

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

ÉTUDE DU
MÉTABOLISME DU TRIBUTYLÉTAIN PAR
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-SPECTROMÉTRIE DE MASSE

THÈSE
PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Comme exigence partielle
du programme de doctorat conjoint en océanographie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Océanographie)

PAR
KHALIDA BÉKRI

Jury de thèse

Dr. Jean-Pierre Gagné, professeur-chercheur à l'ISMER.....	<i>Président</i>
Dr. Jaime Padrós, chercheur sénior à Perkin-Elmer à Montréal.....	<i>Examineur externe</i>
Dr. Jonathan Gagnon, professeur-chercheur à l'UQAR.....	<i>Examineur interne</i>
Dr. Émilien Pelletier, professeur-chercheur à l'ISMER.....	<i>Directeur de thèse</i>

Mai 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

*On peut accumuler le savoir
mais on ne réalise pas toujours
la connaissance.*

*ℒ Cheikfi Khaled
Bentounès ℒ*

*À mes Parents,
Betafa & Zawa &
&
À la mémoire de M'ma &*

REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à présenter mes sincères remerciements à mon professeur, le Dr. Émilien Pelletier. Il m'a permis de «fouler» un monde de la science que je n'aurais jamais pensé aborder, avant mon arrivée au Québec. Il a mis à ma disposition, entre autres, des appareils de chimie analytique de haut niveau et des laboratoires que j'ai pris pour «mon chez-moi». Il n'a jamais été avarre ni de son temps, ni de ses subventions, me permettant d'explorer tout ce dont j'ai jugé bon et possible, durant ces années. **Émilien**, permets-moi de t'exprimer ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance pour tout; ta générosité, ta patience et ta disponibilité. *Choukran jazeelan*. Je vais quitter mon nid rimouskois pour voguer vers d'autres horizons, avec mon bagage, bien rempli.

Je désire remercier les membres du jury, monsieur Jean-Pierre Gagné, président, monsieur Jonathan Gagnon, examinateur interne et monsieur Jaime Padrós, examinateur externe, pour avoir accepté d'évaluer cette thèse et pour l'intérêt qu'ils lui consacrent, mais aussi pour leurs commentaires constructifs.

Jaime, je te suis reconnaissante de m'avoir soutenue et aidée au tout début de cette thèse, en confortant mes idées et ma démarche scientifique. La problématique est devenue beaucoup plus analytique, mais tes conseils avisés sur le plan biochimique et tes réponses à tous mes questionnements, tout au long de ce parcours, m'ont été d'une grande aide. Comme je te l'ai déjà mentionné, tu en as fait plus que tu ne le penses et tes critiques seront les bienvenues, pour un bon débat lors de ma soutenance.

Au Dr. **Richard** Saint-Louis: reçois toute ma gratitude pour ton aide inestimable, pour mon initiation au LC-API-MS, ta patience illimitée et ton soutien scientifique quotidien. Tu as toujours été disponible pour répondre à toutes mes questions, futiles soient-elles, du matin au soir. Je te suis reconnaissante pour ton temps, ta bonne humeur et ta générosité.

À **Ghislain** Canuel, je te présente tous mes remerciements pour ton aide technique, ta grande disponibilité, ta patience infinie, les calculs et conversions chimiques et pour toutes les petites attentions. «Je vais quitter l'ISMER finalement après toi, mais presque en même temps». Je te remercie pour toutes ces belles années et te souhaite une belle retraite.

Je remercie **Benoît** Légaré pour les mesures de l'EROD et pour m'avoir appris la procédure d'injection intrapéritonéale, **Émilie** Doussantousse pour son aide lors de l'expérience d'exposition avec les poissons, **Isabelle** Desbiens avec qui j'ai eu un plaisir fou de partager nos journées de laboratoire, ainsi que toutes les personnes qui m'ont apportée leur soutien technique, minime soit-il, durant cette thèse.

Je remercie également tous les professeurs de l'ISMER et ceux du département de Biologie et de Chimie, pour avoir mis à ma disposition leurs laboratoires et leur matériel, et tout le personnel technique et administratif de l'ISMER. Je remercie tout particulièrement le Dr. **Céline** Audet et son équipe pour m'avoir fournie les ombles de fontaine, tout au long de ce travail. Je remercie également les chercheurs d'autres pays (J. Cravédi et É. Perdu ainsi que R.F. Lee) pour leurs conseils et réponses scientifiques.

Je n'oublie point mes collègues et amis de laboratoire et de bureau, ainsi que tous mes amis, jeunes et moins jeunes, d'ici et d'ailleurs, pour leur amitié, leurs encouragements (t'es capable, lâche-pas, tu verras ça payera un jour...), leur soutien moral et autre dans les moments difficiles et pour tous les merveilleux moments passés en leur compagnie. Également, *choukran* à l'éternelle Oum Kalthoum *fi sahara'ti el tawila wa tafkiri el 3amiq*.

Je tiens à remercier mes parents, pour leur amour, leur soutien et bénédictions infinies. Ils ont toujours respecté mes choix. Je remercie beaucoup mon père, dont les coups de pieds dans le «...» ont été d'une grande aide, pour finaliser ma rédaction, même si la motivation ne m'ait jamais quittée. Merci également à mes sœurs et mon frère pour leur affection.

Cette étude a été supportée financièrement en partie par le CRSNG-Programme de subventions de recherches individuelles (É. Pelletier) et par le Programme canadien de Chaire de recherche (É. Pelletier).

RÉSUMÉ

La contamination par le tributylétain (TBT) et les butylétains (BTs), en général, est encore un sujet d'actualité en écotoxicologie aquatique. Ces composés chimiques ont une faible dégradabilité dans l'environnement, un taux d'accumulation généralement élevé et une toxicité à long terme. La biotransformation des contaminants est un processus qui joue un rôle important pour réduire la toxicité des composés en général et pour leur excrétion hors de l'organisme. L'identification des produits et des voies métaboliques d'un contaminant est donc une étape importante pour comprendre ses mécanismes de toxicité. L'objectif principal de ce travail était d'examiner en détail le métabolisme *in vivo* et *in vitro* du TBT, en utilisant la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse par une interface d'ionisation à pression atmosphérique (LC-API-MSⁿ). L'avantage de cette technique d'ionisation douce est l'analyse de la structure des molécules polaires, peu volatiles ou thermiquement fragiles, difficilement observables par d'autres techniques analytiques (e.g. la GC-MS).

Dans un premier temps, nous avons développé une méthode d'analyse des BTs par LC-APCI-MS qui a servi par la suite à la détection des métabolites du TBT générés *in vitro* et *in vivo*. Nous avons d'abord synthétisé chimiquement un des dérivés métaboliques de phase I du TBT non disponible commercialement, le chlorure du delta-hydroxybutyl-dibutylétain (4-OHBuDBTCl), composé plus polaire que le TBT. Nous avons développé des méthodes de séparation par gradient d'élution en phase inverse et de détection simultanée des deux composés, ainsi que d'un dérivé du TBT simplement déalkylé, le dibutylétain (DBT). Les limites de détection (LODs) de la méthode pour les deux composés (35 ng.mL⁻¹ pour le TBT et 26 ng.mL⁻¹ pour le 4-OHBuDBT) sont comparables aux valeurs publiées de LOD pour les BTs en LC-API-MS. Pour illustrer une application de notre méthode LC-MS, nous avons développé une méthode d'extraction à partir d'échantillons d'eau de mer additionnés des deux composés de polarité différente, le TBT et le 4-OHBuDBT, en utilisant le *n*-hexane et l'acétate d'éthyle. Cette méthode a permis la récupération en moyenne de 72 à 96% des deux composés. En se basant sur les valeurs des limites de quantification (LOQ), notre méthode analytique LC-APCI-MS permet de mesurer approximativement 0,08-0,1 µg de chaque composé dans 1 L d'eau de mer, ce qui est comparable aux méthodes publiées dans la littérature avec la même technique analytique.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des expérimentations *in vitro* à l'aide de microsomes de foie d'un poisson salmonidé, l'omble de fontaine *Salvelinus fontinalis*, et des expériences *in vivo* par exposition intrapéritonéale d'ombles de fontaine et par exposition via l'eau de mer de moules bleues *Mytilus edulis*.

Le métabolisme du TBT *in vitro* et *in vivo* par les deux organismes, l'omble de fontaine et la moule bleue, révèle principalement des métabolites hydroxylés de phase I du type OHBuDBT, qui sont considérés par certains auteurs comme une voie de détoxification. D'autres métabolites avec la composition typique de l'étain, issus du métabolisme *in vivo*, sont également détectés, mais leur caractérisation n'a pas pu être réalisée à cause de leur faible concentration et la faible quantité des extraits. Pour certains composés analysés en mode d'ionisation négatif et dont les $m/z > 500$, on pourrait avancer qu'il s'agit de composés de phase II non identifiés.

Dans un troisième temps, nous avons réalisé des expérimentations *in vitro* et *in vivo* avec le 4-OHBuDBT. Les incubations *in vitro* de microsomes de foie d'ombles de fontaine avec ce composé avait comme but de contourner l'étape du métabolisme de phase I et tenter de générer un métabolite conjugué de phase II à l'acide glucuronique. Nos tentatives ont été infructueuses car le 4-OHBuDBT serait un faible substrat pour l'UDP-glucuronyl transférase.

Nous avons également exposé des ombles de fontaine par injection péritonéale au 4-OHBuDBT, ainsi que des moules bleues via l'eau de mer au même composé, toujours dans le but de contourner le métabolisme de phase I du TBT. Les résultats obtenus révèlent essentiellement la présence d'un composé avec le patron isotopique de l'étain à m/z 321 en mode positif d'ionisation, aussi bien dans les extraits de foie de poissons que dans les extraits de tissus de moules. En nous basant sur une étude publiée et la communication personnelle avec un chercheur d'un autre laboratoire, nous avons suggéré que ce composé serait issu d'une hydroxylation supplémentaire du 4-OHBuDBT (métabolisme de phase I), pour générer un composé carboxylé, le carboxypropyl-dibutylétain ($\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$). D'autres composés avec le patron isotopique typique de l'étain ont été détectés dans les tissus des deux organismes, mais ils sont différents les uns des autres. La caractérisation de ces composés n'a pas été possible, à cause de leur faible concentration dans les extraits ainsi que la faible quantité de ces derniers.

L'ensemble de ces travaux montre d'une part la capacité des organismes marins à métaboliser le TBT et, d'autres part, la possibilité de détecter des métabolites principalement hydroxylés même en très faibles quantités, avec la technique LC-MS.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE ALPHABÉTIQUE DES ABRÉVIATIONS.....	xvi
 INTRODUCTION.....	 1
1.1 Biotransformation des contaminants.....	4
1.1.1 Les réactions métaboliques.....	5
1.1.1.1 Métabolisme de phase I.....	6
1.1.1.2 Métabolisme de phase II.....	8
1.1.2 Complexité du métabolisme et enzymes isofonctionnelles	8
1.1.3 Toxicité due au processus de métabolisation.....	10
1.1.4 Quelques considérations métaboliques entre organismes aquatiques.....	11
1.2 Problématique environnementale du tributylétain (TBT) et toxicité.....	13
1.2.1 Description et accumulation.....	15
1.2.2 Toxicité.....	17
1.2.3 Mécanismes — Interaction avec certaines enzymes clefs du métabolisme.....	20
1.2.4 Transformations métaboliques du TBT — État des connaissances.....	25
1.2.5 Métabolisme du TBT et signification toxicologique.....	27
1.2.6 Analyse et dosage du TBT.....	29
1.3 Contexte du projet.....	30
1.4 Objectifs	35
1.5 Approches expérimentales <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	37
1.5.1 Le foie comme organe clé d'évaluation métabolique.....	37
1.5.2 Approche expérimentale <i>in vitro</i>	37
1.5.3 Les moules bleues en expérimentation <i>in vivo</i>	39
1.5.4. Les poissons comme modèle biologique.....	39
1.6 Approche analytique par LC - API - MS ⁿ et principe d'ionisation en API.....	40

CHAPITRE I

DETERMINATION OF TRIBUTYL TIN AND 4-HYDROXYBUTYLDIBUTYL TIN CHLORIDES IN SEAWATER BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION-MASS SPECTROMETRY.....46

Résumé.....	47
Abstract.....	48
1. Introduction	49
2. Experimental	51
2.1. Reagents and solutions.....	51
2.2. Equipment.....	52
2.2.1. GC-MS.....	52
2.2.2. Infrared spectroscopy.....	52
2.2.3. LC-APCI-MS.....	52
2.2.3.1. <i>Chromatographic conditions</i>	53
2.2.3.2. <i>Mass spectrometer conditions</i>	53
2.2.3.3. <i>Quantification</i>	54
2.3. Synthesis of 4-hydroxybutyldibutyltin chloride (4-OHBuDBTCl).....	54
2.4. Seawater extraction procedure.....	56
3. Results and discussion.....	57
3.1. Mass spectra description	57
3.2. Optimization of chromatographic separation.....	61
3.3. Analytical performance	67
3.4. Extraction recoveries.	69
4. Conclusion.....	69

CHAPITRE II

ÉTUDE DU MÉTABOLISME *IN VITRO* ET *IN VIVO* DU TRIBUTYLÉTAIN (TBT) PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....71

1. INTRODUCTION.....	72
2. MÉTHODOLOGIE.....	74
2.1. Réactifs et solutions.....	74
Composés biochimiques:.....	74
Composés chimiques:	74
2.2 Expériences <i>in vitro</i>	75

Préparation des microsomes de foies de poissons.....	75
Incubations des microsomes et hydroxylation du TBT.....	76
2.3. Expériences <i>in vivo</i>	77
Les poissons: traitements et échantillonnage.....	77
Les moules bleues: traitements et échantillonnage.....	78
2.4. Procédures d'extraction du TBT et ses métabolites.....	79
Extraction des incubations de microsomes.....	79
Procédure d'extraction de l'eau de mer des béciers.....	80
Procédure d'extraction de la bile de poisson.....	81
Procédure d'extraction des foies de poissons et des tissus de moules	81
Hydrolyse enzymatique des extraits de foie de poissons.....	82
2.5. Analyse LC-APCI/ESI -MS.....	86
Conditions chromatographiques.....	86
Conditions d'opération du spectromètre de masse.....	88
3. RÉSULTATS.....	90
3.1. Spectres de masse des standards de TBT et du 4-OHBuDBT.....	90
En mode d'ionisation positif.....	91
En mode d'ionisation négative: spectre de masse du 4-OHBuDBT.....	93
3.2. Hydroxylation du TBT par les microsomes de foies de poissons.....	93
3.3. Métabolisme du TBT <i>in vivo</i> par les moules bleues.....	96
3.4. Métabolisme du TBT <i>in vivo</i> par les poissons.....	101
Analyse des extraits de foies de poissons.....	101
Analyse des extraits de biles de poissons.....	108
4. DISCUSSION.....	111
5. CONCLUSION.....	119

CHAPITRE III

MÉTABOLISME *IN VITRO* ET *IN VIVO* DU 4-HYDROXYBUTYL-DIBUTYLÉTAÏN (4-OHBUDBT).....

