.2		8.8	30.7	23.3	8.7	
	15	9.1	7.2	9		17.6	-42.6	37.2	37.2	

PAHs	Sera from maternal bloods					Sera from umbilical cord bloods				
	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)
FLT	2	16.1	9.3	20.8	2-20	2.2	34.4	8.1	10.2	2.2-22
	5	10.7	5.5	19.4		5.5	4.7	14.1	19.4	
	10	-4.1	8.2	17.4		11	2.6	13.4	17.4	
	20	-0.6	7.0	10.5		22	1.9	10.5	10.5	
PYR	0.5	-8.5	16.2	23	1.3-5	0.4	3.4	14.8	19	0.4-4
	1.25	1.7	13.1	40		1		18.1	27.0	
	2.5	32.3	13.1	13.1		2	-6.9	10.9	10.9	
	5	34.7	8.5	11		4	3.8	14.5	18.9	
							-9.1			
BcF	1	32.7	6.6	17.5	1-10	0.5	8.2	8.6	14.7	0.5-5
	2.5	19.0	5.2	6.2		1.25	-1.8	12.1	12.1	
	5	15.7	4.8	6.6		2.5	-3.5	10.5	10.5	
	10	26.6	5.3	7.4		5	-4.8	4.9	5.6	
BaA	3	43.6	14.2	14.2	3-30	2.8	5.6	12.0	12.9	2.8-28
	7.5	10	7.9	10.5		7	8.5	15.4	15.4	
	15	-1.9	7.9	9.4		14	7.8	14.7	14.7	
	30	4.7	4.3	7.3		28	11.3	8.5	8.7	
CHR	0.5	46.3	6.8	12.2	0.5-5	0.3	-20.7	12.8	25	0.3-3
	1.25	5.5	5.5	8.9		0.75		12.8	12.8	
	2.5	-10.0	7.8	9.8		1.5	-6.7	10.2	10.2	
	5	-7.1	4.1	8.9		3	4.1	10.2	10.2	
							5.1			10.2

	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)
5MCHR	0.5 1.25 2.5 5	49.5 18.3 -0.1 10.8	8.8 4.2 3.7 7	28.4 11 9.3 11.2	1.1-5	0.3 0.75 1.5 3	11.6 6.5 1.7 -4	11.2 14.3 11.6 8.2	23.1 14.3 11.6 9.5	0.3-3
BjF	20 50 100 200	6.0 15.8 10.3 3.3	14.6 26.3 9.8 6.0	19.0 29.8 9.8 12.4	20-200	16 40 80 160	10.6 6.3 1.9 -0.7	17.1 10.8 11.0 5.6	17.2 10.8 11.0 5.8	16-160
BbF	1 2.5 5 10	54.4 14.2 0.8 1.5	10.7 22.3 4.0 2.6	16.1 26.5 10.7 9.6	1.4-10	0.4 1 2 4	-2.8 8.5 8.6 7	19.3 13 15 7.9	38.6 13.0 15.1 8.0	0.4-4
BkF	0.5 1.25 2.5 5	19.7 9.3 0.3 7.2	17.3 7.9 7.7 4.4	25.4 10.4 14.1 5.4	0.5-5	0.2 0.5 1 2	-10.8 -1.6 6.4 2.1	15.2 11.0 10.2 12.7	30.0 14.4 10.2 12.7	0.2-2
BaP	0.5 1.25 2.5 5	15.2 -2.6 -18.6 -13.3	11.6 8.3 5.0 3.9	28.4 16.5 11.4 14.9	0.5-5	0.25 0.62 1.25 2.5	-33.2 6.6 17.8 16.3	25.0 17.1 6.5 7.8	39.6 18.4 8.4 7.9	0.25-2.5

PAHs	Sera from maternal bloods					Sera from umbilical cord bloods				
	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Relative bias (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate precision (RSD %)	Valid Range (ng/mL)
DahA	1	39.8	6.6	10.9	1-10	0.5	-19.3	13.4	4.5	0.5-5
	2.5	0.9	4.5	4.6		1.25	-3.9	11.1	15.8	
	5	-18.6	7.4	7.4		2.5	1.5	11.3	11.3	
	10	-14.6	4.3	7.7		5	2.5	4.8	4.8	
DalP	2	-7.6	10.3	35.9	2-20	0.6	-17.2	4.0	11.3	0.6-6
	5	-11.9	7.3	11.1		1.5	-7.2	12.5	12.5	
	10	-23.1	8.8	12.5		3	-5.9	12.4	12.4	
	20	-19.1	6.1	12.9		6	-0.5	11.0	11.0	
BghiP	1	-7.1	25.5	25.6	1-10	0.6	-7.6	16.5	16.5	0.6-6
	2.5	-5.6	11.1	11.1		1.5	-2.4	12.4	12.4	
	5	-14.5	13.0	13.0		3	2.4	12.9	12.9	
	10	-6.3	5;7	17.8		6	5.8	6.4	6.4	
DaeP	1	26.3	10.0	20.3	1-10	1.5	-4.5	8.1	9.5	1.5-15
	2.5	-15.2	11.7	13.6		3.75	-4.3	12.1	12.1	
	5	-7.2	14.0	18.4		7.5	1.0	10.9	10.9	
	10	-23.5	18.8	18.8		15	7.6	12.4	12.4	
DaiP	2	22.6	14.1	22.3	2-5	1.2	-10.8	9.0	12.1	1.2-12.1
	5	-0.2	14.0	14.0		3	-5.8	7.8	7.8	
	10	-5.9	11.4	12.6		6	-1.1	13.3	13.3	
	20	-4.7	7.5	14.8		12.1	-5.3	5.5	5.5	
DahP	2	27.4	14.3	72.8	4.6-20	2	35	8.3	25.6	3.3-20
	5	7.4	6.5	24.0		5	-2.5	5.8	11.7	
	10	-12.9	11.5	20.0		10	-23.9	10.6	11.6	
	20	-11.9	10.2	16.7		20	-27	15.0	15.0	

## V.5. Conclusion

To our knowledge, this study is the first one which presents the validation based on the total error approach and the accuracy profile of an analytical method for the quantitation of 22 regulated PAHs in maternal and umbilical cord sera by LC/DAD-FD. The analytical method includes a complex sample pretreatment with a protein precipitation followed by SPE on a C18 based silica sorbent and evaporation-redissolution steps, a LC separation and detection by both DAD and FD. The efficiency of the extraction was determined in spiked pooled maternal and umbilical cord bloods and the obtained recoveries ranged from 17 to 82% for maternal sera and between 21 and 87% for umbilical cord sera with SD lower than 17%, these extraction recoveries were used as corrective factors for the validation samples. Using the accuracy profile as a decision tool and according to the PAH and the nature of the serum, 5 different groups of acceptance limits were defined: 40%, 60%, 80%, 80%-30% and 80%-50%. Moreover, this analytical method proved to be reliable with LOQs ranged from 0.5 to 20 ng/mL and from 0.2 to 16 ng/mL in maternal and umbilical cord sera, respectively. In perspective, it will be interesting to develop the same approach in GC/MS in order to obtain a confirmation analytical method for the PAH identification and quantitation. Altogether, twenty maternal and umbilical sera samples from caesarian delivery were analyzed but no PAH was detected.



## **Chapitre VI**

**DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE  
DE CONFIRMATION PAR GC/MS POUR LA  
QUANTIFICATION DES 24 HAP DANS LE SÉRUM  
MATERNEL ET LE SÉRUM DE CORDON OMBILICAL**



## **Chapitre VI. Développement et validation d'une méthode de confirmation par GC/MS pour la quantification des 24 HAP dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical**

Dans le chapitre précédent, nous avons validé une méthode de quantification de 22 HAP par LC/UV-FD dans le sérum maternel et de cordon ombilical, par l'approche des profils d'exactitude. Nous avons montré qu'il était indispensable de fixer différentes limites d'acceptabilité selon le composé et parfois même différentes limites d'acceptabilité selon la concentration étudiée afin d'obtenir une méthode de quantification la plus sensible possible. Ainsi, les HAP ont pu être regroupés en 4 groupes ( $\pm 60\%$ ,  $\pm 80\%$ ,  $\pm 80\%-30\%$ ,  $\pm 80\%-50\%$ ) pour le sérum maternel et 5 groupes pour le sérum de cordon ( $\pm 40\%$ ,  $\pm 60\%$ ,  $\pm 80\%$ ,  $\pm 80\%-30\%$ ,  $\pm 80\%-50\%$ ). Des LOQs, comprises entre 0,5 et 20 ng/mL et entre 0,2 et 16 ng/mL, ont été obtenues pour le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical respectivement. Une vingtaine d'échantillons réels ont été analysés et les résultats obtenus mettent en évidence l'absence de HAP dans ces échantillons. Il est donc indispensable de proposer une méthode complémentaire de confirmation dans le cas où des HAP seraient présents dans ces échantillons réels, mais également dans l'optique d'en doser d'autres.

Rappelons, comme décrit précédemment dans le 0, que les auteurs ont utilisé la GC/MS dans 66% des cas pour la quantification des HAP dans les matrices biologiques (32 études). Les colonnes chromatographiques utilisées étaient des colonnes capillaires classiques apolaires avec une phase stationnaire composée de 95% de copolymère de phényl-méthylpolysiloxane et 5% en phényl. Le spectromètre de masse utilisé dans toutes ces études était un quadripôle. En raison de la stabilité des HAP, l'analyse de ces molécules par spectrométrie de masse utilise l'ionisation par impact électronique (bombardement d'électrons à 70 eV). Par ailleurs, les auteurs ont souvent opté pour la détection en mode SIM afin d'obtenir de meilleures sensibilités. En effet, comparé au mode FS, où une gamme de masses est balayée tout au long de l'analyse, le mode SIM ne balaye que quelques ions caractéristiques sélectionnés, permettant ainsi d'améliorer la sélectivité et la limite de détection, en abaissant le bruit de fond.

Pour les raisons énumérées précédemment mais également, en raison du mécanisme de séparation basé sur les températures d'ébullitions des analytes, et par

conséquent différent de la LC, la GC couplée à une détection MS semble très appropriée comme technique complémentaire de confirmation. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre est le développement et la validation d'une méthode de quantification des 24 HAP en GC/MS. Tout d'abord, différents paramètres ont été étudiés afin d'obtenir la meilleure séparation en termes de résolution, de sensibilité et de reproductibilité. Pour ce faire, différents gradients de température, volumes d'injection, étalons internes et phases stationnaires ont été testés et comparés.

## **VI.1. Matériel et Méthodes**

Les échantillons biologiques ont été obtenus après consentement écrit de la patiente et approbation du comité éthique local (CPP 2015-Mai-13909). Les échantillons de sang du cordon et de la mère ont été recueillis après l'accouchement de patientes provenant de 2 maternités différentes : Antoine Béclère à Clamart et Beaujon à Clichy. Le sérum a été obtenu après centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min. Tous les échantillons de sérum ont été stockés dans des tubes Protein Lobind et conservés à -20°C jusqu'à leurs analyses au laboratoire.

### **VI.1.1. Réactifs chimiques**

L'acétonitrile (ACN) de qualité HPLC et le tétrahydrofurane (THF) ont été achetés par Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'eau déionisée a été obtenue par un système de purification milli-Q (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les solutions étalons des HAP suivants: acénaphthylène (ACY) 99%, cyclopenta[cd]pyrène (CPcdP) 99%, benzo[c]fluorène (BcF) 97%, benzo[j] fluorène (BjF) 99,7%, dibenzo [a, l]pyrène (DalP) 99,8%, dibenzo[a,e]pyrène (DaeP) 99,8%, dibenzo[a,h]pyrène (DahP) 99%, dibenzo[a,i]pyrène (DaiP) 99% à 10 mg/l dans l'ACN et une solution étalon des 16 HAP US-EPA à 100 mg/l dans l'ACN ont été achetés chez Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). Une solution aqueuse contenant 10% (p/v) de dodécyl sulfate de sodium (SDS) a été achetée chez Thermofisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Les différentes solutions de HAP utilisées au cours de cette étude ont été préparées à partir de solutions individuelles à une concentration de 10 mg/L dans l'ACN (CIL Cluzeau). Une solution stock d'ACN contenant le carbazol, le 3-méthyle-anthracène et le 9-méthyle-chloranthrène (Sigma Aldrich) dans l'ACN respectivement à une concentration de 200 ng/mL, 300 ng/mL et 3000 ng/mL a été préparée. Toutes les solutions ont été conservées au frais jusqu'à leur utilisation (6°C).

### **VI.1.2. Système chromatographique et conditions d'analyse**

Les analyses chromatographiques étaient réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A couplé à un spectromètre de masse Agilent 5975 inert

XL MSD avec une source d'ionisation à impact électronique (EI). Le dispositif était équipé d'un bras passeur MPS (Multi Purpose Sampler) de la marque Gerstel, permettant des injections liquides automatisées. Le gaz vecteur était de l'hélium et le débit imposé dans la colonne était de 1,2 mL/min. L'injecteur a été chauffé à 280°C. L'injection a été réalisée en mode splitless avec un volume d'échantillon de 1 µL. La détection était réalisée en mode SIM (Single Ion Monitoring) avec une source d'ionisation à impact électronique et la ligne de transfert chauffée à 280°C, une énergie d'ionisation de 70 eV et un quadripôle chauffé à 180°C. Le reste des conditions expérimentales, notamment le gradient de température du four sera détaillé dans la partie résultats. Deux colonnes ont été testées au cours de cette étude : la colonne Zebron ZB-PAH (Phenomenex) d'une longueur de 20 m avec un diamètre interne de 0,18 mm et une épaisseur de film de 0,14 µm et la colonne J&W DB-17MS (Agilent Technologies) d'une longueur de 20 m avec un diamètre interne de 0,18 mm et une épaisseur de film de 0,18 µm.

### VI.1.3. Préparation d'échantillon

Les cartouches SPE utilisées étaient les suivantes : Hypersep de ThermoFisher Scientific (Villebon, Coutaboef, France) remplies avec 25 mg de phase stationnaire octadécyle trifonctionnelle (taille des particules : 40 à 63 µm, taille des pores : 60 Å, surface spécifique : 520 m<sup>2</sup>/g, taux de carbone : 21 à 23%). Le protocole utilisé était le même que celui décrit précédemment dans les chapitres 5 et 6 avec de légères modifications afin de permettre l'analyse des extraits finaux en GC. Ainsi, pour ce faire, 100 µL de sérum maternel ou de cordon ombilical ont été dopés à 30 ng/mL pour chaque HAP excepté le DaiP, le DalP, le DaeP et le DahP introduits à 100 ng/mL. Une solution aqueuse contenant 10% de dodécylsulfate de sodium (Thermofisher Scientific) a été ajoutée pour atteindre une concentration finale de 0,2% (p /v) dans l'échantillon. L'échantillon a été vortexé et 233 µL d'ACN ont été ajoutés. Une centrifugation à 4500 tr/min pendant 30 min à 4 °C a été réalisée. Ensuite, 300 µL de surnageant ont été récupérés auxquels 120 µL d'eau ont été ajoutés pour obtenir une teneur finale en ACN de 50% (v/v). L'étape de SPE a été entièrement automatisée à l'aide d'un automate GX271 (Gilson). Ainsi, 400 µL de ce mélange ont été percolés sur la cartouche SPE. Une étape de lavage avec 100 µL d'ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) suivie par une étape de séchage et d'élution des HAP avec 300 µL de THF ont été mises en œuvre. Enfin, 40 µL de toluène ont été ajoutés

à la fraction d'éluion qui était ensuite vortexée et évaporée. L'extrait final a été repris avec 90  $\mu\text{L}$  d'ACN et 10  $\mu\text{L}$  de la solution stock d'étalon interne avant son injection en GC/MS (1  $\mu\text{L}$ ).

#### **VI.1.4. Validation**

La validation a pour principal objectif de démontrer l'aptitude et la fiabilité d'une méthode analytique. Pour valider la méthode analytique globale mise en œuvre pour la quantification des HAP d'intérêt dans le sérum maternel et le cordon ombilical, l'approche des profils d'exactitude a été choisie. Pour réaliser cette validation, deux types d'échantillons ont été préparés : les solutions d'étalonnage dans l'ACN servant à la calibration de l'analyse et les témoins de validation. La validation s'est déroulée sur 3 jours.

##### **VI.1.4.1. Solutions d'étalonnage**

Tout d'abord, des solutions d'étalonnage dans l'ACN avec des concentrations comprises entre 1 ng/mL et 200 ng/mL pour chaque HAP ont été préparées. Les courbes d'étalonnages ont été tracées à partir de 4 niveaux de concentration pour chaque HAP. Ces solutions ont été préparées le premier jour de validation uniquement et les solutions étaient stockées au frais (6°C). A chaque nouveau jour de validation, des nouveaux flacons ont été remplis avec les solutions préparées le premier jour de validation pour être injectées en GC/MS. Ainsi, au total, 12 injections ont été réalisées.

##### **VI.1.4.2. Témoins de validation**

Les témoins de validation ont été obtenus à partir d'un pool de sérum maternel et d'un autre de sérum de cordon ombilical dopé à différents niveaux de concentration correspondant à environ 1 ; 2,5 ; 5 et 10 fois la limite de quantification instrumentale ( $S/N=10$ ) estimée dans la matrice. Ainsi, les concentrations étaient comprises entre 1,6 et 180 ng/mL. Pour chaque niveau de concentration, 3 témoins ont été préparés et pour chaque sérum, un témoin non dopé était également préparé. En tout, il y avait donc 13 témoins de validation par sérum. Par la suite, ces échantillons ont été soumis au protocole de préparation d'échantillon décrit dans la section précédente avant leurs injections en GC/MS. Cette validation a été réalisée sur 3 jours consécutifs. En raison de la quantité limitée des échantillons de sérum, l'étape de traitement de l'échantillon a été réalisée

uniquement le premier jour de validation avec les 13 témoins de validation. Les extraits étaient ensuite stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  à la fin de chaque jour de validation en attendant leur réinjection le jour suivant.

## VI.2. Résultats

### VI.2.1. Mise au point de la séparation

La mise au point de la séparation a d'abord été réalisée sur la colonne Zebron ZB-PAH (Phenomenex). Dans un premier temps, le gradient de température a été mis au point et ensuite différents volumes d'injection ont été testés. Rappelons que les injections ont été effectuées en mode splitless tandis que tous les autres paramètres étaient constants (cf. VI.1.2). Le **Tableau 3** rappelle la masse moléculaire de chaque HAP ainsi que leur température d'ébullition.

*Tableau 3: Température d'ébullition et masse moléculaire des 24 HAP*

HAP	Point d'ébullition ( $^{\circ}\text{C}$ )	Masse moléculaire (g/mol)
NAPH	218	128
ACE	280	152
ACY	279	154
FLO	295	166
PHE	340	178
ANT	340	178
FLT	375	202
PYR	393	202
BcF	398	216
BaA	437	228
CPcdP	438	226
CHR	448	228
5MCHR	449	242
BbF	481	252
BkF	481	252
BjF	480	252
BaP	495	252
IcdP	536	276
DahA	524	278
BghiP	550	276
DaIP	552	302
DaeP	552	302
DaiP	552	302
DahP	552	302

### VI.2.1.1. Gradient de température

Dans le but d'obtenir, une résolution satisfaisante ainsi qu'une durée d'analyse relativement courte des 24 HAP d'intérêt, l'optimisation du gradient de température a représenté une étape clé de ce développement analytique. Ainsi, le point de départ de ce travail a été le gradient fourni par le fabricant sur cette colonne ZB-PAH pour la séparation des 24 HAP réglementés. Cette colonne a été choisie car c'est une colonne "spéciale HAP" (phase stationnaire confidentielle) dont les performances décrites dans la note d'application semblent appropriées et satisfaisantes pour notre étude (meilleures résolutions pour la séparation des paires et triplets critiques d'isomères de HAP et résistance thermique pour la séparation des HAP les plus lourds). Le gradient du fabricant est présenté dans le **Tableau 4**. Il est à noter que dans la procédure du fabricant, les HAP ont été dilués dans de l'hexane tandis que nos extraits ont été dilués dans l'ACN. Dans un premier temps, l'influence de la température initiale du gradient sur la forme des pics des HAP les plus légers a été étudiée. Pour ce faire, les expériences ont été réalisées avec une solution d'ACN contenant les 9 HAP les plus volatils, à savoir le NAPH, l'ACY, l'ACE, le FLO, le PHE, l'ANT, le FLT, le PYR et le BcF à une concentration de 1 mg/L.

**Tableau 4** : Gradient de température utilisé par Phenomenex pour la séparation des 24 HAP réglementés en GC/MS

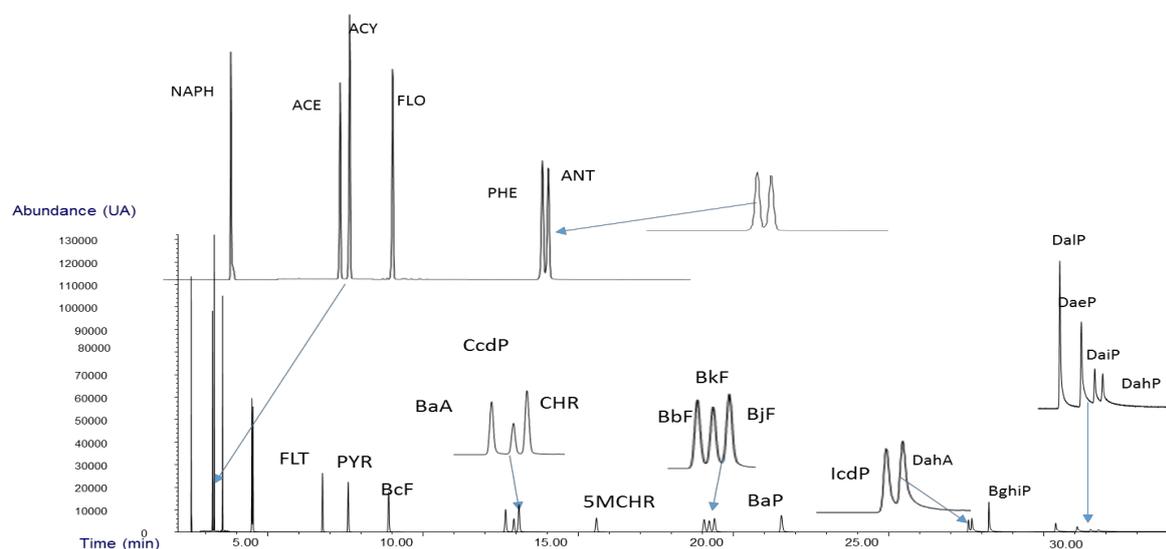
Rampe (°C/min)	Température (°C)	Temps palier (min)
	70	0,8
70	210	0
2,5	220	0
3	280	0
40	335	5

Chaque température de début de gradient a toujours été maintenue constante pendant 0,8 min. Idéalement, l'effet recherché était une recondensation complète de tous les HAP en tête de colonne. Ainsi, 5 températures de début de gradient ont été testées : 50, 60, 70, 80 et 90°C. Plus la température initiale était élevée, plus le pic du NAPH, présentait une trainée. D'après les résultats obtenus, il semblerait donc qu'une température de 50°C soit la température idéale pour obtenir un pic symétrique de NAPH. Néanmoins, plus cette température initiale était basse (sur la plage 50 – 90°C), plus les 5 pics des HAP élués après le NAPH (ACY, ACE, FLO, PHE et ANT) étaient déformés, avec une trainée avant, affectant en plus la résolution du couple PHE/ANT. En effet, les résolutions obtenues pour ce couple d'isomères étaient comprises entre 1,05 (50°C) et 1,60 (90°C). En revanche, pour le FLT, le PYR et le BcF, aucune déformation des pics correspondant n'était observée avec les différentes températures testées. Ces déformations de pics étaient probablement dues à la nature du solvant de dilution utilisé, à savoir l'ACN dans cette étude. Rappelons que la température d'ébullition de l'ACN est 82°C. Cependant, le comportement du NAPH en présence d'ACN est très différent des autres HAP, plus lourds et possédant des températures d'ébullition bien plus importantes (218°C pour le NAPH et supérieure à 280°C pour les autres composés présents dans le mélange). C'est pourquoi, à ce stade de l'étude, un compromis a été fait et la température initiale du gradient a été fixée à 70°C pendant 0,8 min. Ensuite, le gradient préconisé sur la colonne ZB-PAH a été modifié afin de conserver des résolutions supérieures ou égales à 1,2 pour l'analyse des 24 HAP. En outre, le but était de réaliser une séparation rapide pour ces composés en moins d'une heure. En effet, le fait de réduire le temps d'analyse permettait de limiter la dilution dans la colonne des derniers HAP, plus particulièrement les dibenzoapyrènes, et ainsi améliorer leur sensibilité. Le gradient finalement retenu est présenté dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5** : Gradient de température développé pour la séparation des 24 HAP réglementés en GC/MS avec la colonne ZB-PAH

Rampe (°C/min)	Température (°C)	Temps palier (min)
	70	0,8
70	210	0
2,5	220	0
3	280	0
40	335	5

La séparation des 24 HAP a été obtenue en 35 min (cf. **Figure 21**). Parallèlement, à ce stade de l'étude, la détection MS a été optimisée et réalisée en mode SIM. Pour chaque HAP, un ion de quantification a été déterminé. Le **Tableau 6** présente le temps de rétention de chaque HAP et la valeur M/Z choisie pour sa détection en mode SIM.

**Figure 21**: Chromatogramme de la séparation des 24 HAP sur la colonne ZB-PAH (concentration des HAP : 100 ng/mL, détection MS : Mode SIM, volume d'injection : 1 µL)

**Tableau 6** : Temps de rétention des 24 HAP et M/Z choisi pour leur détection en mode SIM

Composé	t <sub>R</sub> (min)	Ion pour la quantification
NAPH	2,5	128
ACY	3,2	152
ACE	3,3	154
FLO	3,5	166
PHE	4,5	178
ANT	4,5	178
FLT	6,7	202
PYR	7,7	202
BcF	9,1	216
BaA	13,0	228
CcdP	13,2	226
CHR	13,4	228
5MCHR	15,9	242
BbF	19,4	252
BkF	19,6	252
BjF	19,8	252
BaP	21,9	252
IcdP	25,3	276
DahA	25,4	278
BghiP	26,0	276
DalP	29,2	302
DaeP	30,3	302
DaiP	31,0	302
DahP	31,4	302

### VI.2.1.2. Volume d'injection

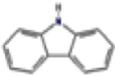
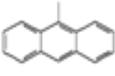
Pour cette étude, une injection splitless a été choisie afin d'obtenir les meilleures sensibilités. En effet, l'avantage de ce type d'injection est une introduction de la plus grande partie de l'échantillon injecté dans la colonne. Il en résulte ainsi une sensibilité nettement plus élevée que celle obtenue en split. Toute l'optimisation précédente du gradient a été réalisée avec un volume d'injection de 1  $\mu$ L. Dans le but d'améliorer les limites de détection et de quantification, un volume d'injection de 2  $\mu$ L a été testé, également, avec une solution d'ACN contenant les 24 HAP à 10 ng/mL. Les résultats obtenus ont montré qu'une augmentation du volume d'injection affectait la forme des pics de l'ACE au PYR. En effet, une déformation avant de ces pics a été observée, reflétant ainsi une surcharge de la colonne. Cependant, la symétrie du pic du NAPH et des HAP les plus lourds n'a pas été affectée. Les LOQs (S/N=10) ont été déterminées à partir d'injections de solutions standards. Ainsi, elles ont été améliorées d'environ un facteur 2. Cependant, en raison de la surcharge de la colonne pour les HAP les plus légers mais aussi dans le but d'étudier les 24 HAP simultanément, un compromis a été fait et le volume d'injection a été

fixé à 1  $\mu\text{L}$  pour le reste de l'étude. Des LOQs comprises entre 0,3 et 54 ng/mL ont été obtenues avec ce volume d'injection.

### VI.2.1.3. Étalons internes

Afin de s'affranchir des problèmes d'injection propres à la GC, des étalons internes ont été introduits. Le choix des étalons internes est très important car ces derniers doivent avoir un comportement analytique similaire aux molécules ciblées. C'est pourquoi, lorsque les molécules deutérées sont commercialement disponibles, il est recommandé de les utiliser pour l'étalonnage interne car ces molécules ont plus de chance d'avoir un comportement similaire à la molécule non deutérée. Cependant, en raison du prix élevé de ces molécules, des composés aromatiques tels que le nitropyrene, le pyrelène, le carbazole, le 3-méthyl-chloranthrène et le 9-méthyl-anthracène ont été testés comme potentiels étalons internes. Finalement, seuls le carbazol, le 9-méthyle-anthracène et le 3-méthyle-chloranthrène ont été retenus en raison de leur temps de rétention adéquat avec la séparation développée. Vu leurs temps de rétention, le carbazol a été utilisé comme étalon interne pour les 6 premiers HAP (du NAPH jusqu'à l'ANT), le 9-méthyl-anthracène pour les 11 suivants (du FLT jusqu'au BaP), et le 3-méthylchloranthrène pour les 7 derniers (du IcdP jusqu'au DahP). Le **Tableau 7** présente les différentes propriétés physico-chimiques des étalons internes choisis.

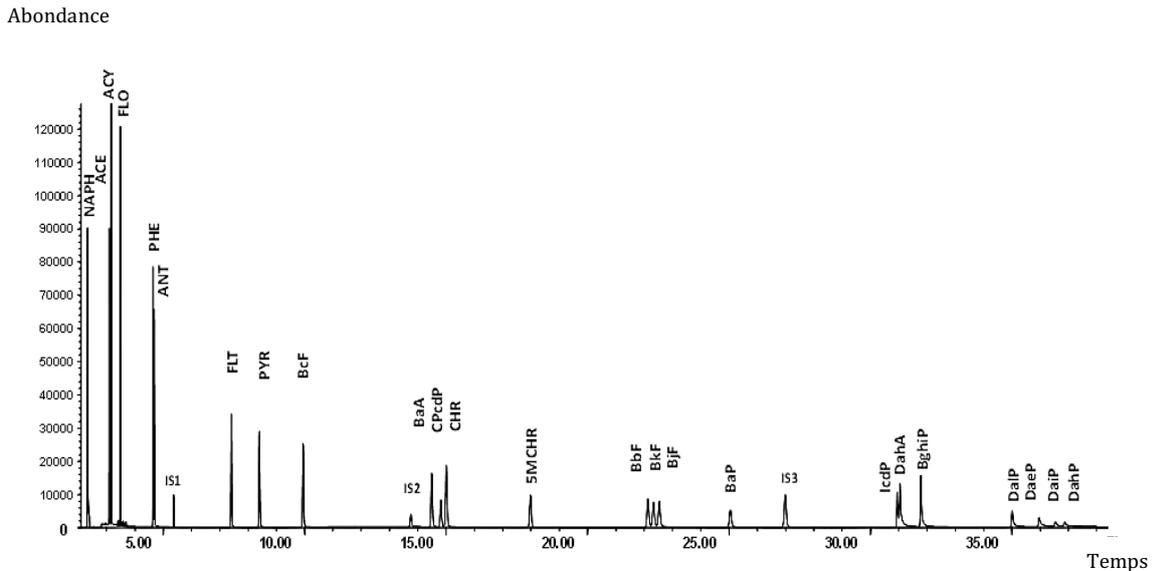
**Tableau 7:** Caractéristiques et propriétés physico-chimiques des étalons internes choisis

Structure	Nom chimique	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/l)	Point d'ébullition (°C)	$t_R$ (min)	m/z pour la détection SIM
	Carbazol	167,2	1,8 mg/L	355	5,1	167
	9-Méthylanthracène	192,3	-	205	12,3	192
	3-Méthylchloranthrène	268,4	$2,9 \times 10^{-3}$ mg/L	280	23,2	268

#### VI.2.1.4. Comparaison de différentes colonnes

Comme exposé précédemment dans le chapitre 2, les colonnes de GC les plus utilisées pour la séparation des HAP dans les échantillons biologiques sont des colonnes possédant des phases stationnaires apolaires (5% phényl-95 méthyl polysiloxane). Cependant, des revues ont montré que ces colonnes présentaient certains inconvénients [82,127]. En effet, la séparation des HAP isomères et en particulier du trio BbF, BkF et BjF est difficile. De plus, une perte de sensibilité au niveau des HAP les plus lourds et plus particulièrement les dibenzoapyrènes est souvent observée. C'est pourquoi, afin de s'affranchir de ces deux problèmes, il est préconisé de travailler avec des colonnes possédant des phases stationnaires de polarité moyenne (50% phényl-50% méthyl polysiloxane). Ainsi, à ce stade de l'étude, les conditions de séparation et de détection développées ont été testées sur la colonne DB 17MS, de polarité moyenne (50% phényl-50% méthyl polysiloxane) possédant les caractéristiques géométriques très proches de la colonne ZB-PAH (cf. VI.1.2), mais dont la nature de la phase stationnaire est confidentielle.

Les résultats ont montré que les résolutions obtenues pour le couple ANT/PHE (1,6) ainsi que pour le trio BbF/BkF/BjF (1,2/ 1,3) sont similaires (cf. **Figure 22**). Cependant, en raison de l'épaisseur de film plus importante de la colonne DB-17MS, les 24 HAP ont été séparés en 35 min contre 32 min avec la colonne ZB-PAH. De plus, étant donné que l'ordre d'élution des HAP ainsi que les résolutions des paires critiques d'isomère sont similaires avec les 2 colonnes, il semblerait que la phase stationnaire de la colonne ZB-PAH se comporte comme une phase stationnaire moyennement polaire contenant 50% de phényl et 50% de méthyl polysiloxane, légèrement modifiée afin d'être brevetée.



**Figure 22** : Chromatogramme de la séparation des 24 HAP et des 3 étalons internes avec la colonne DB 17MS (solution de HAP : 100 ng/mL dans l'ACN, Volume d'injection : 1  $\mu$ L en mode splitless, gradient de température : cf. Tableau 2, détection : SIM cf. Tableau 3)

Par ailleurs, les LOQs ( $S/N=10$  à partir d'injections de solutions standards) ont été déterminées avec la colonne DB 17MS et comparées à celles obtenues avec la colonne ZB-PAH. Le **Tableau 8** présente les valeurs obtenues pour chaque HAP avec chacune des colonnes. Globalement, les valeurs augmentent avec la rétention des HAP, certainement parce que les pics sont de plus en plus larges, donnant ainsi des LOQs pouvant atteindre jusqu'à 54 ng/mL pour le DahP avec la colonne ZB-PAH contre 25 ng/mL avec la colonne DB 17MS. Par ailleurs, les LOQs du NAPH jusqu'au BjF sont similaires pour les 2 colonnes et sont comprises entre 0,3 et 3 ng/mL. Cependant, pour certains HAP, notamment les plus lourds, quelques différences ont été reportées. En effet, la LOQ du BaP est 2 fois plus élevée avec la colonne DB 17MS (2 ng/ml). Une autre observation importante porte sur la différence notable des LOQs obtenues pour les HAP possédant 6 à 7 cycles (IcdP à DahP) entre les 2 colonnes. Les LOQs avec la colonne DB 17MS sont environ 2 à 2,5 fois plus basses (cf. **Tableau 8**). C'est pourquoi, la colonne DB 17MS a finalement été retenue pour le reste de cette étude.

Composé	ZB-PAH	DB 17MS
NAPH	0,4	0,5
ACE	1,2	1,4
ACY	0,8	0,7
FLO	0,6	0,4
PHE	0,5	0,5
ANT	0,6	0,6
FLT	0,4	0,5
PYR	0,6	0,8
BcF	0,6	1,1
BaA	1,3	1,3
CPcdP	2,1	3,2
CHR	1,2	1,1
5MCHR	2,1	3,0
BbF	1,2	1,0
BkF	1,4	2,0
BjF	1,5	1,0
BaP	1,3	2,0
IcdP	6,1	2,5
DahA	8,5	4,4
BghiP	3,2	2,5
DaiP	11,0	8,3
DaeP	22,4	11,2
DaiP	42,0	26,0
DahP	54,0	28,0

**Tableau 8:** Limites de quantification ( $S/N=10$ ) pour les colonnes ZB-PAH et DB-17MS (détermination à partir de solutions de HAP à 5, 10 et 100 ng/mL, Volume d'injection : 1  $\mu$ L)

Le gradient précédemment développé a été légèrement modifié pour la colonne DB 17MS afin de ne pas abimer cette dernière. En effet, il a été observé au cours du temps que les conditions de gradient précédemment utilisées étaient trop drastiques et réduisaient la durée de vie des colonnes. Ainsi, le nouveau gradient démarre plus haut en température et finit également plus haut. De plus, le palier en fin de gradient a été supprimé et la durée totale de l'analyse est donc passée de 32 min à 38 min (cf. **Tableau 9**).