120

1. INTRODUCTION.....	121
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	122
2.1. Réactifs et solutions.....	122
2.2. Incubations des microsomes avec le 4-OHBuDBT.....	123
2.3. Expériences <i>in vivo</i>	123
Les poissons.....	123
Les moules bleues.....	123
2.4. Procédures d'extraction du 4-OHBuDBT et ses métabolites.....	124

Extraction des incubations de microsomes de foie.....	124
Extraction de l'eau de mer.....	125
Procédure d'extraction de la vésicule biliaire de poissons	125
3. RÉSULTATS.....	125
3.1. Microsomes de foie de poissons exposés au 4-OHBuDBT.....	126
3.2. Métabolisme <i>in vivo</i> du 4-OHBuDBT par les moules bleues.....	126
3.3. Métabolisme <i>in vivo</i> du 4-OHBuDBT par les poissons.....	137
Analyse des foies.....	137
Extraits de bile et de vésicule biliaire.....	140
4. DISCUSSION.....	144
5. CONCLUSION.....	150
 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	 152
1. Développement d'une méthode LC-API-MS.....	153
2. Métabolisme du TBT.....	156
3. Métabolisme du 4-OHBuDBT.....	157
4. Perspectives de recherche.....	160
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 164

LISTE DES TABLEAUX

	page
 CHAPITRE I	
Tableau 1 Optimized APCI-MS operating conditions for TBT, OHBuDBT (segment 1) and DBT (segment 2) analysis and the LC gradient program of elution.	55
Tableau 2 Mean extraction recoveries ($\pm$ S.D.) and RSD% from seawater samples before and after extraction at spiking levels 0.02, 0.2 and 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and calibration curve parameters for TBT and OHBuDBT limits of detection (LOD) and quantification (LOQ).	68
 CHAPITRE II	
Tableau 1. Gradients d'élution pour la séparation des BTs.....	87
Tableau 2. Conditions optimisées de fonctionnement de l'APCI-MS et l'ESI-MS pour l'analyse du TBT et du 4-OHBuDBT ainsi que d'autres métabolites.	89
Tableau 3. Données des concentrations du TBT en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ extrait de l'eau de mer, ayant servi à l'exposition des moules ainsi que ceux du témoin positif (contrôle sans moules, avec le TBT).	102
Tableau 4. Sommaire des données de spectres de masse des composés observés en balayage complet du MS chez les poissons, <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> , ainsi que chez les moules, <i>in vivo</i> , exposés au TBT.	110
Tableau 5. Comparaison des méthodes analytiques utilisées dans la littérature pour l'étude du métabolisme du TBT.	112
 CHAPITRE III	
Tableau 1. Données des concentrations du 4-OHBuDBT en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et d'autres composés d'étain extraits de l'eau de mer, ayant servi à l'exposition des moules et ceux du témoin positif (contrôle sans moules, avec le 4-OHBuDBT).	136
Tableau 2. Sommaire des données de spectres de masse des composés observés en balayage complet du MS chez les poissons, <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> , ainsi que chez les moules, <i>in vivo</i> , exposés au 4-OHBuDBT.	147

LISTE DES FIGURES

page

INTRODUCTION

Figure 1.	Biotransformation des xénobiotiques et balance métabolique.....	7
Figure 2.	Diagramme représentatif des réactions suggérées, impliquées..... impliquées dans le métabolisme du TBT par le système des MFO de poissons ou de crabes (tiré de Lee, 1996).	28
Figure 3.	Processus de formation des ions en mode d'ionisation positif, en ESI et en APCI. Tiré de ThermoFinnigan (2001).	41
Figure 4.	Distribution isotopique caractéristique de l'atome de l'étain Sn (IV).	45

CHAPITRE I

Figure 1.	Mass spectra showing the main ion group of OHBuDBT (A),..... TBT (B) and DBT (C, using mobile phase without tropolone and D, using tropolone in the mobile phase) acquired in the positive mode of full scan of the MS using the APCI source of the LC-MS.	58
Figure 2.	GC-MS mass spectrum (A) and APCI-MS/MS spectrum (B)..... of 4-OHBuDBT acquired in the full scan mode.	62
Figure 3.	Typical LC-APCI-MS chromatograms for (A) butyltin standard..... (2 µg mL ⁻¹) using a Discovery® Cyano column: OHBuDBT (RT= 1.71 min); TBT (RT = 1.91 min) and DBT (RT = 10.41 min); (B) analytical blank extract, and.(C) a sample of seawater spiked at 0.4 µg mL ⁻¹ of both analytes (RT= 3.31 min for OHBuDBT and RT = 3.96 min for TBT).	65

CHAPITRE II

Figure 1.	Protocole d'extraction des butylétains des foies de poissons et des tissus de moules, selon la procédure de Suzuki et al. (1992).	83
Figure 2.	Second protocole d'extraction des butylétains des tissus de moules,..... Développé au cours de ce travail.	85
Figure 3.	Chromatogrammes typiques en utilisant une colonne Kromasil..... C-18 (A) et les spectres de masse des standards (1,5 µg.mL ⁻¹) du 4-OHBuDBT (RT= 4,08 min) et du TBT (RT=11,01) acquis en mode d'ionisation positif en ESI-MS(B) et en APCI-MS(C) avec un balayage des ions entre <i>m/z</i> 240-450.	92

Figure 4.	Chromatogrammes typiques (A) du standard 4-OHBuDBT 94 (RT= 4,11 min; 1,5 µg.mL ⁻¹) élué sur une colonne Kromasil C-18 et ses spectres de masse ESI-MS (B) et APCI-MS (C), acquis en modes d'ionisation négative et de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 70-800].	
Figure 5.	Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI positive (B) 95 d'un extrait de microsomes de foie de poissons exposés à 10 µM TBT (RT= 10,71 min) en présence de NADP ⁺ et du composé OHBuDBT à RT = 3,96 min en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 240-450].	
Figure 6.	Chromatogrammes (A) d'un extrait de tissus de moules (<i>n</i> = 2) 97 exposées au TBT (RT= 11,47 min), ainsi que son métabolite de phase I, le OHBuDBT (RT= 6,78 min), élués sur une colonne Kromasil C-18, et spectres de masse APCI (B) positive en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 240-650].	
Figure 7.	Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B) 99 d'un extrait de tissus de moules (<i>n</i> = 2) exposées 96 h au TBT, et le métabolite non identifié à RT= 6,01 min, avec les ions à <i>m/z</i> 517 et <i>m/z</i> 603 en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 70-800].	
Figure 8.	Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B) 100 d'un extrait de tissus de moules (<i>n</i> = 2) exposées 15 jours au TBT, et le composé à RT= 7,15 min avec <i>m/z</i> 351, 365, 389 et 397, en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 70-800]. Noter l'absence du pic à RT= 6,01 min présent dans la figure 7 (Moules exposées 96 h).	
Figure 9.	Chromatogrammes (A) en utilisant le second gradient d'élution..... 103 sur la colonne Kromasil C-18 et les spectres de masse APCI (B) en mode d'ionisation positive des standards (1,5 µg.mL ⁻¹) du 4-OHBuDBT (RT= 4,36 min) et du TBT (RT= 9,28 min), acquis en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 240-450].	
Figure 10.	Chromatogrammes (A) obtenus sur une colonne Kromasil C-18..... 104 et spectres de masse APCI positive (B) d'un extrait de foie de poisson exposé au TBT (RT= 7,56 et 9,22 min et <i>m/z</i> 332 et 350) et le métabolite de phase I, le OHBuDBT (RT= 3,68 min et <i>m/z</i> 307), en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 240-450].	
Figure 11.	Chromatogramme LC (A) et spectre de masse APCI positive (B) 106 de l'extrait de foie de poisson exposé au TBT (RT= 9,49 min et <i>m/z</i> 332 et 350) et le métabolite de phase I, le OHBuDBT (RT= 5,82 min et <i>m/z</i> 307, 345), en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 240-800].	
Figure 12.	Chromatogrammes (A) et spectre de masse APCI négative (B) 107 de l'extrait de foie de poisson exposé au TBT. Le(s) composé(s) inconnu(s) à RT= 9,61 min avec <i>m/z</i> 371 et <i>m/z</i> 381, en mode de balayage complet du MS [<i>m/z</i> 240-800].	

- Figure 13.** Spectres de masse APCI-MS/MS des ions m/z 371 (A) et m/z 381 (B) 109
de l'extrait de foie de poisson exposé au TBT, avec une fenêtre
d'isolation de masse de 6 amu et en mode de balayage complet
du MS [m/z 100-500].

CHAPITRE III

- Figure 1.** Spectres de masse ESI positive des extraits de microsomes de 127
foie de poissons incubés pendant 3 h avec du 4-OHBDT
(m/z 307), sans cofacteur UDP-GA (A) et avec UDP-GA (B), en
mode de balayage complet du MS [m/z 240-450]. Noter la
présence de l'ion à m/z 332 caractéristique du TBT
- Figure 2.** Chromatogramme LC (A) et spectre de masse ESI positive (B) 128
d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 96 h au 4-
OHBDT (RT= 4,24 min), en mode de balayage complet du MS
[m/z 240-450]. Le pic à RT= 12,10 min correspond au TBT (m/z
332) et le pic à (RT= 4,77 min) est un composé inconnu (m/z 321).
- Figure 3.** Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI positive (B) 129
d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 15 jours au 4-
OHBDT (RT= 3,97 min), en mode de balayage complet du MS
[m/z 240-450]. Le pic à RT= 11,74 min correspond au TBT (m/z
332) et le pic à (RT= 4,49 min) est un composé inconnu (m/z 321).
- Figure 4.** Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI négative (B) 131
d'un extrait d'eau de mer ayant servi à l'exposition des moules
au 4-OHBDT, au jour 6. Le pic inconnu à RT= 1,36 et 1,82 min
(méthode avec la colonne Discovery®Cyano) correspond à m/z
321 avec l'ion adduit à m/z 435, en mode de balayage complet du
MS [m/z 240-500].
- Figure 5.** Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI négative (B) 132
d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées pendant 96 h au
4-OHBDT (RT=4,27 min; m/z 387, 397) et le pic inconnu (RT=
4,98 min; m/z 365) et les m/z 518, 673 et 683 (RT= 4,81), en mode
de balayage complet du MS [m/z 70-800].
- Figure 6.** Chromatogrammes (A) et spectre de masse ESI négative (B) 134
d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 15 jours au 4-
OHBDT (RT= 3,97 min) et les pics inconnus (RT= 4,19 min;
 m/z 365) et les m/z 518, 673 et 683, en mode de balayage complet
du MS [m/z 70-800].
- Figure 7.** Spectre de masse APCI-MS/MS négatif de l'ion m/z 365 d'un 135
extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 96 h au 4-OHBDT,
en mode de balayage complet du MS [m/z 100-400] et en
appliquant une énergie de collision de 45% (unité arbitraire) et
une fenêtre d'isolation de masse de 10 amu.