**Tableau 9:** Gradient développé pour la colonne DB 17MS

Rampe (°C/min)	Température (°C)	Temps palier (min)
	90	0,8
70	210	0
2,5	277	0
40	320	0
2,5	340	0

### VI.2.2. Rendements d'extraction

A ce stade de l'étude, maintenant que la séparation et la détection en GC/MS ont été développées et optimisées, les rendements d'extraction ont été déterminés à nouveau à partir de 100  $\mu$ L d'un pool de sérums maternel et de sérums de cordon ombilical dopés à 30 ng/mL pour chaque HAP excepté le DaiP, le DalP, le DaeP et le DahP introduits à 100 ng/ml. En effet, cette étape était importante puisque de légères modifications au protocole utilisé dans les chapitres précédents ont été apportées (cf **section VI.1.3**). L'extrait final a été repris dans 100  $\mu$ L d'ACN au lieu de 100  $\mu$ l d'un mélange eau/ACN (1/1, v/v). De plus, il est important d'évaluer les effets matrices avec ce nouveau détecteur. Par ailleurs, ces valeurs vont nous permettre de corriger les profils d'exactitude lors de l'étape de validation du protocole analytique.

Tout d'abord, des courbes d'étalonnage ont été faites à l'aide de solution d'ACN contenant les HAP à des concentrations comprises entre 1 et 200 ng/mL avec 4 niveaux de concentration. Dans un premier temps, un modèle d'étalonnage avec des droites affines a été évalué. Les résultats obtenus ont montré que cette modélisation était satisfaisante pour les HAP de faible poids moléculaires allant du NAPH au BcF. En revanche, pour les autres HAP, cette modélisation n'était pas satisfaisante et ne permettait pas de décrire correctement les courbes d'étalonnage des HAP, présentant des écarts-types de plus en plus marqués. C'est pourquoi, un modèle polynomial de second degré a été testé. Il a permis d'obtenir des résultats très satisfaisants pour les 24 HAP. Par ailleurs, notons que les courbes d'étalonnage obtenues avec ce modèle mathématique étaient toutes de forme concave. Cette forme inhabituelle laisserait penser que le taux d'ionisation au niveau de la source du spectromètre de masse augmente avec la concentration présente en HAP. Au vu de ces résultats, un modèle quadratique (polynôme du second degré) a été retenu pour la suite de l'étude. Ensuite, pour chaque matrice, les rendements ont été déterminés en faisant 3 répétitions. Par ailleurs, il a été également vérifié que ces pools de sérum ne

contenaient pas de HAP endogènes. Comme décrit précédemment dans le chapitre 6, seul le PHE a été retrouvé à une concentration de 5 ng/ml, résultant probablement de l'utilisation du toluène au cours du protocole de préparation d'échantillon. Les rendements obtenus sont présentés dans le **Tableau 10** pour des échantillons des pools de sérums maternels et de sérums de cordon ombilical dopés à 30 ng/mL pour tous les HAP excepté le DalP, DaeP, DaiP et le DahP à 100 ng/mL (n=3).

**Tableau 10** : Rendements d'extraction obtenus pour des échantillons de sérums maternels et de sérums de cordon ombilical dopés à 30 ng/mL pour tous les HAP excepté le DalP, le DaeP, le DaiP et le DahP à 100 ng/mL (n=3)

Composés	sérum maternel		sérum de cordon ombilical	
	R (%)	Écart-type(%)	R (%)	Écart-type(%)
<b>NAPH</b>	25	12	29	15
<b>ACE</b>	27	10	28	8
<b>ACY</b>	33	14	38	9
<b>FLO</b>	47	13	39	11
<b>PHE</b>	55	12	48	13
<b>ANT</b>	53	10	81	15
<b>FLT</b>	78	12	69	6
<b>PYR</b>	80	10	78	8
<b>BcF</b>	78	8	75	5
<b>BaA</b>	95	10	91	4
<b>CPcdP</b>	18	2	22	5
<b>CHR</b>	108	15	100	8
<b>5MCHR</b>	111	12	90	11
<b>BbF</b>	103	12	103	6
<b>BkF</b>	102	10	105	8
<b>BjF</b>	99	13	101	8
<b>BaP</b>	79	12	82	12
<b>IcdP</b>	27	6	38	2
<b>DahA</b>	36	6	44	2
<b>BghiP</b>	28	6	40	2
<b>DalP</b>	20	4	32	4
<b>DaeP</b>	34	4	50	2
<b>DaiP</b>	< LOQ	-	< LOQ	-
<b>DahP</b>	< LOQ	-	< LOQ	-

Notons tout d'abord que les rendements obtenus restent similaires d'une matrice à l'autre, excepté pour l'ANT où le rendement d'extraction dans le sérum de cordon est plus élevé. Les rendements pour les HAP les plus légers, du NAPH au PHE sont faibles,

compris entre 25 et 55% avec des valeurs d'écart-types importantes comprises entre 8 et 15%. Ces faibles rendements sont dus aux pertes lors de l'étape de séchage mais également lors de l'étape d'évaporation. De même pour les HAP de hauts poids moléculaires, (IcdP à DaeP), les rendements sont également faibles, compris entre 20 et 50% avec des valeurs d'écart-types comprises entre 2 et 6%. Cette perte importante pour les HAP les plus lourds est probablement liée à plusieurs facteurs. Tout d'abord, cette perte peut être due à l'adsorption des HAP sur les parois des flacons et donc une mauvaise reprise de l'extrait après l'étape d'évaporation. Une autre possibilité est un problème d'ionisation de ces HAP dans la matrice. En effet, notons qu'il n'a pas été possible de déterminer les rendements d'extraction pour le DaiP et le DahP, les 2 HAP les plus lourds, en raison de signaux chromatographiques inférieurs à la LOQ. Ainsi, d'après cette dernière observation, l'hypothèse d'une perte liée au système de détection semble plus probable. En outre, les écart-types obtenus pour les HAP les plus lourds en GC sont plus petits que ceux obtenus en LC (cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable.). En effet, cela est certainement dû au solvant utilisé pour la resuspension de l'extrait après l'étape d'évaporation. Rappelons qu'en LC, l'extrait est repris dans 100 µL d'un mélange H<sub>2</sub>O/ACN (1/1, v/v) alors qu'en GC, il est repris avec 100 µL d'ACN. Il est donc probable qu'en GC les problèmes de reprise soient moins importants conduisant ainsi à moins de variabilités et par conséquent des écart-types plus petits. Enfin, pour tous les autres HAP, les rendements sont corrects, de 53 à 111% avec des écart-types compris entre 2 et 15%, excepté pour le CPcdP dont le rendement est de l'ordre de 20% pour les deux matrices. Il est fortement possible que les faibles rendements obtenus pour ce composé soient également dus à une mauvaise ionisation dans la matrice

### VI.2.3. Validation

Maintenant que la méthode de séparation et de détection a été développée et que les rendements d'extraction dans les 2 matrices ont également été déterminés, il est important de valider la méthode afin de déterminer ses performances analytiques obtenues. La validation vise donc à établir, sur la base de résultats expérimentaux, si les performances de la méthode sont conformes à ses exigences. Cela nécessite donc l'évaluation à la fois de la justesse et de la précision intermédiaire, c'est-à-dire de la précision dans le même laboratoire, dans des conditions différentes (par exemple, des

jours différents). La combinaison de la justesse et de la précision est appelée erreur totale. Comme précédemment dans le Erreur ! Source du renvoi introuvable., une approche statistique basée sur l'approche de l'erreur totale et le profil d'exactitude a été utilisée dans cette étude. Cette méthode, utilisant un intervalle de tolérance et un profil d'exactitude, garantit qu'une proportion définie ( $\beta$ ) des mesures futures obtenues avec la méthode analytique sera incluse dans les limites attendues. La probabilité minimale  $\beta$  a été fixée à 80%. Cette approche statistique originale a été appliquée avec succès dans le Erreur ! Source du renvoi introuvable.. Le but de notre étude, ici est donc de valider la méthode développée en GC/MS pour l'analyse des 24 HAP dans les sérums avec les LOQs les plus sensibles possibles, malgré leurs comportements différents (cf. **Tableau 10**). C'est pourquoi, étant donné qu'il n'existe aucune norme concernant les HAP dans les matrices biologiques, nous avons fixé les limites d'acceptabilité selon les comportements de nos composés. La validation s'est déroulée sur 3 jours et les témoins de validation ont été dopés à des concentrations comprises entre 1,4 et 180 ng/mL.

Notons que les LOQs de la procédure analytique sont généralement données par l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptabilité. S'il n'y a pas d'intersection, le premier témoin de validation correspond à la LOQ du HAP en question. Afin de prendre en compte les différents comportements des HAP, il a été nécessaire d'abord de tracer les profils d'exactitude avant de pouvoir définir les limites d'acceptabilité. Le but était donc de fixer des limites d'acceptabilité permettant de définir le premier niveau de calibration en tant que LOQ tout en définissant des groupes selon les comportements des différents HAP. Il a été convenu de ne pas fixer des limites d'acceptabilité supérieures à 80%. De plus, comme décrit précédemment dans le Erreur ! Source du renvoi introuvable., nous nous attendions à avoir une plus grande dispersion aux faibles concentrations (premier et/ou deuxième témoin de validation) par rapport au reste du domaine d'étude pour certains HAP. C'est pourquoi, un changement des limites d'acceptabilité sur le domaine d'étude a également été envisagé quand cela était nécessaire. Afin de faciliter la transposition de cette procédure analytique en routine, un modèle d'étalonnage commun à tous les HAP a été choisi. Les profils d'exactitude de chaque composé ont donc été tracés à l'aide d'un modèle d'étalonnage quadratique comme défini précédemment.

Par ailleurs, il est important de noter qu'en raison des problèmes rencontrés pour déterminer les rendements du DaiP et du DahP et en raison de leur LOQs élevées, il a été décidé d'éliminer ces 2 composés de la validation. En outre, en raison de la présence de nombreux interférents au début du chromatogramme, certainement due à un relargage de composés présents au niveau du septum des flacons utilisés, la quantification du NAPH à faibles concentrations (inférieures à 30 ng/mL) n'a pas été possible. C'est pourquoi, ce composé a également été éliminé de la validation. Enfin, au cours de la validation, au fur et à mesure des jours de validation, il a été observé que l'étalon interne choisi pour corriger le volume d'injection des HAP allant de l'IcdP au DaeP n'avait pas le même comportement que les composés en question. Ces composés n'ont donc pu être validés. Ainsi, la validation de la procédure analytique a été faite pour seulement 16 composés sur les 24. La **Figure 23** présente les profils d'exactitude obtenus pour ces 16 composés pour le sérum maternel et pour le sérum de cordon ombilical. Rappelons que pour tracer ces profils d'exactitude, étant donné qu'un biais systématique existait, les valeurs déterminées plus haut pour les rendements d'extraction ont été utilisées pour les corriger (cf. **Tableau 10**). La procédure analytique est valide tant que l'intervalle  $\beta$  (droites bleues) est compris entre les deux droites rouges en pointillées, qui symbolisent les limites d'acceptabilité. Comme déjà observé au Erreur ! Source du renvoi introuvable., des profils très différents ont été obtenus. Afin de réaliser les meilleurs compromis entre limites de quantification et limites d'acceptabilité, il est apparu nécessaire de séparer les HAP en différents groupes. Le **Tableau 11** présente ainsi les différents groupes déterminés pour chaque matrice. Ainsi, 5 groupes différents de limites d'acceptabilité ont été définis pour le sérum maternel et 4 pour le sérum de cordon. Notons, tout de même, que la majorité des composés dans le sérum maternel (9 HAP) ont été validés avec une limite d'acceptabilité de 80%. Ces composés sont principalement les HAP légers (ACY, PHE, ANT, FLT) mais aussi d'autres HAP de poids moléculaires plus importants comme le PYR, le BaA, le 5MCHR, le CHR et le B<sub>j</sub>F. En outre, pour certains composés tels que le B<sub>b</sub>F, l'ACE et le BaP, des limites d'acceptabilité de type affine (80% + 50% ou 80% + 60 %) ont été définies. En effet, d'après la **Figure 23**, on peut remarquer que pour ces composés, il n'aurait pas été avantageux de fixer une limite d'acceptabilité unique sur tout le domaine d'étude. Cependant, pour d'autres HAP tels que le B<sub>c</sub>F, le CPcdP et le B<sub>k</sub>F ou encore le FLO, il était plus judicieux de fixer une limite d'acceptabilité constante (30% ou 60%) sur tout le domaine d'étude et différente selon le composé en question. Ainsi, cette description

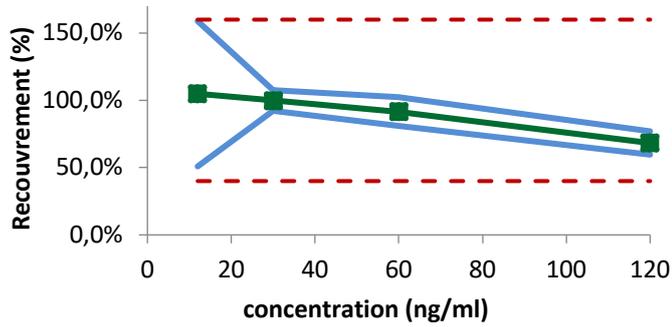
détaillée pour le sérum maternel, montre la complexité dans notre étude de prévoir les limites d'acceptabilité attendues, en raison des comportements différents des HAP, et par conséquent démontre tout l'intérêt de procéder de la façon décrite précédemment pour définir le cahier des charges de la méthode. Enfin, des LOQs comprises entre 1,6 et 20 ng/ml pour le sérum maternel ont été obtenues.

De manière similaire, 4 groupes ont été déterminés pour le sérum de cordon. Cependant à la différence du sérum maternel, les composés ont été majoritairement validés avec des limites d'acceptabilité de 80% (4 HAP) ou de 60% (4 HAP). Par ailleurs, d'après la **Figure 23**, nous pouvons noter qu'il était encore une fois plus intéressant de définir des limites d'acceptabilité de type affine pour les composés suivants : FLO, FLT, BaA, CHR, CPcdP et BaP (80%-50% ou 80%-60 %). Ainsi, des LOQs comprises entre 1,5 et 12 ng/ml ont été obtenues. Enfin, comme le montre la **Figure 23**, il n'y a pas d'intersection entre les profils d'exactitude et les limites supérieures d'acceptabilité, pour la gamme de concentration étudiée pour les 2 matrices. Par conséquent, les limites supérieures de la procédure analytique correspondent à la concentration la plus élevée testée pour chaque matrice et chaque HAP. Elles sont donc comprises entre 15 et 120 ng/mL et 12 et 120 ng/mL dans les échantillons respectivement de sérums maternels et de sérums de cordon ombilical.

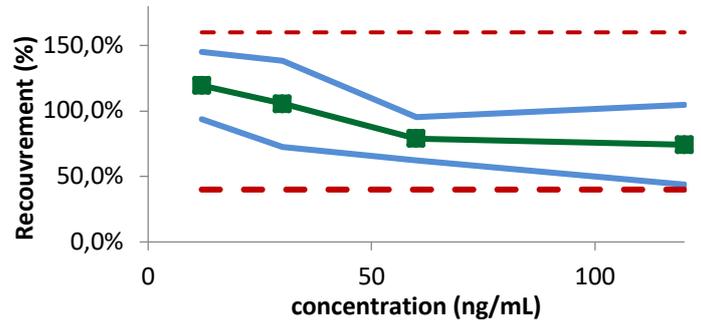
**Tableau 11** : Les différents groupes de limites d'acceptabilité définis pour les HAP dans chaque matrice

Limites d'acceptabilité	Sérum maternel	Sérum de cordon
80%	ACY, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, 5MCHR, B <sub>j</sub> F,	ACY, PHE, ANT, B <sub>j</sub> F, B <sub>b</sub> F
60%	B <sub>c</sub> F, CPcdP, B <sub>k</sub> F	ACE, PYR, B <sub>c</sub> F, B <sub>k</sub> F
80% +60%	B <sub>b</sub> F	BaA, CHR, BaP
80% +50%	ACE, BaP	FLO, FLT, CPcdP, 5MCHR
30%	FLO	-

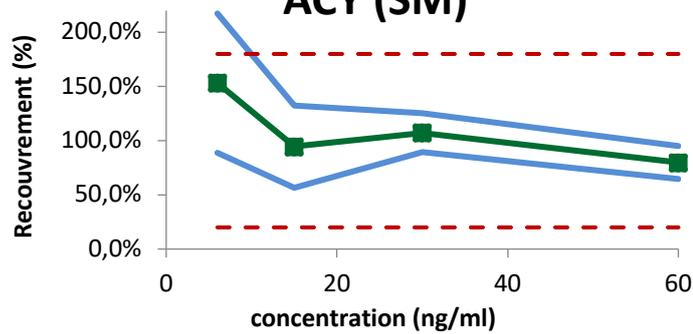
**ACE (SM)**



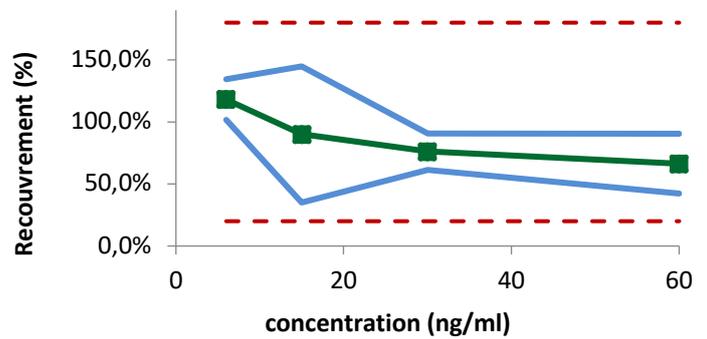
**ACE (SC)**



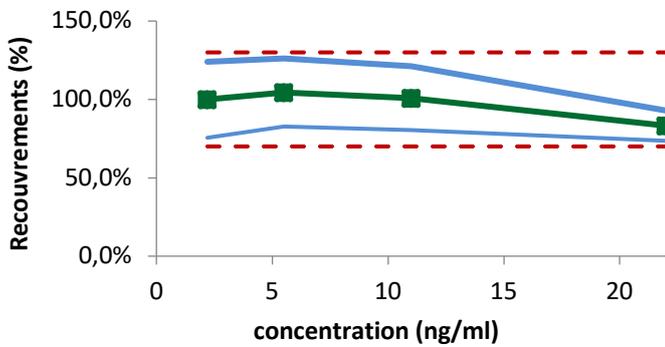
**ACY (SM)**



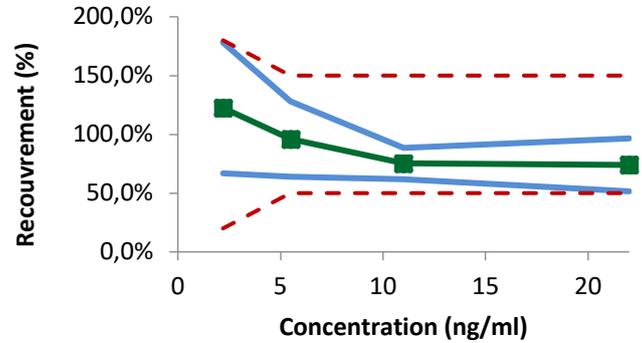
**ACY (SC)**



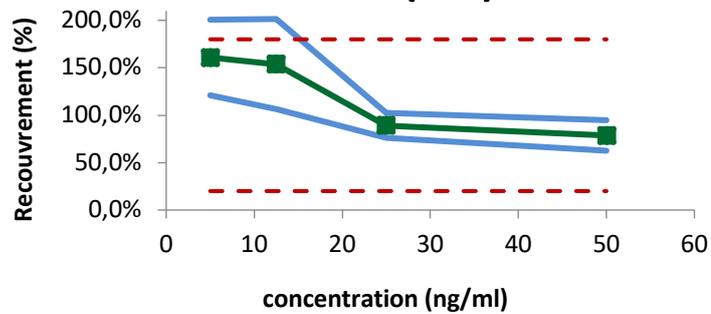
**FLO (SM)**



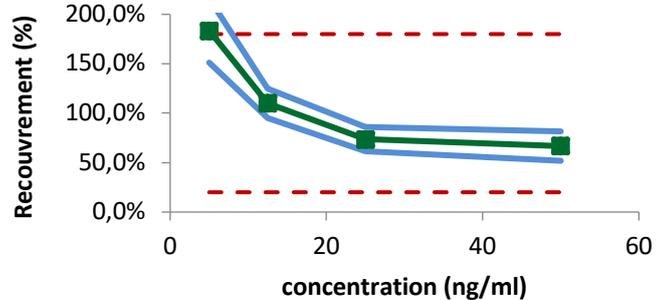
**FLO (SC)**

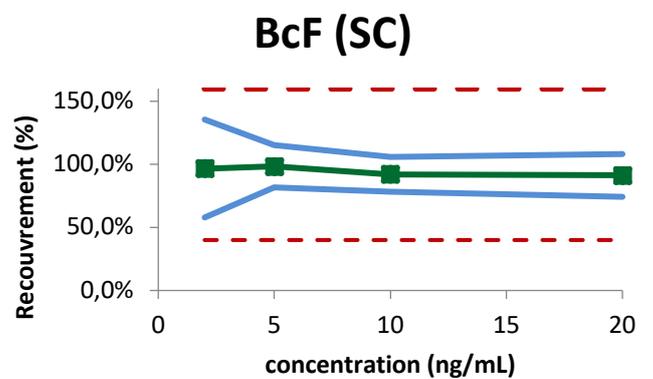
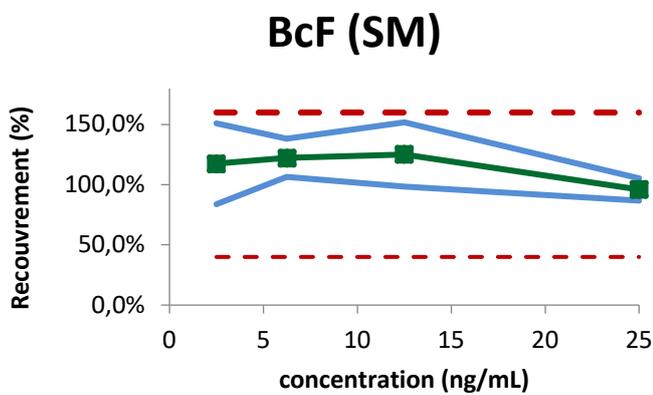
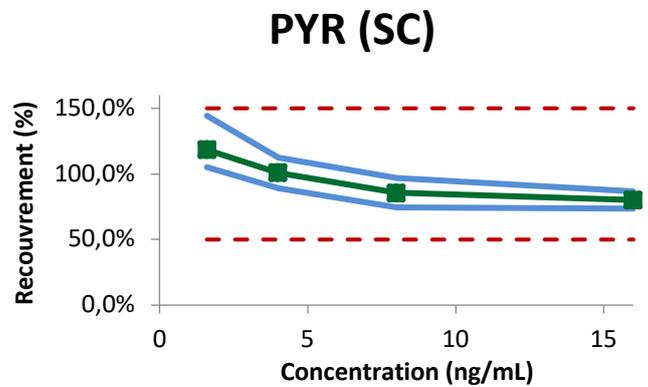
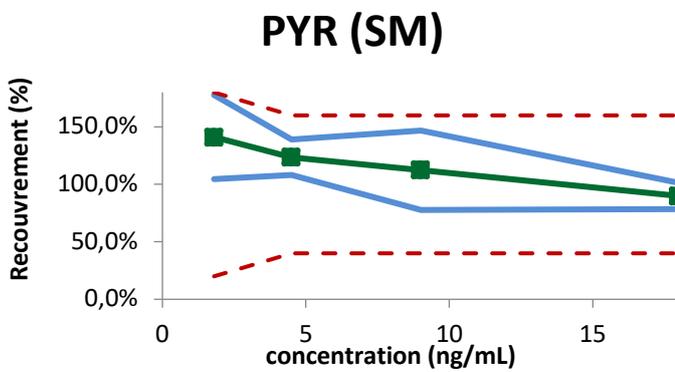
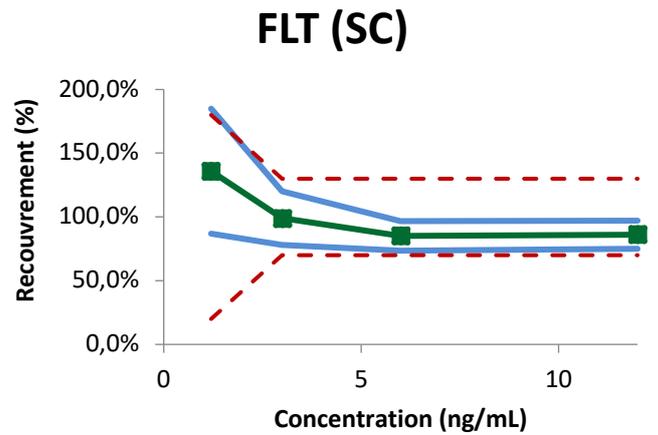
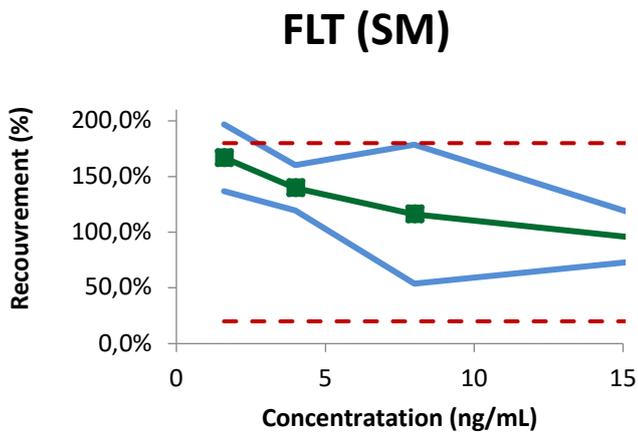
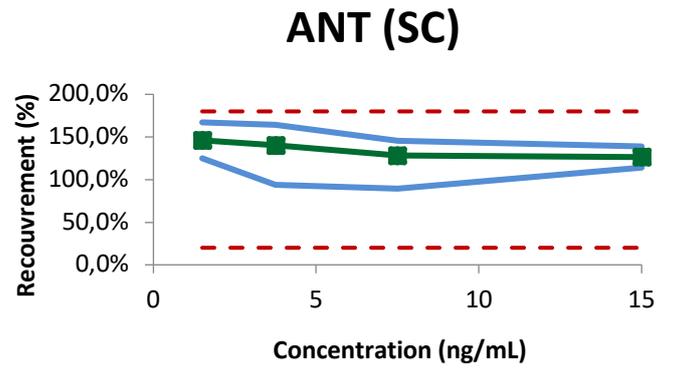
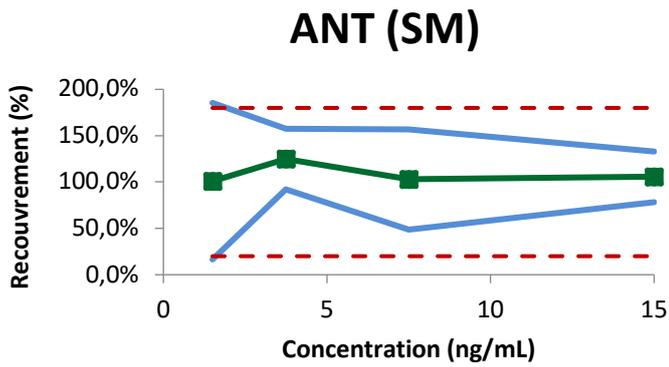


**PHE (SM)**

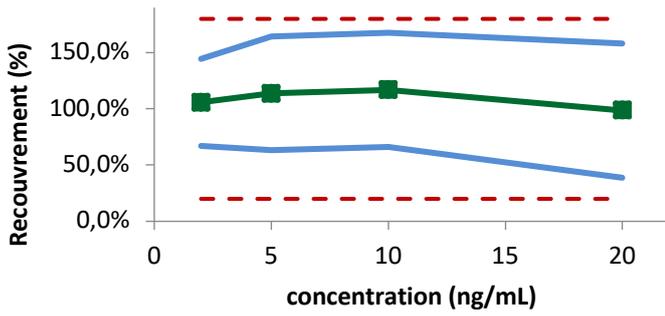


**PHE (SC)**

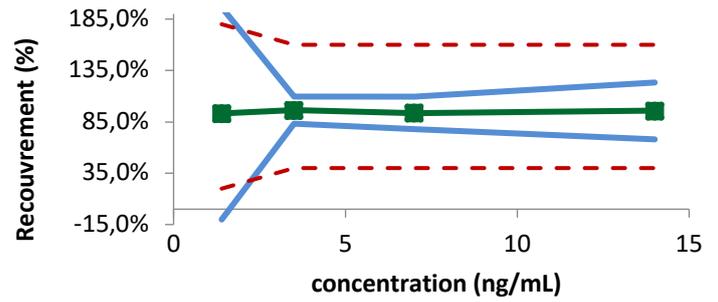




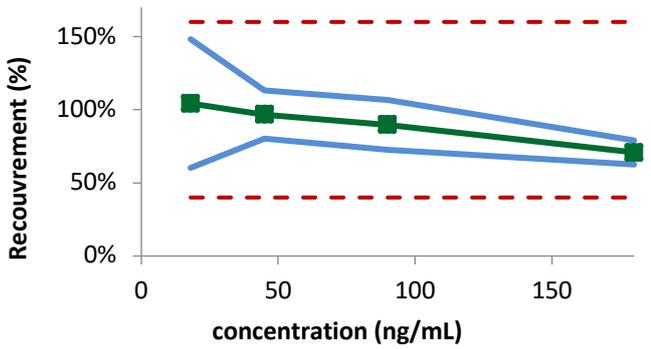
**BaA (SM)**



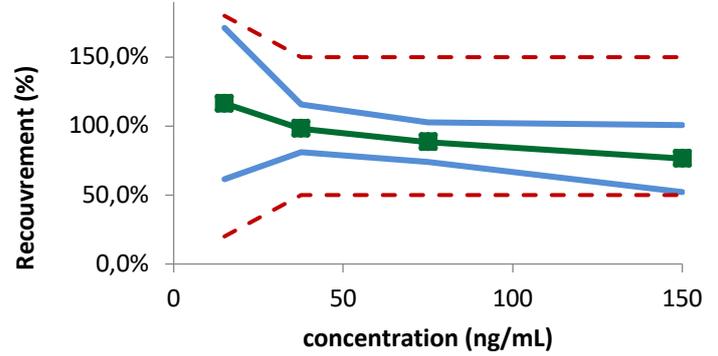
**BaA (SC)**



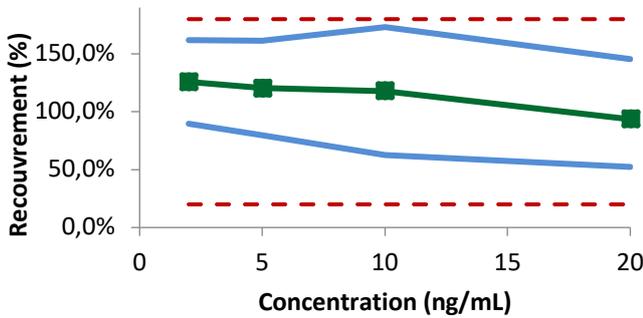
**CPcdP (SM)**



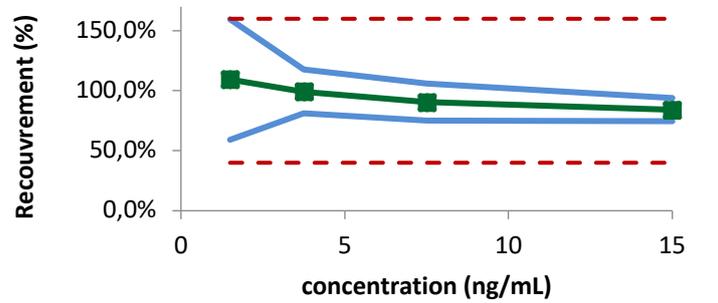
**CPcdP (SC)**



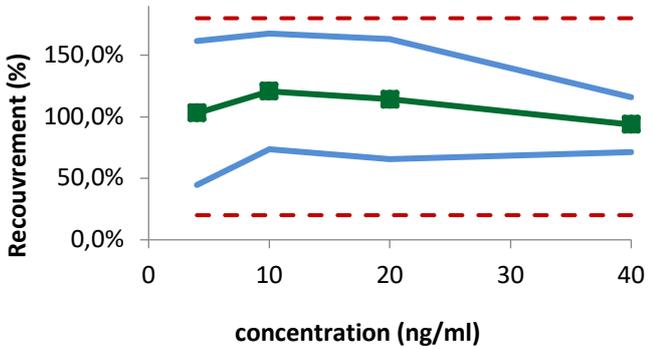
**CHR (SM)**



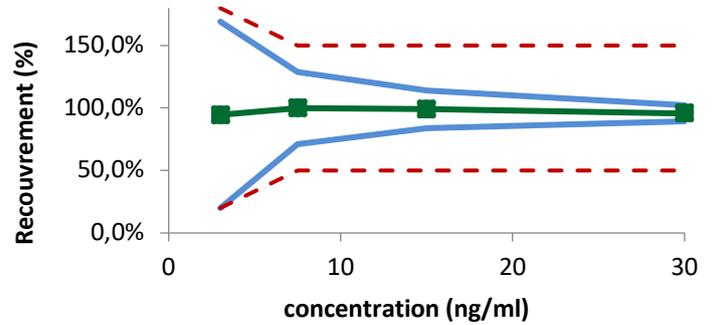
**CHR (SC)**

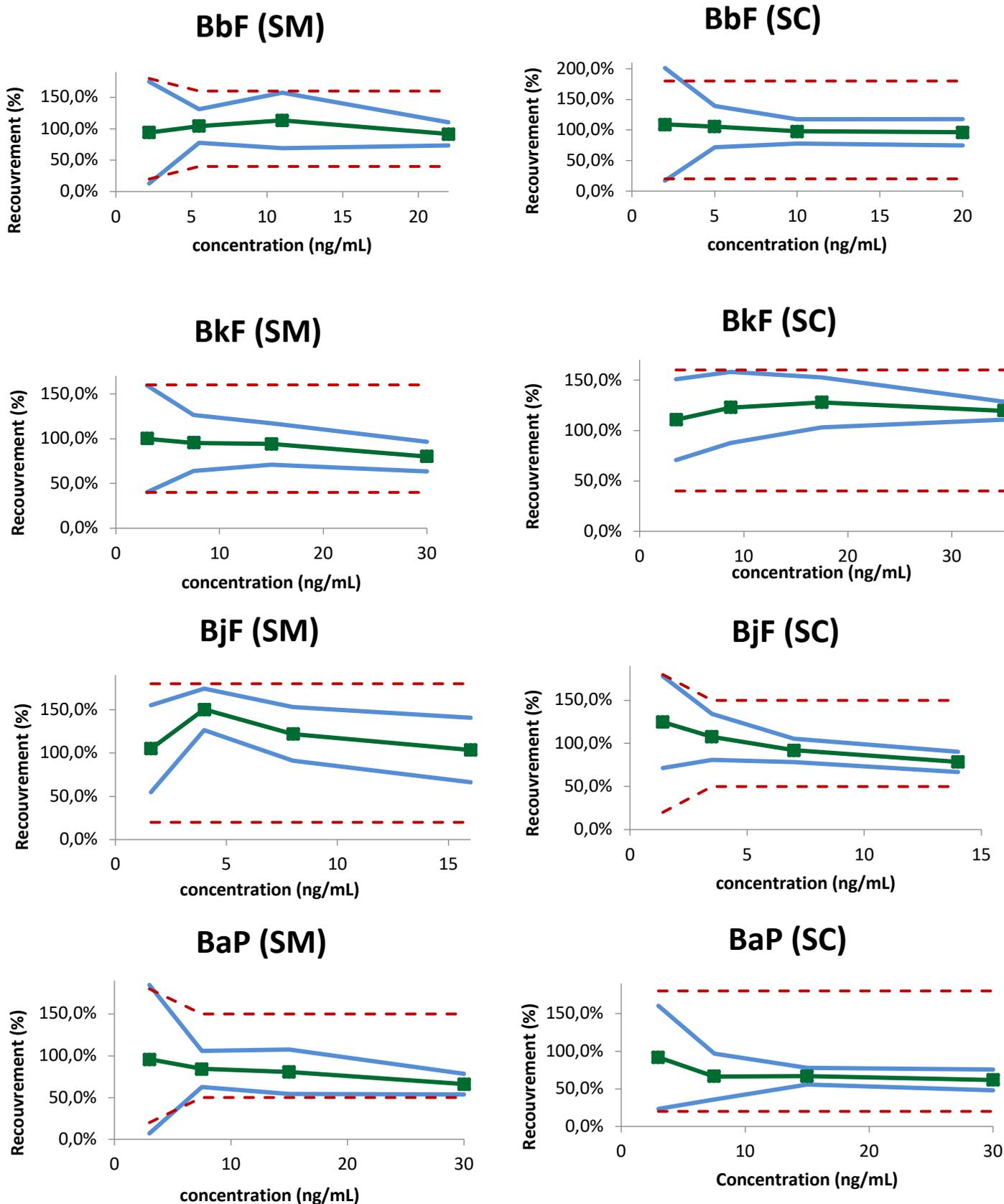


**5MCHR (SM)**



**5MCHR (SC)**





**Figure 23 :** Profils d'exactitude obtenus pour 16 HAP dans le sérum maternel (SM) et dans le sérum de cordon ombilical (SC). Les carrés représentent les rendements obtenus pour les témoins de validation, après correction, les courbes vertes la justesse, les courbes bleues les limites de tolérance et les courbes rouges en pointillées les limites d'acceptabilité

Enfin, l'erreur systématique a été estimée par la justesse, qui fait référence à l'étroite concordance entre la concentration théorique et la concentration moyenne calculée dans les témoins de validation, après correction. La justesse, illustrée par la courbe verte dans la **Figure 23** a été exprimée en rendements (%) pour chaque témoin de validation pour les deux matrices et pour chaque HAP. De plus, le biais relatif pour chaque niveau de concentration dans chaque sérum et pour chacun des HAP a été calculé. Le **Tableau 12** regroupe toutes ces données. Au vu des objectifs de notre validation, à savoir fixer des LOQs les plus sensibles possibles, il n'est pas étonnant d'obtenir des biais importants, notamment pour le premier témoin de validation. De plus, notons que le **Tableau 12**, présente les biais obtenus pour toutes les concentrations testées et la gamme de concentration qui a été validée, selon les limites d'acceptabilité fixées. Ainsi, comme indiqué dans ce tableau, les biais relatifs sont compris entre -33,9 et 60,9 % dans le sérum maternel. Les biais relatifs les plus importants ont été obtenus pour l'ACE, le PHE, le BaP et le B<sub>j</sub>F. Cependant, pour les autres HAP, des biais relatifs plus faibles compris entre -31,7 à 25,8% ont été obtenus. En outre, notons que les biais relatifs obtenus pour le sérum de cordon étaient compris entre -35,1 et 83,5%. Les biais relatifs les plus importants ont été obtenus pour les HAP les plus polaires tels que l'ACE, FLO, ANT, PHE, probablement en raison de leurs pertes lors du protocole analytique entraînant par conséquent plus de variabilité, mais aussi pour les HAP les plus hydrophobes, notamment le B<sub>j</sub>F et le BaP. La valeur très élevée pour le PHE (83.5%) pour le premier niveau de concentration des témoins de validation peut être liée à une surestimation, en raison de la contamination en PHE par les réactifs utilisés.