Figure 8.	Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B)138 d'un extrait de tissus de moules ($n=2$) exposées 96 h au 4-OHBuDBT révélant des pics inconnus à RT= 4,88 min (m/z 365) et RT= 18,26 (m/z 528), en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800].	138
Figure 9.	Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI positive (B) 139 d'un extrait de foie de poisson exposé au 4-OHBuDBT (RT= 3,19 et 4,20 min; m/z 307) et le métabolite non identifié (RT= 5,08 min; m/z 321), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-800].	139
Figure 10.	Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B)141 de l'extrait de foie de poisson exposé au 4-OHBuDBT (RT= 4,10 min; m/z 387 et m/z 397) et le métabolite non identifié (RT= 5,28 min et m/z 365 et m/z 263), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-800].	141
Figure 11.	Spectre de masse MS/MS en APCI négative de l'extrait de foie.....142 de poisson exposé au 4-OHBuDBT révélant les ions fragments du pic à m/z 365, en mode de balayage complet du MS [m/z 100-500] en appliquant une énergie de collision de 30% (unité arbitraire) et une fenêtre d'isolation de masse de 6 amu.	142
Figure 12.	Chromatogrammes (A) et spectre de masse APCI négative (B)..... 143 de l'extrait de bile de poisson exposé au 4-OHBuDBT révélant la présence d'un pic à RT= 3,75 min, correspondant à des ions non identifiés à m/z 518, 558, 568 et 585, en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800].	143
Figure 13.	Chromatogrammes (A) et spectre de masse APCI positive (B)..... 145 de l'extrait de vésicule biliaire de poisson exposé au 4-OHBuDBT révélant la présence d'un pic à RT= 7,92 min, correspondant à l'ion à m/z 307, en mode de balayage complet du MS [m/z 240-500].	145

LISTE ALPHABÉTIQUE DES ABRÉVIATIONS

ACN	Acétonitrile;
Amu	<i>atomic mass unit</i> ; unité de masse atomique;
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> ; ionisation chimique à pression atmosphérique;
BTs	Butylétains;
CYP450	Cytochrome P450;
Da	Dalton;
DBT	Dibutylétain;
d.i.	Diamètre interne;
EtOAc	Éthylacétate;
EtOH	Éthanol;
Et ₂ O	Éthyl éther; diéthyl éther;
ESI	<i>Electrospray ionization</i> ; ionisation par électronébulisation;
FAD	Flavine-adénine dinucléotide;
GC-MS	<i>Gas chromatography - mass spectrometry</i> ; chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse;
GSH	Glutathion;
GSTs	Glutathion-S-transférases;
HAc	Acide acétique;
HPLC/LC	Chromatographie liquide haute performance;
i.p.	intrapéritonéale;
LC-MS	<i>Liquid chromatography - mass spectrometry</i> ; chromatographie liquide - spectrométrie de masse;
LOD	Limite de détection;
LOQ	Limite de quantification;
MBT	Monobutylétain;
MeOH	Méthanol;
MFO	<i>mixed-function oxygenases</i> ; monooxygénases à fonction mixte;
MS	<i>Mass spectrometry</i> ; spectrométrie de masse;
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem;

<i>m/z</i>	<i>Mass to charge ratio</i> ; rapport de la masse/ nombre de charge;
NADP⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; forme oxydée;
NADPH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate; forme réduite;
NH₄OH	Hydroxyde d'ammonium;
OHBuDBT	Hydroxybutyl dibutylétain;
PropOH	iso-Propanol;
RT	<i>Retention time</i> ; temps de rétention;
TBT	Tributylétain;
Sn	Étain;
SULTs	Sulfotransférases;
UDP-GA	Uridine DiPhospho (UDP)- <i>glucuronic acid</i> ; acide UDP-glucuronique;
UDP-GTs	
ou UGTs	UDP-glucuronosyl et / ou glucuronyl transférases.

INTRODUCTION

L'identification de plusieurs xénobiotiques aquatiques aussi bien que l'évaluation de leur toxicité pour la vie aquatique ont été et restent encore compliquées. La raison en est que l'environnement, principalement la zone côtière, est continuellement dopé d'une multitude de substances étrangères contaminantes (comprenant des métaux, des composés organiques ainsi que des organométaux et autres composés xénobiotiques) qui sont relâchées par les communautés urbaines et les industries. Le réceptacle ultime pour beaucoup de ces composés est l'environnement aquatique suite, entre autres, aux décharges directes ou aux processus hydrologiques et atmosphériques (Stegeman et Hahn, 1994). Les conséquences des activités anthropiques apparaissent aujourd'hui très préoccupantes, principalement à cause de leurs effets néfastes sur les organismes aquatiques. Ces organismes se retrouvent donc souvent baignés dans un mélange complexe de composés toxiques auxquels ils sont exposés.

En dépit des mesures imposées par la majorité des pays développés pour réduire considérablement les rejets dans les milieux naturels, le problème posé par les pollutions et les risques associés restent particulièrement aigus et très préoccupants. Ceci est dû au fait que nombre de produits toxiques anciennement rejetés et/ou stockés au fil des années, peuvent être remobilisés et présenter un risque pour les écosystèmes aquatiques et terrestres, à tous les niveaux de l'échelle biologique (depuis la molécule jusqu'aux niveaux biologiques supérieurs tels la population, la communauté et la biocénose).

D'énormes efforts sont déployés pour élucider les mécanismes d'action des composés chimiques (drogues, polluants, carcinogènes, etc.) chez les modèles mammifères comme le rat et la souris. L'ultime objectif de ce type de recherche

comparative est de déceler, contrôler, et probablement intervenir lors d'exposition chimique et d'effets chez les humains. En toxicologie aquatique, l'intérêt premier est la santé et la sécurité des espèces aquatiques pour leur propre protection d'une part, et aussi parce qu'elles représentent des ressources pour les besoins de l'homme, d'autre part (Stegeman et Hahn, 1994).

Parmi la multitude de composés retrouvés dans l'environnement, les butylétains et particulièrement le tributylétain (TBT), auxquels notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années, constituent des composés d'un grand intérêt écotoxicologique. Ces composés sont visés par les législations environnementales sur la base de leur toxicité, leur persistance et leurs propriétés de bioaccumulation dans les écosystèmes aquatiques. Les effets néfastes du TBT sur les organismes aquatiques sont reconnus et prouvés depuis maintenant plus d'une vingtaine d'années. Son préjudice "non intentionnel" envers les espèces sensibles non ciblées a été découvert au début des années 1980 (de Mora, 1996).

La biotransformation (transformation chimique d'un composé par un organisme) est un mécanisme crucial que les organismes ont adapté pour survivre dans des environnements pollués de manière chronique (Stegeman, 2000). Le métabolisme est un exemple de biotransformation. Ce processus, catalysé par des enzymes de métabolisation, joue un rôle central dans l'élimination et l'excrétion des xénobiotiques, mais aussi sur les effets et la réactivité biologique ou la toxicité de certains composés (Stegeman, 2000). Comprendre le rôle que jouent ces enzymes dans le métabolisme des xénobiotiques peut révéler largement de quelle manière ces composés chimiques causent leurs effets toxiques.

La transformation métabolique est donc un facteur important qui peut influencer les processus de bioaccumulation, de biodisponibilité, de transfert et de biomagnification d'un contaminant donné ainsi que son temps de résidence. Après sa

bioaccumulation et son absorption, un contaminant peut provoquer de nombreuses atteintes structurales et fonctionnelles, les actions cytotoxiques sont fortement dépendantes de sa forme ou sa structure chimique et donc de sa spéciation. De plus, le processus de biotransformation de ces structures chimiques est capable d'altérer leur activité biologique et donc, l'interaction des composés chimiques (xénobiotiques) avec la cellule.

L'importance de l'identification et de la quantification des espèces chimiques d'un même composé présent dans les échantillons biologiques et environnementaux est bien reconnue. L'une des raisons est que différentes espèces chimiques d'un même élément peuvent avoir des propriétés toxicologiques différentes, car ces dernières sont influencées par la forme chimique. Mais encore, la connaissance des voies métaboliques et de la spéciation d'un composé sont importantes, du moment que les deux aspects influencent d'une manière importante non seulement les propriétés toxicologiques, mais aussi le sort d'un contaminant dans l'écosystème aquatique. De ce fait, nous nous sommes proposés d'apporter une contribution à la compréhension de la biotransformation du TBT. Plus en détail, nous nous proposons d'approfondir les connaissances sur le métabolisme et les voies enzymatiques majeures impliquées dans sa transformation et l'élimination de ses produits de transformation polaires (métabolites conjugués), chez quelques organismes aquatiques et plus particulièrement chez les poissons.

Au cours des récentes années, le développement de méthodes analytiques sensibles telle que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) pour les études biomédicales et pharmaceutiques, a permis d'approfondir les connaissances des enzymes métaboliques et les études de caractérisation métabolique des drogues et médicaments. Ce système analytique a attiré les chercheurs en

environnement qui empruntent de plus en plus les méthodes analytiques et de biologie cellulaire utilisées en sciences biomédicales pour les recherches en toxicologie aquatique. Pour notre étude, nous avons utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MSⁿ) pour la caractérisation des molécules conjuguées au TBT et ses produits de dégradation, puisque cette technique permet de détecter un large éventail de différents composés avec différents groupes fonctionnels.

Dans les sections qui suivent nous exposons l'état des connaissances dans le domaine du métabolisme et la dégradation du TBT, sa toxicité et les méthodes de son analyse. Les objectifs du projet sont identifiés ainsi que les approches expérimentales utilisées pour les atteindre. Les réactions de biotransformation et le système d'enzymes impliquées sont passées en revue, ainsi que l'action du TBT sur ces dernières.

1.1 Biotransformation des contaminants

Le terme biotransformation désigne les diverses modifications chimiques que subissent des composés dans l'organisme pour donner naissance à des métabolites. Comme il a déjà été mentionné, la biodisponibilité et le devenir d'un xénobiotique sont hautement dépendants de sa biotransformation (transformation métabolique) (James et Kleinow, 1994) qui est connue comme la détoxification métabolique, un processus responsable de débarrasser le corps des xénobiotiques toxiques (Li, 1997). D'une manière générale, les biotransformations sont des réactions de défense de l'organisme qui conduisent à des molécules moins toxiques et moins actives que la molécule initiale.

Les organismes aquatiques ont développé des stratégies pour l'élimination et la détoxification des contaminants accumulés dans leurs tissus. Il existe deux voies majeures d'élimination d'un composé chimique par un organisme: soit l'excrétion sous

sa forme originale (le composé parent), ou alors la biotransformation. Une machinerie métabolique, catalysant ce processus important de biotransformation, est formée d'un grand nombre de différentes enzymes qui agissent sur des substrats de nature variée (Stegeman et Hahn, 1994). La conséquence majeure de cette transformation est la conversion des composés lipophiles et hydrophobes en métabolites plus polaires, solubles dans l'eau (hydrophiles) et excrétables. Ces métabolites peuvent être plus facilement excrétés du foie, par exemple, directement dans la bile. Sinon, ils sont libérés dans le sang et ensuite éliminés dans l'urine *via* le rein ou dans les fèces *via* l'intestin.

Sur le plan toxicologique, chaque métabolite doit être considéré comme une nouvelle molécule qui a ses propres caractéristiques toxicocinétiques (demi-vie, distribution, élimination, etc.), souvent indépendantes et différentes de celles du composé parent.

Tous les organismes possèdent une batterie d'enzymes de biotransformation exprimées dans le foie ainsi que dans de nombreux tissus périphériques. Généralement, ces enzymes sont présentes à des niveaux plus élevés dans le foie chez les vertébrés, ou dans les tissus associés au processus d'alimentation pour les invertébrés (Livingstone, 1998).

1.1.1 Les réactions métaboliques

La métabolisation est un processus par lequel les composés subissent diverses séries de réactions, avec plusieurs enzymes participant à des étapes séquentielles d'oxydation-conjugaison menant à l'activation, la détoxification et ultimement à l'excrétion du xénobiotique. En 1959, Williams a proposé une systématique des voies métaboliques d'un xénobiotique ou d'un composé chimique. C'est le concept de métabolisation biphasique consistant en des réactions de Phase I de fonctionnalisation

(oxydation, réduction et hydrolyse) et des réactions de Phase II synthétiques (conjugaison et détoxication), permettant de distinguer les étapes dans ce processus séquentiel du métabolisme.

Le métabolisme et la biotransformation des xénobiotiques principalement chez les poissons mais aussi chez les invertébrés, ainsi que les enzymes impliquées ont fait l'objet de plusieurs revues (Buhler et Williams, 1989; Foureman, 1989; Clarke et al., 1991; Goksøyr et Förlin, 1992; George, 1994; Hansen et Shane, 1994; Stegeman et Hahn, 1994; Livingstone, 1998; Schlenk, 1998; van der Oost et al., 2003). La figure 1 résume les réactions de biotransformation et les conséquences majeures sur l'organisme.

1.1.1.1 Métabolisme de phase I

La première phase (phase I) implique des réactions non synthétiques, d'oxydation et de fonctionnalisation des xénobiotiques, assurées par des enzymes qui sont majoritairement des monooxygénases à fonction mixte (MFO). Ces dernières sont des enzymes microsomales, associées au réticulum endoplasmique de la cellule. Le système des MFO a des composantes multiples constituées de phospholipides, cytochrome P450, et NADPH cytochrome P450 réductase, cytochrome b₅, etc. Les cytochromes P450 jouent un rôle important dans le métabolisme oxydatif des composés endogènes et exogènes.

Les enzymes de cette phase sont surtout présentes dans le foie mais aussi dans d'autres tissus, tels que les intestins. Parmi les autres enzymes, on retrouve le système des monooxygénases à flavines (FMO), l'époxyde hydrolase et les réductases à flavoprotéines (comme le cytochrome P450 réductase).

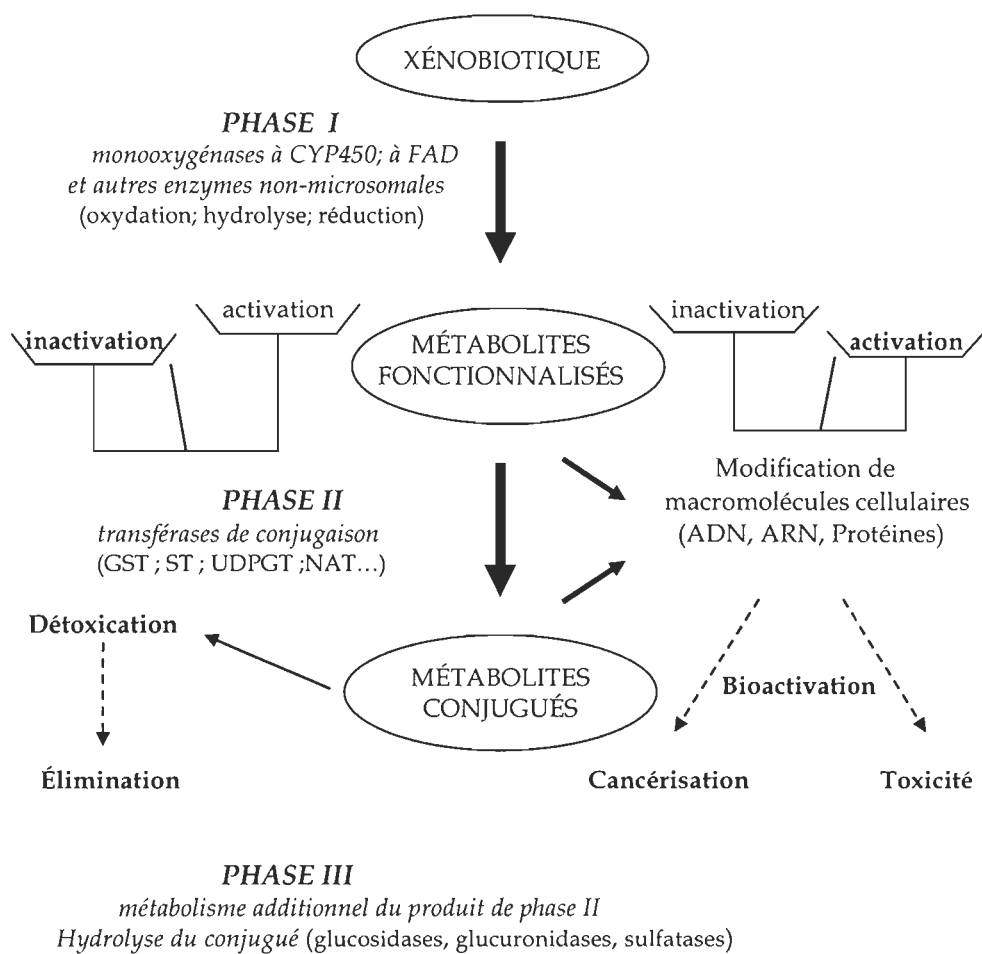


Figure 1. Biotransformation des xénobiotiques et balance métabolique.

Durant cette phase, des réactions d'hydroxylation, d'oxydation, de déalkylation, de réduction et d'hydrolyse, entre autres, introduisent (ou modifient) un groupe fonctionnel (-OH, -COOH, -NO₂, etc.) au xénobiotique.

Le résultat des différentes réactions de fonctionnalisation est de créer un métabolite intermédiaire, sur lequel pourra s'exercer une seconde transformation, celle de phase II.

1.1.1.2 Métabolisme de phase II

Les réactions de phase II sont des réactions synthétiques qui catalysent la conjugaison des molécules fonctionnalisées à des substrats endogènes pour les rendre plus polaires. Les enzymes de conjugaison sont généralement cytosoliques et sont exprimées dans le foie ainsi que dans de nombreux tissus. La phase II comporte des réactions de conjugaison, par exemple, à l'acide glucuronique (glucuronoconjugaison catalysée par des UDP-glucuronyltransférases, UDPGTs), au sulfate (sulfoconjugaison catalysée par des sulfotransférases), avec des acides aminés (catalysée par des *N*-acyltransférases), au glutathion (mercaptoconjugaison catalysée par des glutathion *S*-transférases, GSTs), etc.

1.1.2 Complexité du métabolisme et enzymes isofonctionnelles

Le métabolisme des xénobiotiques est assez complexe. Même s'il est souvent acquis que ce métabolisme est réalisé par l'intermédiaire d'une seule réaction de phase I et/ou de phase II, en réalité un xénobiotique peut être métabolisé simultanément par plusieurs enzymes cytochrome P450 et aussi par des enzymes non microsomales. Chaque produit peut être encore métabolisé par le cytochrome P450 ou d'autre

enzymes. La nomenclature en phases I et II n'implique pas que ces réactions s'enchaînent toujours selon cet ordre: certaines réactions de phase I peuvent suivre celles de phase II, et ces dernières peuvent être absentes. Par ailleurs, les produits formés après chacune de ces étapes peuvent être rendus plus hydrophiles par voie d'enzymes de phase II (George, 1994; Hansen et Shane, 1994).

Chez les poissons, comme chez les mammifères, la plupart des enzymes importantes dans la biotransformation des xénobiotiques, incluant le cytochrome P450 (Miranda et al., 1991; Nebert et al., 1991; Buhler et Wang-Buhler, 1998), l'UDP-glucuronosyl transférase (Burchell et al., 1998; Clarke et al., 1992; George, 1994; George et Taylor, 2002), la sulfotransférase (Coughtrie et al., 1998; Sugahara et al., 2003) et la glutathion S-transférase (Fouremant et al., 1987; Mannervik et Danielson, 1988; George et Buchanan, 1990; Hayes et Pulford, 1995; Trute et al., 2007), présentent de multiples formes nommées isoformes avec différentes inductibilités et une sélectivité de substrats. Les isoenzymes sont des protéines très apparentées sur le plan structural, synthétisées par un même organisme et catalysant le même type de réaction. Elles sont aussi appelées des isoformes, ou encore enzymes isofonctionnelles et interagissent de façon différentielle avec n'importe quelle quantité de composés. Certaines formes sont constitutives et d'autres inductibles par certains substrats (fabriquées en réponse à l'exposition à un substrat donné). Leur répartition relative change généralement d'un tissu à l'autre. La nature des isoenzymes présentes dans différents tissus est alors un facteur important qui détermine la probabilité qu'un xénobiotique soit biotransformé dans le tissu en question (James et Kleinow, 1994). Les différentes isoenzymes se distinguent notamment par leurs coefficients cinétiques, leur spécificité et parfois par leur stabilité ou leur sensibilité à certains inhibiteurs.

Les mollusques bivalves possèdent également des systèmes d'enzymes de phases I et II, similaires à ceux des poissons et des mammifères (Livingstone, 1991, 1998;

Simpson et al., 2002). La présence, l'expression ou l'activité de plusieurs gènes de familles de CYP450 ont été rapportées soit dans les tissus de l'animal entier, soit dans la glande digestive ou d'autres organes des moules *Mytilus edulis* (Wootton et al., 1995; Porte et al. 1995) et *M. galloprovincialis* (Wootton et al., 1995). L'activité des SULTs est également présente chez l'huître *Crassostrea gigas* (Shofer et Tjeerdema., 1993), la moule *Mytilus galloprovincialis* (Michel et al., 1995), ainsi que les bivalves *Mya arenaria* et *Protothaca staminea* (Simpson et al., 2002). La présence des GSTs a été démontré chez les bivalves *Mytilus galloprovincialis* (Fitzpatrick et al., 1995), *Corbicula fluminea* (Vidal et Narbonne, 2000), *Mytilus edulis* (Gowland et al., 2002) et *Pecten maximus* (Le Pennec et Le Pennec, 2003), ainsi que celle des UGTs chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Michel et al., 1995).

1.1.3 Toxicité due au processus de métabolisation

Généralement, la métabolisation d'un contaminant réduit sa persistance, accroît son élimination et réduit sa toxicité. Cependant, il est maintenant bien reconnu que le métabolisme de certains composés, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, peut activer le composé chimique résultant en des produits métaboliques qui sont plus toxiques que le composé parent. L'activation métabolique est à la base de nombreuses toxicités induites par les composés chimiques telles que la cytotoxicité, la cancérogenèse et la tératogénie (Stegeman et Hahn, 1994; Li, 1997).

Bien que les réactions d'oxydation jouent un rôle important dans l'activation, les réactions de conjugaison telle que la sulfatation, par exemple, peuvent aussi participer directement à la bioactivation (Hansen et Shane, 1994; Stegeman et Hahn, 1994; Glatt, 2000). D'un autre côté et toujours dans ce contexte, si la capacité des enzymes de phase II (e.g. GSTs et les UDPGTs décrites en 1.1.1.2.) est insuffisante pour conjuguer les produits réactifs et toxiques de la phase I, les métabolites électrophiles peuvent se lier

aux centres nucléophiles des macromolécules cellulaires (ADN, ARN, protéines) impliquant un endommagement membranaire, une toxicité cellulaire, des mutations ou encore une forme quelconque de cancérogenèse (van der Oost et al., 2003).

Finalement, la toxicité résultante de n'importe quel xénobiotique est reliée, entre autre, à la balance entre les réactions de bioactivation et de détoxification. Autrement dit, elle dépend de la balance entre la formation des composés toxiques et ceux non toxiques (Vermeulen, 1996) et de leur degré d'élimination par l'organisme exposé.

1.1.4 Quelques considérations métaboliques entre organismes aquatiques

Les trente dernières années ont servi à la caractérisation du métabolisme des xénobiotiques chez les organismes aquatiques, tels que les poissons. La présence de la plupart des enzymes responsables de la biotransformation chez les mammifères ont aussi été identifiées chez les poissons et certains invertébrés marins, incluant les cytochromes P450 monooxygénases ou le système d'oxygénases à fonction mixte (MFO), le système des monooxygénases à flavines (FMO), les déshydrogénases, les époxyde hydrolases et les réductases à flavoprotéines (comme le cytochrome P450 réductase) de phase I; et les glutathione S-transférases (GSTs), l'UDP-glucuronyltransférases et l'UDP-glucosyltransférases (UDP-GTs), les sulphotransférases (SulTs), et les conjugases aux acides aminés telles les N-acétyltransférases (NATs) de phase II (Livingstone, 1991; George, 1994; Stegeman et Hahn, 1994; Wootton et al., 1995; Schlenk et al., 1996; Vidal et Narbonne, 2000; George et Taylor, 2002; Simpson et al., 2002; Giessing et al., 2003; Rewitz et al., 2003; Shofer et Tjeerdema, 1993; Sugahara et al., 2003; Trute et al., 2007; Yamagushi et al., 2007).

Plusieurs études rapportent que la majorité des réactions observées chez les mammifères ont aussi lieu chez les poissons, avec quelques différences: 1) les activités des réactions de phase I et de phase II sont généralement plus faibles,

2) l'absence d'induction des activités MFO par les composés du type phénobarbital, et
3) les optima de température pour l'activité enzymatique sont plus faibles chez la plupart des espèces de poissons examinés, en comparaison à 37°C chez les mammifères (e.g. Kennedy, 1994).

Seulement très peu d'études des réactions de conjugaison chez les poissons et les invertébrés aquatiques sont disponibles. Toutefois, quelques auteurs ont démontré que des tissus ou des fractions de tissus de poissons ont la capacité de conjuguer des composés modérément lipophiles à l'acide glucuronique, au sulfate, au glutathion et aux acides aminés (Chambers et Yarbrough, 1976; Balk et al., 1980; Gregus et al., 1983). Selon les études actuellement disponibles, la glucuronidation semble être une voie majeure de conjugaison aussi bien pour des xénobiotiques que pour des stéroïdes chez les poissons (Truscott, 1983; Morrison et al., 1985; Clarke et al., 1991; Leaver et al., 1992; George, 1994; van den Hurk et James, 2000). Certains invertébrés étudiés tels que les annélides (Giessing et al., 2003) présentent aussi cette caractéristique.

Chez les invertébrés, les enzymes de phase I tels que les cytochromes P450 ont été trouvées et signalées chez les annélides, les crustacés, les échinodermes et les mollusques (den Besten, 1998; Brown et al., 1998; Lee, 1998; James et Boyle, 1998; Rewitz et al., 2003). Concernant le métabolisme de phase II chez les invertébrés marins, la conjugaison au glucose (glucosidation) et au sulfate prédominent en comparaison à la conjugaison avec l'acide glucuronique (glucuronidation) (Livingstone, 1998). Toutefois, comme pour les mammifères et les poissons, de grandes différences spécifiques dans le métabolisme de phase II sont observées chez les invertébrés (Shofer et Tjeerdema, 1993; Giessing et Lund, 2002).

Une autre considération à prendre en compte concerne la sulfatation et la glucuronidation. Certaines études réalisées chez l'homme et le rat, *in vivo* ou *in vitro* (Koster et al., 1981; Fry, 1987) ont démontré que la balance sulfatation/glucuronidation

est dépendante de la dose du substrat testé. La conjugaison au sulfate est la voie prédominante à faibles doses, alors qu'à des concentrations plus élevées, la glucuronidation prédomine. Les auteurs suggèrent que le changement dans cette balance est largement relié aux différentes caractéristiques cinétiques (e.g. affinité, capacité) de ces transférases. D'une part, ceci impliquerait que si l'une des deux voies était saturée, l'autre voie prendrait la relève (Fry, 1987). D'une autre part, le substrat non complètement conjugué pourrait être disponible pour une hydroxylation ou oxydation secondaire par le cytochrome P450 et peut-être générer un métabolite encore plus réactif que le composé parent (e.g. cas du BaP-7,8-dihydrodiol et du BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (van den Hurk et James, 2000).