La précision de la méthode, exprimée en coefficient de variation (CV), a été déterminée pour les deux matrices et pour chaque composé (**Tableau 12**). Les CV de répétabilités étaient acceptables avec des valeurs entre 0,1 et 25,4% pour le sérum maternel. Concernant le sérum de cordon ombilical, les valeurs obtenues sont comprises entre 2,4 et 24,6%. Par ailleurs, les CV de précision intermédiaire étaient du même ordre de grandeur que les CV de répétabilité dans les 2 matrices à quelques exceptions près. En effet, les HAP les plus hydrophobes, du BaA au BaP, présentent des CV de répétabilité élevés, notamment pour le premier niveau de témoin de validation, pouvant atteindre jusqu'à 45,3% et 34,9% pour le BaP respectivement dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical.

**Tableau 12** : Résultats détaillés de la validation par l'approche de l'erreur totale pour le sérum maternel et le sérum de cordon

HAP	Sérum maternel					Sérum de cordon ombilical				
	Concentration (ng/mL)	Bias relatif (%)	Répétabilité (CV %)	Précision intermédiaire (CV %)	Gamme de validité (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Bias relatif (%)	Répétabilité (CV %)	Précision intermédiaire (CV %)	Gamme de validité (ng/mL)
ACE	12	4,9	17,6	28,9	12-120	12	19,4	13,3	14,2	12-120
	30	-0,1	4,4	4,9		30	5,5	21,0	21,0	
	60	-8,4	7,9	7,9		60	-21,1	14,1	14,1	
	120	-31,7	8,6	8,6		120	-25,8	27,7	27,7	
ACY	6	53,2	11,9	22,6	8-60	6	18,0	9,2	9,3	6-60
	15	-5,4	19,8	24,8		15	-10,1	13,4	31,1	
	30	7,4	7,5	9,4		30	-23,8	13,0	13,0	
	60	-20,1	12,3	12,3		60	-33,6	24,6	24,6	
FLO	2,2	-0,1	15,5	16,1	2,2-22	2,2	22,5	12,3	24,2	2,2-22
	5,5	4,4	12,2	13,6		5,5	-4,0	22,3	22,3	
	11	0,8	13,7	13,7		11	-24,8	10,5	10,5	
	22	-16,8	7,9	7,9		22	-26,0	20,5	20,5	
PHE	5	60,9	10,6	14,8	15-50	5	83,5	11,9	11,9	7,9-50
	12,5	53,8	7,4	15,9		12,5	10,0	8,9	8,9	
	25	-10,8	8,6	9,7		25	-26,0	11,3	11,3	
	50	-21,4	13,9	13,9		50	-33,3	15,1	15,1	
ANT	1,5	0,9	25,4	45,7	1.9-15	1,5	46,1	7,4	11,0	1,5-15
	3,75	24,8	17,7	17,7		3,75	40,2	10,8	10,8	
	7,5	2,8	11,9	26,8		7,5	28,1	9,3	9,3	
	15	5,7	14,6	16,6		15	26,4	7,1	7,1	
FLT	1,6	45,4	11,8	12,1	1,6-16	1,2	35,9	18,0	24,1	2,3-12
	4	21,9	5,1	8,2		3	-0,9	14,5	14,5	
	8	1,3	3,8	24,9		6	-14,9	9,3	9,3	
	16	-18,6	11,8	11,8		12	-13,8	8,7	8,7	

HAP	Sérum maternel					Sérum de cordon ombilical				
	Concentration (ng/mL)	Bias relatif (%)	Répétabilité (CV %)	Précision intermédiaire (CV %)	Gamme de validité (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Bias relatif (%)	Répétabilité (CV %)	Précision intermédiaire (CV %)	Gamme de validité (ng/mL)
PYR	1,8	-11,2	17,5	17,5	1,8-18	1,6	18,4	7,1	9,5	1,6-16
	4,5	23,6	4,3	7,0		4	-4,4	3,6	6,3	
	9	12,4	17,5	17,5		8	-18,7	8,5	8,8	
	18	-10,1	17,5	17,5		16	-24,0	2,4	4,4	
BcF	2,5	17,4	16,9	18,7	2,5-25	2	-3,3	15,6	23,3	2-20
	6,25	22,3	8,1	8,5		5	-1,6	10,4	11,2	
	12,5	25,1	11,2	13,5		10	-8,0	7,7	9,4	
	25	-4	4,6	5,9		20	-8,6	3,9	9,3	
CPcdP	18	4,2	11,5	22,4	18-180	15	16,4	5,6	22,3	15-150
	45	-3,3	7,5	10,2		37,5	-1,7	11,8	11,8	
	90	-10,4	12,8	12,8		75	-11,6	10,1	10,7	
	180	-29,2	0,08	0,08		150	-23,6	21,5	21,5	
BaA	2	5,7	18,4	22,9	2-20	1,4	-6,8	11,3	51,9	2,6-20
	5	13,6	30,1	30,1		3,5	-3,5	6,9	8,6	
	10	16,8	18,4	18,4		7	-6,2	11,4	11,4	
	20	-1,5	18,4	18,4		14	-4,3	5,2	14,1	
CHR	2	25,8	17,6	19,0	2-20	1,5	9,3	24,0	28,9	1,5-15
	5	20,5	23,0	23,0		3,75	-0,6	12,4	12,4	
	10	17,9	14,2	25,6		7,5	-9,5	11,7	11,7	
	20	-6,5	15,0	24,7		15	-15,8	6,0	7,3	
5MCHR	4	2,9	19,1	31,7	4-40	3	-5,4	7,2	36,9	3-30
	10	20,6	4,9	18,5		7,5	-0,1	8,3	15,5	
	20	14,2	20,8	26,4		15	-0,9	9,3	10,0	
	40	-6,4	10,2	14,2		30	-4,2	4,6	4,6	

HAP	Sérum maternel					Sérum de cordon ombilical				
	Concentration (ng/mL)	Bias relatif (%)	Répétabilité (CV %)	Précision intermédiaire (CV %)	Gamme de validité (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Bias relatif (%)	Répétabilité (CV %)	Précision intermédiaire (CV %)	Gamme de validité (ng/mL)
BbF	2,2	-6,1	13,0	41,5	2,7-22	2	9,1	7,7	39,4	2-20
	5,5	4,4	6,7	13,5		5	5,4	20,2	21,1	
	11	13,3	5,0	18,6		10	-2,3	11,5	13,1	
	22	-8,3	4,7	10,4		20	-3,7	5,9	11,8	
BkF	3	-0,2	7,6	28,3	3-30	3,5	10,0	18,8	22,7	3,5-35
	7,5	-4,8	10,8	18,1		8,75	22,8	9,5	16,0	
	15	-6,0	16,6	16,6		17,5	27,8	10,8	12,5	
	30	-19,9	6,0	11,2		35	19,6	5,0	5,0	
BjF	1,6	5,0	31,3	32,1	1,6-16	1,4	24,9	18,4	25,4	1,4-14
	4	50,4	10,8	10,8		3,5	7,7	10,9	14,9	
	8	22,0	12,1	15,6		7	-8,0	10,0	10,0	
	16	3,5	6,2	17,6		14	-21,4	6,2	8,8	
BaP	3	-4,1	16,0	45,3	6-30	3	-3,4	7,2	34,9	3-30
	7,5	-15,8	11,2	15,7		7,5	-30,0	12,8	24,5	
	15	-19,2	16,4	20,4		15	-29,9	11,1	11,1	
	30	-33,9	12,1	12,5		30	-35,1	15,3	15,3	

### VI.3. Conclusion

L'objectif de ce travail a été de développer une méthode analytique de confirmation par GC/MS pour la quantification simultanée de 24 HAP dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical. Pour mettre en place la méthode, nous avons dans un premier temps optimisé les paramètres de séparation et de détection en GC/MS avec la colonne ZB-PAH. Pour ce faire, le gradient de température, le volume d'injection et la nature des étalons internes ont été optimisés. Les HAP peu volatils, étant très retenus, ont eu une forme de pic avec des trains arrière et très large, ce qui a eu pour conséquence des LODs et LOQs moins bonnes. Les LOQs obtenues s'échelonnaient de 0,4 ng/mL pour le NAPH à 54 ng/mL pour le DahP.

Le gradient a été ré-optimisé et une nouvelle colonne de phase stationnaire similaire à la ZB-PAH a été utilisée : la DB 17MS. Cette colonne permettait d'obtenir de meilleures LOQs. Les nouvelles LOQs étaient donc comprises entre 0,5 (NAPH) et 28 ng/ml (DahP). Ainsi, des rendements compris entre 20 et 111% avec des écarts-types < 15% et compris entre 28 et 10% avec des écarts-types <15% dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical respectivement, ont été déterminés. Les rendements des deux HAP les plus hydrophobes, le DaiP et le DahP, n'ont pas pu être déterminés, probablement à cause d'un problème de détection.

En outre, la validation a permis de mettre en évidence que le 3-methylcholanthrène ne permettait pas de corriger les variations de volumes d'injection pour les HAP les plus lourds (IcdP à DaeP). Cette observation nous permet d'en déduire qu'il est préférable d'utiliser les molécules deutérées, comme étalons internes, lorsqu'elles sont disponibles. Ainsi, seuls 16 HAP ont pu être validés par l'approche des profils d'exactitude. Pour chaque matrice, les limites d'acceptabilité ont été définies en fonction des comportements des composés. Ainsi, pour le sérum maternel, 5 groupes ont été distingués (80%, 60%, 80%+50%, 80%+60%, 30%) tandis que seuls 4 groupes ont été déterminés pour le sérum de sang de cordon ombilical (80%, 60%, 80%+50%, 80%+60%). Enfin, les LOQs obtenues, pour ces 16 HAP, étaient comprises entre 1,6 et 20 ng/mL et 1,5 et 12 ng/mL dans les échantillons de sérums maternels et de sérums de cordon ombilical, respectivement. Ce protocole validé a été mis en œuvre pour la quantification des 16 HAP validés dans les mêmes échantillons de sérums analysés dans

le chapitre précédent (20 échantillons). Aucun HAP n'a été détecté, mis à part le PHE, à des concentrations environnantes 5 ng/mL, correspondant à la contamination induite par les réactifs utilisés.

Par ailleurs, la méthode analytique développée a montré plusieurs limites. Tout d'abord, il semble difficile d'obtenir une seule méthode, avec des LOQs optimales, pour l'analyse simultanée des 24 HAP en GC/MS, avec une injection de 1  $\mu$ L en mode splitless. En effet, il a été démontré dans ce travail qu'il existait une discrimination importante des HAP les plus lourds, entraînant alors des LOQs non satisfaisantes pour l'analyse de traces dans les matrices biologiques. Ainsi, il pourrait être envisager de développer 2 méthodes différentes, une pour les HAP les plus légers avec un volume d'injection de 1  $\mu$ L et une pour les HAP les plus lourds avec un volume d'injection plus important et un gradient en températures plus rapide (2  $\mu$ L) afin de gagner en sensibilité. Une autre approche permettant l'analyse simultanée des 24 HAP dans le sérum pourrait également être une injection à large volume et une programmation de température au niveau de l'injecteur. En effet, ce mode d'injection a déjà démontré son efficacité pour l'analyse des HAP dans les matrices environnementales, tout en réduisant les phénomènes de discrimination des HAP les plus lourds [165,166]. Cependant, en raison des nombreux interférents non volatils présents dans les matrices biologiques, ce mode d'injection pourrait nécessiter une maintenance plus importante et plus fréquente du système chromatographique (changement du liner et découpe de la tête de colonne).

## **Chapitre VII**

ÉTUDE DE L'EFFET DE 16 HAP US EPA SUR LES  
FONCTIONS DE DIFFÉRENCIATION ET LES FONCTIONS  
HORMONALES PLACENTAIRES ET PASSAGE  
TRANSPLACENTAIRE DE CES HAP



## **Chapitre VII. Étude de l'effet des 16 HAP US-EPA sur les fonctions de différenciations trophoblastiques, les fonctions hormonales placentaires et évaluation de leur passage transplacentaire**

Dans les chapitres précédents, nous avons, pour la première fois, développé et validé une procédure analytique en LC-UV/FD et GC/MS pour quantifier simultanément 22 HAP dans des échantillons de sérums provenant de sang maternel et de sang de cordon ombilical. Ces procédures analytiques ont été appliquées à des échantillons provenant de sang de femmes enceintes et de sang de cordon ombilical, prélevés dans différentes maternités et issus d'accouchements par césarienne. Aucun HAP n'a été détecté dans ces échantillons. Il se peut que les HAP soient non détectables en raison de l'hémodilution complémentaire réalisée au moment de l'accouchement avec perfusion. Malgré le fait qu'aucun HAP n'a été détecté dans ces échantillons, il apparaît tout de même important d'évaluer l'impact de l'exposition maternelle aux HAP sur les différentes fonctions placentaires. En effet, comme indiqué précédemment, les villosités chorales sont la source de toutes les fonctions placentaires pendant la grossesse humaine. De plus, compte tenu de son rôle essentiel et de son emplacement clé dans l'espace intervilloux, en contact direct avec le sang maternel, le syncytiotrophoblaste est sensible aux médicaments, aux xénobiotiques et aux polluants absorbés par la mère. Ces molécules exogènes peuvent donc avoir des conséquences néfastes sur la fonction syncytiale et la régénération. Par conséquent, l'exposition maternelle aux HAP peut affecter la croissance et le développement du fœtus.

Ainsi, à ce stade du projet doctoral, l'objectif était, dans un premier temps, d'évaluer les répercussions potentielles de ces polluants sur les fonctions placentaires, en particulier les fonctions de différenciation, de fusion et les fonctions endocrines, à l'aide d'un modèle de culture primaire in vitro de cytotrophoblastes humains (placenta à termes) avec 16 HAP US-EPA. La différenciation et la fusion des cytotrophoblastes villositaires en syncytiotrophoblastes ont été évaluées via une technique d'immunocytochimie (index de fusion) et une analyse transcriptionnelle (RT-qPCR) de gènes d'intérêt (gènes impliqués dans la syncytialisation et la fusion (SYNC1, SYNC2, ASCT2, MFSD2, GCM1 et CDH1). Ensuite, la fonction hormonale du placenta a été également étudiée via une

analyse transcriptionnelle (RT-qPCR) notamment des gènes tels que hCG, hPL et PIGF, mais aussi via l'analyse sécrétrice des hormones hCG et hPL, dosée par test ELISA dans les surnageants de culture. Enfin, une étude de gènes relatifs à l'inflammation et la détoxification (IL6, CYP19, CYP1A1, CYP1B1, CYP11A1) a été menée. Les résultats de cette étude ont été comparés à ceux observés par le BaP seul afin de conclure sur un effet différentiel sur la fonction placentaire. Cette étude a été intégralement réalisée par Jessica Dalmasso, dans le cadre de son stage de Master 2.

Ensuite le deuxième axe d'étude était d'étudier le passage transplacentaire et l'accumulation placentaire des HAP au cours de la grossesse, en utilisant le modèle du cotylédon placentaire perfusé. Les différentes expériences ont été réalisées à l'aide d'une solution maternelle contenant 16 HAP (concentration finale d'environ 1  $\mu\text{M}$ ), réglementés pour l'environnement et la molécule témoin de passage, l'antipyrine. Sur les 16 HAP, seuls 12 ont pu être analysés et cette étude a démontré leur passage placentaire avec des cinétiques différentes selon l'hydrophobie et le nombre de cycles (poids moléculaire) pour le composé en question. En effet, 3 profils de cinétique de passage ont été mis en évidence. Les expériences de perfusion ont été menées, sous la responsabilité de Christelle Simasotchi accompagnée de Jessica Dalmasso, à la maternité de Port Royal, tandis que les dosages des HAP dans les solutions maternelles et fœtales ont été réalisés au LSABM à l'ESPCI dans le cadre de mon doctorat.

En revanche, concernant l'accumulation de ces HAP dans les cotylédons perfusés, les analyses de ces derniers n'ont pu être réalisées car, malheureusement, à ce jour, la méthode analytique pour la quantification des HAP dans le tissu placentaire n'est pas encore au point.

### **VII.1.1. Matériel et méthodes**

L'utilisation de placentas humains a nécessité le consentement des parents. Les placentas utilisés étaient issus de grossesses non pathologiques et étaient recueillis à terme (entre 38 et 41 semaines d'aménorrhée) après un accouchement par voie basse pour la perfusion ou par césarienne pour les cultures cellulaires. Ils sont issus des maternités de Port Royal (Paris), de Béclère (Clamart), de l'institut Montsouris (Paris) et l'hôpital privé d'Antony (Antony).

En outre, une solution mère à environ 1 mM dans du DMSO des 16 HAP US-EPA (NAPH, ACY, ACE, FLO, PHE, ANT, FLT, PYR, BaP, CHR, DahA, IcdP, BkF, BbF, BaA, BghiP) a été préparée. Pour chaque HAP, des solutions mères à 500 mg/L, soit 10 mg de chaque HAP dans un volume total de 20 mL (qsp DMSO) ont été préparées. Chaque solution a été solubilisée aux ultrasons 2 minutes et mise à l'obscurité. Des volumes différents de chaque HAP ont été prélevés afin d'obtenir un mélange final des 16 HAP équimolaires à la concentration finale d'environ 1 mM.

### **VII.1.2. Culture primaire de trophoblastes isolés à partir de placentas humains à terme**

A l'arrivée du placenta au laboratoire, celui-ci a été manipulé en conditions stériles sous des postes de sécurité microbiologique (PSM) dans un laboratoire de type L2. Après avoir réalisé l'exérèse des membranes maternelles et fœtales du placenta, la première étape a été la dissection du placenta qui durait au maximum 30 minutes. Les différents fragments ont été par la suite « lavés » dans des bains successifs de HBSS afin d'éliminer tout excédant de sang. Ensuite, la dissection de ces fragments a été réalisée dans de l'HBSS pour récupérer quelques cotylédons (unité fonctionnelle du placenta) et en extraire les villosités (zone d'échange entre la mère et le fœtus). Ces villosités ont été ensuite centrifugées, afin d'être pesées puis elles ont été soumises à une digestion enzymatique (HBSS + trypsine (0,2%) (Trypsin 1 :250 Gibco 27250-018), supplémentée en CaCl<sub>2</sub> 0,1M, MgSO<sub>4</sub> 0,1M, lait demi écrémé (5%) et DNase (0,03%) à raison de 5 mL/g de villosités obtenues. Les villosités ont été digérées au bain marie à 37°C une première fois pendant 30 minutes puis 10 minutes pour les digestions suivantes en changeant la solution enzymatique à chaque fois. Le nombre maximal de digestions était de 8 fois 10

minutes (en excluant la première digestion qui est de 30 minutes). Entre chaque digestion, un échantillon de surnageant a été examiné au microscope optique afin d'évaluer l'avancement de la digestion, c'est-à-dire l'apparition des premiers CTV (Cytotrophoblastes villosus). Dès l'apparition de ces derniers, les surnageants ont été récupérés et transférés dans différents tubes de 50 mL contenant préalablement chacun 5 mL de sérum de veau fœtal (SVF) afin d'inhiber l'action de la trypsine (SVF de-complémenté Sigma®). Ces gestes sont réalisés à chaque étape de digestion. Une fois les digestions terminées, les villosités ont été rincées dans de l'HBSS à température ambiante sous le PSM. Cette étape, répétée 2 à 4 fois permettait d'optimiser la récupération des CTV. Dès que le nombre de CTV isolés semblait diminuer, la digestion a été arrêtée afin d'éviter d'isoler des fibroblastes, pouvant compromettre la réussite ultérieure des cultures.

Après ces étapes, les tubes contenant les CTV ont été centrifugés. Les culots cellulaires ont été repris dans un volume maximum de 2 mL de milieu de culture sans sérum et la suspension cellulaire a été déposée sur un gradient de percoll (Annexe 3-**Tableau S 1**) et soumise à une centrifugation à 2500 rpm, pendant 20 minutes avec une accélération douce. Les CTV ont été séparés et ont été retrouvés à une densité comprise entre 20 et 25 % de percoll. La bande a été récupérée et resuspendue dans un volume adéquat de milieu complet (milieu sans sérum + 10% SVF (CVFSVF00-01 Euro bio®)). Une numération avec une cellule de comptage dans du Bleu de Trypan (Cell counter Biorad®) a permis de déterminer le nombre total de cellules isolées et leur viabilité. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm pour 1 million de cellules et de 60 mm pour 3 millions de cellules. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Le lendemain, les cellules ont été lavées au DMEM afin d'éliminer les cellules mortes ou non adhérentes.

### VII.1.2.1. Traitement des cellules

L'objectif est d'étudier l'effet du BaP et du cocktail de HAP sur la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste et leur fonction endocrine. Les cellules ont été traitées pendant 24h ou 48h soit au DMSO 1 :1000 (témoin), soit au BaP 1µM, soit avec le mélange HAP 1 µM. Une fois la durée du traitement effectuée, les surnageants ont été récupérés et centrifugés, à 1200 rpm pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires, puis

redistribués dans des eppendorfs de 1 mL. La totalité des échantillons a été placée à -20°C en attente des dosages. Parallèlement, les cellules ont été récupérées par trypsination après 3 lavages à l'HBSS et centrifugées à 1200 rpm pendant 10 minutes. Les culots cellulaires ont été asséchés et plongés dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C en vue de leur utilisation.

### **VII.1.2.2. Test de cytotoxicité**

#### Test de viabilité cellulaire au bleu de trypan

La viabilité cellulaire a été mesurée par test au bleu de trypan dans les différentes conditions d'exposition. Le bleu de trypan est un colorant capable de révéler les cellules mortes : il ne pénètre que dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, c'est-à-dire les cellules mortes, les colorant ainsi en bleu. Les conditions testées étaient les suivantes : mélange HAP et BaP à trois concentrations (0,1  $\mu$ M/ 0,5  $\mu$ M/ 1  $\mu$ M), et DMSO (0,1/1000 ; 0,5/1000 et 1/1000). Pour chacune de ces concentrations, la viabilité a été mesurée après 24h et 48h d'exposition. Par la suite, les cellules ont été décollées par trypsination puis 11  $\mu$ L de suspension cellulaire ont été mélangés à 1  $\mu$ L de bleu de trypan. La viabilité a été ensuite mesurée sur cellule de Malassez, en dénombrant la proportion de cellules colorées en bleu.

#### Mesure de la fonctionnalité mitochondriale avec le test MTT

Le principe de ce test est d'évaluer la fonctionnalité mitochondriale des cellules exposées à différentes concentrations des solutions BaP, HAP et DMSO pendant 24h et 48h. Cette technique est basée sur la réaction du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium) et la succinate déshydrogénase mitochondriale. Lorsque la cellule est métaboliquement active, le MTT va précipiter l'anneau de tétrazolium en cristaux intracellulaires de formazan. Ces cristaux donnent une couleur violette à la cellule (Absorbance à 560 nm). La quantité de formazan produit dans les cellules étant proportionnelle à l'activité mitochondriale de celles-ci, la mesure de l'absorbance permet d'en estimer l'importance. Les conditions testées étaient les suivantes : mélange HAP et BaP à trois concentrations (0,1  $\mu$ M/ 0,5  $\mu$ M/ 1  $\mu$ M) et DMSO (0,1/1000 ; 0,5/1000 ; 1/1000). Pour chacune de ces concentrations, les tests ont été menés après 24h et 48h d'exposition. Pour un

puits contenant 200 000 cellules, 500  $\mu$ L de MTT dilué dans du milieu de culture (DMEM + 10% de SVF)   0,5 g/L ont été déposés. Après 4h d'incubation à 37 C, le MTT a été retiré et les cristaux de formazan formés dans les mitochondries des cellules ont été dissous dans 500  $\mu$ L d'isopropanol+HCl. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, l'absorbance à 560 nm a été mesurée par spectrophotométrie (Enspire ).

### **VII.1.2.3. Test de fusion**

Le but des tests de fusion est de déterminer par observation et par calcul le pourcentage de cellules fusionnées au cours du temps. Ceci permet de suivre l'évolution de la fusion des cytotrophoblastes villos en syncytiotrophoblaste suite à une exposition au BaP ou au mix de HAP. Celui-ci est basé sur l'évaluation de la fusion cellulaire via une approche d'immunocytologie (grâce au marquage de la membrane cellulaire des trophoblastes par un anticorps anti-desmoplakine (Abcam  16434), un dénombrement des noyaux cellulaires et leur répartition dans les syncytiums, et enfin l'activité endocrine des syncytia (par le dosage de l'hCG dans les milieux de culture).

#### Fixation des cellules au méthanol

Une fois les traitements effectués (BaP 1  $\mu$ M, HAP 1  $\mu$ M ou DMSO 1 :1000) pendant 24h ou 48h, les cellules ont été lavées 3 fois au PBS, puis fixées avec 1ml de méthanol glacé à -20 C pendant 8 minutes. Une fois fixées, les boîtes ont été lavées 3 fois au PBS et conservées à 4 C dans du PBS.

#### Marquage à la desmoplakine

Après fixation, la saturation des sites non spécifiques a été réalisée avec une solution de PBS et BSA (3%) ajoutée et laissée une heure à température ambiante. La desmoplakine (DSK) est une protéine des jonctions d'ancrage qui permet la cohésion intracellulaire. Elle lie les filaments du cytosquelette aux desmosomes et permet l'adhésion des cellules adjacentes entre elles. Un anticorps anti-desmoplakine (Abcam  16434, souris) dilué au 1/200<sup> me</sup> dans une solution PBS et BSA (1%)  tait ajouté et laissé 2h à température ambiante. Après lavages au PBS, l'anticorps secondaire Alexa fluor 488 (chèvre anti-souris) dilué au 1/500<sup> me</sup> dans une solution PBS et BSA (1%)  tait ajouté. Le DAPI (DAPI Sigma  20mg/ml)  tait ajouté aux cellules afin de marquer les noyaux et le montage des lames était réalisé avec un liquide

de montage de type DAKO Monting medium (Sigma®, S3023). Les boîtes étaient laissées à température ambiante toute la nuit pour une polymérisation totale puis placées à 4°C jusqu'à l'acquisition des images.

Avec l'anticorps anti-DSK reconnaissant la DSK intracellulaire et grâce au 2<sup>ème</sup> anticorps (A-488), les membranes plasmiques étaient marquées en vert permettant leurs observations au microscope. Et le dénombrement des noyaux, marqués en bleu par le DAPI, permettait de compter le nombre de noyau par cellules et donc de déterminer le nombre de cytotrophoblastes villeux et le nombre de syncytiotrophoblaste (>2 noyaux/cellule).

### Acquisition des images en microscopie à fluorescence

Les images ont été prises par une caméra fluorescence à l'aide du logiciel Vision stage fluo à l'objectif x40. Douze acquisitions ont été faites pour chaque boîte (2 boîtes par condition) afin d'avoir un résultat représentatif.

### Traitement des images avec le logiciel imageJ, comptage des CT et ST pour index de fusion

Grâce au logiciel, il était possible de dénombrer la répartition des noyaux cellulaires et ainsi déterminer le nombre de cellules mononuclées (CT) et le nombre de syncytia (ST) formés. Les différents CT et ST ont été recensés dans un tableur Excel et l'index de fusion a été mesuré par la formule : (nombre total de noyaux par syncytium) - (nombre total de syncytium) / nombre total de noyaux. Les résultats ont ensuite été mis en forme et analysé par le logiciel Graph Pad prism 7.

#### **VII.1.2.4. Analyse transcriptionnelle**

##### Extraction ARN

Les extractions d'ARN à partir des culots secs (1 million de cellules) ont été réalisées sur colonne avec le kit d'extraction d'ARN Arcturus ® Picopure ®. Les culots cellulaires de cellules traitées aux différentes conditions pendant 24h et 48h ont tout d'abord été repris dans du tampon de lyse. Après incubation à 42°C suivie d'une heure minimum de stockage à - 80°C, de l'éthanol à 70 % était ajouté à chaque échantillon. Cette solution a été ensuite déposée au centre de la colonne d'extraction. Après centrifugation, permettant aux ARN de se lier à la colonne, un traitement à la DNase Qiagen ® (ref 79254) a été réalisé. La

colonne a été ensuite lavée et centrifugée plusieurs fois. Enfin le tampon d'élution a été déposé au centre de la colonne afin de détacher les ARN qui y sont liés puis la colonne a été centrifugée sur un eppendorf de 0,5 mL. A l'issue de l'extraction, les ARN ont été dosés avec un Nanodrop (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000). Ce dernier, en mesurant l'absorbance des échantillons à 260 nm (longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques), permettait de déterminer la concentration d'ARN présents dans les éluats d'extraction. Le Nanodrop permettait également de déterminer la pureté des ARN extraits (contaminations protéiques et organiques). Une fois ces mesures effectuées, 1 µL d'inhibiteur de RNAses (RNaseOUT Invitrogen®) a été ajouté à chaque échantillon afin d'éviter toute dégradation puis ces derniers ont été conservés à -80°C.

### Rétro transcription d'ARN en ADNc

Le but de cette étape était de transformer les ARN précédemment extraits en ADNc. Pour 500 ng d'ARN dilué dans de l'eau RNase-DNase free, 1 µL de random primers et 1 µL de dNTP ont été ajoutés à chaque échantillon d'ARN. Ces derniers ont ensuite été linéarisés par chauffage afin de faciliter la réaction de rétro transcription à venir. Cette dernière reposait sur l'action d'une ADN polymérase ARN-dépendante (Super script III Invitrogen®) capable de synthétiser de l'ADNc à partir d'un brin matrice d'ARN. Dans chaque tube d'ARN préalablement linéarisé, le MIX contenant la Super script III (Annexe 3-**Tableau S 2**) était ajouté. Les tubes ont ensuite été placés dans un thermocycleur où ils étaient soumis à une température de 50°C pendant 50 minutes (synthèse d'ADNc) puis à une température de 70°C pendant 15 minutes (inactivation de la Super script III).

### PCR quantitative

Cette dernière était réalisée afin de comparer le taux d'ARNm dans les trois conditions (traitement au cocktail HAP, traitement au BaP seul et DMSO (contrôle)). L'objectif de la PCR quantitative (ou qPCR) est la quantification relative des transcrits présents dans un échantillon traité par rapport à un échantillon témoin. Pour réaliser les qPCR, le kit Takyon TmROX SYBR Master Mix dTTP Blue® (Eurogentec®, UF RSMB0701) a été utilisé. Ce dernier utilise les propriétés d'un intercalant de l'ADN, le SYBER Green, capable d'émettre une fluorescence lorsque l'ADN est sous forme bi caténaire. Dans le thermocycleur (thermocycleur 7900 HT Fast Real-Time PCR System d'Applied Biosystems®), des fragments spécifiques d'ADNc

étaient amplifiés à chaque cycle. Du fait des propriétés du SYBER Green, la fluorescence augmentait également à chaque cycle d'amplification. Le thermocycleur était capable de détecter la fluorescence émise par le SYBER Green à partir d'un certain seuil, correspondant à une quantité d'amplicons donnée. Ainsi, le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection de la fluorescence variait suivant la concentration initiale du fragment d'ADNc à amplifier.

Selon le nombre d'échantillons, une certaine quantité de MasterMIX a été préparée avec les amorces correspondant au gène à amplifier (Annexe 3-**Tableau S 3** et Annexe 3-**Tableau S 4**). Enfin, 2  $\mu$ L d'ADNc dilué au 1/5<sup>ème</sup> et 8  $\mu$ L de MasterMIX correspondant au gène à amplifier ont été déposés par puits (plaques qPCR d'Eurogentec®). Le programme d'amplification utilisé était constitué de 40 cycles, comprenant chacun une étape de dénaturation (10 sec à 95°C) et une étape d'hybridation/élongation (1 min à 60°C). A l'issue de ce programme, un cycle de dissociation était réalisé en soumettant les amplicons à une élévation progressive de température (15 sec à 95°C, 15sec à 60°C puis 15sec à 95°C). La température de dissociation d'un fragment d'ADN double brin étant dépendante de sa séquence, cela permettait de vérifier que l'amplification s'était bien faite sur une séquence unique (Annexe 3- **Figure S 5**). Afin de normaliser l'expression des gènes testés, 3 gènes de référence ont été utilisés : celui codant pour l'ARNr 18S, celui codant pour la succinate déshydrogénase complexe (SDHA) et enfin celui codant pour la protéine ribosomique humaine L13 (RPL13) (Annexe 3- **Tableau S 4**). Ces gènes, dont la transcription ne variait pas suivant les conditions expérimentales testées, reflétaient le niveau d'expression basal de la cellule et constituaient un étalon. Les résultats des qPCR ont été analysés avec le logiciel Excel puis Graph Pad prism 7.