1.2 Problématique environnementale du tributylétain (TBT) et toxicité

La contamination des écosystèmes aquatiques par les organoétains butylés (butylétains), principalement le tri-*n*-butylétain (TBT), constitue encore une préoccupation mondiale. Les organoétains sont des composés organométalliques dont la majorité sont de fabrication humaine, à l'exception des méthylétains qui peuvent être produits dans des conditions naturelles (Guard et al., 1981). Les organoétains sont remarquablement variés dans leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques et de ce fait, l'étain possède un plus grand nombre de dérivés organométalliques utilisés en industrie, par rapport à d'autres éléments chimiques (Hoch, 2001). Ils ont attiré l'attention vu leur toxicité et leur utilisation élevée dans le passé pour de multiples applications industrielles, comme stabilisateurs de plastiques, catalyseurs, biocides en industrie agricole, fongicides/bactéricides entre autres pour les textiles, préservatifs pour bois et agents des peintures antisalissures (Snoeijs et al., 1987; Fent, 1996; Hoch, 2001). Par ailleurs, certains composés organoétains sont étudiés pour leurs activités antitumorales (e.g. Gielen et al., 2005). Parmi les composés organométalliques, le TBT a

été largement utilisé comme biocide dans les revêtements antisalissures pour bateaux et engins de pêche. Ces peintures sont encore utilisées pour les bateaux de plus de 25 m, même s'il est bien reconnu que le TBT est d'une grande toxicité envers plusieurs organismes aquatiques. On estimait à la fin des années 1990 que 70% des bateaux du commerce mondial utilisaient du TBT dans leurs peintures antisalissures (Jacobson et Willingham, 2000). Malgré les législations en place et les efforts déployés pour trouver une alternative et la prohibition de l'utilisation des peintures antisalissures, ces dernières semblent constituer encore la voie principale d'introduction directe du TBT dans les environnements aquatiques (Champ, 2000). L'utilisation massive des organoétains a mené à leur dispersion progressive directement dans le milieu aquatique surtout marin, en zones estuariennes et côtières peu profondes, à proximité des lieux où les activités navales sont élevées et les échanges d'eau restreints, tels que les chantiers navals, les cales sèches et les ports marins (de Mora, 1996; Prasad et Schafran, 2006; Hua et Liu, 2008). Une étude récente de Hua et Liu (2008) a démontré que les eaux de ballast des navires marchands, étudiées dans l'est de l'Asie, contenaient des niveaux élevés d'organoétains. Ces eaux de ballast contribueraient à la dispersion du TBT vers d'autres régions, loin des lieux contaminés où elles ont été pompées.

En raison de sa grande toxicité, le TBT est un composé important du point de vue environnemental. Même à de très faibles concentrations, inférieures à 10 ng Sn.L⁻¹, il représente une menace pour les écosystèmes aquatiques. Il cause des effets délétères ou létaux à une grande variété d'organismes, aussi bien durant leur stade larvaire que pendant leur vie adulte (Fent, 1996). Il a été retrouvé à des niveaux toxiques dans les environnements aquatiques (butylétains totaux à 206 ng Sn.L⁻¹ dans l'eau de mer en surface) et sédimentaires (butylétains totaux à 288 ng Sn.g⁻¹ jusqu'à 410 ng Sn.g⁻¹ poids sec) dans plusieurs zones étudiées, dont l'est du Canada (Maguire, 1992; Pelletier et Normandeau, 1997; Saint-Louis et al., 1997; Prouse et Ellis, 1997; Viglino et al., 2004).

1.2.1 Description et accumulation

Le tributylétain (TBT) est un organométal comprenant trois chaînes de *n*-butyle attachées à un seul atome d'étain (IV) (d'où le tri-*n*-butylétain) par des liaisons covalentes Sn-C et fait partie de la famille des butylétains (BTs). De formule chimique $(C_4H_9)_3Sn^+$, le TBT est un cation polaire hydrophobe, avec un coefficient de partage octanol-eau $\log K_{ow} = 3,7-3,8$ (Laughlin et al., 1996). Les trois groupements butyles lui donnent un caractère organique (Laughlin et al., 1987) lui permettant de s'associer à des phases organiques, d'où son caractère lipophile. L'atome d'étain lui confère son caractère ionique, ce qui lui permet de faire des liaisons ioniques avec des ions dissous tels que le chlorure Cl^- , l'hydroxyde OH^- et les carbonates CO_3^{2-} (Laughlin et al., 1986) ou de s'adsorber fortement aux particules vivantes, détritiques ou minérales en suspension dans la colonne d'eau (Blair et al., 1988; Unger et al., 1988; Hermosin et al., 1993; Saint-Louis, 1994).

Pour élucider les mécanismes de toxicité due au TBT, spécifiquement l'oxyde de TBT (TBT_2O) et les composés organoétains associés, le chlorure de dibutylétain ($DBTCl_2$) et le chlorure de TBT ($TBTCl$) ont été largement étudiés depuis 1955. En général, il est convenu que les anions attachés à la molécule d'étain sont de moindre importance lors des interactions cellulaires (Benya, 1997). Ceci est dû au fait que lorsque l'oxyde de TBT est absorbé, ses produits de dégradation seraient sous forme de cations di-*n*-butylétain⁺⁺ et tri-*n*-butylétain⁺ (respectivement DBT et TBT), de sels (chlorure, carbonate, acétate, sulfate), ou alors lié aux protéines par les groupements sulfhydryle ou histidine (Penninks et al., 1990).

La grande affinité du TBT (adsorption) pour la matière particulaire suivie par la sédimentation qui est un mécanisme rapide et très important de retrait du TBT de la colonne d'eau, implique une voie d'entrée directe dans les sédiments, d'où sa persistance dans l'environnement (Langston et Pope, 1995). Les sédiments constituent alors un réservoir de TBT et retardent le rétablissement des écosystèmes car la dégradation des butylétains y est lente. À titre indicatif, des temps de demi-vie allant de quelques mois à plusieurs années, voire des décennies, ont été estimés pour les sédiments oxygènes des environnements marins relativement froids (Hwang et al., 1999). Ils deviennent de ce fait le principal vecteur de bioaccumulation et de remobilisation du TBT, ainsi que de son relargage vers la colonne d'eau et de ses effets toxiques pour les organismes (de Mora, 1996).

Le coefficient de partage K_{ow} du TBT étant élevé, il favorise l'accumulation de celui-ci dans les tissus des organismes (Laughlin, 1996) à des concentrations plus ou moins élevées, dépendamment de l'espèce et de sa capacité de métabolisation et d'élimination du TBT. Des auteurs ont trouvé le TBT dans les tissus de plusieurs espèces aquatiques de différents taxons de la chaîne trophique (Fent, 1996), allant des bactéries (Laughlin et al., 1987) aux mammifères (Saint-Louis et al., 2000), en passant par les mollusques (e.g. Laughlin et al., 1986), le groupe le plus sensible, les échinodermes (Pelletier et Normandeau, 1997), les crustacés et les poissons (Lee, 1996; Harino et al., 2000). Les résidus de BTs retrouvés chez les prédateurs supérieurs des écosystèmes aquatiques impliquent le transfert de ces composés le long de la chaîne trophique, de façon similaire à d'autres polluants anthropogéniques (Iwata et al., 1994). Dans le même contexte, l'homme se retrouve exposé aux BTs par le jeu des chaînes alimentaires et par transfert, suite à la consommation des produits de la mer (e.g. Kannan et Falandis, 1997; Nielsen et Strand, 2002).

1.2.2 Toxicité

Les études faites sur le terrain ou en laboratoire ont rapporté que des niveaux environnementaux de TBT très faibles peuvent exercer des effets létaux et sublétaux sur des espèces écologiquement et économiquement importantes. La toxicité du TBT varie selon les organismes, la spéciation du TBT, le stade de développement et la capacité de métabolisation de ces organismes. Elle se fait aussi sentir à tous les niveaux de l'organisation biologique (molécule, cellule, organe, etc.) (Fent, 1996). Une très bonne revue de la toxicologie de l'oxyde de TBT et de ses métabolites majeurs, aussi bien chez les humains que les organismes aquatiques et terrestres, a été réalisée par Benya (1997).

Une des réponses morphologiques les plus notoires à l'action toxique du TBT est le syndrome d'imposex chez des mollusques gastéropodes comme le bigorneau *Nucella lapillus*. Cela se traduit par l'imposition de caractères morphologiques mâles incluant un pénis et un canal déférent chez les femelles (Langston et al., 1990). Ce syndrome révèle le rôle du TBT en tant que perturbateur endocrinien. C'est un contaminant androgénique qui a conduit à l'infertilité et ultimement à la mortalité des femelles gastéropodes avec le déclin des populations locales des côtes anglaises, dans les années 1980 (Bryan et al., 1986; Langston et al., 1990). L'imposex est encore reconnu comme un phénomène répandu chez les gastéropodes avec un plus grand nombre d'espèces affectées (Omae, 2003). Des concentrations de TBT en solution dans l'eau de mer aussi faibles que 1 à 10 ng Sn.L⁻¹ initient et causent l'imposex chez *Nucella lapillus* (Bryan et al., 1986; Gibbs et al., 1988; Langston et al., 1990). Des niveaux similaires ont causé des anomalies de calcification des coquilles d'huîtres du Pacifique *Crassostrea gigas*, qui à l'origine ont été introduites dans les eaux européennes pour y être cultivées. En effet, les graves

perturbations dans la production ostréicole française ont été l'un des premiers signes de la grande toxicité du TBT sur le terrain (Alzieu et al., 1980; Thain et Waldock, 1985).

L'exposition d'animaux expérimentaux aux organoétains a révélé divers effets toxiques aigus et chroniques, sur divers systèmes incluant les systèmes endocrinien, immunitaire, neurologique, métabolique, enzymatique, gastro-intestinal, etc. Le TBT cause ainsi des malformations et inhibe la croissance chez les mollusques, les crustacés et les poissons (Fent, 1996; Matthiessen et Gibbs, 1998). Il exerce sa toxicité à travers un large éventail de paramètres cellulaires, mais principalement en causant des dommages au niveau des membranes biologiques et en interférant avec celles-ci, e. g. en altérant l'organisation physique de la bicouche phospholipidique (Porvaznik et al., 1986; Gray et al., 1987; Snoeij et al., 1987; Chicano et al., 2001; Ortiz et al., 2005; Falcioni et al., 2008; Zhang et al., 2008). Le TBT ainsi que les organoétains possèdent une grande capacité à traverser la bicouche lipidique (e.g. différentes membranes phospholipidiques et erythrocytes humains, Ortiz et al., 2005).

Le TBT est un puissant immunomodulateur. Il inhibe entre autres la fonction des cellules immunitaires telle que la phagocytose chez différentes espèces (Elferink et al., 1986; Cima et al., 1998; Bouchard et al., 1999; Cima et Ballarin, 2000; St-Jean et al., 2002; Frouin et al., 2008). Des niveaux de TBT inférieurs à 10 ng Sn.L⁻¹ altèrent les paramètres immunitaires des haemocytos de la moule bleue *Mytilus edulis* (St-Jean et al., 2002). Il inhibe significativement, parfois de façon permanente, l'activité des cellules tueuses naturelles NK des leucocytes de souris (Ghoneum et al., 1990) et des lymphocytes humains (Whalen et al., 2002), apparemment en inhibant et réduisant leur capacité de liaison et de lyse envers les cellules tumorales (Whalen et al., 2002; Frouin et al., 2008). D'après Whalen et al. (2002), le TBT se lie fortement aux protéines des cellules NK et les altère, ces protéines étant importantes dans la régulation de la fonction de tuer les cellules cibles. Aluoch et al. (2006) ont montré que l'un des mécanismes impliqué est

l'altération d'une voie intracellulaire de signalisation des cellules NK humaines. Une protéine kinase *mitogen-activated PK* (protéine kinase activée par les facteurs mitogènes ou par un signal extracellulaire) est activée, ce qui rend les cellules NK incapables de répondre aux cellules cibles. Par ailleurs, il induit efficacement l'apoptose provoquant la fragmentation de l'ADN, dans différents types de cellules et chez divers organismes (Batel et al., 1993; Raffray et al., 1993; Zucker et al., 1994; Bentivegna et Piatkowski, 1998; Reader et al., 1999; Micic et al., 2001; Grondin et al., 2007; Zhang et al., 2008). C'est un composé génotoxique causant des dommages à l'ADN, e.g. fragmentation des brins et oxydation des bases, chez différents groupes d'animaux, tels que la moule *Mytilus galloprovincialis* (Micic et al., 2001), le vers *Platynereis du merilii* (Hagger et al., 2002), le poisson tropical d'eau douce *Astyanax bimaculatus* (Oliveira Ribeiro et al., 2002), le rat Sprague-Dawley (Liu et al., 2006) et le rat Wistar (Falcioni et al., 2008). Il perturbe la mitose des cellules V79 du hamster (Jensen et al., 1991). Il bloque le clivage des œufs d'oursins *Paracentrotus lividus* et inhibe aussi la synthèse des protéines et d'ADN dans ces derniers, ce qui bloque le cycle cellulaire (Girard et al., 1997). Par ailleurs, il est considéré comme un composé tératogène pour les rats Wistar (Ema et al., 1995) et il provoque des échecs de gestation chez ces rats (Harazano et al., 1996). Il est potentiellement mutagène tel que démontré par les tests de micronucleus et les aberrations chromosomiques chez le poisson néotropical *Hoplias malabaricus* (Ferraro et al., 2004).

Plusieurs effets du TBT ont été décrits chez diverses espèces de poissons. Il cause des altérations morphologiques, telles que des déformations vertébrales avec paralysie, des irritations de la peau, l'hyperplasie tissulaire et l'atrophie du thymus, ainsi que des lésions histologiques dans différents organes (foie, rein, yeux, branchies, cerveau) (Vos et al., 1990; Wester et al., 1990; Schwaiger et al., 1992; Bentivegna et Piatkowski, 1998; Grinwis et al., 1998; Oliveira Ribeiro et al., 2007; Zhang et al., 2008). Des effets

tératogènes comme une baisse du taux de survie à l'éclosion, des retards de croissance, une baisse du taux d'hémoglobine, mais aussi des changements de comportement ont été rapportés chez le saumon *Salmo gairdneri* et le Tilapia *Tilapia rendalli* (Chliamovitch et Kuhn, 1977), chez les poissons Medaka *Oryzias latipes* et Guppy *Poecelia reticulata* (Wester et al., 1990) et chez la carpe *Cyprinus carpio* (Schmidt et al., 2005). De plus, son effet masculinisateur a été démontré chez le poisson zèbre *Danio rerio*, lorsqu'il y a exposition au TBT, à des concentrations environnementales (100 ng.L⁻¹) lors des premiers stades de vie (McAllister et Kime, 2003).

1.2.3 Mécanismes — Interaction avec certaines enzymes clefs du métabolisme

Un grand nombre d'études écotoxicologiques marines ont été consacrées au TBT depuis les années 1980, suite à la découverte de ses effets néfastes. Malgré les nombreux efforts et les effets observés chez plusieurs organismes, ses mécanismes d'action demeurent largement méconnus.

Une des bases de l'action toxique d'un contaminant, avant même que ses effets ne se manifestent aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique, se situe au niveau des molécules et des cellules. La cytotoxicité est le premier signe qui prend effet suite à la liaison du contaminant aux récepteurs cellulaires ou après que la membrane plasmique ait été affectée (Fent, 1996). Plusieurs composés toxiques, plus précisément les polluants lipophiles ou leurs métabolites, tendent à interagir avec les membranes biologiques. Les conséquences possibles de cette interaction incluent la lyse engendrant la mort cellulaire, ou une modification des propriétés membranaires menant à un changement dans la fonction de la cellule (e.g. changement dans la perméabilité cellulaire ou des propriétés de transport d'ions, dysfonctionnement ou labilité des lysosomes, inhibition des systèmes d'enzymes membranaires, etc.) ou la division cellulaire (e.g. possibilité de retrouver des cellules néoplasiques) (Giam et al., 1987).

Les informations existantes sur les mécanismes d'action du TBT au niveau moléculaire et cellulaire sont limitées. Les principaux mécanismes proposés sont la liaison aux macromolécules telles que les protéines, e.g. la calmoduline chez les ascidies *Botryllus schlosseri* (Cima et Ballarin, 2000), et le blocage et l'inactivation des sites enzymatiques membranaires (e.g. Fent, 1996).

Un des effets prédominants du TBT est la perturbation de l'homéostasie du calcium cellulaire et d'autres éléments chimiques essentiels, dans différents types cellulaires. Il semble qu'il possède la capacité d'altérer les transferts membranaires en facilitant les échanges ioniques dans les membranes cellulaires et mitochondriales, même à de très faibles concentrations dans les erythrocytes humains (Gray et al., 1987). Il peut se lier et inactiver les enzymes membranaires, spécifiquement les ATPases pompes à protons Ca^{2+} , Na^{+} et K^{+} des mitochondries et autres membranes, et de ce fait découpler la synthèse d'ATP de la prise d'oxygène e.g. chez le rat (Snoeij et al., 1987), chez la moule bleue *Mytilus edulis* (Widdows et Page, 1993) et chez le poisson *Sebasticus marmoratus* (Zhang et al., 2008). Par conséquent, il inhibe la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP, en se liant aux sous-unités hydrophobes du complexe ATP-synthétase des membranes mitochondriales de rats (Aldridge, 1976), ce qui altère l'énergie métabolique cellulaire. Il inhibe également la respiration des mitochondries hépatiques de souris (Ueno et al., 2003b). Par ailleurs, l'altération de l'homéostasie calcique perturbe les composantes cytosquelettiques, telles que l'activité des ATPases de calcium et la calmoduline dépendante de la Ca^{2+} -ATPase, chez les ascidies *Botryllus schlosseri* (Cima et al., 1998; Cima et Ballarin, 2000). En ce qui a trait au cycle cellulaire, l'inhibition de la pompe de transport Ca^{2+} -ATPase localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique, induit la baisse de ce cation dans les compartiments intracellulaires, chez l'oursin *Paracentrotus lividus* (Girard et al., 1997).

Par ailleurs, le TBT se lie aux protéines cellulaires, telles que le système des CYP450 et aux GSTs, provoquant l'inhibition de ces enzymes, par exemple chez les rats Sprague-Dawley (Henry et Byington, 1976; Rosenberg et Drummond, 1983) et chez les poissons marins *Siganus canaliculatus* et *Sparus sarba* (Al-Ghais et Ali, 1999) et menant ainsi à la cytotoxicité. Plusieurs auteurs (Fent et Stegeman, 1991, 1993; Ueno et al., 1995; Lee, 1996; Reader et al., 1996) ont associé le mécanisme cytotoxique du TBT à l'inhibition du CYP450. Lee (1996) et Ueno et al. (1997) ont suggéré que la toxicité du TBT est associée à son métabolisme et à la liaison de ses métabolites aux protéines cellulaires. Les contaminants et les hormones suivent des voies de métabolisation similaires, e.g. le système du cytochrome P450, ce qui peut engendrer d'importantes interactions (e.g. George, 1994). Spooner et al. (1991) ont montré que le syndrome de l'imposex chez le gastéropode *Nucella lapillus* était dû à un déséquilibre hormonal, induit par le TBT, suite à une augmentation de la concentration de l'hormone mâle testostérone accumulée dans les tissus. Le TBT inhiberait la conversion de la testostérone en 17β -œstradiol, l'hormone femelle, par inactivation de l'aromatase dépendante du CYP450 catalysant la réaction, e.g. chez le mollusque *Nucella lapillus* (Matthiessen et Gibbs, 1998). Alternativement, Ronis et Mason (1996) indiquent que chez la littorine *Littorina littorea* le TBT inhibe les mécanismes de conjugaison du stéroïde et son transport excrétoire qui sont les cibles biochimiques majeures de ce xénobiotique. Étant donné que le TBT est lipophile, il pénètre la partie hydrophobe de la structure du P450 et pourrait donc se lier à certains acides aminés du site actif de l'enzyme (Fent, 1996). Kuhl et Brouwer (2006) ont montré que l'exposition des juvéniles du poisson medaka *Oryzias latipes* au TBT n'a entraîné aucune conversion de femelles en mâles, même si l'activité de l'aromatase a été inhibée. Cette étude est en contraste avec plusieurs autres études publiées, dont celle de McAllister et Kime (2003) réalisée chez le poisson zèbre *Danio rerio*. Les auteurs suggèrent que le rôle de l'aromatase

serait déterminant lors des stades de développement, et uniquement durant l'étape de détermination du sexe (Kuhl et Brouwer, 2006).

L'inhibition de l'activité d'enzymes impliquées dans la synthèse stéroïdienne a également été signalée chez l'homme (Heidrich et al., 2001; Cooke, 2002: l'aromatase dépendante du cytochrome P450) et chez le rat Sprague-Dawley (McVey et Cooke, 2003: une déshydrogénase de stéroïde). Une étude *in vitro* récente a montré que le TBT inhibait l'activité de l'aromatase-CYP450 dépendante des microsomes ovariens et cervicaux de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Hinfray et al., 2006). À part le fait que le TBT agisse en inhibant l'activité de l'aromatase dépendante du cytochrome P450, un autre mécanisme a été mis en évidence et pourrait expliquer le rôle du TBT dans la perturbation endocrinienne. Dans un test de liaison compétitive, Satoh et al. (2001) ont montré que le TBT avait une plus grande affinité envers le récepteur d'androgène chez l'homme, en comparaison avec d'autres polluants environnementaux testés, ce qui pourrait bloquer la liaison des androgènes. Par contre, il n'a aucune affinité pour le récepteur des oestrogènes.

L'interaction du TBT avec le système de MFO a été décrite comme un mode de toxicité. Les effets inhibiteurs sur certaines enzymes ont été bien documentés chez les poissons, aussi bien *in vitro* chez le spara doré *Stenotomus chrysops* (Fent et Stegeman, 1991), la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, l'anguille européenne *Anguilla anguilla*, et le poisson *Cottus gobio* (Fent et Bucheli, 1994), que *in vivo* chez le poisson *Stenotomus chrysops* (Fent et Stegeman, 1993). Le TBT diminue le contenu en protéine CYP450 1A *in vitro* et *in vivo* ainsi que les activités reliées au cytochrome P450 chez les mammifères tels que les rats Sprague-Dawley (Rosenberg et al., 1980; Rosenberg et Drummond, 1983), chez les poissons, e.g. le spara doré *Stenotomus chrysops* (Fent et Stegeman, 1991, 1993) et les crustacés, e.g. le crabe bleu *Callinectes sapidus* (Oberdörster et al., 1998). Il agit directement sur le cytochrome P450 et le détruit pour former le P420, du moins à des concentrations élevées chez le rat Sprague-Dawley (Rosenberg et Drummond,

1983) et le poisson *Stenotomus chrysops* (Fent et Stegeman 1991, 1993). Il inhibe le métabolisme de l'hème en diminuant l'activité de l'alanine synthase chez le rat Sprague-Dawley (Rosenberg et al., 1981) impliquée dans la synthèse de l'hème. Concernant d'autres formes de la protéine cytochrome P450 tels que le CYP2B et le CYP3A, d'après Fent et al. (1998), les effets du TBT étudiés chez le sparc doré *Stenotomus chrysops* (Fent et Stegeman, 1991, 1993) sont beaucoup moins importants que sur le CYP1A (et à de plus grandes doses), suggérant une grande sélectivité d'action de ce composé.

Le TBT, administré à des concentrations environnementales pertinentes (nanomolaires), réduit significativement le contenu cellulaire en glutathion (GSH) chez le rat Wistar (Okada et al., 2000) et l'omble chevalier *Salvelinus alpinus* (Padrós et al., 2003), inhibe l'activité de la GST cytosolique chez deux poissons marins tropicaux *Siganus canaliculatus* et *Sparus sarba* (Al-Ghais et Ali, 1999) et le poisson salmonidé *Salvelinus alpinus* (Padrós et al., 2003). Les activités hydrolytiques des carboxylestérases microsomales et cytosoliques sont réduites chez deux poissons marins tropicaux *Siganus canaliculatus* et *Acanthopagrus latus*, qui sont impliquées dans la detoxication de certains pesticides et hydrocarbures aromatiques polycycliques (Al-Ghais et al., 2000). Par contre, une étude plus récente a montré que chez la carpe commune *Cyprinus carpio* l'activité de la GST était augmentée *in vivo*, après exposition au TBT (Schmidt et al., 2005). Des travaux *in vitro* ont montré que le TBT inhibe également l'activité de l'UDP-GT impliquée dans la conjugaison de la testostérone, sans effet sur celle de l'œstradiol, chez les poissons marins *Mullus barbatus* et *Platichthys flesus* (Morcillo et al., 2004). De même, les activités *in vitro* de sulfatation de l'œstrone et de l'œstradiol ont été inhibées chez l'homme (Ohkimoto et al. 2005), ainsi que celle de l'œstradiol chez la carpe commune *Cyprinus carpio* (Thibaut et Porte, 2004) et les poissons marins *Mullus barbatus* et *Lepidorhombus boscii* (Martin-Skilton et al., 2006).

1.2.4 Transformations métaboliques du TBT — État des connaissances

La dégradation du TBT se fait par une débutylation successive en dibutylétain (DBT), puis en monobutylétain (MBT) et ensuite en étain inorganique Sn (IV). Dans l'environnement aquatique, la liaison Sn-C est un point de moindre résistance de la molécule des organoétains qui sont thermiquement stables, puisque leur décomposition n'a pas lieu en dessous de 200°C (Clark et al., 1988). La rupture chimique de la liaison Sn-C peut se produire au moyen de réactifs nucléophiles ou électrophiles comme les acides minéraux, les alcalis et les acides carboxyliques (Blunden et Chapman, 1986). Dans les tissus biologiques, les mécanismes enzymatiques sont les moyens les plus efficaces de modification et d'élimination du TBT afin de réduire sa charge dans l'organisme (Laughlin, 1996). Quelques études ont démontré que le TBT est oxydé par le système cytochrome P450-monooxygénases dépendantes en une série de dérivés hydroxylés chez le rat albinos (Casida et al., 1971; Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977) et le rat Wistar (Matsuda et al., 1993; Ueno et al., 2003a), la souris albinos (Ueno et al., 1997, 2003a), le crabe *Callinectes sapidus* (Lee, 1986) et les poissons *Leiostomus xanthurus* (Lee, 1986) et *Pagrus major* (Yamamoto et al., 1997). Théoriquement, ces composés seraient par la suite conjugués à des sulfates ou des glucides par le système d'enzymes de Phase II, ce qui faciliterait leur élimination (Lee, 1986).

La plupart des organismes aquatiques peuvent métaboliser le TBT accumulé *via* l'eau ou la nourriture (Lee, 1986; Maguire et al., 1984; Tsuda et al., 1988; Bryan et al., 1989; Rice et al., 1989; Saint-Louis, 1994; Guruge et al., 1996). Un bon nombre d'études menées *in vivo* ont montré que plusieurs espèces de poissons testés sont capables de métaboliser le TBT (e.g. Lee, 1986; Martin et al., 1989; Yamamoto et al., 1997; Krone et Stein, 1999; Padrós et al., 2003). Le processus de dégradation du TBT est généralement

associé à la présence d'un système de monooxygénases à fonction mixte (MFO) dépendantes du cytochrome P450 (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Lee, 1996). La présence et l'activité (faible ou importante) de ce système ont été démontrées dans les tissus de plusieurs espèces de poissons (Buhler et Williams, 1989) et de mollusques (Livingstone, 1991).

Le TBT subit des réactions de biotransformation enzymatique en composés polaires solubles s'effectuant en deux phases. Les réactions phase I sont principalement catalysées par le système du cytochrome P450 avec le NADPH réduit comme cofacteur essentiel. Durant cette étape, le TBT est hydroxylé en dérivés 1-, 2-, 3- et 4-hydroxybutyl dibutylétains (Fish et al., 1976; Lee, 1986), avec la prédominance du 2-hydroxybutyl dibutylétain (Fish et al., 1976; Fish, 1984; Lee, 1986). Les dérivés résultants de phase I subissent, par la suite, les réactions synthétiques de phase II, qui les conjuguent à des sucres ou des sulfates. Ces conjugués polaires peuvent être rapidement évacués hors de l'organisme (Lee, 1996). Les dérivés hydroxylés sont déalkylés pour former le DBT. Les produits 1- et 2- hydroxylés sont instables et se transforment rapidement en DBT (Bridges et al., 1967). Ils subissent des réactions de déstannylation sous des conditions acides pour former les dérivés de DBT et le 1-butanol et le 1-butène, respectivement. Le composé 3- hydroxylé est encore oxydé à la cétone correspondante. Par ailleurs, le DBT subit des clivages par les monooxygénases ou des clivages non enzymatiques pour donner des dérivés butylétains (Fish, 1984). Les études *in vivo* ont montré que le di- et le mono- butylétains sont les métabolites majeurs, chez les rats albinos (Kimmel et al., 1977). Krone et al. (1989) ont montré que le DBT était la forme prédominante de BTs retrouvés dans le foie de la sole anglaise *Platychthys flesus*.