### **VII.1.2.5. Dosages hormonaux**

#### Dosage hCG

Les dosages d'hCG ont été réalisés sur les surnageants de culture de trophoblastes récupérés aux temps 24h et 48h après traitements (contrôle DMSO, BaP 1  $\mu$ M, HAP 1  $\mu$ M). Les dosages ont été réalisés (Pr. J. Guibourdenche, Cochin) par l'automate « ADVIA Centaur hCG total (ThCG)© ». L'automate reconnaît l'hCG sous ses formes dimériques grâce à l'utilisation de deux anticorps. L'anticorps primaire est un anticorps polyclonal de

chèvre anti-hCG marqué par l'ester d'acrinium qui est un marqueur chimioluminescent. L'anticorps secondaire est un anticorps monoclonal de souris anti-hCG couplé à des particules paramagnétiques. Les molécules non liées aux particules paramagnétiques après application d'un champ magnétique étaient éliminées par les lavages. L'oxydation de l'ester d'acrinium produit un flash luminescent des antigènes pris en sandwich. Les concentrations étaient quantifiées en UI/L.

### Dosage hPL

La sécrétion d'hPL des trophoblastes en culture dans les différentes conditions de traitement a été mesurée par dosage immuno-enzymatique avec un kit hPL ELISA (DIAsource hPL Enzyme Immunoassay Kit KAPD1283®). Le test s'appuie sur une technique de dosage immuno-enzymatique à phase solide (ELISA) en sandwich.

La première étape consistait à concentrer les échantillons sur colonne Amicon (Amicon ultra -4-10K UFC801096®) par centrifugation à 4000 rpm plusieurs fois pendant 10 minutes afin que le volume dans la colonne soit concentré ( $\leq 100 \mu\text{L}$ ) et qu'il puisse être mesuré en fin de centrifugation. La deuxième étape était le dosage hPL via le kit ELISA. Après dilution des échantillons concentrés au 1/5<sup>ème</sup> par la solution zéro de calibration, la gamme et les échantillons ont été déposés en duplicate sur une plaque 96 puits possédant un anticorps monoclonal dirigé vers un site antigénique unique de la molécule hPL. Les surnageants de culture contenant l'hPL endogène ont été incubés dans ces puits avec un conjugué enzymatique (anticorps monoclonal anti-hPL conjugué à la peroxydase de raifort). Après incubation, le conjugué non lié a été lavé. La quantité de peroxydase liée était proportionnelle à la concentration d'hPL dans l'échantillon. Après avoir ajouté la solution de substrat, l'intensité de la couleur mesurée par spectrophotométrie (Enspire®) était proportionnelle à la concentration de l'hPL dans les surnageants. Les concentrations ont été quantifiées en UI/L.

#### **VII.1.2.6. Statistique et analyse des résultats**

Les résultats, représentés sous forme d'histogrammes avec moyenne et écart-type, ont été analysés avec le logiciel GraphPad Prism 7. Les tests statistiques effectués étaient des tests de Student appariés (ou paired t. tests). La réalisation de tests appariés a été choisie car les échantillons étaient considérés comme appariés puisque liés aux placentas

utilisés. Les différences ont été considérées comme significatives dès lors que  $p$  était inférieur à 0,05.

### VII.1.3. Perfusion d'un cotylédon *ex vivo*

Le modèle de cotylédon perfusé *ex vivo* consiste à mimer physiologiquement le passage transplacentaire du mélange des 16 HAP environnementaux de la face maternelle vers la face fœtale et ainsi déterminer le transfert des HAP qui peuvent passer de la mère au fœtus.

Les placentas ont été perfusés en circuit ouvert, c'est-à-dire sans recirculation des perfusats maternel et fœtal, selon une méthode adaptée de Schneider [42]. Cette méthode consiste à rétablir la double circulation materno-fœtale, *ex vivo*, sous contrôle du pH, de la température et des débits de perfusion. Pour la perfusion (solution maternelle et solution fœtale), une solution saline physiologique a été utilisée (Earle's Balanced Salts® Us Biological) supplémentée en BSA 25g/L (BSA 30% Euromedex®). Un contrôle continu du pH des solutions a été assuré et maintenu à 7,4 +/- 0,1 pour la solution maternelle et 7,2 +/- 0,1 pour la solution fœtale. Les solutions ont été maintenues à 39°C dans un bain marie afin d'obtenir une température dans les tubulures à 37 °C pour l'arrivée dans le placenta. L'homogénéisation des solutions a été assurée par agitation magnétique permanente. La perfusion débutait après avoir enlevé la membrane superficielle du placenta et vérifié que ce dernier n'était pas lésé. Côté fœtal, une branche de l'artère choriale vascularisant un cotylédon et la veine associée ont été canulées par les cathéters appropriés. Un débit de 6 mL/min a été établi afin de s'assurer de l'équilibre existant entre les débits artériels et veineux (en cas de déséquilibre du débit, la perfusion était arrêtée). Sur la face maternelle, un gonflement et un blanchiment progressif du cotylédon perfusé ont été observés, permettant de l'identifier avec certitude. Un témoin de perméabilité placentaire, l'antipyrine (Sigma Aldrich® A5882-25G), a été ajouté dans la solution maternelle ainsi que le mélange des 16 HAP étudiée à une concentration d'environ 1  $\mu$ M final. Deux cathlons ont été introduits dans la chambre intervilleuse et la circulation du côté maternel a été lancée. La durée totale de la perfusion était de 125 minutes. Lors de l'expérience de perfusion, le débit fœtal a été fixé à 6 mL/min et le débit maternel à 12 mL/min. L'équilibre des débits fœtaux artériel et veineux a été contrôlé tout au long de la manipulation, ainsi que la stabilité du débit artériel maternel. Egalement, toutes les 30

minutes, des prélèvements (1 mL) ont été réalisés au niveau maternel afin de déterminer les concentrations d'antipyrine (témoin de la perfusion). De plus, l'effluent fœtal a été recueilli par tranche de 5 minutes, toutes les 5 minutes pendant 30 minutes puis toutes les 15 minutes jusqu'à la fin de l'expérience, afin de déterminer également les concentrations d'antipyrine et de quantifier les HAP qui ont traversé la barrière materno-fœtale. A l'issue des 125 minutes de perfusion, le cotylédon a été conservé à -20°C en vue de la quantification des HAP dans le tissu placentaire.

### **VII.1.3.1. Validation du modèle de perfusion**

Les concentrations d'antipyrine ont été déterminées par LC/UV dans le laboratoire de la maternité de Port Royal. Les dosages d'antipyrine ont été réalisés avec un seuil de détection de 50 µg/L. Les résultats ont été fournis sous forme de concentrations maternelles et fœtales en fonction du temps. La perfusion a été validée si le Taux de Transfert Fœtal (TTF) de l'antipyrine, rapport de la concentration fœtale sur la concentration maternelle, était supérieure à 20% en prenant en compte l'ensemble des prélèvements réalisés au cours de l'expérience. Ce pourcentage supérieur à 20% permet de valider la perfusion d'un point de vue technique avec une intégrité du placenta respectée et une perméabilité suffisante.

### **VII.1.3.2. Quantification des HAP**

La détermination des concentrations des HAP dans les fractions maternelles et fœtales a été réalisée par LC/UV-FD au LSABM, à l'ESPCI. Le protocole utilisé pour la quantification des HAP correspondait à celui décrit dans l'article 1 pour les échantillons de sérums. En outre, la procédure analytique a été validée dans ce nouveau milieu biologique par l'approche des profils d'exactitude. La validation s'est déroulée sur 4 jours. Pour chaque HAP, 4 témoins de validation et 4 niveaux de concentration pour la calibration ont été choisis. Pour chaque témoin de validation, 3 essais ont été réalisés. Concernant les solutions pour la calibration, ces dernières ont été préparées uniquement le premier jour et réinjectées les autres jours de validation. En revanche, pour chaque jour de validation, les témoins de validation ont été préparés et ont été soumis à toute la procédure analytique développée. Ainsi ces échantillons ont été dopés à des concentrations comprises entre 0,2 et 4 ng/mL.

### VII.1.3.3. Méthodes de calcul et analyse statistique

Afin de pouvoir interpréter les données issues de ces expériences, plusieurs formules de calcul concernant les paramètres de transport doivent être introduites :

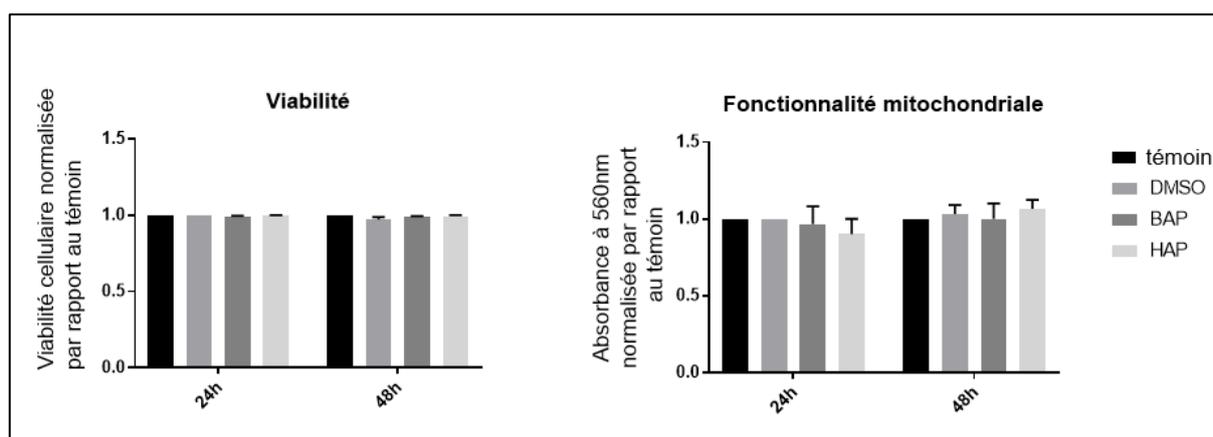
- Le premier paramètre à calculer était le taux de transfert fœtal (TTF) : ce paramètre correspond au rapport de la concentration fœtale d'une molécule donnée sur la concentration maternelle de cette même molécule, multiplié par 100. Le TTF s'exprime en pourcentage et correspond à la fraction de la molécule retrouvée dans la circulation fœtale. Ce dernier a donc été calculé pour les HAP étudiés mais aussi pour la molécule de référence, l'antipyrine.  $TTF = C_f/C_m \cdot 100$ .  
Cf : Concentration fœtale veineuse / Cm : Concentration maternelle artérielle.
- Le deuxième paramètre à étudier était l'indice de clairance (IC). Ce paramètre correspond au rapport du TTF de la molécule étudiée sur le TTF de l'antipyrine. L'IC n'a donc pas d'unité. Ce dernier est compris entre 0 et 1, et plus il se rapproche de 1, plus la molécule étudiée traverse le placenta, et inversement. L'IC permet de comparer les placentas entre eux. En effet, ce paramètre permet de corriger les résultats de TTF des molécules étudiées d'un placenta à un autre grâce au TTF de l'antipyrine.

## VII.2. Résultats

### VII.2.1. Culture primaire de trophoblastes

#### VII.2.1.1. Cytotoxicité des différents traitements à 24h et 48h sur les trophoblastes in vitro

La viabilité et la fonctionnalité des trophoblastes n'ont pas été altérées par un traitement au BaP 1  $\mu$ M, ni par un traitement au mix HAP 1  $\mu$ M, quel que soit le temps d'exposition (24h ou 48h) (cf. **Figure 24**). Différentes concentrations inférieures (de 0,1  $\mu$ M à 1  $\mu$ M) ont été utilisées et toutes ne modifiaient pas la viabilité et la fonctionnalité des trophoblastes en culture primaire. Ce résultat avec le BaP a confirmé les résultats antérieurs du laboratoire ; de plus, le mix HAP 1  $\mu$ M, n'affectant pas non plus la viabilité cellulaire, cette concentration de 1  $\mu$ M pour le BaP et de 1  $\mu$ M pour le mix HAP a été choisie pour toutes les expériences suivantes.



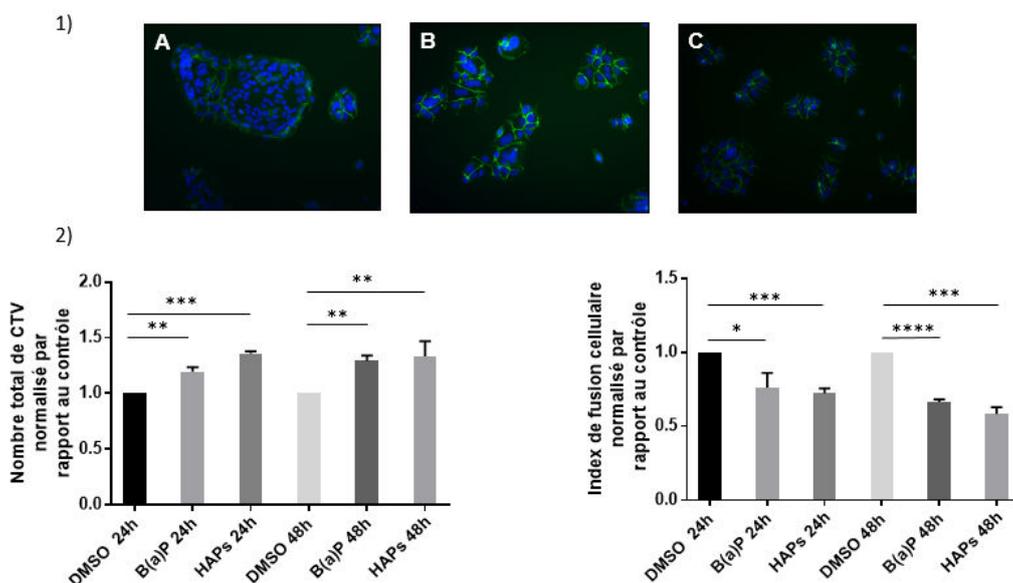
**Figure 24:** Viabilité et fonctionnalité mitochondriale des trophoblastes exposés à différents traitements (DMSO 1/1000, BaP 1 $\mu$ M ou mélange de HAP 1 $\mu$ M) sur une durée de 24h ou 48h. (n=2 cultures de placentas différentes avec 2 mesures par conditions et par placenta).

## VII.2.1.2. Différenciation et fusion des trophoblastes exposés au BaP ou au mélange de HAP pendant 24h à 48h

### VII.2.1.2.1. Index de fusion

Les effets biologiques du BaP et du mélange de HAP sur la différenciation et la fusion des trophoblastes humains ont été observés par immunofluorescence et quantifiés grâce au test de fusion. Après traitement au BaP et au mélange de HAP pendant 48h, les prises de vue ont montré que les cellules restaient agrégées sans pouvoir fusionner (cf. **Figure 25-1b, c**). A l'inverse, les prises de vue des cellules témoins ont montré des plaques de syncytium avec un nombre important de noyaux par cellule (cf. **Figure 25-1a**). Cette observation suggérerait un défaut de fusion par le traitement au BaP ou au mix HAP 1  $\mu$ M.

Effectivement, une augmentation significative du nombre calculé de cellules mononuclées a été observée en présence de BaP ou du mix HAP dès 24h d'exposition (cf. **Figure 25-2**). Le profil était identique après 48h d'exposition. Cette augmentation du nombre de cellules mononuclées était associée à une diminution de l'index de fusion lorsque les cellules étaient traitées au BaP ou au mix HAP dès 24h d'exposition. Cette différence, qui est comparable entre le BaP et le mix HAP, est maintenue après 48h d'exposition (cf. **Figure 25-2**).

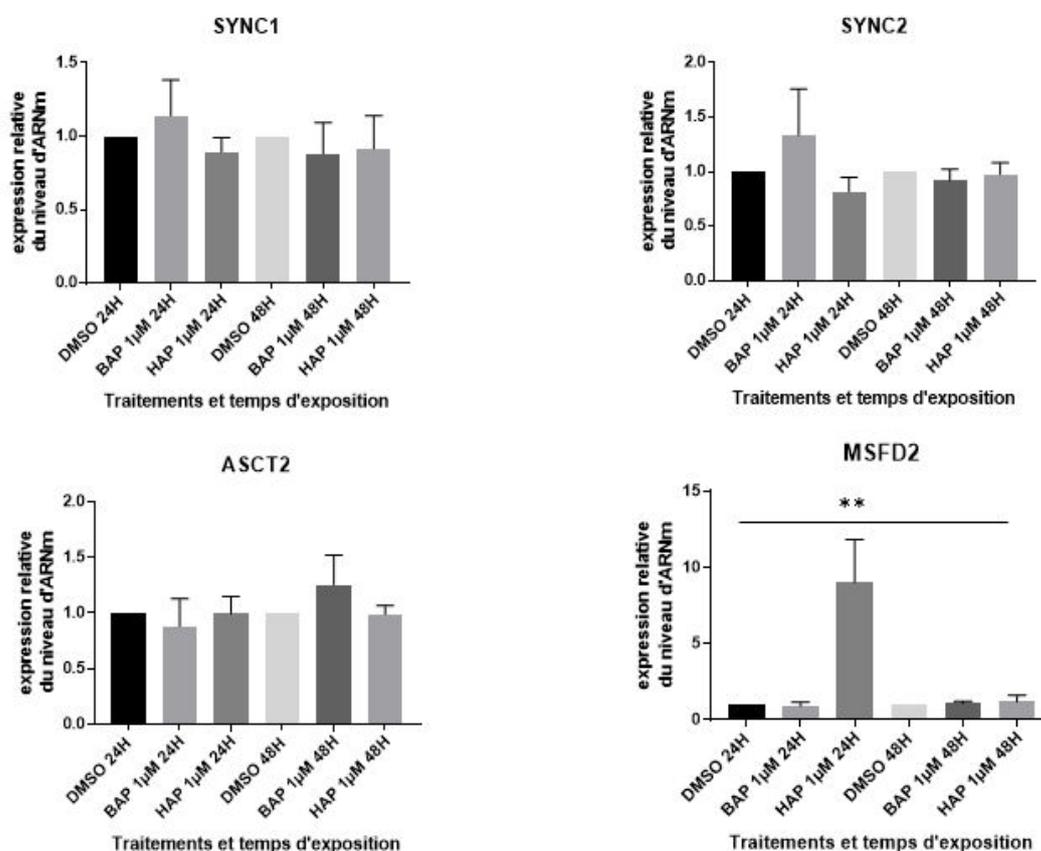


**Figure 25** : 1) Prise de vue de cellules marquées avec l'anticorps anti-desmoplakine d'une culture représentative après exposition au DMSO 1/1000 (témoin, A), au BaP 1  $\mu$ M (B), ou au mélange de HAP 1  $\mu$ M (C) pendant 48h. Les noyaux sont marqués au DAPI. 2) Nombre total de cellules mononuclées et index de fusion après 24h et 48h d'exposition au BaP 1  $\mu$ M ou au mélange de HAP 1  $\mu$ M.

Les résultats présentés dans la **Figure 25** correspondent à 4 cultures de placentas différents avec 2 boîtes par condition et par temps, et un comptage de 12 images par boîte (soit une moyenne sur 96 images par condition et par temps). Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle (DMSO) des temps d'expositions respectifs 24h et 48h.

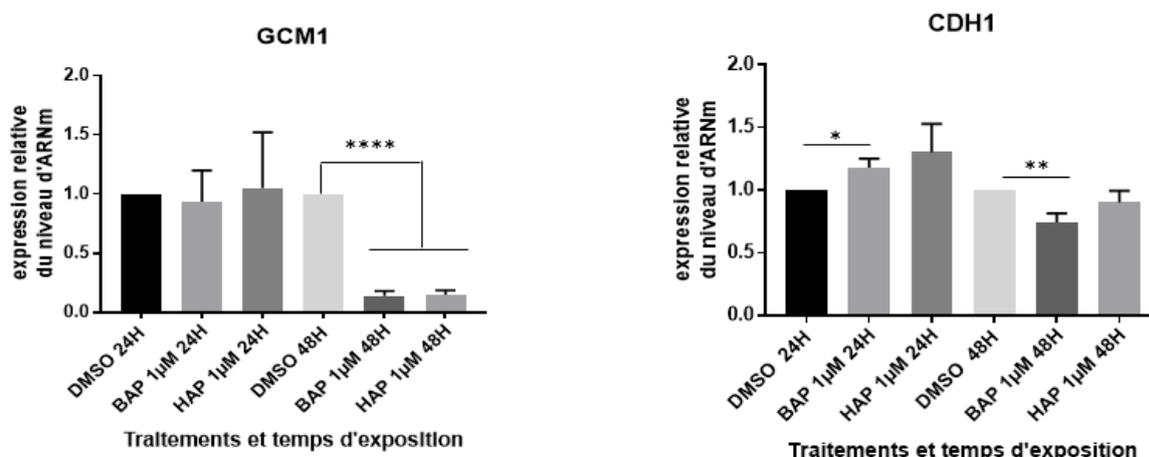
#### VII.2.1.2.2. Analyse transcriptionnelle des molécules impliquées dans la fusion des trophoblastes

Quelles que soient les conditions de cultures, l'expression des syncytines 1 et 2 et celle du récepteur ASCT2 (récepteur de la syncytine 1) ne variaient pas de manière significative. Concernant l'expression de MFSD2 (récepteur de la syncytine 2), seul le traitement au mix HAP pendant 24h induisait sa surexpression significative par rapport au témoin. Cette surexpression d'un facteur 10 était transitoire puisqu'après 48h de traitement au mix HAP, l'expression génique revenait à un niveau basal, comparable au témoin (cf. **Figure 26**).



**Figure 26** : Expression relative des gènes de fusion (*SYNC1* et *SYNC2*) et de leurs récepteurs respectifs (*ASCT2* et *MSFD2*) sur les trophoblastes traités au BaP (1 μM) ou au mélange de HAP (1 μM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messager normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse était réalisée sur n=4 cultures de placentas différents

Pour ce qui est des facteurs de régulation impliqués dans la formation du syncytiotrophoblaste, l'expression génique de *GCM1* était inchangée après 24h de traitements par le BaP ou le mélange de HAP. Cependant, après 48h de traitement, un effet tardif du BaP et du mix HAP était observé puisque ces traitements induisaient de manière significative une réduction de l'expression de *GCM1* par rapport au témoin (cf. **Figure 27**). Enfin, l'expression génique de *CDH1* était augmentée de manière significative après 24h de traitement au BaP puis diminuée après 48h de traitement au BaP (cf. **Figure 27**). Le mélange de HAP n'avait pas d'effet significatif.

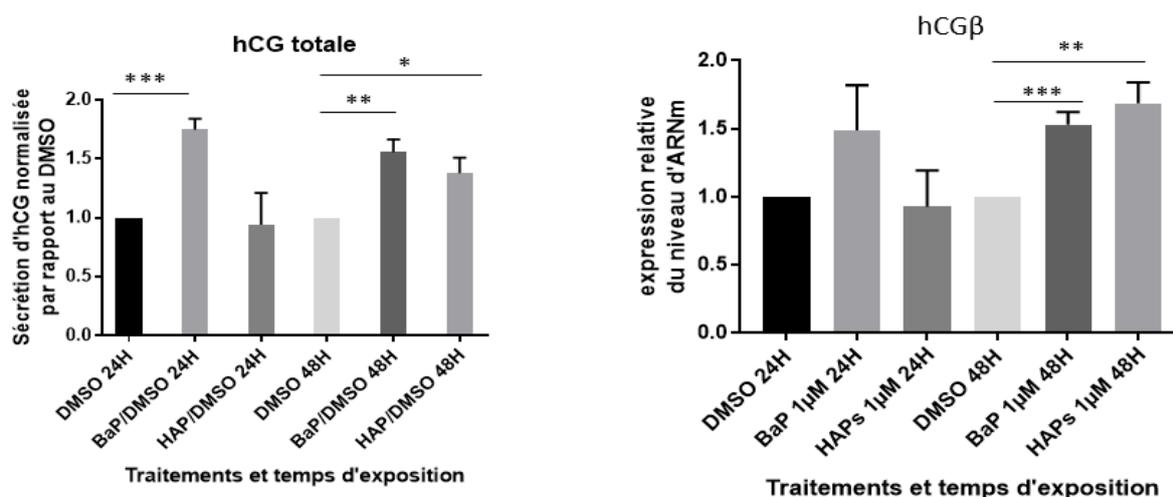


**Figure 27:** Expression relative des gènes *GCM1* et *CDH1* sur les trophoblastes traités au BaP (1 μM) ou au mélange de HAP (1 μM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messager normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents.

### VII.2.1.3. Effet du BaP ou du mix HAP sur la fonction sécrétrice des trophoblastes

#### VII.2.1.3.1. Impact sur la sécrétion et l'expression génique de l'hCG

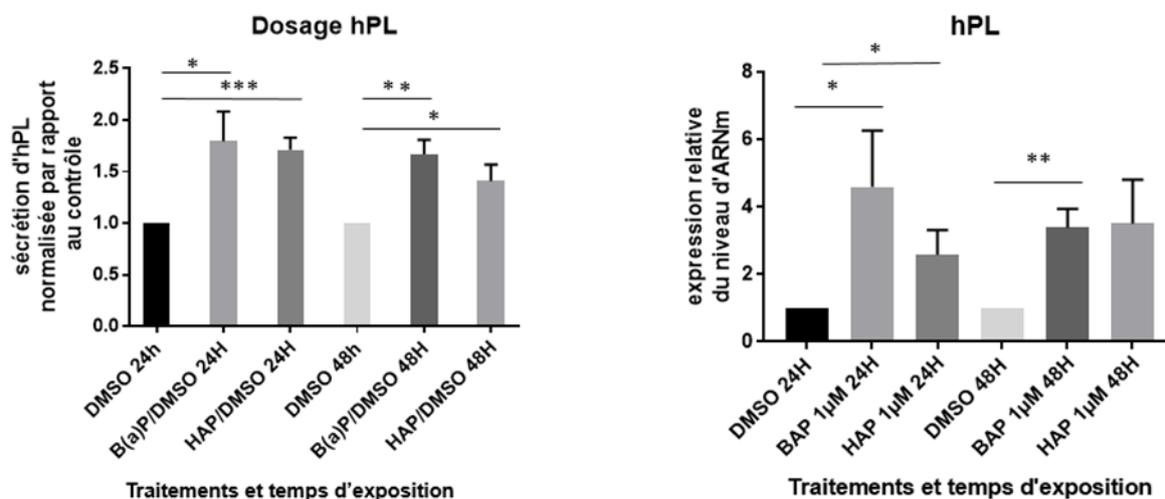
Après 24h ou 48h d'exposition au BaP, la sécrétion d'hCG était augmentée de manière significative par rapport au contrôle DMSO. De manière intéressante, l'effet du mélange de HAP semble plus tardif car il n'est visible qu'après 48h d'exposition, avec également une augmentation significative de la sécrétion d'hCG (cf. **Figure 28**), sans différence de niveau entre le BaP et le mélange de HAP. Ces résultats sont concordants avec une augmentation de l'expression génique d'hCGβ par les trophoblastes traités au BaP ou avec le mélange de HAP. Cependant ce qui était significatif à 24h pour le BaP au niveau de la sécrétion n'est plus qu'une tendance pour l'expression génique (cf. **Figure 28**).



**Figure 28:** Mesure de la sécrétion d'hCG et de l'expression relative d'hCGβ après traitement de 24h et 48h par le BaP ou le mélange de HAP 1 μM. (n= 4 cultures de placentas différentes). Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle (DMSO) des temps d'expositions

#### VII.2.1.3.2. Impact sur la sécrétion et l'expression génique de l'hPL (human Placental Lactogen)

La sécrétion d'hPL était augmentée de façon significative et comparable dans les cultures de trophoblastes traités pendant 24h ou 48h en présence du BaP ou du mélange de HAP (cf. **Figure 29**). Ces résultats sont concordants avec une augmentation de l'expression génique, à l'exception du traitement HAP 1 μM pendant 48h qui montrait une tendance mais n'était pas significatif (cf. **Figure 29**).



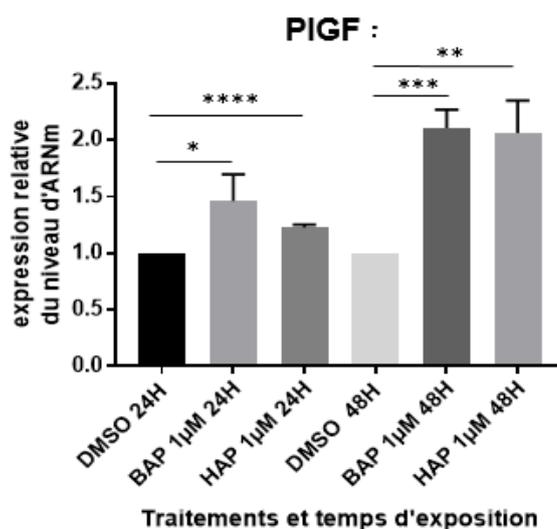
**Figure 29:** Mesure de la sécrétion d'hPL et de l'expression génique relative d'hPL après traitements de 24h ou 48h par le BaP ou les HAP 1 µM (n=4 cultures de placentas différents). Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle (DMSO) des temps d'exposition respectifs

### VII.2.1.3.3. Impact sur la synthèse des stéroïdes

L'expression génique des CYP11A1 et CYP19 après exposition des trophoblastes au BaP et au mélange de HAP pendant 24h et 48h a été suivi. Aucune différence significative n'a été observée. La stéroïdogénèse ne semblait donc pas être affectée par les traitements (résultats non montrés).

### VII.2.1.3.4. Impact sur l'expression d'un facteur d'angiogénèse PlGF

Après 24h et 48h de traitement, quels qu'ils soient, les trophoblastes surexprimaient de manière significative PlGF. Cette induction était progressive entre les temps 24h et 48h et les effets étaient comparables entre le BaP et le mélange de HAP (cf. **Figure 30**).

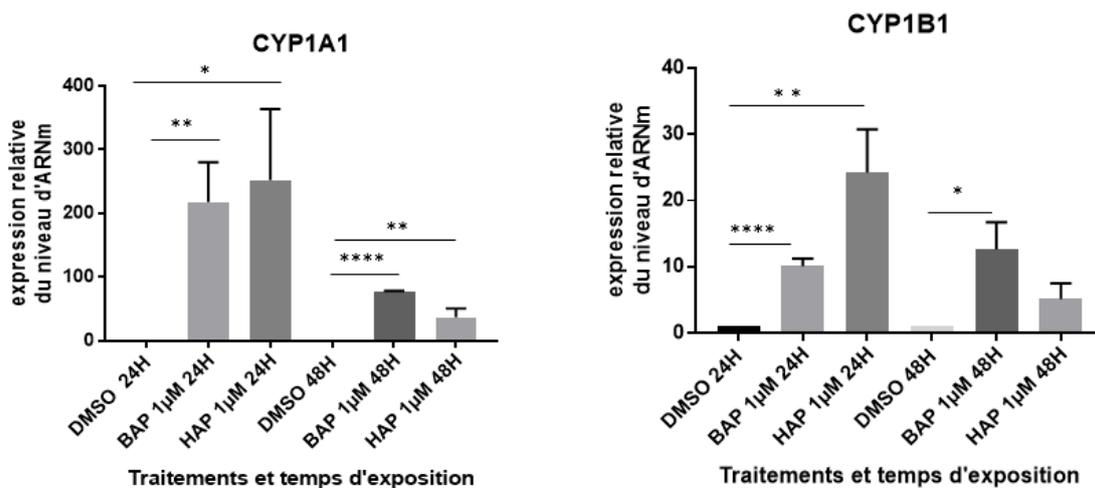


**Figure 30:** Expression relative du gène de PIGF sur les trophoblastes traités au BaP (1  $\mu$ M) ou au mélange de HAP (1  $\mu$ M) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messager normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents.

#### VII.2.1.4. Effet d'un traitement au BaP ou au mix HAP sur les autres fonctions placentaires du trophoblaste

##### VII.2.1.4.1. Effet sur les fonctions de détoxification CYP1A1 et CYP1B1

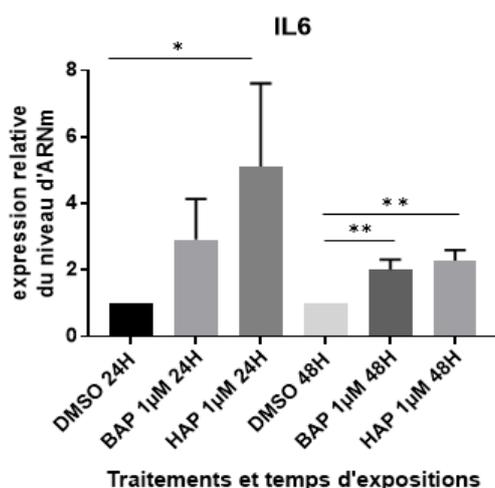
D'après la **Figure 31**, que ce soit après 24h ou après 48h de traitement, l'exposition des trophoblastes au BaP ou au mélange de HAP induisait une surexpression significative des CYP1A1 et CYP1B1 par rapport au témoin. De manière intéressante, les ratios d'augmentation étaient comparables entre le BaP et le mélange de HAP. Ils sont de 200 à 250 à 24h pour le CYP1A1 et de 10 à 25 pour le CYP1B1. Les ratios diminuaient à 48h mais il persistait une augmentation significative (30-80 fois supérieur) pour CYP1A1 quel que soit le traitement et pour le BaP (15 fois supérieur) uniquement concernant le CYP1B1.



**Figure 31:** Expression relative des gènes CYP1A1 et CYP1B1 sur les trophoblastes traités au BaP (1 µM) ou au mélange de HAP (1 µM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARNm normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents.

#### VII.2.1.4.2. Effet sur un facteur d'inflammation IL6

L'expression d'IL6 était augmentée par rapport au contrôle après traitement au BaP et au mélange de HAP pendant 24h. Les variations d'expression étaient importantes et rendaient significative seule l'augmentation sous l'effet du mélange de HAP. De manière intéressante, l'exposition des trophoblastes pendant 48h au BaP ou au mélange de HAP induisait une augmentation de l'expression d'IL6 significative par rapport au contrôle mais moins forte qu'à 24h (cf. **Figure 32**).

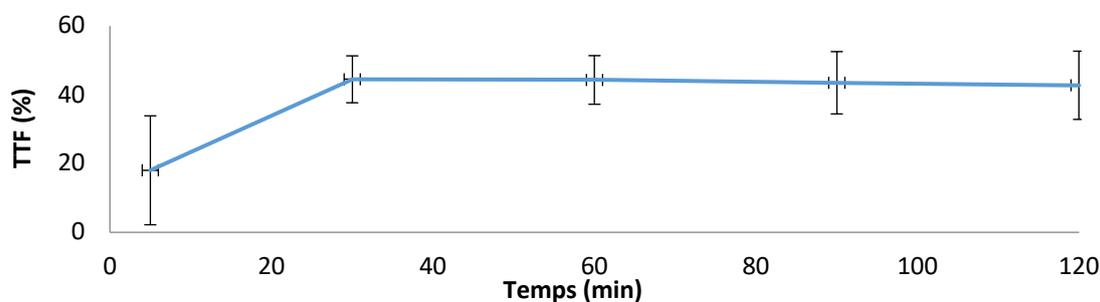


**Figure 32:** Expression relative du gène IL6 sur les trophoblastes traités au BaP (1 μM) ou au mélange de HAP (1 μM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messager normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents.