En utilisant la chromatographie en phase gazeuse - ionisation par plasma micro-ondes - spectrométrie d'émission atomique (GC/MIP/AED), l'étude du métabolisme

et des espèces chimiques du TBT a révélé la présence d'une variété de métabolites chez les rats Wistar (Matsuda et al., 1993) et les souris albinos (Ueno et al., 1997, 2003a), ainsi que chez différentes espèces de poissons marins et de bivalves (Suzuki et al., 1992; Yamamoto et al., 1997), dont les moules marines *Mytilus graynus* et *Mytilus edulis* (Suzuki et al., 1998). À part le TBT, le DBT et le MBT, ces auteurs ont identifié des composés intermédiaires hydroxylés, carboxylés et oxygénés du TBT, ainsi que ceux du DBT.

Lee (1996) a reconstitué en laboratoire les étapes suggérées impliquées dans l'hydroxylation du TBT par le système des MFO de poisson *Leiostomus xanthurus* ou de crabe *Callinectes sapidus*, en présence de NADPH. En résumé, le TBT forme un complexe en se liant avec le cytochrome P450 (Fe^{3+}) oxydé qui subit une réduction en cytochrome P450 (Fe^{2+}) et qui réagit avec l'oxygène, par la suite. Le substrat formé est hydroxylé (hydroxybutyl dibutylétain), en position 1, 2, 3 ou 4. Une molécule d'eau est alors libérée, depuis le cytochrome P450 réoxydé (Lee, 1996; voir la figure 2).

Des travaux *in vitro* récents (Ohhira et al., 2006a, b) ont mis en évidence les CYP450 spécifiques, responsables du métabolisme du TBT, en utilisant des isoenzymes métabolisantes qui contiennent l'ADN complémentaire exprimant des CYP humains ou de rats. Parmi les enzymes étudiées, les CYP2C6 et CYP2C11 sont impliqués dans la déalkylation significative du TBT chez le rat (Ohhira et al., 2006a). Chez l'homme, ce sont les CYP2C9, CYP2C19 et CYP3A4 qui pourraient être majoritairement responsables de son métabolisme (Ohhira et al., 2006b).

1.2.5 Métabolisme du TBT et signification toxicologique

Tel que mentionné dans la section 1.2.3, certaines indications montrent qu'un des métabolites du TBT, le DBT, serait à l'origine des effets observés chez les animaux expérimentaux. Il semble être plus hépatotoxique et plus immunotoxique que le TBT.

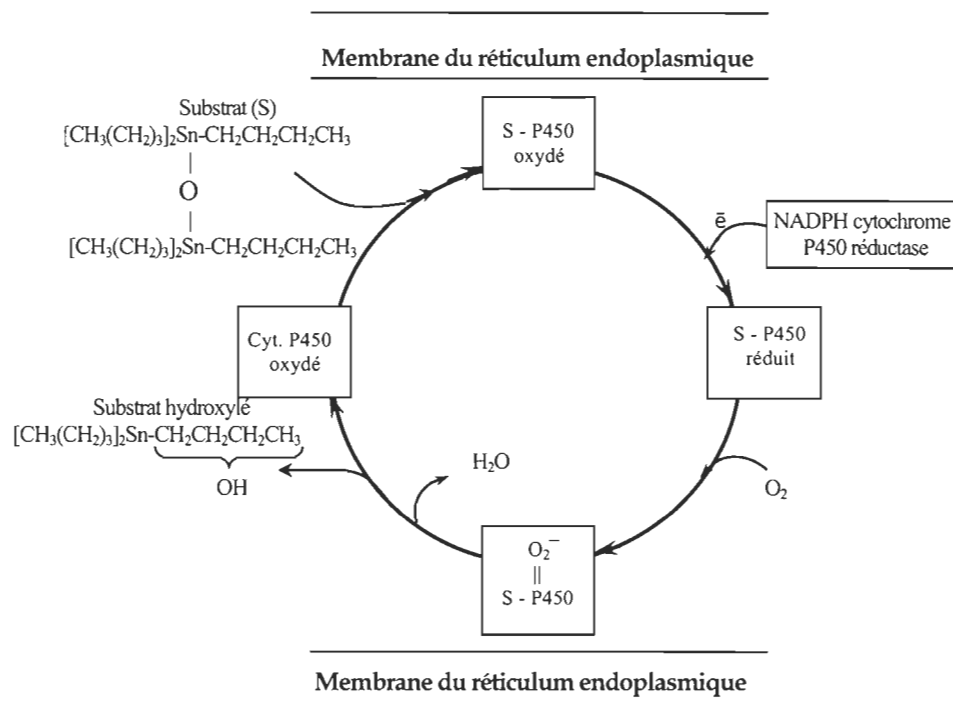


Figure 2. Diagramme représentatif des réactions suggérées, impliquées dans le métabolisme du TBT par le système des MFO de poissons ou de crabes (tiré de Lee, 1996).

En ce qui concerne les mécanismes immunosuppresseurs et tératogènes du TBT, certains auteurs suggèrent que ce composé agirait de façon indirecte par le biais du DBT (e.g. Snoeij et al., 1988; Penninks et al., 1990) qui serait de ce fait plus toxique (e.g. Ema et al., 1991; St-Jean et al., 2002; Frouin et al. 2008). Les travaux de Ueno et al. (2003a, b) suggèrent que le DBT serait plus hépatotoxique que le TBT. Ces auteurs pensent que le DBT est beaucoup plus hépatotoxique que le TBT à cause de la différence de métabolisme entre les deux composés et de distribution dans les organelles cellulaires (Ueno et al., 2003a). Le DBT possède une plus grande affinité pour les groupements sulfhydryles (Ueno et al., 2003b). Cependant, il n'existe pas assez d'études pour confirmer sa plus grande toxicité.

1.2.6. Analyse et dosage du TBT

La quantification des concentrations de TBT dans divers médias a été un problème, la seule technique disponible à l'époque de la découverte de ses effets délétères étant la spectrophotométrie en absorption atomique. Cette dernière renseignait sur la quantité des organoétains totaux sans discernement entre les différents composés, avec une limite de détection médiocre de 0,11 µg.l⁻¹ (Cleary et Stebbing, 1985), concentration excédant celles reconnues subséquemment comme biologiquement toxiques. La méthodologie utilisée pour la détermination des BTs en traces dans les échantillons d'eau, de sédiments et de tissus biologiques est complexe et maintenant bien documentée (e.g. Tsuda et al., 1986; Sullivan et al., 1988; Krone et al., 1989; Chau et al., 1997; Michel et Averty, 1999; et plusieurs autres).

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est l'approche la plus utilisée vu sa grande résolution pour séparer les organoétains. Elle est combinée à différents systèmes de détection, telle la spectrométrie de masse (MS), l'ionisation à la flamme (FID), la photométrie de flamme (FPD) et l'absorption atomique (GC-AAS). Dans cette

technique, les organoétains sont d'abord dérivés avant leur détection, pour les rendre plus volatils. Ce sont des composés ioniques, peu volatils en solution. La dérivation des composés se fait à l'aide du réactif de Grignard, mais l'éthylation au tétraéthylborate de sodium a été proposée comme méthode beaucoup plus simple et moins longue (Michel et Averty, 1999).

Plus récemment, avec le développement de la chromatographie liquide (LC) et son couplage à différents systèmes de détection fait que la LC est de plus en plus utilisée pour l'analyse des organoétains. Cette technique ne requiert pas de dérivation préalable des organoétains, ce qui rend la méthode plus simple que la GC. Plusieurs modes ont été proposés, la chromatographie d'échange d'ions étant la plus utilisée. Malgré l'introduction de la LC pour l'analyse des organoétains en analyse environnementale, son utilisation reste quelque peu limitée, à cause de la faible résolution et la difficulté de détection. Cependant, durant la dernière décennie, l'avènement de la spectrométrie de masse (MS) et de l'ionisation par plasma (ICP-MS) ont amélioré la sélectivité et la sensibilité de détection nécessaires pour les analyses des organoétains, dans les matrices environnementales complexes (Gonzalez-Toledo et al., 2003).

1.3 Contexte du projet

Depuis les législations votées pour la prohibition des peintures antisalissures sur les petites embarcations, une diminution notoire des concentrations du TBT dans l'eau a été observée (Champ, 2000; Hoch, 2001), alors que le TBT associé aux sédiments apparaît plus persistant (Chau et al., 1997). Cependant, des données (Fent et Hunn, 1995; Hashimoto et al., 1998; Michel et Averty, 1999) montrent que la contamination par les composés organoétains constitue encore une menace autant pour les organismes aquatiques que pour les humains, principalement à cause de la persistance

de ces composés dans les sédiments (e.g. Harino et al., 2005; Hua et Liu, 2008). De ce fait, les études de bioaccumulation, de biotransformation et d'effets du TBT sur les organismes aquatiques, incluant les mollusques et les poissons, sont importantes pour comprendre son impact et ainsi protéger les espèces vulnérables.

Les butylétains sont accumulés par les poissons selon deux voies; accumulation et absorption directe de l'eau à travers les branchies et à partir de la nourriture (Lee, 1986; Tsuda et al., 1991; Yamada et al., 1994). Les poissons benthiques consomment des organismes vivant dans les sédiments comme les vers annélides et les amphipodes qui peuvent prendre en charge le TBT des sédiments et le concentrer (Meador et al., 1997; Krone et al., 1996). Chez les mollusques, les butylétains sont accumulés par filtration de l'eau de mer et à partir de la nourriture (Fent, 1996; Laughlin, 1996).

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, une grande variété de xénobiotiques est principalement métabolisée dans le foie des poissons ainsi que dans des organes analogues associés à la digestion, chez d'autres organismes. Ce processus de métabolisme se fait par une séquence de réactions généralement en deux phases. Dans celles-ci, le xénobiotique est activé, en premier lieu, par le système à monooxygénases microsomales – dépendantes du cytochrome P450 pour produire des métabolites oxydés (hydroxylés), les métabolites de phase I contenant des groupements réactifs. Ces métabolites sont par la suite conjugués au sulfate et/ou l'acide glucuronique (et/ou autres composés endogènes) pour donner les métabolites de phase II. Cependant, il est reconnu que la balance entre ces deux phases métaboliques peut jouer un rôle déterminant dans les effets biologiques globaux du composé parent. Sachant que la biodisponibilité et le devenir d'un contaminant dépendent largement de sa biotransformation, un métabolisme intensif peut limiter énormément l'accumulation et la bioconcentration lors des transferts du contaminant

et/ou de ses produits de dégradation dans un réseau trophique, de la proie vers son prédateur.

Dans le contexte des interactions des contaminants, il est maintenant établi (e.g. chez les humains dans le cas des drogues) que l'un des plus importants mécanismes de toxicité est l'effet de ces composés sur l'activité des enzymes clefs responsables de leur métabolisme (Li, 1997). Les interactions entre composés chimiques ou contaminants impliquent des altérations aussi bien d'ordre toxicocinétique (concernant le devenir biotique du composé) que d'ordre toxicodynamique (affectant la réponse du tissu ou de l'organe cible au contaminant et/ou aux préjudices causés par celui-ci). De manière plus précise, les interactions toxicocinétiques impliquent la modification des facteurs exerçant une influence sur le devenir du composé toxique à savoir son absorption, sa distribution, son métabolisme et son excrétion; ces processus étant avant tout régis par l'augmentation (induction) ou l'inactivation (inhibition) des systèmes enzymatiques qui gouvernent le métabolisme de ce composé (Sauer et al., 1997). L'altération du métabolisme d'un composé peut conduire à l'augmentation de sa toxicité et/ou affecter son élimination (Gonzalez, 1997).

Il est donc intéressant et important d'étudier en détail les métabolites du TBT afin de connaître les voies de métabolisation empruntées par ce composé et tenter de comprendre comment ces dernières influencent sa toxicité envers les organismes.

À part les recherches sur le mécanisme d'action du TBT en tant que perturbateur endocrinien (agent actif hormonalement) chez les mollusques ainsi que composé immunotoxique (agissant sur le système immunitaire), la majorité des études qui continuent à être publiées sur le TBT concernent les niveaux de contamination des différents compartiments des écosystèmes (sédiments, eau et organismes). Les données

traitant de la biotransformation du TBT restent fragmentaires et limitées pour tenter de connaître son comportement et les effets d'autres composés sur sa métabolisation.

Il est clair que le TBT est métabolisé par le cytochrome P450 pour être déalkylé en DBT et MBT. Cependant, à l'état actuel des connaissances, de nombreuses questions fondamentales demeurent sans réponses quant aux processus exacts régissant son métabolisme. Les mécanismes et voies contribuant à son élimination par les organismes, à savoir les enzymes exactes impliquées dans le processus de détoxification et les formes (espèces) chimiques intermédiaires, ne sont pas bien connus. Autrement dit, à part les entités chimiques principales, le TBT (Bu_3Sn^+), le DBT ($\text{Bu}_2\text{Sn}^{2+}$), le MBT (BuSn^{3+}) et Sn (IV), présentes dans la colonne d'eau, les sédiments et transférées aux organismes, les autres espèces chimiques (e.g. conjuguées ou non) restent méconnues. En outre, la possibilité que les BTs conjugués soient réabsorbés par un organisme, après leur élimination par un premier organisme reste inconnue.