## VII.2.2. Etude du passage transplacentaire du mix HAP par le modèle du cotylédon ex vivo

### VII.2.2.1. Validation des perfusions

Pour évaluer le transfert des HAP à partir du compartiment maternel, les cotylédons de 5 placentas humains ont été perfusés en présence d'antipyrine. La cinétique du TTF moyen de l'antipyrine est illustrée dans la **Figure 33**. Comme attendu, le TTF de l'antipyrine augmentait rapidement au cours des 20 premières minutes, puis restait constant pendant la période de perfusion. Le TTF moyen à l'équilibre de l'antipyrine était de  $43,8 \pm 8,2\%$ , démontrant l'intégrité des cotylédons utilisés et la perméabilité en termes d'échanges placentaires entre les circulations maternelle et fœtale (cf. **Figure 33**).



**Figure 33:** Variation du taux de transfert de l'antipyrine aux différents temps de perfusions (n=5 placentas différents perfusés avec le mélange de HAP 1 μM).

### VII.2.2.2. Analyse des perfusions

Le **Tableau 13** présente les concentrations des HAP dans la solution de dopage (DMSO) à 2  $\mu\text{M}$  et à 1  $\mu\text{M}$  ainsi que les concentrations maternelles retrouvées au cours des différentes expériences de perfusions, après le traitement d'échantillon. Au vu des résultats obtenus, il semblerait qu'il y ait eu un problème lors de la préparation des solutions individuelle du NAPH et de l'ACY ou bien lors de la réalisation du mélange des 16 HAP. En effet, ces derniers se retrouvent en dessous de la LOQ alors qu'ils devraient être quantifiables d'après les calculs théoriques. Les concentrations de certains isomères tels que le FLT et le PYR étaient différentes des concentrations calculées théoriquement. Cependant, malgré toutes ces différences, il a tout de même été décidé de garder ce mélange pour réaliser les expériences de perfusions. En effet, le but initial était de pouvoir évaluer l'effet « cocktail » des HAP sur le passage transplacentaire. C'est pourquoi, étant donné que les HAP sont à des concentrations du même ordre de grandeur, cette solution a été utilisée pour la suite des expériences. Malheureusement, le NAPH et l'ACY n'ont pas été étudiés.

**Tableau 13:** Concentrations mesurées dans les solutions de dopage et dans les fractions maternelles

HAP	Concentration théorique à 1 µM (ng/mL)	Solution dopage à 2 µM (ng/mL)	Solution dopage à 1 µM (ng/mL)	Solution maternelle: Perfusion 1 (ng/mL)	Solution maternelle: Perfusion 2 (ng/mL)	Solution maternelle: Perfusion 3 (ng/mL)
NAPH	8,0	2,5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
ACY	9,5	3,4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
ACE	9,6	18,2	8,6	13,6	10,6	8,0
FLO	10,4	23,5	11,4	16,1	14,0	10,7
PHE	11,1	26,4	12,8	15,2	14,5	14,5
ANT	11,1	28,9	14,2	11,7	13,9	12,2
FLT	12,6	52,1	25,1	22,7	27,0	25,0
PYR	12,6	27,4	12,2	10,1	12,4	11,6
BaA	14,3	30,1	14,5	11,0	10,7	11,6
CHR	14,3	28,2	13,8	10,5	12,2	11,4
BbF	15,8	45,8	13,6	9,9	12,2	12,3
BkF	15,8	35,2	17,4	9,3	11,8	12,0
BaP	15,8	28,4	13,8	9,5	11,4	11,0
DahA	17,3	33,5	16,6	11,9	11,5	13,1
BghiP	17,3	30,5	15,1	12,9	15,2	14,4
IcdP	17,3	37,9	15,0	11,5	12,5	13,5

Les indices de clairance des différents HAP étudiés ont été calculés à partir des concentrations déterminées dans les fractions maternelles et fœtales pour chaque HAP et des TTF. Ces TTF sont présentés dans l'**Annexe -Figure s 6**. Au préalable, la procédure analytique pour la quantification des HAP dans ce nouveau milieu biologique a été validée par l'approche des profils d'exactitudes. Malheureusement, seules les fractions maternelles et fœtales de 3 perfusions (3 placentas différents) ont été analysées, à ce jour. En outre, il est important de noter que la quantification d'ACE dans les fractions fœtales était impossible en raison d'une impureté qui coéluait au même temps de rétention. De plus, la concentration d'IcdP était en dessous de la limite de détection dans les différentes fractions fœtales au cours de l'expérience de perfusion malgré sa concentration initiale supérieure à la limite de quantification dans la solution maternelle. Pour les raisons évoquées ci-dessus, les cinétiques de passage transplacentaire d'ACE et d'IcdP n'ont donc pas été étudiées. Ainsi la **Figure 34** présente les profils d'exactitudes des différents HAP détectés et quantifiés dans les fractions fœtales. Afin d'atteindre les meilleures sensibilités possibles pour suivre la cinétique de passage transplacentaire, des limites d'acceptabilité non constantes sur toute la gamme d'étude ont été définies pour la majorité des composés. En effet, d'après nos précédents travaux sur la validation de cette même procédure analytique pour l'analyse d'échantillons de sérums, il a été démontré qu'à faible concentration (1<sup>er</sup> témoin de validation), proche de la limite de quantification, des limites d'acceptabilité jusqu'à 80% étaient obtenues. C'est pourquoi, pour ce nouveau milieu biologique, des limites d'acceptabilité de type affine définies entre 80% et 40% entre le premier et le deuxième témoin de validation puis fixées à 40% pour le reste de la gamme de concentration ont été choisies pour la majorité des composés étudiés. En revanche, concernant le FLO, la deuxième limite d'acceptabilité (à partir du deuxième témoin) a été fixée à 50%. Par ailleurs, seuls le PHE, le BaA et le BbF ont été obtenus avec des limites d'acceptabilité fixées à 60% sur toute la gamme de concentration étudiée. Enfin, cette validation, avec les limites d'acceptabilité fixées, permet d'atteindre des limites de quantification comprises entre 0,2 et 4 ng/mL dans ce milieu biologique, pour les 12 HAP détectés dans les fractions foetales.

Enfin, la **Figure 35** représente, grâce aux indices de clairance calculés, les différentes cinétiques obtenues pour chaque HAP et pour chaque perfusion réalisée (n=3). Notons qu'en raison du nombre limité de perfusions analysées (n=3), il était plus

judicieux de représenter chaque cinétique obtenue pour chaque placenta et pour chaque HAP. En effet, à ce stade de l'étude, les moyennes des indices de clairance n'ont pas été calculées. Ce choix a été motivé par le fait que certaines valeurs sont parfois inattendues/aberrantes. C'est pourquoi, dans cette partie, nous nous proposons de définir des profils de cinétiques de passage transplacentaire, comme illustré dans la **Figure 35** par les courbes rouges, en attendant les résultats des perfusions manquantes pour avoir un profil plus représentatif (n=5).

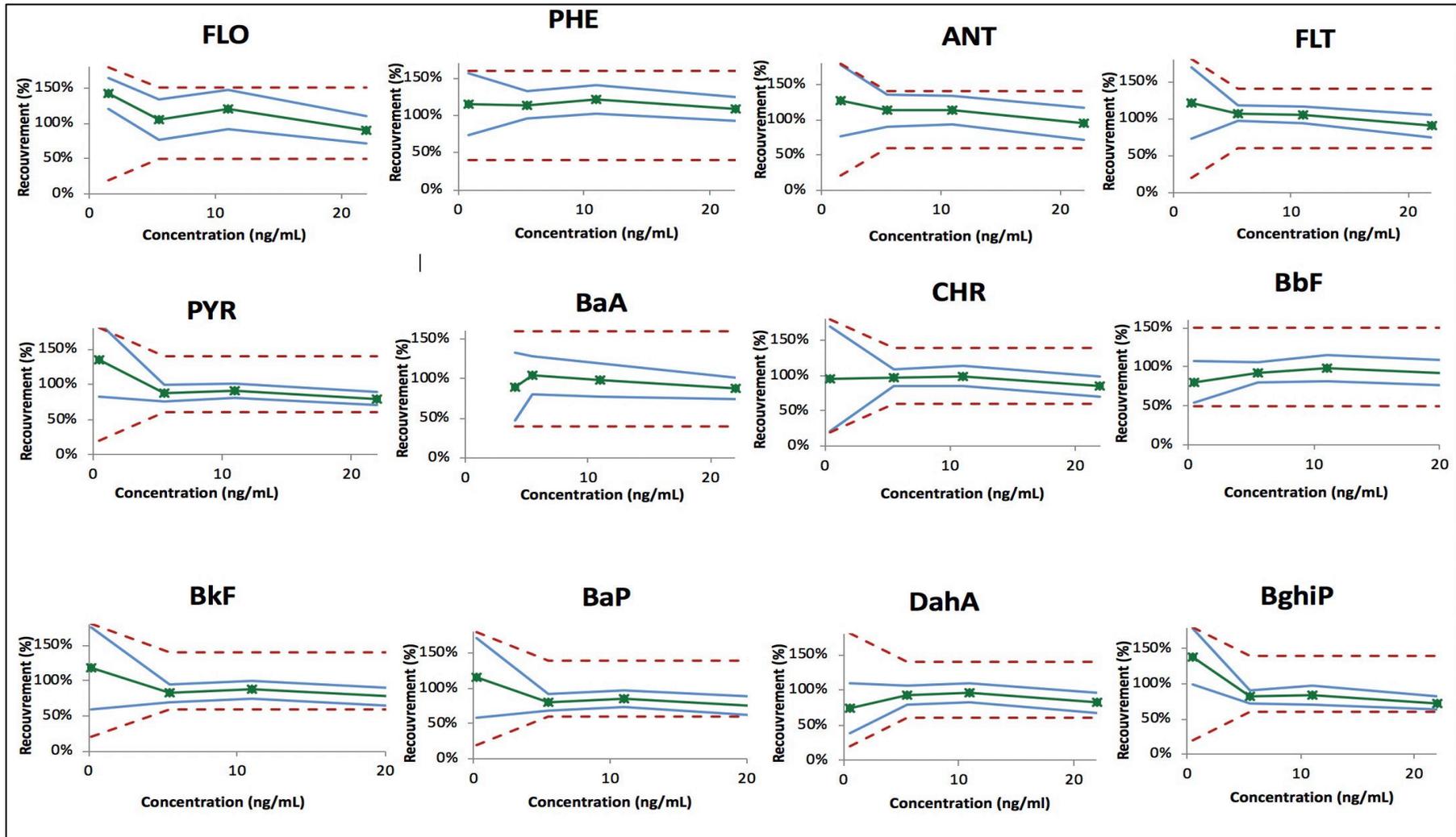


Figure 34: Profils d'exactitude des différents HAP. Les points verts correspondent aux concentrations calculées dans les témoins de validation, les courbes vertes correspondent aux biais relatifs, les courbes bleues représentent les limites hautes et basses de tolérance et les courbes en pointillés rouges sont les limites d'acceptabilité.

Ainsi, d'après les résultats obtenus, il était possible de distinguer 3 profils de cinétique de passage transplacentaire différents. Le premier profil concernait les HAP suivants : FLO, PHE, ANT, FLT et PYR. Pour ces HAP, le passage du compartiment maternel vers le compartiment fœtal était immédiat. C'est pourquoi dans la majorité des cas, pour ces composés l'indice de clairance obtenu au temps 1 min n'était pas nul. Une fois la molécule passée dans le compartiment fœtal, un plateau était rapidement atteint avec des indices de clairance compris entre 0,6 et 0,8. Ces résultats suggèrent donc un passage transplacentaire rapide du compartiment maternel vers le compartiment fœtal pour ces 5 HAP avec un équilibre atteint dès les premières minutes de perfusions.

Ensuite le deuxième profil de cinétique concernait les 5 HAP suivants : BaA, CHR, BbF, BkF et BaP. Les résultats obtenus montrent que cette cinétique était plus lente et qu'il fallait attendre une quarantaine de minute avant d'atteindre un plateau et par conséquent être à l'équilibre. Ainsi, l'indice de clairance de ces composés augmentait pendant les 40 premières minutes avant d'atteindre un maximum aux alentours de 0,6.

Enfin, concernant le passage du DahA et le BghiP, ces 2 HAP avaient une cinétique différente des deux groupes précédemment définis. En effet, d'après les résultats illustrés sur la figure 12, il a été noté que pour ces 2 composés les indices de clairance augmentaient de manière croissante durant toute l'expérience pour atteindre un maximum compris entre 0,4 et 0,5 à 120 minutes. Néanmoins, l'équilibre n'était pas atteint après les 120 minutes de perfusion. Ces résultats suggèrent donc que la cinétique de passage de ces 2 composés est encore plus lente.

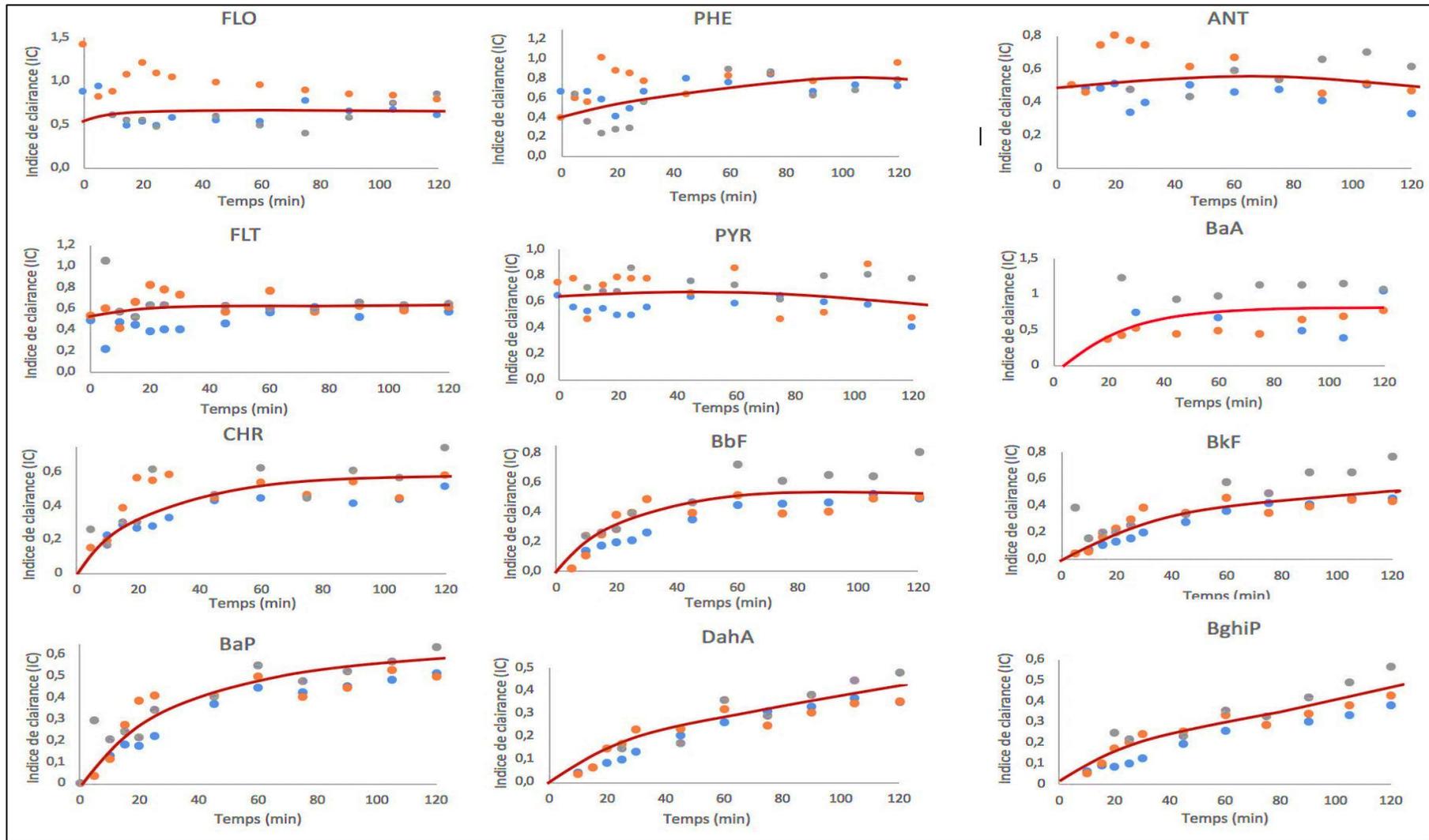


Figure 35: Représentation de l'indice de clairance en fonction du temps de perfusions pour les 12 HAP détectés et quantifiés dans les fractions fœtales (n=3 placentas).

### VII.3. Discussion

Le premier objectif de ce projet était de caractériser l'effet d'un mélange de HAP environnementaux sur les fonctions du trophoblaste, tout particulièrement de différenciation et les fonctions endocrines, et de les comparer à l'effet du BaP seul. Des études précédentes menées dans le laboratoire ont démontré que le BaP altérait les fonctions endocrines du placenta à terme. En effet, une exposition des trophoblastes humains (unité fonctionnelle du placenta) au BaP entraîne la surexpression du gène codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'hCG (hCG $\beta$ ), de celui codant pour l'hPL ainsi que leurs sécrétions (résultats non publiés).

Cette deuxième étude avec le mélange de HAP a montré que ces derniers avaient des effets comparables à ceux du BaP en inhibant la différenciation et la fusion des trophoblastes, sur la fonction endocrine en surexprimant hPL et hCG, ainsi que sur les fonctions de détoxifications en surexprimant les CYP1A1 et CYP1B1. Ces fonctions sont indispensables au bon fonctionnement du placenta et donc à une bonne croissance du fœtus et un bon déroulement de la grossesse. Chacune est liée à l'autre et il suffit d'une altération pour ébranler cette machine bien rodée. De fait, une altération de ces fonctions aura obligatoirement une répercussion sur le développement du fœtus. À notre connaissance, aucun HAP n'a été défini comme responsable de grossesses pathologiques, cependant des études ont prouvé que l'exposition aux HAP des femmes enceintes pouvait entraîner à terme des troubles chez l'enfant à différents niveaux. En effet, Perera et son équipe ont prouvé un lien entre l'exposition des mères aux HAP, des troubles de comportements et des altérations du QI chez les enfants à plus long terme (3-8 ans) [58,167,168].

Tout d'abord, nous avons montré qu'une exposition des trophoblastes au mélange de HAP ou au BaP seul pendant 24h ou 48h induisait une forte diminution de la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. Or, cette fusion permet un renouvellement du syncytiotrophoblaste qui assure les échanges fœto-maternels et les fonctions endocrines du placenta. Les partenaires impliqués dans la formation du syncytiotrophoblaste étaient les syncytines 1 et 2 et leur récepteur respectif (ASCT2 et MFSD2). De manière inattendue, seul le mix de HAP entraînait une surexpression du gène du récepteur de la syncytine 2 (MFSD2) de façon transitoire. Cette surexpression d'un facteur 10 pourrait s'expliquer comme un mécanisme de régulation impliquant un HAP

autre que le BaP. Une analyse individuelle des HAP permettrait de vérifier cette hypothèse. D'autres facteurs interviennent également dans la régulation de la fusion comme GCM1 (Glial cells missing-1) et CDH1 (Ecadhérine). Notamment nous avons montré qu'une exposition de 48h des trophoblastes au BaP ou au mix HAP provoquait une diminution importante de l'expression génique de GCM1. Ce facteur de transcription est connu pour up-réguler l'expression des syncytines. Or, jusqu'à 48h, l'expression des syncytines n'était pas modifiée par les traitements. Il serait donc nécessaire d'étudier leur expression génique et protéique après 48h de traitement. Il est décrit qu'une diminution de GCM1 peut être impliquée dans des pathologies de grossesse comme le RCIU et la prééclampsie [169]. Il est possible de suggérer que le BaP comme le mix HAP en exposition prolongée pourrait être impliqué dans ces pathologies.

La E-cadhérine est présente dans les cytotrophoblastes et down-régulée pour permettre la fusion des CT en ST. Cette étude a montré que seul le BaP altérait de façon significative l'expression de CDH1, en la surexprimant après 24h de traitement, ce qui est en accord avec l'altération de la fusion des trophoblastes. En revanche, la down régulation à 48h était en contradiction avec les résultats obtenus sur la fusion. Il semble donc nécessaire d'étudier l'expression protéique de CDH1.

D'une manière générale, afin de comprendre les mécanismes qui peuvent être impliqués au cours de la syncytialisation en présence de BaP ou du mélange de HAP, il serait intéressant de suivre l'expression d'une protéase impliquée dans les mécanismes de fusion des trophoblastes, ADAM 12 (A Disintegrin And Metalloproteinases 12). Effectivement, celle-ci a pour rôle de promouvoir l'invasion et la fusion trophoblastique notamment en régulant GCM1 et les syncytines [170]. De la même manière, il serait intéressant d'observer l'effet de ces deux traitements sur la voie de signalisation AMPc/PKA qui est la voie de référence pour la fusion des CT en ST. Notamment, un dosage de l'AMPc pourrait indiquer si cette voie est dérégulée sous l'effet des traitements au BaP et au mélange de HAP. De plus, il est montré que cette voie de signalisation est impliquée dans la sécrétion des hormones de grossesse (hCG et hPL) [171]. Une diminution de fusion devrait entraîner une diminution de la sécrétion des hormones par le syncytiotrophoblaste, comme l'hCG et hPL. Or, de manière paradoxale, alors que la fusion des trophoblastes en présence de BaP ou du mélange de HAP diminuait, l'exposition des trophoblastes à ces deux traitements entraînait une surexpression de la fonction

endocrine. Néanmoins des nuances entre les effets du BaP et du mélange de HAP ont été observées. Effectivement, seule l'exposition au BaP entraînait une surexpression de la sécrétion de l'hCG dès 24h suggérant un effet plus tardif du mélange de HAP sur la sécrétion d'hCG uniquement visible à 48h d'exposition. Une surexpression des hormones de grossesse est le plus souvent associée à des pathologies placentaires comme l'hypertension, la prééclampsie ou encore un retard de croissance intra-utérin [172]. Une des raisons pouvant expliquer cette surexpression serait un vieillissement prématuré des trophoblastes en présence de BaP ou du mélange de HAP qui provoquerait un relargage plus important des hormones. Cette hypothèse serait d'autant plus probable, que le placenta semble vouloir compenser la fonction de différenciation et de fusion des trophoblastes en les incitant à relarguer davantage l'hCG et l'hPL en présence de polluants environnementaux. Les expressions d'hCG, d'hPL et de PlGF sont connues pour être CREB-dépendante [173]. L'hypothèse pouvant être émise pour expliquer leur surexpression en présence du mélange de HAP ou du BaP, est que ces polluants puissent activer la transcription de ces gènes via le facteur de transcription CREB. Ainsi les HAP pourraient induire une augmentation d'AMPC dans les cytotrophoblastes exposés, ce qui pourrait alors activer la PKA, entraîner la phosphorylation de CREB et ainsi activer la transcription de gènes CREB-dépendants ; d'où l'importance des dosages d'AMPC produits par les trophoblastes traités.

Des résultats précédents dans le laboratoire ont prouvé qu'il existait deux modes de production de l'hCG par les cytotrophoblastes : une production constitutive et une production induite par des ligands exogènes comme le BaP et qui dépend strictement de la voie AhR (résultats non publiés). Or, ces travaux ont montré que le BaP et le mélange de HAP avait des effets comparables sur la surexpression de CYP1A1 et de CYP1B1 suggérant ainsi une voie d'activation par AhR semblable pour les deux traitements à 24h et 48h. Il est probable que l'induction de CYP1A1 et CYP1B1 par le mélange des 16 HAP (ou le BaP seul) va permettre l'augmentation du métabolisme des xénobiotiques et ainsi conduire à une augmentation de la formation d'adduits. Certains de ces adduits peuvent mener à la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxide ou le peroxide d'hydrogène qui sont associés le plus souvent à des lésions cellulaires et à l'apoptose [174]. De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une surexpression de facteurs intervenant dans les phénomènes apoptotiques comme les MAPK (Mitogen-

activated protein kinases) ou encore une surexpression des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B (Nuclear factor Kappa B) en présence de HAP (que ce soit le mélange ou le BaP seul). Ces facteurs pourraient permettre l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 [175]. En effet, nous avons montré qu'un traitement au mix HAP pendant 24h ou 48h et un traitement de 48h au BaP entraîne une surexpression d'IL-6. Ces résultats confortent l'hypothèse de stress oxydant et du vieillissement prématuré du placenta lorsqu'il est exposé à des polluants environnementaux tels que les HAP.

Le deuxième objectif de ce projet a été de caractériser qualitativement et quantitativement le passage transplacentaire des HAP à partir du mélange réalisé précédemment. Pour ce faire, le modèle de cotylédon humain perfusé a été utilisé pour étudier la cinétique du transfert d'un mélange de HAP à travers le placenta. Ce modèle est la seule technique expérimentale permettant d'étudier le transfert placentaire humain avec une double circulation intacte de la mère et du fœtus et du tissu placentaire [176]. Par diffusion passive, le taux de transfert à travers la barrière est déterminé par les propriétés physicochimiques de la molécule, principalement le poids moléculaire, la liposolubilité, le degré d'ionisation et le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques. L'ajout à la circulation maternelle d'un marqueur ne subissant qu'une diffusion passive, telle que l'antipyrine, peut être utilisé pour évaluer l'intégrité du tissu placentaire ainsi que la perméabilité de la membrane.

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de l'antipyrine nous a permis de comparer les différents placentas perfusés entre eux en termes de passage. Notre étude a démontré que la cinétique du transfert des HAP au cours de la procédure de perfusion est différente de celle de l'antipyrine. En effet, 3 groupes de cinétique de transfert ont pu être mis en évidence. Ainsi, les HAP les plus légers (FLO, PHE, ANT, FLT et PYR), avec une masse moléculaire comprise entre 166 et 202 g/mol et des valeurs de log P comprises entre 4,0 et 5,4, diffusaient rapidement du compartiment maternel vers le compartiment fœtal. Il semble donc que ces HAP, peu hydrophobes, passent facilement la barrière placentaire, en raison de leur faible liposolubilité. Au regard des valeurs d'indice de clairance inférieur à 1 (entre 0,6 et 0,8), nous pouvons également émettre l'hypothèse que ces HAP diffusent moins vite que l'antipyrine.

Pour les HAP avec des masses moléculaires plus importantes, (BaP au BghiP), la diffusion d'un compartiment à un autre était plus lente. Cette cinétique plus lente laisse penser que ces HAP, avec un nombre de cycles aromatiques supérieurs à 4 passent moins la barrière placentaire. Cette observation peut s'expliquer du fait que ces HAP sont plus liposolubles (Log P compris entre 5,9 et 7,2) que les HAP de faible poids moléculaire. En effet, les HAP, quels qu'ils soient, sont connus pour interagir fortement avec les protéines, et plus particulièrement les HAP les plus hydrophobes. Mais, à ce jour, le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques pour chaque HAP n'est pas connu. Par ailleurs, nous savons que plus le poids moléculaire d'une molécule est important, plus sa liaison aux protéines plasmatiques est élevée. Or, des résultats précédant concernant le transfert du BaP ont montré que son passage augmentait avec des concentrations d'albumine croissante (résultats non publiés).

En outre, il a été noté que la dispersion des résultats obtenus entre les différentes perfusions était plus importante, en particulier en début de cinétique. Ce phénomène est d'autant plus marqué pour les 5 HAP les plus légers. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette observation. Tout d'abord, des résultats précédents ont démontré que les HAP les plus polaires sont les plus sensibles au protocole analytique, notamment à l'étape d'évaporation comprise dans la préparation d'échantillon. En outre, pour tous les HAP, la validation du protocole analytique a mis en évidence que des limites d'acceptabilité importantes, en particulier pour les faibles concentrations étaient obtenues. Or la dispersion observée est d'autant plus importante au début de la cinétique, c'est-à-dire où les concentrations quantifiées sont les plus faibles. L'autre hypothèse qui pourrait expliquer ces résultats serait un comportement atypique d'un placenta en particulier (points gris sur la figure 12 pour la majorité des composés). En effet, le TTF de l'antipyrine pour cette perfusion était différent des 2 autres perfusions, notamment pendant les 10 premières minutes. Le passage de l'antipyrine était plus lent. Les HAP peuvent s'accumuler dans le tissu placentaire en étant retenu aux protéines intracellulaires et expliquer ainsi les différences de passage observées. En effet, à titre d'exemple dans la littérature, plusieurs études montrent que le passage de certains médicaments est fonction de la concentration en albumine perfusée, du fait de leur fort pourcentage de fixation protéique. Ainsi plus les concentrations en albumine sont importantes, plus les molécules franchissent plus facilement la barrière placentaire et s'accumulent peu. Enfin,

le fait que nous observions différentes cinétiques selon l'HAP étudié nous conforte dans l'idée d'une probable accumulation dans le placenta humain, en particulier pour les HAP les plus lourds au vu de leurs cinétiques et des faibles valeurs d'indice de clairance obtenues (0,4-0,6).

En conclusion, les HAP altèrent les fonctions placentaires tant au niveau de la différenciation cellulaire qu'au niveau endocrine. Le mélange équimolaire des 16 HAP ( $\approx 1 \mu\text{M}$  final) produit en grande majorité les mêmes effets que le BaP ( $1 \mu\text{M}$ ) sur de nombreuses fonctions des trophoblastes. Nous aurions pu nous attendre à ce que le mélange amplifie l'effet de l'altération observée avec le BaP. Néanmoins, nous observons quelques effets différentiels qui peuvent s'expliquer par la nature d'un HAP particulier et/ou par la concentration du BaP. Concernant, le passage transplacentaire des HAP, il a été mis en évidence que les HAP traversaient la barrière placentaire avec des cinétiques différentes. En effet, cette cinétique est dépendante de leurs poids moléculaires mais aussi leurs hydrophobies traduisant ainsi leur liposolubilité. Ainsi trois profils de cinétique différents ont été caractérisés.

Les perspectives, suite à ces premiers travaux, seraient dans un premier temps, d'analyser les fractions maternelles et fœtales des 2 dernières perfusions, afin de confirmer les résultats obtenus pour les 3 autres perfusions. Ensuite, il apparaît nécessaire de finir le développement et la validation de la procédure analytique pour quantifier les HAP dans les tissus placentaires. En effet, grâce à cette méthode et après analyse des cotylédons, il sera possible d'évaluer l'accumulation de ces polluants dans les tissus placentaires. Ainsi l'accumulation dans le placenta humain pourrait expliquer les effets néfastes de l'exposition aux HAP sur les trophoblastes primaires humains observés. Concernant, les cultures primaires, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences avec le mix des HAP réglementés pour l'alimentation et identifier à partir des deux cocktails, les HAP autres que le BaP qui perturbent les fonctions placentaires et qui traversent la barrière placentaire. Sur un plan mécanistique il devient nécessaire de caractériser les voies de signalisation spécifiques à ces polluants.



## **Chapitre VIII**

### **DÉVELOPPEMENT DE LA QUANTIFICATION DES HAP DANS LES TISSUS PLACENTAIRES : PREMIÈRES EXPÉRIENCES**

## **Chapitre VIII. Développement de la quantification des HAP dans les tissus placentaires : premières expériences**

Dans les chapitres précédents, une méthode analytique pour la quantification de 22 HAP réglementés dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical a été développée. Le protocole final a mis en œuvre une préparation d'échantillon comprenant une précipitation des protéines suivie d'une SPE sur support C18 suivie d'une évaporation-redissolution. L'étape de SPE a été automatisée et la procédure analytique a été validée en LC-UV/FD et en GC/MS.

Ensuite, l'impact des HAP sur les fonctions de différenciation et les fonctions sécrétrices placentaires a été étudié avec un mélange de 16 HAP US EPA. Enfin, le passage de ces HAP a également été étudié grâce au modèle *ex vivo* du cotylédon perfusé. L'accumulation placentaire reste à évaluer. Ceci nécessite cependant le développement d'un protocole d'extraction des HAP du placenta avant leur analyse. Ainsi, ce court chapitre présente les premières expériences réalisées dans le but d'analyser les HAP dans les tissus placentaires. Ainsi, l'étape d'homogénéisation du placenta, à savoir la lyophilisation et la sonication de l'extrait, a été étudiée.

## **VIII.1. Matériel et Méthodes**

### **VIII.1.1. Placentas**

Les échantillons biologiques ont été obtenus après consentement écrit de la patiente et approbation du comité éthique local (CPP 2015-Mai-13909). Les échantillons de placenta ont été recueillis après l'accouchement de patientes (par césarienne ou par voie basse) provenant de 2 maternités différentes : Antoine Béclère à Clamart et Beaujon à Clichy. Les morceaux de placenta récupérés étaient lavés de leur sang avec 3 lavages successifs de PBS. Ensuite, une centrifugation pendant 10 min à 4500 tours/min a été réalisée afin d'éliminer l'excédent de PBS. Ensuite, les morceaux de placentas ont été stockés dans des tubes Protein Lobind et conservés à -80°C jusqu'à leurs utilisations.

### **VIII.1.2. Réactifs chimiques**

L'ACN de qualité HPLC et le THF provenaient de Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'eau déionisée a été obtenue par un système de purification milli-Q (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les solutions étalons des HAP suivants : ACY (99% de pureté), CPcdP (99% de pureté), BcF (97% de pureté), BjF (99,7% de pureté), DalP (99,8% de pureté), DaeP (99,8% de pureté), DahP (99% de pureté), DaiP (99% de pureté) à 10 mg/l dans l'ACN et une solution étalon des 16 HAP US-EPA à 100 mg/l dans l'ACN ont été achetées à Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). Les différentes solutions de HAP utilisées au cours de cette étude ont été préparées à partir de solutions individuelles à une concentration de 10 mg/L dans l'ACN (CIL Cluzeau). Toutes les solutions ont été conservées au frais jusqu'à leur utilisation (6°C).

### **VIII.1.3. Système chromatographique et conditions d'analyse**

Les analyses en LC/UV-FD ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase liquide série 1200 (Agilent Technologies, Massy, France) doté d'une pompe binaire, d'un échantillonneur automatique, d'un détecteur à barrettes de diodes, d'un détecteur à fluorescence. La chaîne était contrôlée par le logiciel ChemStation. Une colonne spéciale HAP (100 x 2,1 mm, 3 µm, Agilent Technologies) a été maintenue à 35 ° C avec un four à colonne (Croco-cil, Interchim, Montluçon, France). Les échantillons ont été analysés en utilisant un gradient linéaire avec de l'eau (A) et un mélange MeOH/ACN (6/4, v/v) (B). Le gradient commençait à 50% de B et augmentait à 90% de B en 27 min, et était maintenu pendant

13 min puis augmentait à nouveau à 100% de B en 1 min. Un palier de 10 min, pour équilibrer le système, était réalisé. Le débit a été fixé à 0,2 mL/min et le volume d'injection était de 8 µL. ACY et BjF ont été quantifiés avec le détecteur UV. Pour les autres HAP, un programme de longueurs d'onde d'excitation et d'émission a été réalisé, en fonction du temps de rétention, et ils ont été quantifiés avec le détecteur FD.

## **VIII.2. Préparation d'échantillon**

### **VIII.2.1. Homogénéisation du placenta**

Pour chaque expérience, 0,5 g (poids humide) de tissus placentaires ont été utilisés. Les tissus placentaires ont été dopés avec 300 µL d'une solution contenant 24 HAP à 100 ng/mL en utilisant une seringue pour injecter cette solution à différent endroit du placenta. Ensuite, les échantillons dopés ont été immergés, pendant 15 min, dans de l'acétone contenant de la carboglace (-80°C), afin d'être congelés en vue de leurs lyophilisations. Pour évaluer l'impact de la lyophilisation, des échantillons ont été lyophilisés pendant 9h (n= 3) et d'autres pendant 15h (n=3). Les échantillons lyophilisés ont été récupérés et broyés, à l'aide d'une baguette en verre, afin d'obtenir une fine poudre. Les échantillons ont été pesés, à nouveau, afin de déterminer le poids sec des extraits obtenus. Pour chaque échantillon, 1 mL d'ACN a été ajouté et l'ensemble a été vortexé, pendant 2 min. Une partie des échantillons a été placée au bain à ultrasons pendant 30 min (n=3) ou 1 h (n=3). Le reste des échantillons n'a pas été placé au bain à ultrasons et a été vortexé pendant 10 min à température ambiante (n=3). Enfin, le surnageant de tous les échantillons a été récupéré. Pour tous les échantillons, 250 µL du surnageant ont été dilués avec 250 µL d'eau pour obtenir une teneur finale en ACN de 50% (v/v). Le mélange a ensuite été vortexé avant de réaliser l'étape de SPE.

### **VIII.2.2. SPE**

Les cartouches SPE utilisées étaient les suivantes : Hypersep de ThermoFisher Scientific (Villebon, Coutaboef, France) remplies avec 25 mg de phase stationnaire octadécyle trifonctionnelle (taille des particules : 40 à 63 µm, taille des pores : 60 Å, surface spécifique : 520 m<sup>2</sup>/g, taux de carbone : 21 à 23%). Le même protocole que celui décrit dans les chapitres précédents, avec de légères modifications, a été utilisé. L'étape de SPE a été entièrement automatisée à l'aide d'un automate GX271 (Gilson). Ainsi, 400

$\mu\text{L}$  du mélange précédemment obtenu, ont été percolés sur une cartouche SPE Hypersep de 25 mg (ThermoFisher Scientific). Une étape de lavage avec 100  $\mu\text{L}$  d'ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1, v/v) suivie par une étape de séchage et d'élution des HAP avec 300  $\mu\text{L}$  de THF ont été mises en œuvre. Enfin, 40  $\mu\text{L}$  de toluène ont été ajoutés à la fraction d'élution qui était ensuite vortexée et évaporée. L'extrait final a été dilué avec 100  $\mu\text{L}$  d'ACN avant son injection en LC/UV-FD (8  $\mu\text{L}$ ).

### VIII.3. Résultats

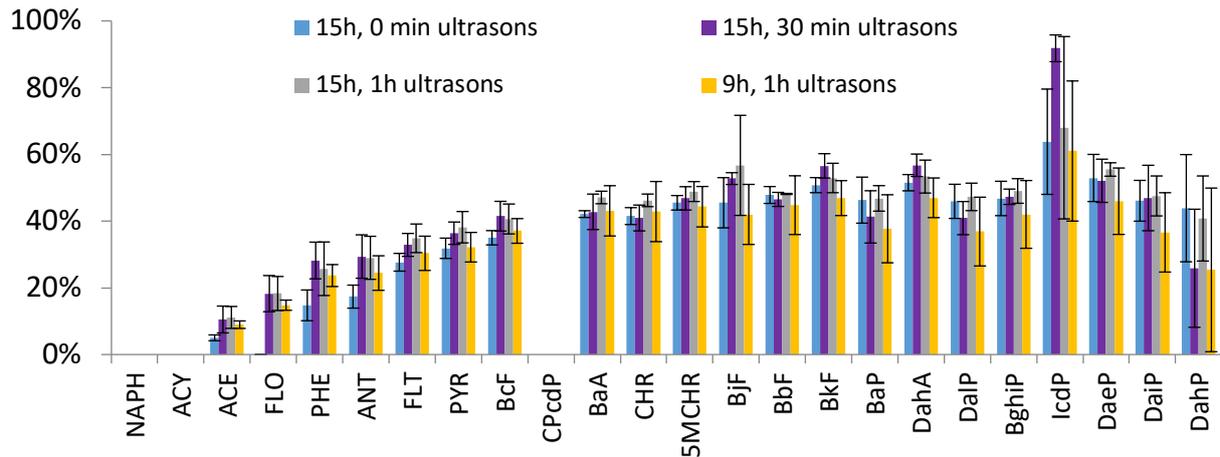
#### VIII.3.1. Lyophilisation

Au cours de ces expériences, l'étape de lyophilisation a été incontournable afin d'éliminer l'eau contenue dans les tissus placentaires. Ainsi, cette première étape a été optimisée en testant différents temps de lyophilisation. En effet, au cours de la lyophilisation, nous redoutions la perte des HAP les plus volatils. C'est pourquoi, afin d'évaluer l'impact de cette étape, il était important de doper les échantillons avant leur lyophilisation. Ainsi, les échantillons ont été lyophilisés pendant 9 h ou 15 h. La **Figure 36** présente les résultats obtenus pour les différentes expériences réalisées. D'après les résultats obtenus, dans les 2 conditions, le NAPH et l'ACY étaient en dessous de la LOD. Il semblerait donc que la lyophilisation cause la perte de ces 2 HAP. Ainsi, les rendements obtenus sont compris entre 9 et 61% avec des valeurs d'écart-types inférieures à 12% excepté pour l'IcdP (21%) et le DahP (25%) et entre 11 et 74% avec des valeurs d'écart-types inférieures à 15% excepté pour l'IcdP (27%) pour les lyophilisations de 9 h et 15 h, respectivement. Les résultats du test ANOVA ( $\alpha = 5\%$ ) ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative pour tous les HAP excepté pour le DahP, où 15 h est plus favorable. C'est pourquoi, une lyophilisation de 15 h a été utilisée pour la suite de l'étude.

#### VIII.3.2. Sonication des échantillons

Une fois que le temps de lyophilisation a été défini (15 h), différents temps pour le passage des échantillons au bain à ultrasons ont été testés. En effet, cette étape est importante pour améliorer les rendements d'extraction car celle-ci permet de s'assurer que toutes les cellules ont été brisées et par conséquent elle permet d'améliorer les rendements d'extraction. Cependant, le but étant de développer une procédure analytique la plus rapide possible tout en obtenant les meilleurs rendements d'extraction, il est

important d'évaluer le temps minimum nécessaire pour cette étape. Dans ce but, trois temps de sonication différents ont été testés : 0, 30 et 60 min. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 36**. Des rendements compris entre 5 et 51% avec des écarts-types inférieurs à 16%, entre 11 et 92% avec des écarts-types inférieurs à 18% et entre 11 et 74% avec des écarts-types inférieurs à 15%, excepté pour IcdP (27%) ont été obtenus pour les sonications de 0, 30 et 60 min, respectivement. Après application du test ANOVA, aucune différence significative concernant les rendements d'extraction n'a été mise en évidence, excepté pour le FLO. En effet, lorsque l'échantillon n'a pas été soumis aux ultrasons, il n'a pas été possible de quantifier le FLO, car ce dernier était inférieur à la LOQ. Pour les autres HAP, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre des sonications pendant 30 et 60 min. Cependant, pour le DahP la sonication pendant 30 min conduisait à un rendement plus faible avec un écart-type plus important ( $26 \pm 18\%$ ) comparé à une sonication pendant 1 h ( $41 \pm 13\%$ ). Il reste donc préférable de choisir 60 min de sonication afin d'être capable de détecter et quantifier ce composé. Malheureusement, le CPcdP n'a pas pu être quantifié au cours de cette étude en raison d'une impureté au même temps de rétention.



**Figure 36:** Rendements d'extraction obtenus pour les différents paramètres testés (lyophilisation et sonication)

### VIII.3. Conclusion et perspectives

Enfin, ces premiers résultats ont démontré que le protocole permettant d'obtenir les meilleurs rendements correspondait à une lyophilisation des tissus placentaires pendant 15 h suivie d'une sonication de l'échantillon pendant 60 min. Les rendements d'extraction obtenus étaient compris entre 11 et 74% avec des écarts-types inférieurs à 15%, excepté pour IcdP (27%). Ainsi, afin d'améliorer la sensibilité, il serait intéressant d'augmenter la quantité de tissus initiale pour augmenter les chances de pouvoir détecter les HAP présents dans les échantillons réels. En effet, concernant le placenta, il y a moins de contraintes liées à la quantité de matrice, ce qui n'est malheureusement pas le cas pour le sérum. Enfin, afin d'évaluer les performances de ce protocole, il pourrait être envisagé de comparer les rendements obtenus avec la procédure communément utilisée dans la bibliographie, à savoir la saponification.



## Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail était de développer des méthodes analytiques pour la quantification des 24 HAP réglementés, ayant une gamme de polarité assez large (Log P compris entre 3,3 et 7,7), dans le sérum maternel, le sérum de cordon et le placenta. Ce travail visait pour la première fois la détermination simultanée de ces 24 HAP à partir de faibles volumes (100 µL) de sérums, avec une préparation d'échantillon permettant de réduire autant que possible la quantité de solvants utilisée. Une part importante de ce projet doctoral a été consacrée à l'évaluation des performances analytiques des différentes méthodes développées, afin de palier ce manque souvent présent dans la littérature. C'est pourquoi, les méthodes ont été validées par l'approche des profils d'exactitude. Ensuite, une deuxième partie de ce projet a été consacrée à l'évaluation de l'impact d'une exposition aux HAP sur les fonctions placentaires mais également l'étude du passage transplacentaire de ces molécules, en mettant en œuvre des cultures cellulaires de trophoblastes et le modèle du cotylédon perfusé *ex vivo*.

Dans la première partie de ce travail doctoral, le développement d'une procédure analytique pour la quantification des 24 HAP dans le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical par LC-UV/FD a été réalisé. Au vu de la complexité des matrices biologiques, une préparation d'échantillon a ensuite été développée. Cette étape a impliqué une précipitation des protéines suivie d'une SPE et d'une étape d'évaporation-redissolution. Le protocole final, ne requérant que 100 µL, a conduit à des rendements d'extraction pour 22 HAP compris entre 27 et 57% dans les sérums de sang maternel et entre 34 et 69% dans les sérums de cordon respectivement, avec des écarts types inférieurs à 11%. Des LOQs comprises entre 0,2 et 3,1 ng/mL pour les HAP fluorescents et entre 7,0 et 14,5 ng /mL pour ACY et BjF (détection UV) dans les échantillons réels ont été obtenues. Cependant, ce protocole n'a pas permis de quantifier le CPcdP et l'IcdP, en raison d'impuretés présentes dans les échantillons de sérums. Par ailleurs, les LOQs obtenues sont proches des concentrations attendues dans les échantillons biologiques selon l'étude bibliographique réalisée en début de manuscrit.

Ensuite, la deuxième étape de ce projet a été la validation de la procédure analytique développée, en vue de son utilisation pour la quantification des HAP dans les échantillons réels. Le but de cette validation était d'obtenir les LOQs les plus sensibles afin de pouvoir quantifier les HAP présents à l'état de traces dans les échantillons de sérums. La méthode développée a donc été validée sur 3 jours par l'approche des profils d'exactitude. Les limites d'acceptabilité ont été fixées selon les comportements des différents HAP, étant donné qu'il n'existe pas de réglementation. Des LOQs comprises entre 0,5 et 20 ng/mL et 0,2 et 16 ng/mL ont été obtenues pour le sérum maternel et le sérum de cordon ombilical, respectivement. Au vu des objectifs que nous nous sommes fixés (LOQs les plus sensibles possibles), il a été observé que des biais importants pour les faibles concentrations étaient parfois obtenus, pouvant atteindre 55%, notamment pour les composés les moins hydrophobes et par conséquent les plus volatils. Cependant, la méthode a tout de même été validée car le but était d'évaluer les performances de la méthode développée et pouvoir être capable de fournir le biais existant lors de futurs dosages dans les échantillons réels. Une vingtaine d'échantillon (sérums maternels et sérums de cordon ombilical confondus issus d'accouchements par césarienne) a été analysée et les résultats obtenus ont mis en évidence l'absence de HAP dans ces échantillons, probablement en raison d'une hémodilution importante à cause de la perfusion (2 L environs). Ensuite, une méthode d'analyse complémentaire et de confirmation par GC/MS a été développée. Pour ce faire, le développement et la validation de la quantification de 24 HAP en GC/MS ont été réalisés. Les conditions d'analyse optimisées ont permis d'obtenir des LOQs comprises entre 0,5 et 28 ng/mL. Ainsi, les LOQs obtenues des HAP les plus lourds étaient jusqu'à 50 fois supérieures à celles obtenues en LC-UV/FD. La méthode développée a été validée par l'approche des profils d'exactitude. Plusieurs limitations sont apparues lors de cette étude. Tout d'abord, il semble difficile d'obtenir une seule méthode, avec des LOQs optimales, pour l'analyse simultanée des 24 HAP en GC/MS, avec une injection de 1 µL en mode splitless. En effet, il existe une discrimination importante des HAP les plus lourds, entraînant alors des LOQs élevées et non satisfaisantes pour l'analyse de traces dans les matrices biologiques. Ensuite, Les rendements des deux HAP les plus hydrophobes, le DaiP et le DahP, n'ont pas pu être déterminés, probablement à cause d'un problème de détection. En outre, la validation a permis de mettre en évidence que le 3-methylcholanthrène ne permettait pas

de corriger les variations de volumes d'injection pour les HAP les plus lourds (IcdP à DaeP). Ainsi, seuls 16 HAP ont pu être validés en GC/MS. Les LOQs obtenues, pour ces 16 HAP, étaient comprises entre 1,6 et 20 ng/mL et 1,5 et 12 ng/mL dans les échantillons de sérums maternels et de sérums de cordon ombilical, respectivement. Ces résultats ont permis de confirmer que la LC-UV/FD est la technique de choix pour quantifier les HAP dans les échantillons de sérums. En effet, les LOQs obtenues sont plus sensibles et la procédure analytique a pu être validée pour 22 HAP.

Enfin, l'étude de l'impact des HAP sur les fonctions placentaires, grâce à des cultures cellulaires primaires de trophoblastes exposées à un mix des 16 HAP US-EPA, a été faite. Le but était aussi d'évaluer l'effet "cocktail", tout en comparant les résultats à ceux obtenus avec des cultures cellulaires exposées uniquement au BaP. Cette étude a montré que les 16 HAP US-EPA avaient des effets comparables à ceux du BaP, à savoir une inhibition de la différenciation et de la fusion des trophoblastes, une surexpression de l'hPL et l'hCG pour la fonction endocrine, ainsi qu'une surexpression des CYP1A1 et CYP1B1 pour les fonctions de détoxification. Les résultats attendus de cette étude était une amplification de l'effet de l'altération observée avec le BaP. Cependant, quelques effets différentiels ont pu être observés, probablement en raison de la nature d'un HAP en particulier et/ou par la concentration du BaP. C'est pourquoi, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences avec les 16 HAP EFSA afin d'identifier à partir de cet ensemble d'expériences les HAP autres que le BaP qui pourraient être responsables de l'altération des fonctions placentaires. Enfin, le passage transplacentaire des 16 HAP US-EPA a été étudié, grâce au modèle du cotylédon *ex vivo* perfusé. Il a été mis en évidence que les HAP traversaient la barrière placentaire avec des cinétiques différentes. Afin de confirmer les résultats obtenus, il est important dans un premier temps, d'analyser les fractions maternelles et fœtales des 2 dernières perfusions. Ensuite, il apparaît nécessaire de finir le développement et la validation de la procédure analytique pour quantifier les HAP dans les tissus placentaires, afin d'évaluer l'accumulation placentaire. Enfin, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences de perfusions avec les 16 HAP EFSA.

Ce travail de thèse, et notamment le développement des méthodes analytiques, nous a permis d'avoir accès aujourd'hui à la cohorte épidémiologique ELFE. Cette dernière fournira au laboratoire des échantillons de sérums maternels et de sérums de

cordons ombilicaux avec un volume de 300  $\mu$ L pour chacun. Au vu des résultats obtenus au cours de cette étude et en raison de l'impossibilité de détecter les HAP dans les échantillons analysés issus d'accouchements par césarienne, il peut être envisagé de modifier légèrement le protocole afin d'améliorer les sensibilités. En effet, dans le but de détecter les HAP présents dans les échantillons, il est possible de réaliser le protocole développé au cours de cette thèse avec un volume initial d'échantillon plus important (300  $\mu$ L). Cette modification impliquerait, par conséquent, d'utiliser des supports SPE de même chimie (C18) mais avec une quantité de phase plus importante (75 mg) afin de pouvoir percoler la totalité du surnageant obtenu, suite à l'étape de précipitation des protéines. Le volume de reprise serait, en revanche, inchangé. Ainsi, le facteur d'enrichissement obtenu pourrait être amélioré d'un facteur 3 et par conséquent les LOQs obtenues dans la matrice seront plus basses. L'analyse d'un nombre conséquent d'échantillons provenant de cette cohorte et issus à la fois d'accouchements par voies basses et par césariennes permettra d'identifier les HAP majoritairement présents dans la population française et ainsi comparer les données avec celles recensées dans la littérature issue d'autres pays. Par ailleurs, le développement et la validation de l'analyse des HAP dans les tissus placentaires restent encore à développer afin d'obtenir des éléments de réponses supplémentaires quant au rôle du placenta en tant que barrière protectrice et efficace, limitant l'exposition prénatale.



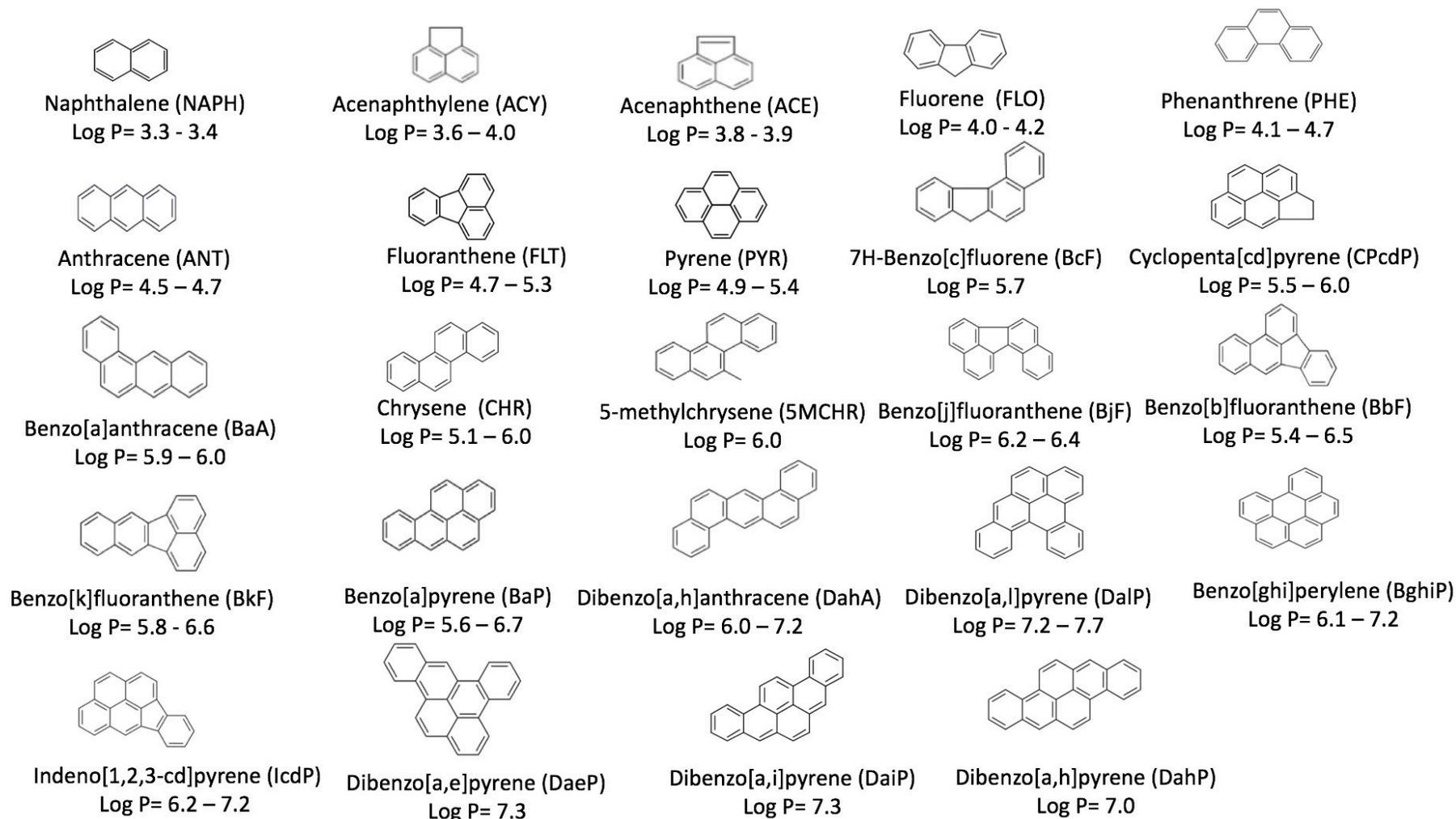


---

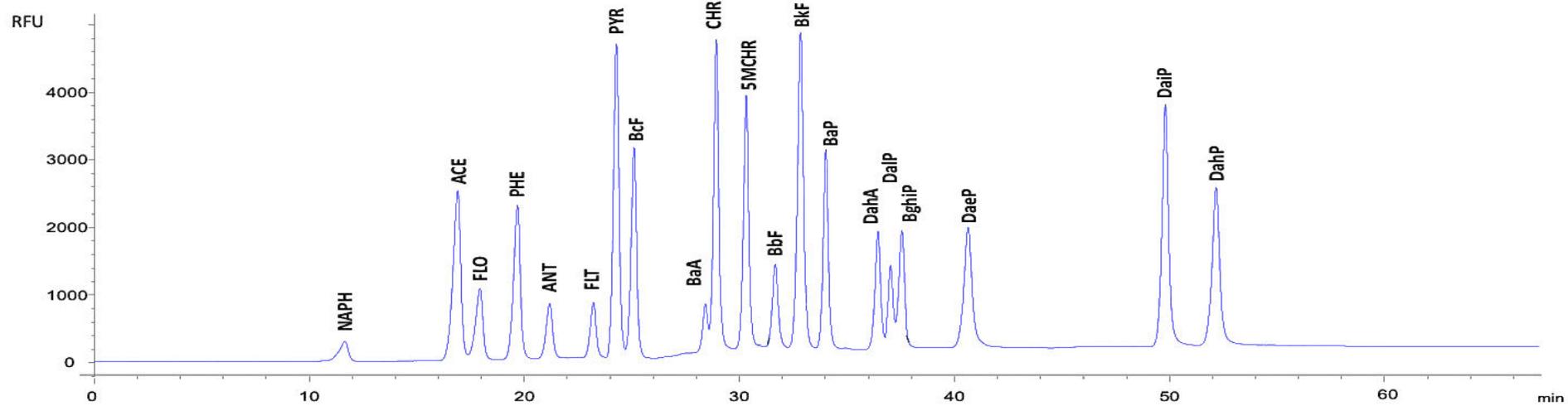
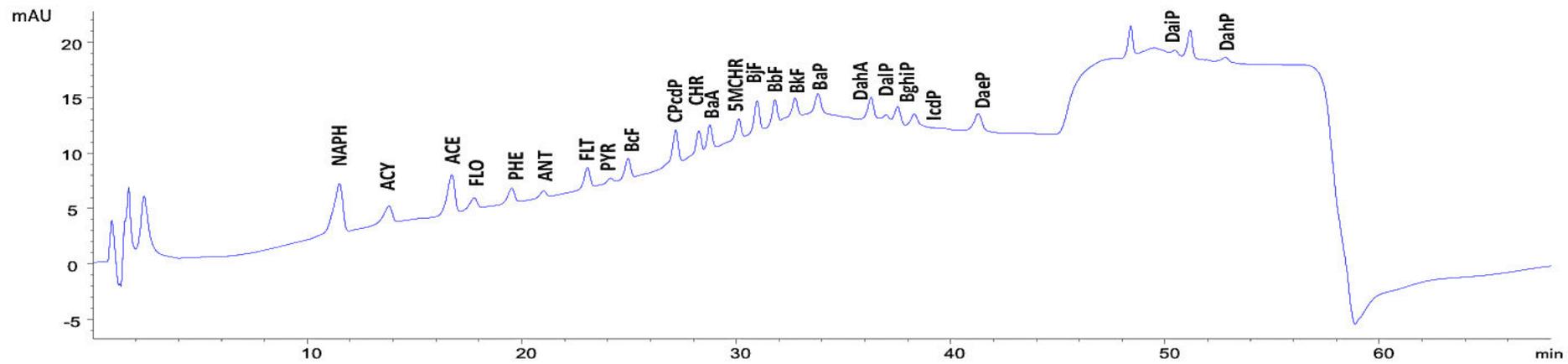
# **ANNEXES**

---

## Annexe 1



**Figure S 1** : Chemical structure and log P values of the 24 regulated PAHs



**Figure S 2** : LC-UV/FD chromatograms of a standard solution of 24 PAHs at 100  $\mu\text{g/L}$  in ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) with (A) UV detection at 220 nm and (B) Fluorescence detection

Factor 1 Proportion of ACN	Factor 2 Heating	Factor 3 Proportion of SDS	ACE	FLO	PHE	ANT	FLT	PYR	BcF	CHR	SMCHR	BbF	BkF	BaP	DahA	DalP	DaeP	DahP
1	1	3	<8%	13%	<8%	<20%	<13%	<5%	24%	23%	26%	32%	28%	23%	<20%	<25%	<15%	26%
1	1	1	21%	25%	40%	35%	47%	54%	31%	33%	30%	35%	28%	29%	29%	30%	33%	36%
1	1	1	-	-	-	-	-	-	28%	39%	32%	49%	31%	28%	24%	30%	28%	34%
-1	-1	2	30%	35%	43%	39%	47%	52%	39%	62%	40%	44%	43%	40%	48%	37%	38%	37%
1	-1	2	59%	51%	79%	73%	73%	82%	54%	61%	56%	62%	54%	48%	62%	66%	52%	43%
1	-1	3	54%	48%	73%	52%	59%	71%	58%	57%	56%	58%	60%	39%	52%	41%	47%	43%
1	-1	3	47%	54%	73%	72%	72%	78%	54%	57%	55%	60%	62%	55%	56%	54%	52%	59%
-1	-1	3	42%	41%	57%	65%	47%	59%	49%	53%	48%	49%	48%	43%	48%	46%	49%	47%
-1	1	1	19%	22%	36%	27%	39%	43%	35%	33%	34%	38%	30%	29%	29%	30%	36%	34%
-1	1	1	28%	27%	45%	43%	49%	53%	31%	40%	36%	34%	34%	31%	32%	33%	33%	25%
1	-1	1	42%	45%	62%	62%	55%	53%	40%	45%	44%	48%	43%	39%	38%	43%	39%	<13%
1	1	2	14%	14%	33%	<20%	38%	55%	23%	25%	21%	26%	22%	21%	<20%	<25%	<15%	25%
-1	1	2	28%	12%	24%	<20%	29%	37%	23%	27%	25%	26%	23%	24%	22%	29%	32%	21%
-1	1	3	21%	9%	28%	<20%	34%	34%	29%	30%	31%	36%	32%	30%	31%	39%	37%	28%
-1	-1	1	29%	36%	43%	41%	50%	46%	38%	61%	37%	42%	40%	35%	45%	33%	36%	28%

*Table S 1: Optimization of the precipitation step : experimental design matrix with experimental responses (extraction recoveries for each PAH).*

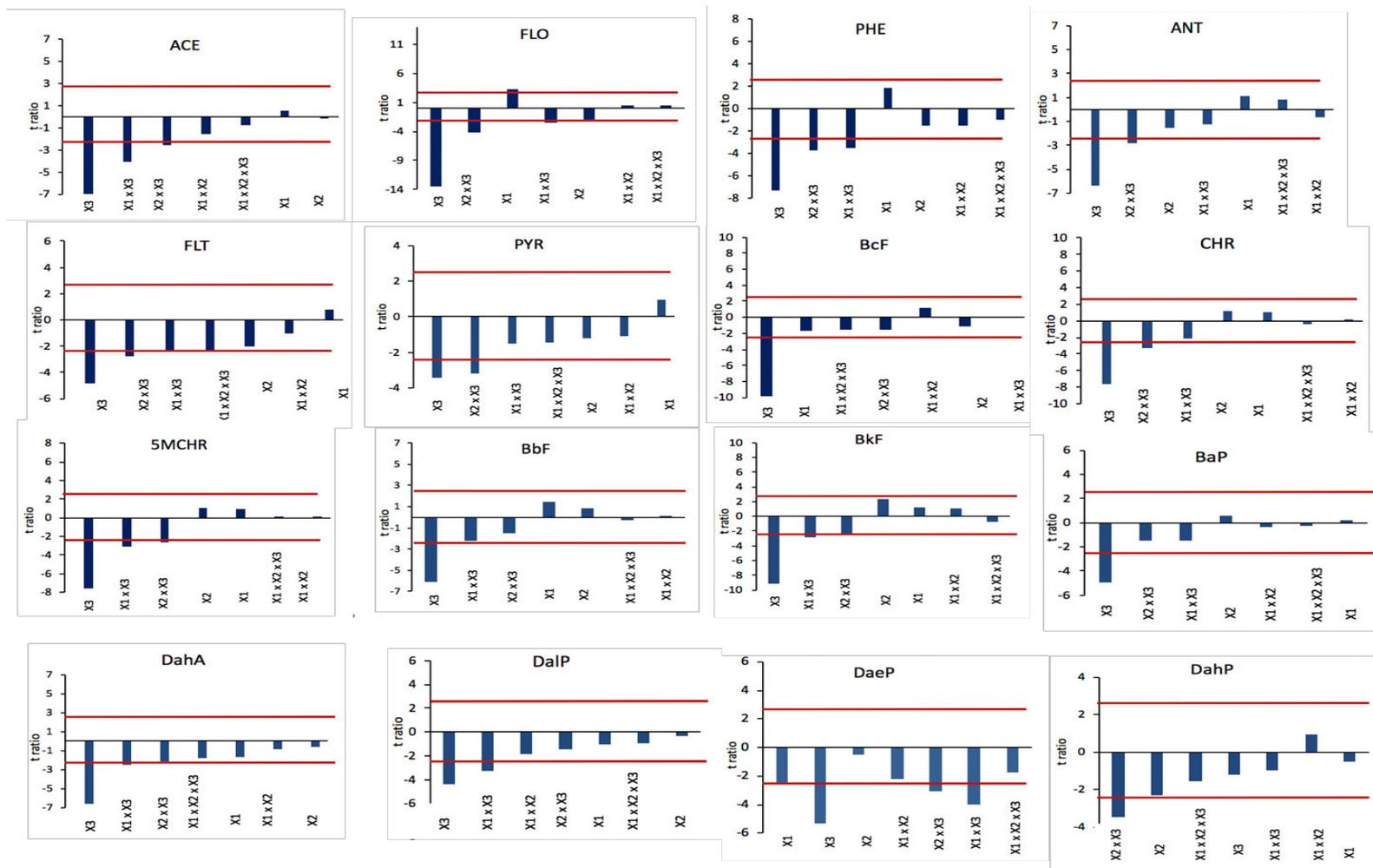
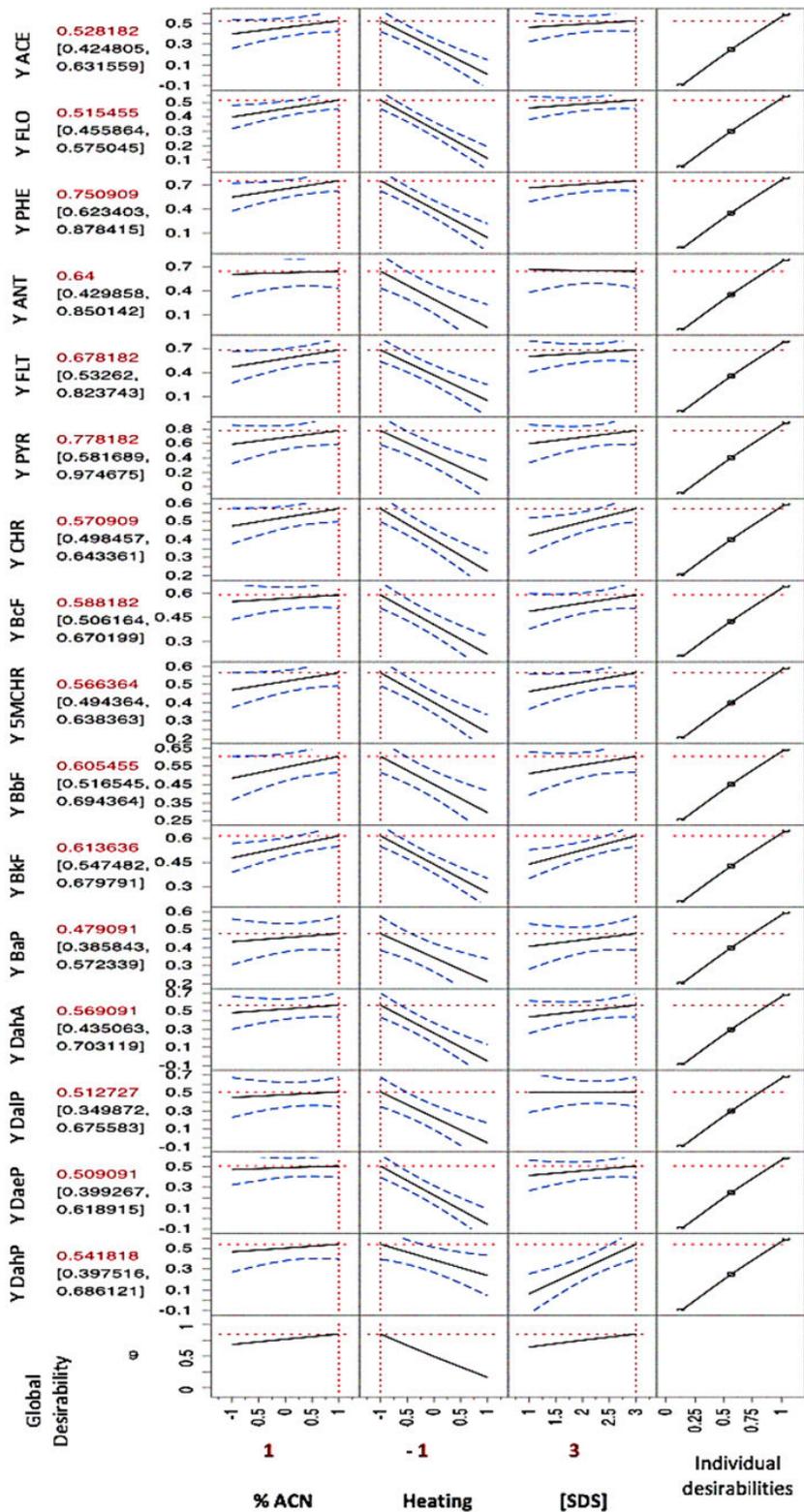


Figure S3 : Effect of the 3 studied factors (ACN percentage, SDS concentration and heating) and their interactions on each PAH recovery. X1: % ACN, X2: [SDS], X3: heating.



**Figure S4:** Optimization carried out by means of the prediction profiler of JMP software. The sixteen responses of interest correspond to the first sixteen rows with their individual desirability function represented in the last column. The last row gives the global desirability as a function of the 3 studied factors (ACN percentage, SDS content, and temperature), represented at optimum coded values in the first 3 columns. Values appearing under the global desirability and each response are the values at the predicted optimized conditions ( $\pm$  95% confidence interval).

## Annexe 2

**Table S 2:** LOQs ( $S/N=10$ ) in  $\mu\text{g/L}$  obtained with fluorescence and UV detections and estimated by injecting 10  $\mu\text{L}$  of a solution of PAHs at 1, 5, and 20  $\mu\text{g/L}$  in ACN-water (1/1, v/v).

Compounds	$\lambda_{\text{UV}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}$ (nm)	LOQ <sub>FD</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ <sub>UV</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )
NAPH	220	269, 327	1.2	2.2
ACY	230	-	-	2.1
ACE	230	227, 315	0.5	2.3
FLO	260	227, 315	1.1	13.2
PHE	250	250, 364	0.4	1.5
ANT	250	250, 364	0.9	0.7
FLT	230	234, 454	0.9	4.8
PYR	240	237, 388	0.2	0.9
BcF	230	237, 388	0.3	8.0
CPcdP	230	-	-	6.8
BaA	275	265, 376	1.5	8.7
CHR	270	265, 376	0.1	6.3
5MCHR	270	265, 376	0.2	5.5
BjF	240	-	-	4.9
BbF	260	290, 440	0.3	4.6
BkF	240	290, 440	0.1	5.7
BaP	260	290, 440	0.2	4.5
DahA	295	292, 428	0.3	3.6
DalP	315	292, 428	0.4	6.7
BghiP	285	292, 428	0.3	15.9
IcdP	300	-	-	9.3
DaeP	310	280, 404	0.8	5.7
DaiP	240	390, 439	0.4	6.2
DahP	310	260, 456	0.4	2.0

## Annexe 3

**Tableau S 1:** Gradient de percoll

Préparation d'une solution à 90% de percoll (dans une solution de HANKS 10X). A partir de cette solution à 90% on prépare des solutions allant de 70 à 5% dans de l'HBSS 1X.

Volume solution de Percoll	Volume HBSS 1X	Dilutions obtenues (%)
3,6 mL de 90%	1,4 mL	65%
2,5 mL de 90%	2,5 mL	45%
7,8 mL de 90%	2,2 mL	70%
5 mL de 70%	5 mL	35 %
5,6 mL de 90%	4,4 mL	50%
5 mL de 50 %	5 mL	25 %
4,5 mL de 90 %	5,5 mL	40 %
5mL de 40%	5 mL	20%
5 mL de 20%	5 mL	10%
5 mL de 10%	5 mL	5%
6,7 mL de 90%	3,3 mL	60%
5 mL de 60%	5 mL	30 %
5 mL de 30%	5 mL	15%
3 mL de 90%	2 mL	55%

**Tableau S 2:** Comparaison du MIX pour les rétro-transcriptions

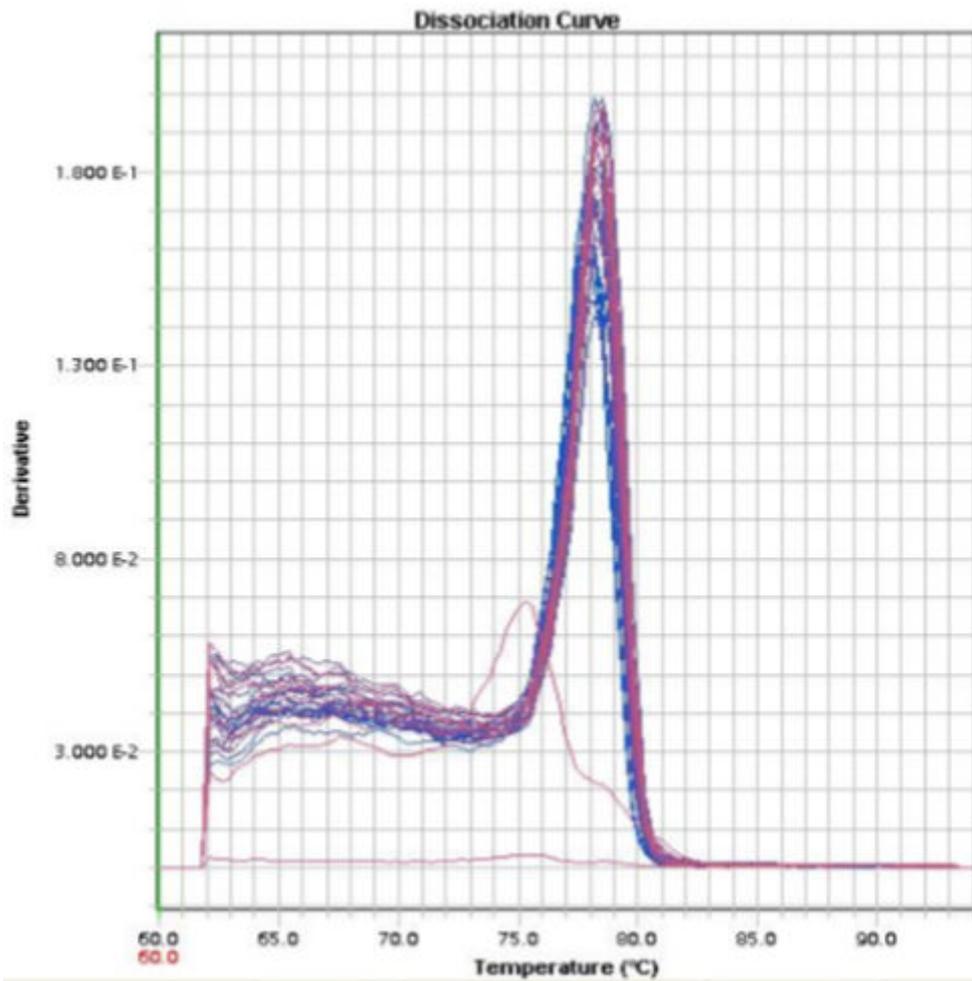
Composants	Volumes
Super script III	1 µL
5X first strand buffer (tampon d'action de la Super script III)	4 µL
Dithiothréitol ou DTT (réactif nécessaire à le rétrotranscription)	1 µL
RNAseOUT (inhibiteur de RNAses)	1 µL

**Tableau S 3:** Comparaison du Master MIX (Takyon Tm ROX SYBR Master MIX dTTP Blue UF RSM B0701)

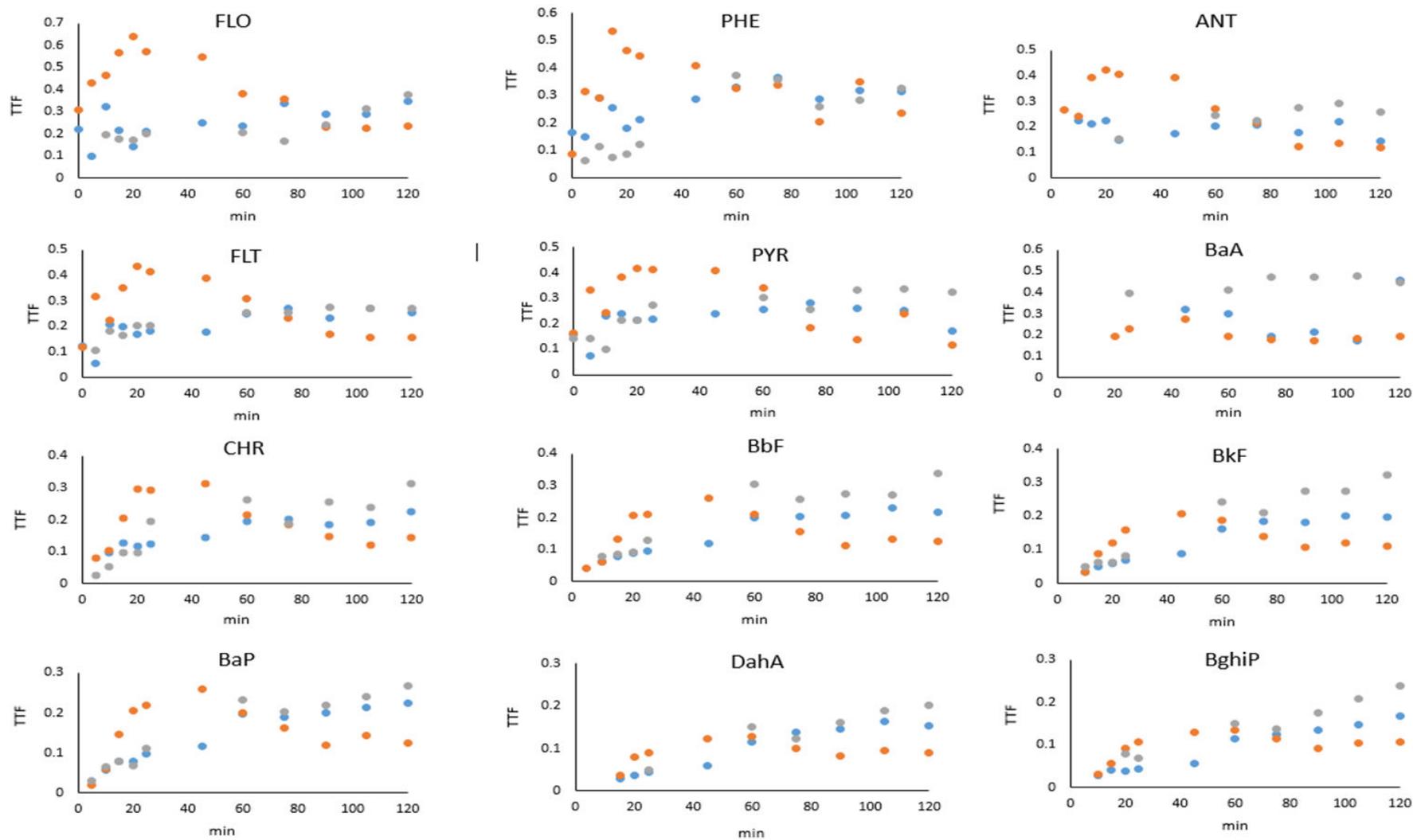
Takyon DNA polymérase
MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM final concentration)
SYBR Green®
dNTPs
ROX passive reference
Inert Blue Dye
Stabilizers

**Tableau S 4:** Les séquences des amorces utilisées

S18	F 5' TCCCCAACTTCTTAGAGG 3' R 5' CTTATGACCCGCACTTACTG 3'
RPL13	F 5' AAGGTCGTGCGTCTGAAG 3' R 5' GAGTCCGTGGGTCTTGAG 3'
SDHA	F 5' CCACCACTGCATCAAATTCATG 3' R 5' TGGGAACAAGAGGGCATCTG 3'
SYNC 1	F 5' CGGACATCCAAAGTGATACATCCT 3' R 5' TGATGTATCCAAGACTCCACTCCA 3'
SYNC 2	F 5' GCCTGCAAATAGTCTTCTTT 3' R 5' ATAGGGGCTATTCCCATTAG 3'
ASCT2	F 5' GGCTTGGTAGTGTTTGCCAT 3' R 5' GGGCAAAGAGTAAACCACA 3'
MFSD2	F 5' CTCCTGGCCATCATGCTCTC 3' R 5' GGCCACCAAGATGAGAAA 3'
GCM1	F 5' CTGACAAGGCTTTTTTCTTCACA 3' R 5' CCAGACGGGACAGGTTT 3'
CDH1	F 5' TCTTTCAGGAACCTCTGTGATG 3' R 5' CAATGCCGCCATCGCTTACACC 3'
hPL	F 5' GCATGACTCCCAGACCTCCTT 3' R 5' TGCGGAGCAGCTCTAGATTGG 3'
hCG $\beta$	F 5' GCTACTGCCCCACCATGACC 3' R 5' ATGGACTCGAAGCGCACATC 3'
CYP1B1	F 5' AACGTACCGGCCACTATCAC 3' R 5' CAGTGGTGGCATGAGGAATA 3'
CYP1A1	F 5' CCACAGCACAACAAGAGAC 3' R 5' CCATCAGGGGTGAGAAAC 3'
PIGF	F 5' GCTCGTCAGAGGTGGAAGTGGT 3' R 5' CTCGCTGGGGTACTCGGACA 3'
CYP11A1	F 5' TTTTTGCCCTGTTGGATGCA 3' R 5' CCCTGGCGCTCCCAAAAAT 3'
CYP19A1	F 5' CCTGAAGCCATGCCTGCTGC 3' R 5' CCGATCCCCATCCACAGGAATCT 3'
IL-6	F 5' ACAGCCACTCACCTTTCAC 3' R 5' TGGAGCATCCATCTTTTC 3'



*Figure S 5: Allure typique d'une courbe de dissociation obtenue après 40 cycles d'amplification*



*Figure S 6: TTF en fonction du temps pour chaque HAP détecté et quantifié dans les fractions fœtales*



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structures chimiques et valeurs de Log P des 24 HAP réglementés [4–8].....	32
<b>Figure 2</b> : Les voies métaboliques possibles des HAP dans le corps humain en utilisant le naphthalène comme exemple. MFO : oxydase à fonction mixte ; CYP: cytochrome P450; EH: époxyde hydrolase; DD: dihydrodiol déshydrogénase; UGT: UDP-glucuronosyltransférase; SULT: sulfotransférase [16]. .....	34
<b>Figure 3</b> : Présentation sur une échelle de log P des 16 HAP réglementés par l’US-EPA à gauche (en bleu) et des 16 HAP réglementés par l’EFSA à droite (en orange) et au centre, des 8 HAP communs aux 2 réglementations (en rouge).....	36
<b>Figure 4</b> : Le placenta humain à terme. A: Face fœtale: plaque choriale (l’astérisque correspond à l’insertion du cordon ombilical), B: Vaisseaux fœtaux parcourant la plaque choriale, C: Face maternelle : plaque basale, D: Cotylédon (l’astérisque correspond à l’orifice d’entrée d’une artère spiralée [23]. .....	39
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique d'une villosité crampon. 1: cytotrophoblaste vilieux ; 2: syncytiotrophoblaste ; 3: chambre intervillieuse ; 4: colonne de cytotrophoblastes extravillieux invasifs prolifératifs ; 5: cytotrophoblastes extravillieux invasifs interstitiels ; 6: cytotrophoblastes extravillieux endovasculaires ; 7: cellules déciduales; 8: artère utérine spiralée.....	41
<b>Figure 6</b> : Les villosités au premier trimestre (A) et au second trimestre de la grossesse (B). 1 : Espace intervillieux ; 2 : Syncytiotrophoblaste ; 3 : cytotrophoblaste ; 4 : Mésoenchyme villositaire ; 5 : Capillaires fœtaux ; 6 : Macrophages [30]. .....	42
<b>Figure 7</b> : Villosité à terme. 1 : Espace intervillieux ; 2 : barrière placentaire d’une villosité terminale ; 3 : capillaires foetaux ; 4 : Membrane basale fusionnée ; 5 : cellules endothéliales ; 6 : cellules du cytotrophoblaste ; 7 : membrane basale du capillaire ; 8: membrane basale du trophoblaste ; 9 : Syncytiotrophoblaste [30]. .....	42
<b>Figure 8</b> : Les différents modes de passage. Transporteurs ABC : transporteurs actifs primaires ; transporteurs SLC : transporteurs actifs secondaires.....	47
<b>Figure 9</b> : Number of papers dealing with the determination of PAHs as a function of the nature of the biological matrice.....	62
<b>Figure 10</b> : Repartition according to country of the studies dealing with the determination of PAHs in biological samples.....	62
<b>Figure 11</b> : RPLC-UV analysis of the 16 US EPA PAHs on two C18-bonded silica columns. (A) monomeric C18 Zorbax ODS column (0.46 ×25 cm, 5 μm)], (B) polymeric C18 Pinnacle II PAH column (0.46 x 25 cm, 5 μm)], Chromatographic conditions: 3 min with water-acetonitrile (50/50, v/v), followed by a 15-min linear gradient to 100% of acetonitrile and a 15 min hold at 100% acetonitrile. Flow rate: 2 mL/min; Detection: 254 nm. Adapted from [127].....	66
<b>Figure 12</b> : Effect of the nature and the volume of organic solvent (30% or 50%) introduced in spiked water on the extraction recoveries. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 100 μL of water containing 30 or 50% of the organic studied solvent and spik with 5 μg/L of each PAH, washing with 100 μL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v), and elution with 300 μL of THF, dilution of the THF extract with water (THF/H <sub>2</sub> O, v/v, 1/1) (n = 3). * not quantifiable PAH.....	133

<b>Figure 13:</b> Comparison of the extraction recoveries obtained using three different SPE sorbents. SPE procedure: percolation of 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O sample (1/1, v/v) spiked with 5 µg/L of each PAH, washing with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v) and elution with 300 µL of THF (n = 3). .....	134
<b>Figure 14:</b> Effect of the nature and the volume of the aromatic solvent added in 200 µL of THF and spiked with 5 µg/L of each PAH on extraction recoveries. The extract was recovered in 50 µL of ACN before analysis (n = 3). * not quantifiable PAHs .....	136
<b>Figure 15:</b> Optimization of the SPE elution volume. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 200 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v) spiked with 5 µg/L of each PAH except ACY, CPcdP, B <sub>j</sub> F, and IcdP at 50 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v), elution with THF, and partial evaporation (addition of 40 µL of toluene in the elution fraction). The extract was recovered with 150 µL of ACN before analysis (n = 3).....	137
<b>Figure 16:</b> Optimization of the SPE percolation volume. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 200 µL or 400 µL of ACN/H <sub>2</sub> O sample (1/1, v/v) spiked with 5 µg/L of each PAH except for ACY, CPcdP, B <sub>j</sub> F, and IcdP at 50 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v), elution with 300 µL of THF and partial evaporation (addition of 40 µL of toluene in the elution fraction). The extract was recovered with 150 µL of ACN before analysis (n = 3). .....	138
<b>Figure 17:</b> Optimization of the resuspension volume after evaporation before LC analysis. SPE procedure (Hypersep cartridge): percolation of 400 µL of ACN/H <sub>2</sub> O sample (1/1, v/v) spiked with 5 µg/L of each PAH except for ACY, CPcdP, B <sub>j</sub> F, and IcdP at 50 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v), elution with 300 µL of THF, and partial evaporation (addition.....	139
<b>Figure 18:</b> LC/UV/FLD chromatograms of the extracted maternal (A) and umbilical cord (B) pooled sera spiked with 24 PAHs at 10 µg/L except CPcdP and IcdP at 20 µg/L. Other conditions: see section 2.2. 1, NAPH ; 2, ACE ; 3, FLO ; 4, PHE ; 5, ANT ; 6, FLT ; 7, PYR ; 8, B <sub>c</sub> F ; 9, BaA ; 10, CHR ; 11, 5MCHR ; 12, B <sub>b</sub> F ; 13, B <sub>k</sub> F ; 14, BaP ; 15, DahA ; 16, DaIP ; 17, B <sub>ghi</sub> P ; 18, DaeP ; 19, DaiP ; 20, DahP.....	143
<b>Figure 19:</b> Comparison of accuracy profiles using linear regression mode in pooled umbilical cord sera for a representative PAH of each group of acceptance limits without correction (A) or with correction (B) of the obtained extraction recoveries for the validation samples. The dots represent the obtained extraction recoveries of the validation samples with or without correction, the green plain lines are the accuracy, the blue plain lines are the β expectation tolerance limits and the dashed curves represent the acceptance limits.....	160
<b>Figure 20 :</b> Accuracy profiles using linear regression mode in (A) maternal serum and (B) umbilical cord serum for 22 regulated PAHs. The dots represent the obtained extraction recoveries of the validation samples after correction, the green plain lines are the accuracy, the blue plain lines are the β expectation tolerance limits and the dashed curves represent the fixed acceptance limits. ....	168
<b>Figure 21:</b> Chromatogramme de la séparation des 24 HAP sur la colonne ZB-PAH (concentration des HAP : 100 ng/mL, détection MS : Mode SIM, volume d'injection : 1 µL) .....	187
<b>Figure 22 :</b> Chromatogramme de la séparation des 24 HAP et des 3 étalons internes avec la colonne DB 17MS (solution de HAP : 100 ng/mL dans l'ACN, Volume d'injection : 1 µL en mode splitless, gradient te température : cf. Tableau 2, détection : SIM cf. Tableau 3).....	191

<b>Figure 23 :</b> Profils d'exactitude obtenus pour 16 HAP dans le sérum maternel (SM) et dans le sérum de cordon ombilical (SC). Les carrés représentent les rendements obtenus pour les témoins de validation, après correction, les courbes vertes la justesse, les courbes bleues les limites de tolérance et les courbes rouges en pointillées les limites d'acceptabilité.....	202
<b>Figure 24:</b> Viabilité et fonctionnalité mitochondriale des trophoblastes exposés à différents traitements (DMSO 1/1000, BaP 1µM ou mélange de HAP 1µM) sur une durée de 24h ou 48h. (n=2 cultures de placentas différentes avec 2 mesures par conditions et par placenta). .....	224
<b>Figure 25 :</b> 1) Prise de vue de cellules marquées avec l'anticorps anti-desmoplakine d'une culture représentative après exposition au DMSO 1/1000 (témoin, A), au BaP 1 µM (B), ou au mélange de HAP 1 µM (C) pendant 48h. Les noyaux sont marqués au DAPI. 2) Nombre total de cellules mononuclées et index de fusion après 24h et 48h d'exposition au BaP 1 µM ou au mélange de HAP 1 µM.....	225
<b>Figure 26 :</b> Expression relative des gènes de fusion (SYNC1 et SYNC2) et de leurs récepteurs respectifs (ASCT2 et MSFD2) sur les trophoblastes traités au BaP (1 µM) ou au mélange de HAP (1 µM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messenger normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse était réalisée sur n=4 cultures de placentas différents .....	226
<b>Figure 27:</b> Expression relative des gènes GCM1 et CDH1 sur les trophoblastes traités au BaP (1 µM) ou au mélange de HAP (1 µM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messenger normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents. 227	
<b>Figure 28:</b> Mesure de la sécrétion d'hCG et de l'expression relative d'hCGβ après traitement de 24h et 48h par le BaP ou le mélange de HAP 1 µM. (n= 4 cultures de placentas différentes). Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle (DMSO) des temps d'expositions .....	228
<b>Figure 29:</b> Mesure de la sécrétion d'hPL et de l'expression génique relative d'hPL après traitements de 24h ou 48h par le BaP ou les HAP 1 µM (n=4 cultures de placentas différents). Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle (DMSO) des temps d'exposition respectifs.....	229
<b>Figure 30:</b> Expression relative du gène de PlGF sur les trophoblastes traités au BaP (1 µM) ou au mélange de HAP (1 µM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messenger normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents. ....	230
<b>Figure 31:</b> Expression relative des gènes CYP1A1 et CYP1B1 sur les trophoblastes traités au BaP (1 µM) ou au mélange de HAP (1 µM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messenger normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents. 231	
<b>Figure 32:</b> Expression relative du gène IL6 sur les trophoblastes traités au BaP (1 µM) ou au mélange de HAP (1 µM) sur une durée de 24h ou 48h. Les résultats sont exprimés en niveau relatif d'ARN messenger normalisé par rapport au contrôle DMSO. Cette analyse est réalisée sur n=4 cultures de placentas différents. ....	232
<b>Figure 33:</b> Variation du taux de transfert de l'antipyrine aux différents temps de perfusions (n=5 placentas différents perfusés avec le mélange de HAP 1 µM). .....	232
<b>Figure 34:</b> Profils d'exactitude des différents HAP. Les points verts correspondent aux concentrations calculées dans les témoins de validation, les courbes vertes correspondent aux biais relatifs, les courbes bleues représentent les limites hautes et basses de tolérance et les courbes en pointillés rouges sont les limites d'acceptabilité. ...	237

<b>Figure 35:</b> Représentation de l'indice de clairance en fonction du temps de perfusions pour les 12 HAP détectés et quantifiés dans les fractions fœtales (n=3 placentas).....	239
<b>Figure 36:</b> Rendements d'extraction obtenus pour les différents paramètres testés (lyophilisation et sonication) .....	253
<b>Figure S 1 :</b> Chemical structure and log P values of the 24 regulated PAHs .....	262
<b>Figure S 2 :</b> LC-UV/FD chromatograms of a standard solution of 24 PAHs at 100 µg/L in ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v) with (A) UV detection at 220 nm and (B) Fluorescence detection .....	263
<b>Figure S 3 :</b> Effect of the 3 studied factors (ACN percentage, SDS concentration and heating) and their interactions on each PAH recovery. X1: % ACN, X2: [SDS], X3: heating. ....	265
<b>Figure S 4:</b> Optimization carried out by means of the prediction profiler of JMP software. The sixteen responses of interest correspond to the first sixteen rows with their individual desirability function represented in the last column. The last row gives the global desirability as a function of the 3 studied factors (ACN percentage, SDS content, and temperature), represented at optimum coded values in the first 3 columns. Values appearing under the global desirability and each response are the values at the predicted optimized conditions (± 95% confidence interval).....	266
<b>Figure S 5:</b> Allure typique d'une courbe de dissociation obtenue après 40 cycles d'amplification .....	270
<b>Figure S 6:</b> TTF en fonction du temps pour chaque HAP détecté et quantifié dans les fractions fœtales.....	271

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Teneurs maximales autorisées en BaP et somme des 4 HAP dans les aliments d'après le règlement UE n ° 835/2011 * µg/kg de gras	37
<b>Tableau 2:</b> Les différentes données des études réalisées pour évaluer l'impact de l'exposition aux HAP pendant la grossesse	106
<b>Tableau 3:</b> Température d'ébullition et masse moléculaire des 24 HAP	184
<b>Tableau 4:</b> Gradient de température utilisé par Phenomenex pour la séparation des 24 HAP réglementés en GC/MS	186
<b>Tableau 5:</b> Gradient de température développé pour la séparation des 24 HAP réglementés en GC/MS avec la colonne ZB-PAH	187
<b>Tableau 6:</b> Temps de rétention des 24 HAP et M/Z choisi pour leur détection en mode SIM	188
<b>Tableau 7:</b> Caractéristiques et propriétés physico-chimiques des étalons internes choisis	189
<b>Tableau 8:</b> Limites de quantification (S/N=10) pour les colonnes ZB-PAH et DB-17MS (détermination à partir de solutions de HAP à 5, 10 et 100 ng/mL, Volume d'injection : 1 µL)	192
<b>Tableau 9:</b> Gradient développé pour la colonne DB 17MS	193
<b>Tableau 10 :</b> Rendements d'extraction obtenus pour des échantillons de sérums maternels et de sérums de cordon ombilical dopés à 30 ng/mL pour tous les HAP excepté le DaIP, le DaeP, le DaiP et le DahP à 100 ng/mL (n=3)	194
<b>Tableau 11 :</b> Les différents groupes de limites d'acceptabilité définies pour les HAP dans chaque matrice	198
<b>Tableau 12 :</b> Résultats détaillés de la validation par l'approche de l'erreur totale pour le sérum maternel et le sérum de cordon	204
<b>Tableau 13:</b> Concentrations mesurées dans les solutions de dopage et dans les fractions maternelles	234
<b>Table 1 :</b> Chemical structure and partition coefficient of the twenty-four regulated PAHs. Log P values are issued from [4,5,7,126], PubChem DataBase and INERIS toxicological and environmental data sheets	63
<b>Table 2 :</b> PAH analysis in human biological matrices by HPLC	67
<b>Table 3:</b> PAHs analysis in human biological samples by GC	73
<b>Table 4:</b> sample pretreatment to extract the PAHs from different human biological samples	87
<b>Table 5:</b> LOQs (S/N=10) in µg/L obtained with fluorescence and UV detections and estimated by injecting 10 µL of a solution of PAHs at 1, 5, and 20 µg/L in ACN-water (1/1, v/v).	131
<b>Table 6:</b> 2x2x3 factorial design with the different factors studied for their potential impact on the PAH recoveries during the protein precipitation (test with a synthetic serum: Earle's balanced salt solution containing albumin at 25 g L <sup>-1</sup> spiked with 16 PAHs at 4 µg/L each).	141
<b>Table 7 :</b> Extraction recoveries and SD (n = 3) of 24 PAHs in spiked ACN-H <sub>2</sub> O mixture, maternal and umbilical cord pooled sera. Precipitation step: 0.2 % of SDS and 70% of ACN. SPE (Hypersep cartridge): percolation of 400 µL of spiked sample with 10 µg/L of each PAH except for CPcdP, BjF and IcdP at 20 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v), elution with 300 µL of THF and partial evaporation (addition of 40 µL of toluene in the elution fraction). The extract was further recovered with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v). NQ: Non-quantifiable.	144

<b>Table 8</b> : Extraction recoveries and standard deviations (SD) (n = 3) of 22 PAHs for spiked maternal and umbilical cord pooled sera. Precipitation step: 0.2 % of SDS and 70% of ACN. Automatized SPE (Hypersep cartridge): percolation of 400 µL of spiked sample with 10 µg/L of each PAH except for B <sub>j</sub> F at 20 µg/L, washing with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v), elution with 300 µL of THF and partial evaporation (addition of 40 µL of toluene in the elution fraction). The extract was further recovered with 100 µL of ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v).	157
<b>Table 9</b> : Different groups of acceptance limits for each sera (80%-30%: 80% for low concentrations-30% for high concentrations, 80%-50%: 80% for low concentrations-50% for high concentrations)	161
<b>Table 10</b> : Detailed results of validation by the total error approach in maternal and umbilical cord sera	171
<b>Tableau S 1</b> : Gradient de percoll	268
<b>Tableau S 2</b> : Comparaison du MIX pour les rétro-transcriptions	268
<b>Tableau S 3</b> : Comparaison du Master MIX (Takyon Tm ROX SYBR Master MIX dTTP Blue UF RSM B0701)	268
<b>Tableau S 4</b> : Les séquences des amorces utilisées	269

## Références

- [1] D. Yi, Y. Yuan, L. Jin, G. Zhou, H. Zhu, R.H. Finnell, A. Ren, Levels of PAH–DNA adducts in cord blood and cord tissue and the risk of fetal neural tube defects in a Chinese population, *NeuroToxicology*. 46 (2015) 73–78. doi:10.1016/j.neuro.2014.12.003.
- [2] J.P. Arnould, P. Verhoest, V. Bach, J.P. Libert, J. Belegaud, Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood, *Hum. Exp. Toxicol.* 16 (1997) 716–721.
- [3] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egypt. J. Pet.* (n.d.). doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011.
- [4] F. Alves de Lima Ribeiro, M.M.C. Ferreira, QSPR models of boiling point, octanol–water partition coefficient and retention time index of polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Mol. Struct. THEOCHEM*. 663 (2003) 109–126. doi:10.1016/j.theochem.2003.08.107.
- [5] G.-N. Lu, X.-Q. Tao, Z. Dang, X.-Y. Yi, C. Yang, Estimation of *n*-octanol/water partition coefficients of polycyclic aromatic hydrocarbons by quantum chemical descriptors, *Cent. Eur. J. Chem.* 6 (2008) 310–318. doi:10.2478/s11532-008-0010-y.
- [6] Lu Gui-Ning, Dang Zhi, Tao Xue-Qin, Yang Chen, Yi Xiao-Yun, Estimation of Water Solubility of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Quantum Chemical Descriptors and Partial Least Squares, *QSAR Comb. Sci.* 27 (2008) 618–626. doi:10.1002/qsar.200710014.
- [7] Estimation of Octanol-Water Partition... (PDF Download Available), (n.d.). [https://www.researchgate.net/publication/224861970\\_Estimation\\_of\\_Octanol-Water\\_Partition\\_Coefficients\\_for\\_Polycyclic\\_Aromatic\\_Hydrocarbons\\_Using\\_Reverse-Phase\\_HPLC](https://www.researchgate.net/publication/224861970_Estimation_of_Octanol-Water_Partition_Coefficients_for_Polycyclic_Aromatic_Hydrocarbons_Using_Reverse-Phase_HPLC) (accessed April 19, 2018).
- [8] Y. Wang, X. Wang, F.S. Lee, [Estimation of the octanol-water partition coefficients of PAHs by solid-phase microextraction], *Se Pu Chin. J. Chromatogr.* 17 (1999) 424–426.
- [9] Z. Zelinkova, T. Wenzl, The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review, *Polycycl. Aromat. Compd.* 35 (2015) 248–284. doi:10.1080/10406638.2014.918550.
- [10] T. Zheng, Y. Ran, L. Chen, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rural soils of Dongjiang River Basin: occurrence, source apportionment, and potential human health risk, *J. Soils Sediments*. 14 (2014) 110–120. doi:10.1007/s11368-013-0753-8.

- [11] L.C. Paraíba, S.C.N. Queiroz, A. de H.N. Maia, V.L. Ferracini, Bioconcentration factor estimates of polycyclic aromatic hydrocarbons in grains of corn plants cultivated in soils treated with sewage sludge, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3270–3276. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.026.
- [12] L. Kacálková, P. Tlustoš, The uptake of persistent organic pollutants by plants, *Cent. Eur. J. Biol.* 6 (2011) 223–235. doi:10.2478/s11535-010-0116-z.
- [13] E. Gungormus, S. Tuncel, L. Hakan Tecer, S.C. Sofuoglu, Inhalation and dermal exposure to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and associated carcinogenic risks in a relatively small city, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108 (2014) 106–113. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.015.
- [14] E. Lannerö, M. Wickman, H. Van, A. Bergström, G. Pershagen, L. Nordvall, Exposure to environmental tobacco smoke and sensitisation in children, *Thorax.* 63 (2008) 172–176. doi:10.1136/thx.2007.079053.
- [15] T. Shimada, Y. Fujii-Kuriyama, Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1, *Cancer Sci.* 95 (2004) 1–6.
- [16] C. Tang, J. Tan, R. Fan, B. Zhao, C. Tang, W. Ou, J. Jin, X. Peng, Quasi-targeted analysis of hydroxylation-related metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1461 (2016) 59–69. doi:10.1016/j.chroma.2016.07.051.
- [17] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 92 (2010) 1–853.
- [18] I.C.T. Nisbet, P.K. LaGoy, Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 16 (1992) 290–300. doi:10.1016/0273-2300(92)90009-X.
- [19] Z. Zelinkova, T. Wenzl, EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements: analytical approach and occurrence, *Food Addit. Contam. Part A.* 32 (2015) 1914–1926. doi:10.1080/19440049.2015.1087059.
- [20] K.-H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, R.J.C. Brown, A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environ. Int.* 60 (2013) 71–80. doi:10.1016/j.envint.2013.07.019.

- [21] A.T. Lawal, Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review, *Cogent Environ. Sci.* 3 (2017) 1339841. doi:10.1080/23311843.2017.1339841.
- [22] K. Srogi, Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review, *Environ. Chem. Lett.* 5 (2007) 169–195. doi:10.1007/s10311-007-0095-0.
- [23] V. Tsatsaris, A. Malassiné, T. Fournier, K. Handschuh, J.-P. Schaaps, J.-M. Foidart, D. Evain-Brion, Placenta humain, *EMC - Obstétrique.* 1 (2006) 1–22. doi:10.1016/S0246-0335(06)41336-3.
- [24] D. Evain-Brion, Les deux voies de différenciation du trophoblaste humain, *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 29 (2001) 497–502. doi:10.1016/S1297-9589(01)00175-8.
- [25] Développement du placenta humain et physiopathologie de la prééclampsie – Human placental development and pathophysiology of preeclampsia - 14760.pdf, (n.d.). <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/14760.pdf> (accessed March 22, 2016).
- [26] A. Malassiné, G. Pidoux, P. Gerbaud, J.L. Frendo, D. Evain-Brion, Human trophoblast in trisomy 21: a model for cell-cell fusion dynamic investigation, *Adv. Exp. Med. Biol.* 714 (2011) 103–112. doi:10.1007/978-94-007-0782-5\_4.
- [27] G. Pidoux, P. Gerbaud, S. Gnidehou, M. Grynberg, G. Geneau, J. Guibourdenche, D. Carette, L. Cronier, D. Evain-Brion, A. Malassiné, J.-L. Frendo, ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) C1517-1526. doi:10.1152/ajpcell.00484.2008.
- [28] C.W.G. Redman, D.S. Tannetta, R.A. Dragovic, C. Gardiner, J.H. Southcombe, G.P. Collett, I.L. Sargent, Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia, *Placenta.* 33 (2012) S48–S54. doi:10.1016/j.placenta.2011.12.006.
- [29] H.S. Gammill, T.M. Aydelotte, K.A. Guthrie, E.C. Nkwopara, J.L. Nelson, Cellular Fetal Microchimerism in Preeclampsia, *Hypertension.* 62 (2013) 1062–1067. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01486.
- [30] La circulation placentaire, (n.d.). <http://www.embryology.ch/francais/fplacenta/circulplac01.html> (accessed April 1, 2016).
- [31] D. Evain-Brion, Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans, *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 Suppl. 88 (1999) 12–16.
- [32] R. Brauner, F. de Zegher, Facteurs endocriniens du développement fœtal, *J. Pédiatrie*

Puériculture. 7 (1994) 210–213. doi:10.1016/S0987-7983(05)80417-7.

[33] Hormones à visée reproductive : hormones placentaires et utérines, (n.d.). <http://www.vetopsy.fr/endocrinologie/hormones-sexuelles/hormones-placenta-uterus.php> (accessed March 31, 2016).

[34] J. Guibourdenche, T. Fournier, A. Malassiné, D. Evain-Brion, Development and hormonal functions of the human placenta, *Folia Histochem. Cytobiol.* 47 (2009) S35-40. doi:10.2478/v10042-009-0110-3.

[35] J.R. Pasqualini, Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97 (2005) 401–415. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.08.004.

[36] T.E. Spencer, F.W. Bazer, Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 7 (2002) d1879-1898.

[37] E. Lecarpentier, T. Fournier, J. Guibourdenche, S. Gil, V. Tsatsaris, Le placenta humain, EM-Consulte. (2015). <http://www.em-consulte.com/article/966746/le-placenta-humain> (accessed June 6, 2017).

[38] The Placenta. Biological and Clinical Aspects., *Ann. Intern. Med.* 82 (1975) 449. doi:10.7326/0003-4819-82-3-449\_3.

[39] M. Desforges, C.P. Sibley, Placental nutrient supply and fetal growth, *Int. J. Dev. Biol.* 54 (2010) 377–390. doi:10.1387/ijdb.082765md.

[40] P. Myllynen, K. Vähäkangas, Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue, *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* 27 (2013) 507–512. doi:10.1016/j.tiv.2012.08.027.

[41] M. Panigel, Placental perfusion experiments, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 84 (1962) 1664–1668. doi:10.1016/0002-9378(62)90009-1.

[42] H. Schneider, M. Panigel, J. Dancis, Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 114 (1972) 822–828.

[43] G. Pidoux, P. Gerbaud, J. Guibourdenche, P. Thérond, F. Ferreira, C. Simasotchi, D. Evain-Brion, S. Gil, Formaldehyde Crosses the Human Placenta and Affects Human Trophoblast Differentiation and Hormonal Functions, *PLoS ONE.* 10 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0133506.

- [44] A.M. Padula, E.M. Noth, S.K. Hammond, F.W. Lurmann, W. Yang, I.B. Tager, G.M. Shaw, Exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy and risk of preterm birth, *Environ. Res.* 135 (2014) 221–226. doi:10.1016/j.envres.2014.09.014.
- [45] V.K. Singh, J. Singh, M. Anand, P. Kumar, D.K. Patel, M.M. Krishna Reddy, M.K. Javed Siddiqui, Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in placental tissues of Indian women with full- and preterm deliveries, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 211 (2008) 639–647. doi:10.1016/j.ijheh.2007.11.004.
- [46] H. Choi, V. Rauh, R. Garfinkel, Y. Tu, F.P. Perera, Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Risk of Intrauterine Growth Restriction, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 658–65.
- [47] J. Dejmek, I. Solanský, I. Benes, J. Leníček, R.J. Srám, The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome., *Environ. Health Perspect.* 108 (2000) 1159–1164.
- [48] J. Wu, H. Hou, B. Ritz, Y. Chen, Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and missed abortion in early pregnancy in a Chinese population, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 2312–2318. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.02.028.
- [49] H. Choi, L. Wang, X. Lin, J.D. Spengler, F.P. Perera, Fetal Window of Vulnerability to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Proportional Intrauterine Growth Restriction, *PLOS ONE.* 7 (2012) e35464. doi:10.1371/journal.pone.0035464.
- [50] W. Jedrychowski, F.P. Perera, D. Tang, L. Stigter, E. Mroz, E. Flak, J. Spengler, D. Budzyn-Mrozek, I. Kaim, R. Jacek, Impact of barbecued meat consumed in pregnancy on birth outcomes accounting for personal prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: Birth cohort study in Poland, *Nutrition.* 28 (2012) 372–377. doi:10.1016/j.nut.2011.07.020.
- [51] D.K. Lamichhane, J.-H. Leem, H.-C. Kim, J.-Y. Lee, M.-S. Park, D.-Y. Jung, J.K. Ko, M. Ha, Y. Kim, Y.-C. Hong, E.-H. Ha, Impact of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from maternal diet on birth outcomes: a birth cohort study in Korea, *Public Health Nutr.* 19 (2016) 2562–2571. doi:10.1017/S1368980016000550.
- [52] H. Choi, F.P. Perera, Sources of greater fetal vulnerability to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons among African Americans, *J. Epidemiol. Community Health.* 66 (2012) 121–126. doi:10.1136/jech.2009.099051.

- [53] H. Choi, W. Jedrychowski, J. Spengler, D.E. Camann, R.M. Whyatt, V. Rauh, W.-Y. Tsai, F.P. Perera, International Studies of Prenatal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Fetal Growth, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1744–1750.
- [54] I. Al-Saleh, A. Alsabbahen, N. Shinwari, G. Billedo, A. Mashhour, Y. Al-Sarraj, G.E.D. Mohamed, A. Rabbah, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as determinants of various anthropometric measures of birth outcome, *Sci. Total Environ.* 444 (2013) 565–578. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.021.
- [55] P.H. Langlois, A.T. Hoyt, P.J. Lupo, C.C. Lawson, M.A. Waters, T.A. Desrosiers, G.M. Shaw, P.A. Romitti, E.J. Lammer, and the National Birth Defects Prevention Study, Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of neural tube defect-affected pregnancies, *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 94 (2012) 693–700. doi:10.1002/bdra.23045.
- [56] M.J. Rosa, K.H. Jung, M.S. Perzanowski, E.A. Kelvin, K.W. Darling, D.E. Camann, S.N. Chillrud, R.M. Whyatt, P.L. Kinney, F.P. Perera, R.L. Miller, Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke and asthma, *Respir. Med.* 105 (2011) 869–876. doi:10.1016/j.rmed.2010.11.022.
- [57] J. Jerzynska, D. Podlecka, K. Polanska, W. Hanke, I. Stelmach, W. Stelmach, Prenatal and postnatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and allergy symptoms in city children, *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*. 45 (2017) 18–24. doi:10.1016/j.aller.2016.07.006.
- [58] F.P. Perera, Z. Li, R. Whyatt, L. Hoepner, S. Wang, D. Camann, V. Rauh, Prenatal Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure and Child IQ at Age 5 Years, *PEDIATRICS*. 124 (2009) e195–e202. doi:10.1542/peds.2008-3506.
- [59] F.P. Perera, V. Rauh, R.M. Whyatt, W.-Y. Tsai, D. Tang, D. Diaz, L. Hoepner, D. Barr, Y.-H. Tu, D. Camann, P. Kinney, Effect of Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Neurodevelopment in the First 3 Years of Life among Inner-City Children, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1287–1292. doi:10.1289/ehp.9084.
- [60] F. Perera, T.Y. Li, C. Lin, D. Tang, Effects of prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and environmental tobacco smoke on child IQ in a Chinese cohort, *Environ. Res.* 114 (2012) 40–46. doi:10.1016/j.envres.2011.12.011.
- [61] F.P. Perera, S. Wang, J. Vishnevetsky, B. Zhang, K.J. Cole, D. Tang, V. Rauh, D.H. Phillips, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons–Aromatic DNA Adducts in Cord Blood and

Behavior Scores in New York City Children, *Environ. Health Perspect.* 119 (2011) 1176–1181. doi:10.1289/ehp.1002705.

[62] S.C. Edwards, W. Jedrychowski, M. Butscher, D. Camann, A. Kieltyka, E. Mroz, E. Flak, Z. Li, S. Wang, V. Rauh, F. Perera, Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Children's Intelligence at 5 Years of Age in a Prospective Cohort Study in Poland, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 1326–1331. doi:10.1289/ehp.0901070.

[63] K.K. Ferguson, T.F. McElrath, G.G. Pace, D. Weller, L. Zeng, S. Pennathur, D.E. Cantonwine, J.D. Meeker, Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolite Associations with Biomarkers of Inflammation, Angiogenesis, and Oxidative Stress in Pregnant Women, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 4652–4660. doi:10.1021/acs.est.7b01252.

[64] K. Polanska, G. Dettbarn, J. Jurewicz, W. Sobala, P. Magnus, A. Seidel, W. Hanke, Effect of Prenatal Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure on Birth Outcomes: The Polish Mother and Child Cohort Study, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) 1–10. doi:10.1155/2014/408939.

[65] J. Lewtas, Experimental Evidence for the Carcinogenicity of Indoor and Outdoor Air Pollutants, in: L. Tomatis (Ed.), *Indoor Outdoor Air Pollut. Hum. Cancer*, Springer Berlin Heidelberg, 1993: pp. 103–118. doi:10.1007/978-3-642-78197-1\_6.

[66] T. Nielsen, H.E. Jørgensen, J.C. Larsen, M. Poulsen, City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects, *Sci. Total Environ.* 189–190 (1996) 41–49. doi:10.1016/0048-9697(96)05189-3.

[67] J. Zidzik, I. Kalina, J. Salagovic, R.J. Sram, P. Rössner, T. Popov, P.B. Farmer, Influence of PAHs in ambient air on chromosomal aberrations in exposed subjects: International study – EXPAH, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 620 (2007) 41–48. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.02.021.

[68] A.C. Amarillo, H. Carreras, Quantifying the influence of meteorological variables on particle-bound PAHs in urban environments, *Atmospheric Pollut. Res.* (n.d.). doi:10.1016/j.apr.2016.02.006.

[69] B.A.M. Bandowe, M. Bigalke, L. Boamah, E. Nyarko, F.K. Saalia, W. Wilcke, Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment, *Environ. Int.* 65 (2014) 135–146. doi:10.1016/j.envint.2013.12.018.

- [70] L. Drabova, J. Pulkrabova, K. Kalachova, M. Tomaniova, V. Kocourek, J. Hajslova, Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea using two-dimensional gas chromatography coupled with time of flight mass spectrometry, *Talanta*. 100 (2012) 207–216. doi:10.1016/j.talanta.2012.07.081.
- [71] E. Fasano, I. Yebra-Pimentel, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods, *Food Control*. 59 (2016) 581–590. doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.036.
- [72] L. Campo, F. Rossella, S. Pavanello, D. Mielzynska, E. Siwinska, L. Kapka, P.A. Bertazzi, S. Fustinoni, Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers, *Toxicol. Lett.* 192 (2010) 72–78. doi:10.1016/j.toxlet.2008.12.018.
- [73] M. Oliveira, K. Slezakova, M.J. Alves, A. Fernandes, J.P. Teixeira, C. Delerue-Matos, M. do C. Pereira, S. Morais, Firefighters' exposure biomonitoring: Impact of firefighting activities on levels of urinary monohydroxyl metabolites, *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 219 (2016) 857–866. doi:10.1016/j.ijheh.2016.07.011.
- [74] S. Waidyanatha, Y. Zheng, S.M. Rappaport, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine of coke oven workers by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Chem. Biol. Interact.* 145 (2003) 165–174.
- [75] Y. Hu, G. Li, X. Xue, Z. Zhou, X. Li, J. Fu, B. Cohen, N. Roy, D. Li, J. Sun, P. Nan, M.-S. Tang, Q. Qu, PAH-DNA adducts in a Chinese population: relationship to PAH exposure, smoking and polymorphisms of metabolic and DNA repair genes, *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 13 (2008) 27–40. doi:10.1080/13547500701671895.
- [76] J.D. Pleil, M.A. Stiegel, J.R. Sobus, S. Tabucchi, A.J. Ghio, M.C. Madden, Cumulative exposure assessment for trace-level polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using human blood and plasma analysis, *J. Chromatogr. B*. 878 (2010) 1753–1760. doi:10.1016/j.jchromb.2010.04.035.
- [77] Product: Guide to Occupational Exposure Values, 2005: ACGIH, (n.d.). <https://www.acgih.org/forms/store/ProductFormPublic/guide-to-occupational-exposure-values-2005> (accessed February 22, 2018).
- [78] P. Boffetta, N. Jourenkova, P. Gustavsson, Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Causes Control*. 8 (1997) 444–472. doi:10.1023/A:1018465507029.

- [79] P.B. Bach, M.J. Kelley, R.C. Tate, D.C. McCrory, Screening for Lung Cancer\*, *Chest*. 123 (2003) 72S-82S. doi:10.1378/chest.123.1\_suppl.72S.
- [80] T. Rengarajan, P. Rajendran, N. Nandakumar, B. Lokeshkumar, P. Rajendran, I. Nishigaki, Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5 (2015) 182–189. doi:10.1016/S2221-1691(15)30003-4.
- [81] WHO | State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012, WHO. (n.d.). <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/> (accessed November 19, 2017).
- [82] D.L. Poster, M.M. Schantz, L.C. Sander, S.A. Wise, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 859–881. doi:10.1007/s00216-006-0771-0.
- [83] T. Wenzl, R. Simon, E. Anklam, J. Kleiner, Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union, *TrAC Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716–725. doi:10.1016/j.trac.2006.05.010.
- [84] J. Lewtas, D. Walsh, R. Williams, L. Dobiáš, Air pollution exposure–DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 378 (1997) 51–63. doi:10.1016/S0027-5107(97)00097-3.
- [85] B. Binková, Y. Giguère, P. Rössner, M. Dostál, R.J. Šrám, The effect of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21WAF1 proteins and cell cycle distribution, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 471 (2000) 57–70. doi:10.1016/S1383-5718(00)00111-X.
- [86] P.B. Farmer, R. Singh, B. Kaur, R.J. Sram, B. Binkova, I. Kalina, T.A. Popov, S. Garte, E. Taioli, A. Gabelova, A. Cebulska-Wasilewska, Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants: Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage, *Mutat. Res. Mutat. Res.* 544 (2003) 397–402. doi:10.1016/j.mrrev.2003.09.002.
- [87] M.M. Pratt, K. John, A.B. MacLean, S. Afework, D.H. Phillips, M.C. Poirier, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and DNA Adduct Semi-Quantitation in Archived Human Tissues, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8 (2011) 2675–2691. doi:10.3390/ijerph8072675.
- [88] B. Ewa, M.-Š. Danuta, Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA

adducts, *J. Appl. Genet.* 58 (2017) 321–330. doi:10.1007/s13353-016-0380-3.

[89] N.D. Madhavan, K.A. Naidu, Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta, maternal blood, umbilical cord blood and milk of Indian women, *Hum. Exp. Toxicol.* 14 (1995) 503–506. doi:10.1177/096032719501400607.

[90] Y. Yu, X. Wang, B. Wang, S. Tao, W. Liu, X. Wang, J. Cao, B. Li, X. Lu, M.H. Wong, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues in Human Milk, Placenta, and Umbilical Cord Blood in Beijing, China, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 10235–10242. doi:10.1021/es202827g.

[91] X. Zhang, X. Li, Y. Jing, X. Fang, X. Zhang, B. Lei, Y. Yu, Transplacental transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons in paired samples of maternal serum, umbilical cord serum, and placenta in Shanghai, China, *Environ. Pollut.* 222 (2017) 267–275. doi:10.1016/j.envpol.2016.12.046.

[92] J. Pulkrabova, M. Stupak, A. Svarcova, P. Rossner, A. Rossnerova, A. Ambroz, R. Sram, J. Hajslova, Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk, *Sci. Total Environ.* 562 (2016) 640–647. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.013.

[93] S. Santonicola, A. De Felice, L. Cobellis, N. Passariello, A. Peluso, N. Murru, M.C. Ferrante, R. Mercogliano, Comparative study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in breast milk and infant formula and risk assessment, *Chemosphere.* 175 (2017) 383–390. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.084.

[94] S.R. Kim, R.U. Halden, T.J. Buckley, Polycyclic aromatic hydrocarbons in human milk of nonsmoking U.S. women, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2663–2667.

[95] M. Del Bubba, L. Zanieri, P. Galvan, G.P. Donzelli, L. Checchini, L. Lepri, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and total fats in human milk, *Ann. Chim.* 95 (2005) 629–641.

[96] H.L. Tsang, S. Wu, C.K.M. Leung, S. Tao, M.H. Wong, Body burden of POPs of Hong Kong residents, based on human milk, maternal and cord serum, *Environ. Int.* 37 (2011) 142–151. doi:10.1016/j.envint.2010.08.010.

[97] A.J. Wheeler, N.A. Dobbin, M.-E. Héroux, M. Fisher, L. Sun, C.F. Khoury, R. Hauser, M. Walker, T. Ramsay, J.-F. Bienvenu, A. LeBlanc, E. Daigle, E. Gaudreau, P. Belanger, M. Feeley, P. Ayotte, T.E. Arbuckle, Urinary and breast milk biomarkers to assess exposure to

naphthalene in pregnant women: an investigation of personal and indoor air sources, *Environ. Health Glob. Access Sci. Source.* 13 (2014) 30. doi:10.1186/1476-069X-13-30.

[98] I. Çok, B. Mazmanci, M.A. Mazmanci, C. Turgut, B. Henkelmann, K.-W. Schramm, Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey, *Environ. Int.* 40 (2012) 63–69. doi:10.1016/j.envint.2011.11.012.

[99] L. Zanieri, P. Galvan, L. Checchini, A. Cincinelli, L. Lepri, G.P. Donzelli, M. Del Bubba, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area, *Chemosphere.* 67 (2007) 1265–1274. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.011.

[100] X. Xu, J. Liu, C. Huang, F. Lu, Y.M. Chiung, X. Huo, Association of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and lead co-exposure with child physical growth and development in an e-waste recycling town, *Chemosphere.* 139 (2015) 295–302. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.080.

[101] V.K. Singh, D.K. Patel, Jyoti, S. Ram, N. Mathur, M.K.J. Siddiqui, Blood levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in children and their association with oxidative stress indices: An Indian perspective, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 152–161. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.11.017.

[102] V.K. Singh, D.K. Patel, S. Ram, N. Mathur, M.K. Siddiqui, J, J.R. Behari, Blood Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Children of Lucknow, India, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 (2008) 348–54. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00244-007-9015-3.

[103] X.F. Song, Z.Y. Chen, Z.J. Zang, Y.N. Zhang, F. Zeng, Y.P. Peng, C. Yang, Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbon level in blood and semen quality for residents in Pearl River Delta Region in China, *Environ. Int.* 60 (2013) 97–105. doi:10.1016/j.envint.2013.08.003.

[104] A.A. Provatas, C.A. King, S.L. Kolakowski, J.D. Stuart, C.R. Perkins, Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Avian Dried Blood Spots by Ultra-performance Liquid Chromatography with Simple Liquid Extraction and Phospholipid Solid-phase Extraction Preparation, *Anal. Lett.* 50 (2017) 2649–2660. doi:10.1080/00032719.2017.1302461.

[105] Y. Guo, X. Huo, K. Wu, J. Liu, Y. Zhang, X. Xu, Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in umbilical cord blood of human neonates from Guiyu, China, *Sci. Total*

Environ. 427 (2012) 35–40. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.007.

[106] Y.Y. Qin, C.K.M. Leung, C.K. Lin, A.O.W. Leung, H.S. Wang, J.P. Giesy, M.H. Wong, Halogenated POPs and PAHs in Blood Plasma of Hong Kong Residents, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1630–1637. doi:10.1021/es102444g.

[107] S. Yin, M. Tang, F. Chen, T. Li, W. Liu, Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): The correlation with and impact on reproductive hormones in umbilical cord serum, *Environ. Pollut.* 220, Part B (2017) 1429–1437. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.090.

[108] K.-F. Poon, P.K.S. Lam, M.H.W. Lam, Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in human blood serum by proteolytic digestion — direct immersion SPME, *Anal. Chim. Acta.* 396 (1999) 303–308. doi:10.1016/S0003-2670(99)00447-X.

[109] Q. Chen, T. Zheng, B.A. Bassig, Y. Cheng, B. Leaderer, S. Lin, T. Holford, J. Qiu, Y. Zhang, K. Shi, Y. Zhu, J. Niu, Y. Li, H. Guo, X. Hu, Y. Jin, Prenatal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Birth Weight in China, *Open J. Air Pollut.* 03 (2014) 100–110. doi:10.4236/ojap.2014.34010.

[110] K. Sexton, J.J. Salinas, T.J. McDonald, R.M.Z. Gowen, R.P. Miller, J.B. McCormick, S.P. Fisher-Hoch, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Maternal and Umbilical Cord Blood from Pregnant Hispanic Women Living in Brownsville, Texas, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8 (2011) 3365–3379. doi:10.3390/ijerph8083365.

[111] A. Ramesh, A. Kumar, M.P. Aramandla, A.M. Nyanda, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues in Serum Samples of Autopsied Individuals from Tennessee, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12 (2015) 322–334. doi:10.3390/ijerph120100322.

[112] N. Al-Daghri, Serum Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Among Children with and without Asthma: Correlation to Environmental and Dietary Factors, *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 21 (2008) 211–217. doi:10.2478/v10001-008-0021-0.

[113] N.M. Al-Daghri, M.S. Alokail, S.H. Abd-Alrahman, H.M. Draz, Polycyclic aromatic hydrocarbon distribution in serum of Saudi children using HPLC-FLD: marker elevations in children with asthma, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 12085–12090. doi:10.1007/s11356-014-3108-0.

[114] A. Kamal, M. Qayyum, I.U. Cheema, A. Rashid, Biological Monitoring of Blood Naphthalene Levels as a Marker of Occupational Exposure to PAHs among Auto-Mechanics and Spray Painters in Rawalpindi, *BMC Public Health.* 11 (2011) 467. doi:10.1186/1471-2458-

11-467.

[115] N.M. Loutfy, F. Malhat, M.T. Ahmed, Polycyclic aromatic hydrocarbon residues in blood serum and human milk in Egypt, A pilot case study, *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 23 (2017) 1573–1584. doi:10.1080/10807039.2017.1331725.

[116] S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson, L. Ma, Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins in Human Serum by Combined Micelle-Mediated Extraction (Cloud-Point Extraction) and HPLC, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1556–1560. doi:10.1021/ac951028+.

[117] M.S. Neal, J. Zhu, W.G. Foster, Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers, *Reprod. Toxicol. Elmsford N.* 25 (2008) 100–106. doi:10.1016/j.reprotox.2007.10.012.

[118] L. Campo, L. Addario, M. Buratti, L. Scibetta, O. Longhi, C. Valla, P.E. Cirila, I. Martinotti, V. Foà, S. Fustinoni, Biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons by determination of unmetabolized compounds in urine, *Toxicol. Lett.* 162 (2006) 132–138. doi:10.1016/j.toxlet.2005.09.024.

[119] L. Campo, R. Mercadante, F. Rossella, S. Fustinoni, Quantification of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by headspace solid-phase microextraction gas chromatography–isotope dilution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 631 (2009) 196–205. doi:10.1016/j.aca.2008.10.041.

[120] J.R. Sobus, M.D. Mcclean, R.F. Herrick, S. Waidyanatha, F. Onyemauwa, L.L. Kupper, S.M. Rappaport, Investigation of PAH Biomarkers in the Urine of Workers Exposed to Hot Asphalt, *Ann. Occup. Hyg.* 53 (2009) 551–560. doi:10.1093/annhyg/mep041.

[121] A. Toriba, Y. Kuramae, T. Chetiyankornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa, Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human hair by HPLC with fluorescence detection: a biological monitoring method to evaluate the exposure to PAHs, *Biomed. Chromatogr. BMC.* 17 (2003) 126–132. doi:10.1002/bmc.222.

[122] Y. Yamamoto, A. Ishizaki, H. Kataoka, Biomonitoring method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in hair by online in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *J. Chromatogr. B.* 1000 (2015) 187–191. doi:10.1016/j.jchromb.2015.07.033.

[123] Z. Li, B. Wang, S. Ge, L. Yan, Y. Liu, Z. Li, A. Ren, A simultaneous analysis method

of polycyclic aromatic hydrocarbons, nicotine, cotinine and metals in human hair, *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987. 219 (2016) 66–71. doi:10.1016/j.envpol.2016.09.045.

[124] Risk assessment of non-dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) via house PM<sub>2.5</sub>, TSP and dust and the implications from human hair - ScienceDirect, (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231013001738> (accessed September 13, 2018).

[125] X. Dong, Q. Wang, J. Peng, M. Wu, B. Pan, B. Xing, Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from mother to fetus in relation to pregnancy complications, *Sci. Total Environ.* 636 (2018) 61–68. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.274.

[126] M.T.O. Jonker, Determining octanol-water partition coefficients for extremely hydrophobic chemicals by combining “slow stirring” and solid-phase microextraction, *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (2016) 1371–1377. doi:10.1002/etc.3300.

[127] S.A. Wise, L.C. Sander, M.M. Schantz, Analytical Methods for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) — A Historical Perspective on the 16 U.S. EPA Priority Pollutant PAHs, *Polycycl. Aromat. Compd.* 35 (2015) 187–247. doi:10.1080/10406638.2014.970291.

[128] G. Purcaro, S. Moret, L.S. Conte, Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods, *Talanta.* 105 (2013) 292–305. doi:10.1016/j.talanta.2012.10.041.

[129] S.-S. Cai, J.A. Syage, K.A. Hanold, M.P. Balogh, Ultra Performance Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Photoionization–Tandem Mass Spectrometry for High-Sensitivity and High-Throughput Analysis of U.S. Environmental Protection Agency 16 Priority Pollutants Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2123–2128. doi:10.1021/ac802275e.

[130] S.-C.C. Lung, C.-H. Liu, Fast analysis of 29 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs with ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry, *Sci. Rep.* 5 (2015). doi:10.1038/srep12992.

[131] J.Á. Gómez-Ruiz, T. Wenzl, Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15 + 1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1697–1707. doi:10.1007/s00216-008-2585-8.

[132] B. Veyrand, A. Brosseaud, L. Sarcher, V. Varlet, F. Monteau, P. Marchand, F. Andre,

B. Le Bizec, Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach, *J. Chromatogr. A.* 1149 (2007) 333–344. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.043.

[133] R. Schiewek, M. Schellenträger, R. Mönnikes, M. Lorenz, R. Giese, K.J. Brockmann, S. Gäb, T. Benter, O.J. Schmitz, Ultrasensitive determination of polycyclic aromatic compounds with atmospheric-pressure laser ionization as an interface for GC/MS, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4135–4140. doi:10.1021/ac0700631.

[134] X. Xu, T.A. Yekeen, Q. Xiao, Y. Wang, F. Lu, X. Huo, Placental IGF-1 and IGFBP-3 expression correlate with umbilical cord blood PAH and PBDE levels from prenatal exposure to electronic waste, *Environ. Pollut.* 182 (2013) 63–69. doi:10.1016/j.envpol.2013.07.005.

[135] B.N. Srinivasan, E. Fujimori, Benzo[a]pyrene--serum : albumin/cysteine interactions: fluorescence and electron spin resonance studies, *Chem. Biol. Interact.* 28 (1979) 1–15.

[136] M. Lipniak, J. Brandys, A. Moniczewski, [Binding of various polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by plasma albumin and blood cells], *Folia Med. Cracov.* 31 (1990) 73–79.

[137] B. Wang, L. Jin, A. Ren, Y. Yuan, J. Liu, Z. Li, L. Zhang, D. Yi, L. Wang, Y. Zhang, X. Wang, S. Tao, R.H. Finnell, Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Maternal Serum and Risk of Neural Tube Defects in Offspring, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 588–596. doi:10.1021/es503990v.

[138] N. Yoshimitsu, T. Douchi, H. Yamasaki, Y. Nagata, T. Andoh, H. Hatano, Differences in umbilical cord serum lipid levels with mode of delivery, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 106 (1999) 144–147.

[139] M.K. Sanyal, D. Mercan, K. Belanger, R.M. Santella, DNA adducts in human placenta exposed to ambient environment and passive cigarette smoke during pregnancy, *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 79 (2007) 289–294. doi:10.1002/bdra.20346.

[140] M.Y. Obolenskaya, N.M. Teplyuk, R.L. Divi, M.C. Poirier, N.B. Filimonova, M. Zadrozna, M.J. Pasanen, Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity- and chemically-polluted regions, *Toxicol. Lett.* 196 (2010) 80–86. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.1115.

- [141] N.-D. Dat, M.B. Chang, Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies, *Sci. Total Environ.* 609 (2017) 682–693. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.204.
- [142] P. Zhang, Y. Chen, Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in surface soil of China: A review, *Sci. Total Environ.* 605–606 (2017) 1011–1020. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.247.
- [143] J.L. Domingo, M. Nadal, Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature, *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 86 (2015) 144–153. doi:10.1016/j.fct.2015.10.002.
- [144] L.P. Wright, L. Zhang, I. Cheng, J. Aherne, G.R. Wentworth, Impacts and Effects Indicators of Atmospheric Deposition of Major Pollutants to Various Ecosystems - A Review, *Aerosol Air Qual. Res.* 18 (2018) 1953–1992. doi:10.4209/aaqr.2018.03.0107.
- [145] Y. Guo, X. Huo, K. Wu, J. Liu, Y. Zhang, X. Xu, Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in umbilical cord blood of human neonates from Guiyu, China, *Sci. Total Environ.* 427–428 (2012) 35–40. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.007.
- [146] G. Kiss, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 725 (1996) 261–272. doi:10.1016/0021-9673(95)00940-X.
- [147] V.J. Barwick, Strategies for solvent selection — a literature review, *TrAC Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 293–309. doi:10.1016/S0165-9936(97)00039-3.
- [148] S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC–ESI–MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 913–920. doi:10.1016/j.jpba.2004.03.005.
- [149] C. Polson, P. Sarkar, B. Incedon, V. Raguvaran, R. Grant, Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 785 (2003) 263–275. doi:10.1016/S1570-0232(02)00914-5.
- [150] K.L. Gudiksen, I. Gitlin, G.M. Whitesides, Differentiation of proteins based on characteristic patterns of association and denaturation in solutions of SDS, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 7968–7972. doi:10.1073/pnas.0602816103.
- [151] H.Y. Hernández-Unzón, M.L. Ortega-Delgado, Denaturation by heat, sodium dodecyl

sulphate and dithiothreitol of globulins and phaseolin from dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 38 (1988) 211–223.

[152] S. Swiha, V. Pichon, T. Fournier, S. Gil, N. Delaunay, Development of an analytical method for the simultaneous quantitation of 24 regulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in maternal and umbilical cord sera, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2018).

[153] R.D. Marini, A.-C. Servais, E. Rozet, P. Chiap, B. Boulanger, S. Rudaz, J. Crommen, P. Hubert, M. Fillet, Nonaqueous capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of S-timolol using heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)-beta-cyclodextrin: validation using the accuracy profile strategy and estimation of uncertainty, *J. Chromatogr. A.* 1120 (2006) 102–111. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.104.

[154] V. Esters, L. Angenot, V. Brandt, M. Frédérick, M. Tits, C. Van Nerum, J.-N. Wauters, P. Hubert, Validation of a high-performance thin-layer chromatography/densitometry method for the quantitative determination of glucosamine in a herbal dietary supplement, *J. Chromatogr. A.* 1112 (2006) 156–164. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.035.

[155] A. Combes, S. El Abdellaoui, C. Sarazin, J. Vial, A. Mejean, O. Ploux, V. Pichon, Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine in complex environmental samples, *Anal. Chim. Acta.* 771 (2013) 42–49. doi:10.1016/j.aca.2013.02.016.

[156] V. Cuzuel, J. Brunet, A. Rey, J. Dugay, J. Vial, V. Pichon, P.-L. Carrette, Validation of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Targeted Degradation Compounds of Ethanolamine Used in CO<sub>2</sub> Capture: Application to Real Samples, *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. D’IFP Energ. Nouv.* 69 (2014) 821–832. doi:10.2516/ogst/2014021.

[157] A. Dispas, P. Lebrun, E. Ziemons, R. Marini, E. Rozet, P. Hubert, Evaluation of the quantitative performances of supercritical fluid chromatography: from method development to validation, *J. Chromatogr. A.* 1353 (2014) 78–88. doi:10.1016/j.chroma.2014.01.046.

[158] L. Cuccia, R. Bourdon, J. Dugay, D. Bontemps, P.-L. Carrette, J. Vial, Novel approach for the quantitative analysis of MEA degradation products present in gas effluent of CO<sub>2</sub> capture process by thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry: Development and validation, *Int. J. Greenh. Gas Control.* 60 (2017) 110–119. doi:10.1016/j.ijggc.2017.03.012.

[159] S. Mompelat, M.-P. Fourmond, M. Laurentie, E. Verdon, D. Hurtaud-Pessel, J.-P.

Abjean, Validation of a liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix, *J. Chromatogr. A.* 1407 (2015) 119–129. doi:10.1016/j.chroma.2015.06.043.

[160] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 579–586. doi:10.1016/j.jpba.2004.07.027.

[161] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 70–81. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.013.

[162] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal–Part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 82–96. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.032.

[163] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal: Part IV. Examples of application, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 760–771. doi:10.1016/j.jpba.2008.07.018.

[164] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, Validation des procédures analytiques quantitatives: Harmonisation des démarches Partie II-Statistiques, *STP Pharma Prat.* 16 (2006) 30–60.

[165] M.Á. Delgadillo-Marín, A. Peña-Álvarez, M. Villalobos, Application of Programmed Temperature Vaporization Large Volume Injection Gas Chromatography (PTV-LVI-GC) to the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soils, *J. Mex. Chem. Soc.* 57 (2013) 85–91.

[166] M. Blessing, M.A. Jochmann, S.B. Haderlein, T.C. Schmidt, Optimization of a large-

volume injection method for compound-specific isotope analysis of polycyclic aromatic compounds at trace concentrations, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM.* 29 (2015) 2349–2360. doi:10.1002/rcm.7389.

[167] F.P. Perera, D. Tang, S. Wang, J. Vishnevetsky, B. Zhang, D. Diaz, D. Camann, V. Rauh, Prenatal Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Child Behavior at Age 6–7 Years, *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 921–926. doi:10.1289/ehp.1104315.

[168] F.P. Perera, H. Chang, D. Tang, E.L. Roen, J. Herbstman, A. Margolis, T.-J. Huang, R.L. Miller, S. Wang, V. Rauh, Early-Life Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and ADHD Behavior Problems, *PLoS ONE.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0111670.

[169] X. Lu, Y. He, C. Zhu, H. Wang, S. Chen, H.-Y. Lin, Twist1 is involved in trophoblast syncytialization by regulating GCM1, *Placenta.* 39 (2016) 45–54. doi:10.1016/j.placenta.2016.01.008.

[170] M. Delidaki, M. Gu, A. Hein, M. Vatish, D.K. Grammatopoulos, Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line, *Mol. Cell. Endocrinol.* 332 (2011) 213–220. doi:10.1016/j.mce.2010.10.013.

[171] M. Aghababaei, K. Hogg, S. Perdu, W.P. Robinson, A.G. Beristain, ADAM12-directed ectodomain shedding of E-cadherin potentiates trophoblast fusion, *Cell Death Differ.* 22 (2015) 1970–1984. doi:10.1038/cdd.2015.44.

[172] P. Merviel, F. Müller, J. Guibourdenche, N. Berkane, R. Gaudet, G. Bréart, S. Uzan, Correlations between serum assays of human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) and pre-eclampsia or intrauterine growth restriction (IUGR) among nulliparas younger than 38 years, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 95 (2001) 59–67.

[173] C. Depoix, M.K. Tee, R.N. Taylor, Molecular regulation of human placental growth factor (PlGF) gene expression in placental villi and trophoblast cells is mediated via the protein kinase a pathway, *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif.* 18 (2011) 219–228. doi:10.1177/19337191110389337.

[174] S.Y. Park, S. Phark, M. Lee, J.Y. Lim, D. Sul, Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a]pyrene-exposed rats, *Placenta.* 31 (2010) 873–879. doi:10.1016/j.placenta.2010.07.010.

[175] J. Park, J.-S. Min, B. Kim, U.-B. Chae, J.W. Yun, M.-S. Choi, I.-K. Kong, K.-T. Chang, D.-S. Lee, Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in

microglia cells by regulating MAPK and NF- $\kappa$ B pathways, *Neurosci. Lett.* 584 (2015) 191–196. doi:10.1016/j.neulet.2014.10.016.

[176] J.R. Hutson, Prediction of placental drug transfer using the human placental perfusion model, *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol. J. Ther. Popul. Pharamcologie Clin.* 18 (2011) e533-543.