Il est très probable qu'à cause des méthodes analytiques insuffisamment développés, on ne connaisse pas de manière précise, sous quelles formes métaboliques ces composés se trouvent dans l'eau:

- sont-ils plus biodisponibles, parce que présents sous une forme conjuguée ?
- sont-ils plus ou moins toxiques quand ils sont conjugués ou chimiquement associés (liés avec des fonctions e.g. thiols (-SH)) à une protéine ou un peptide hydrosolubles?

Les quelques travaux publiés portant sur l'étude du métabolites conjugués chez les organismes aquatiques sont ceux de Lee (1986) et de Krone et Stein (1999). Dans une étude comparative de biotransformation et de distribution tissulaire du TBT chez deux espèces de poissons marins plats *Pleuronectes vetulus* et *Platichthys stellatus*, Krone et Stein (1999) ont montré que les butylétains (BTs) présents dans la bile de ces poissons

provenaient du TBT injecté. Mis à part le DBT, les BTs se trouvaient sous une forme ne pouvant être extraite avec le solvant utilisé. Ces auteurs en ont déduit que les BTs étaient présents sous forme de conjugués ou de complexes hautement hydrosolubles et ont tenté de les hydrolyser enzymatiquement avec des glucuronidase/sulfatase, dans la bile des poissons expérimentaux. Leur tentative n'a pas abouti à un résultat pouvant aider à la caractérisation des molécules auxquelles le TBT et ses métabolites pourraient être complexés (liés), avant son excrétion. De son côté, Lee (1986) a montré que des quantités importantes de la radioactivité reliée au ^{14}C -TBT, après métabolisation, était retrouvée dans le cytosol des cellules hépatopancréatiques du crabe bleu *Leiosomus xanthurus*. Le TBT a été détecté dans les gouttelettes lipidiques. Une quantité significative de la radioactivité était associée à des métabolites liés de façon covalente à des protéines, dans la fraction subcellulaire. De plus, des métabolites conjugués au sulfate, glucose, ou au glutathion (Lee, 1989, 1996), sans identification formelle des molécules ont été observés. Par ailleurs, des dérivés d'acide mercapturique ont été retrouvés dans l'urine de rats Wistar exposés au TBT par injection péritonéale, mais qui ne comportaient pas d'étain (Suzuki et al., 1999).

En somme, les voies d'élimination enzymatiques du TBT et de ses métabolites n'ont jamais été clairement caractérisées, probablement à cause des limitations analytiques. Une variété de méthodes d'analyses du TBT et de ses métabolites majeurs, le DBT, le MBT et l'étain inorganique Sn IV, ont été publiées. La majorité des méthodes utilisent la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), après dérivation des principaux métabolites (e.g. Chau et al. 1997). Le principal désavantage de la GC-MS est que les composés ne peuvent pas être analysés sans dérivation. Par conséquent, il est impossible d'analyser les composés organoétains de phase II comme les glucuronides et les sulfates avec cette méthode, car les conjugués, molécules polaires et fragiles, sont détruits. À notre connaissance, aucune identification

des métabolites de phase II par GC-MS n'a été décrite dans la littérature. Traditionnellement, la chromatographie sur couches minces (TLC), utilisée par Lee (1986), a permis la mise en évidence de l'existence des métabolites conjugués en tant qu'activité, suite au marquage radioactif du TBT au ^{14}C . Cependant, cette approche ne rend compte d'aucune information quant à la structure chimique des métabolites de phase II. Mais encore, l'absence de standards commerciaux rend l'identification des conjugués compliquée.

Les développements récents en chromatographie liquide ont permis l'acquisition d'informations structurales considérables sur les produits de biotransformation ainsi que leur identification (e.g. Betowski et Jones, 1996), sans avoir recours aux standards. La chromatographie liquide couplée à la spectromètre de masse (LC-MSⁿ) avec une interface d'ionisation à pression atmosphérique API (source APCI d'ionisation chimique par pression atmosphérique ou ESI d'ionisation par électrovaporisation) permet une identification directe des composés polaires comme les glucuronides, généralement sans dérivation préliminaire, ni traitement préalable. La trappe ionique spectromètre de masse permettant la réalisation des MS en multi étape (MSⁿ), comme celle utilisée dans ce travail de recherche, est particulièrement appropriée pour l'obtention d'informations structurales détaillées et l'identification de produits inconnus de dégradation métabolique.

1.4 Objectifs

L'objectif général de cette étude est d'identifier et de caractériser par LC-MS les voies métaboliques principales du TBT, grâce aux formes métaboliques identifiées, chez un poisson salmonidé (*Salvelinus fontinalis*) et chez la moule bleue (*Mytilus edulis*), en utilisant des approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*.

De façon plus spécifique, les objectifs sont:

1) Réaliser la synthèse chimique d'un dérivé de phase I du TBT, le 4-hydroxybutyl-dibutylétain (4-OHBuDBT), qui servira de standard pour le développement d'une méthode d'analyse par LC-API-MS ainsi que pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

2) Développer des méthodes analytiques utilisant la chromatographie liquide LC et la spectrométrie de masse par APCI- et/ou ESI- MSⁿ pour la séparation, l'identification de structure et la quantification des formes métaboliques produites *in vitro* et *in vivo*. En parallèle, développer des méthodes d'extraction liquide-liquide et en phase solide du TBT et de ses métabolites, compatibles avec le système LC-MS, dans différentes matrices biologiques et dans l'eau de mer.

3) Exposer *in vitro* des microsomes de foie de poissons au TBT et, séparément, au composé intermédiaire 4-OHBuDBT. L'exposition à cet intermédiaire métabolique est réalisée dans le but de synthétiser biochimiquement un métabolite du TBT conjugué au glucuronide, qui sera utilisé comme standard d'analyse pour les réactions *in vivo*.

4) Exposer des poissons par injection intrapéritonéale et des moules bleues via l'eau de mer au TBT et, séparément, au 4-OHBuDBT pour analyser les métabolites polaires formés *in vivo*.

1.5 Approches expérimentales *in vivo* et *in vitro*

1.5.1 Le foie comme organe clé d'évaluation métabolique

De par la position et le rôle physiologique du foie, plusieurs facteurs le prédisposent aux atteintes toxiques (e.g. les relations anatomique et physiologique avec le tractus gastro-intestinal, le sang apporté par la veine porte, la fonction d'excrétion de la bile, la structure des hépatocytes et leurs microvillosités, la capacité de biotransformation des xénobiotiques, etc.). Le foie est l'organe de biotransformation le plus important, dû en grande partie à son contenu significatif et sa grande diversité en enzymes oxydatives et conjugatives (des voies de phase I et de phase II) capables du métabolisme, aussi bien de composés étrangers que de composés endogènes. Cependant, concernant la biotransformation, les cytochromes P450 représentent la plus importante famille d'enzymes dans le foie (Sauer et al., 1997). Les xénobiotiques sont d'abord métabolisés par le foie avant d'être excrétés dans la bile ou libérés dans le sang pour être excrétés comme urine via le rein. Par ailleurs, il a été indiqué que la glucuronidation était la voie de phase II la plus importante chez les salmonidés et les pleuronectidés (George, 1994).

En ce qui concerne le TBT, plusieurs études (e.g. Fent, 1996; Lee, 1996; Krone et Stein, 1999) montrent que la biotransformation du TBT chez les poissons adultes prend place en premier lieu dans le foie, avant son excrétion dans la bile.

1.5.2 Approche expérimentale *in vitro*

L'utilisation de méthodes *in vitro* s'avère un outil particulièrement intéressant pour la grande sensibilité, spécificité et précision, ainsi qu'un contrôle plus facile des paramètres physiologiques et biochimiques (temps d'exposition, dose, température, vitamines, hormones, etc.) et où l'activité des systèmes enzymatiques est maintenue.

De plus, le nombre d'organismes à sacrifier reste beaucoup plus faible, en comparaison avec les expériences utilisant des organismes entiers.

Les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques sont aussi bien membranaires (e.g. CYP450- oxygénases à fonction mixtes, réductases dans le réticulum endoplasmique lisse, UGTs) que cytosoliques (e.g. GSTs). Les microsomes (petites vésicules incluses dans une membrane dérivée du réticulum endoplasmique lors du fractionnement cellulaire) manquent de la plupart des enzymes de conjugaisons cytosoliques et des cofacteurs responsables du métabolisme de phase II. Cependant, ils comportent un mélange de CYP450s dans leur environnement natif, ainsi que les enzymes de conjugaison UDP-GTs membranaires (Li, 1997). Ils ont été adoptés comme système de biotransformation *in vitro* pour étudier la réponse des organismes, y compris les poissons, aux drogues et aux polluants environnementaux en terme de toxicité et de métabolisme (Cravedi et al., 1989).

Les études de biotransformation des xénobiotiques effectuées *in vitro*, utilisant des microsomes, ont aussi été réalisées avec des poissons (e.g. Cravedi et al., 1989; Dady et al., 1991). Les données générées *in vitro* pour prédire le métabolisme *in vivo* ont révélé généralement une bonne corrélation qualitative entre les résultats des systèmes *in vitro* et *in vivo* (e.g. Cravedi et al., 1989). Autrement dit, les patrons de métabolisme des xénobiotiques sont très similaires à ce qui est observé *in vivo*.

Concernant le TBT, la majorité des travaux faits sur son métabolisme *in vitro* ont été pour la plupart réalisés avec des microsomes hépatiques de souris et de rats (Casida et al., 1971; Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Iwai et al., 1981; Matsuda et al., 1993; Suzuki et al., 1994) à l'exception des travaux de Lee (1986) effectués avec des microsomes de foie de poissons et d'hépatopancréas de crabes.

Pour notre étude, en plus des expérimentations *in vivo*, il nous est apparu avantageux d'utiliser les microsomes hépatiques comme fractions subcellulaires pour la caractérisation *in vitro* des formes métaboliques du TBT chez le poisson salmonidé

Salvelinus fontinalis.

1.5.3 Les moules bleues en expérimentation *in vivo*

Les mollusques sont considérés comme des organismes bioaccumulateurs de contaminants. Toutefois, ils possèdent les systèmes enzymatiques (CYP450 et enzymes conjuguatives) pour les métaboliser, même s'ils sont considérés plus faibles que ceux des vertébrés (Livingstone 1991; Lee, 1998). Les moules sont des organismes invertébrés qui ont été utilisées pour les études du métabolisme de certains contaminants dont le TBT (e.g. Suzuki et al., 1998). Leur utilisation dans cette étude se base sur le fait que le protocole expérimental était moins lourd que l'utilisation de poissons vivants. De plus, ces mollusques ont été utilisés dans un but de comparaison entre espèces.

1.5.4. Les poissons comme modèle biologique

Les poissons comprennent environ 20 000 espèces existantes, représentant approximativement la moitié de toutes les espèces de vertébrés connues. Ils présentent une extraordinaire diversité, occupant virtuellement toutes les niches des eaux douces et marines et sont une source vitale de protéine pour l'homme (Stegeman, 1993). Le choix des poissons comme modèle biologique se base sur le fait que leur système enzymatique s'apparente dans les grandes lignes à celui des mammifères (Stegeman et Hahn, 1994). Ils possèdent entre autres un système d'oxygénases à fonction mixte (MFO) dépendantes du CYP450 à activité élevée capable de métaboliser le TBT de façon plus importante que d'autres organismes aquatiques inférieurs (Lee, 1996). Par ailleurs, de nombreux laboratoires considèrent les poissons comme de bons modèles animaux, comparables au rat et à la souris, pour l'étude de plusieurs problèmes reliés à la santé humaine (e.g. Buhler et Williams, 1988).

1.6 Approche analytique par LC - API - MS" et principe d'ionisation en API

Comme il a déjà été mentionné en introduction, l'analyse par GC-MS est une méthode destructrice qui ne permet pas l'analyse des molécules conjuguées polaires. L'analyse structurale des échantillons a été réalisée par LC-API (ESI et/ou APCI)-MS. L'avantage de cette technique est que les molécules polaires (conjugués aux composés endogènes: sucres ou autre) contenues dans le solvant sont vaporisées et désolvatées rapidement dans la source API.

Sommairement, les deux techniques majeures d'ionisation à pression atmosphérique API, à savoir l'ESI et l'APCI, reposent sur la formation d'un nébulisât continu à partir du liquide chromatographique. Les ions sont formés ou les ions préexistants sont extraits par un processus d'ionisation à pression atmosphérique et transportés à travers des étapes multiples de pompage dans le vide du spectromètre de masse (Rosenberg, 2003).

La source d'ionisation à pression atmosphérique API permet le couplage du chromatographe liquide au spectromètre de masse. Elle a été introduite par le groupe de Horning au début des années 70 (Horning et al., 1973). Dans l'interface API (figure 3), l'éluant liquide est éliminé, car les solvants sont indésirables pour le bon fonctionnement des spectromètres de masse. Le but premier de la technique API est tout d'abord, d'ioniser les analytes (en APCI) et de transporter les ions en solution vers la phase gazeuse (en ESI) et de désolvater le flux de l'échantillon pour son introduction dans le spectromètre de masse. Ensuite, l'APCI agit comme une enceinte séparant la pression atmosphérique à l'extérieur du spectromètre de masse de l'intérieur de l'instrument MS qui est sous pression de $10^{-4}/10^{-5}$ mbar, et pompe les ions de charge différente des ions à polarité désirée, afin d'éviter leur interférence dans l'analyse de ces derniers (ThermoFinnigan., 2001).

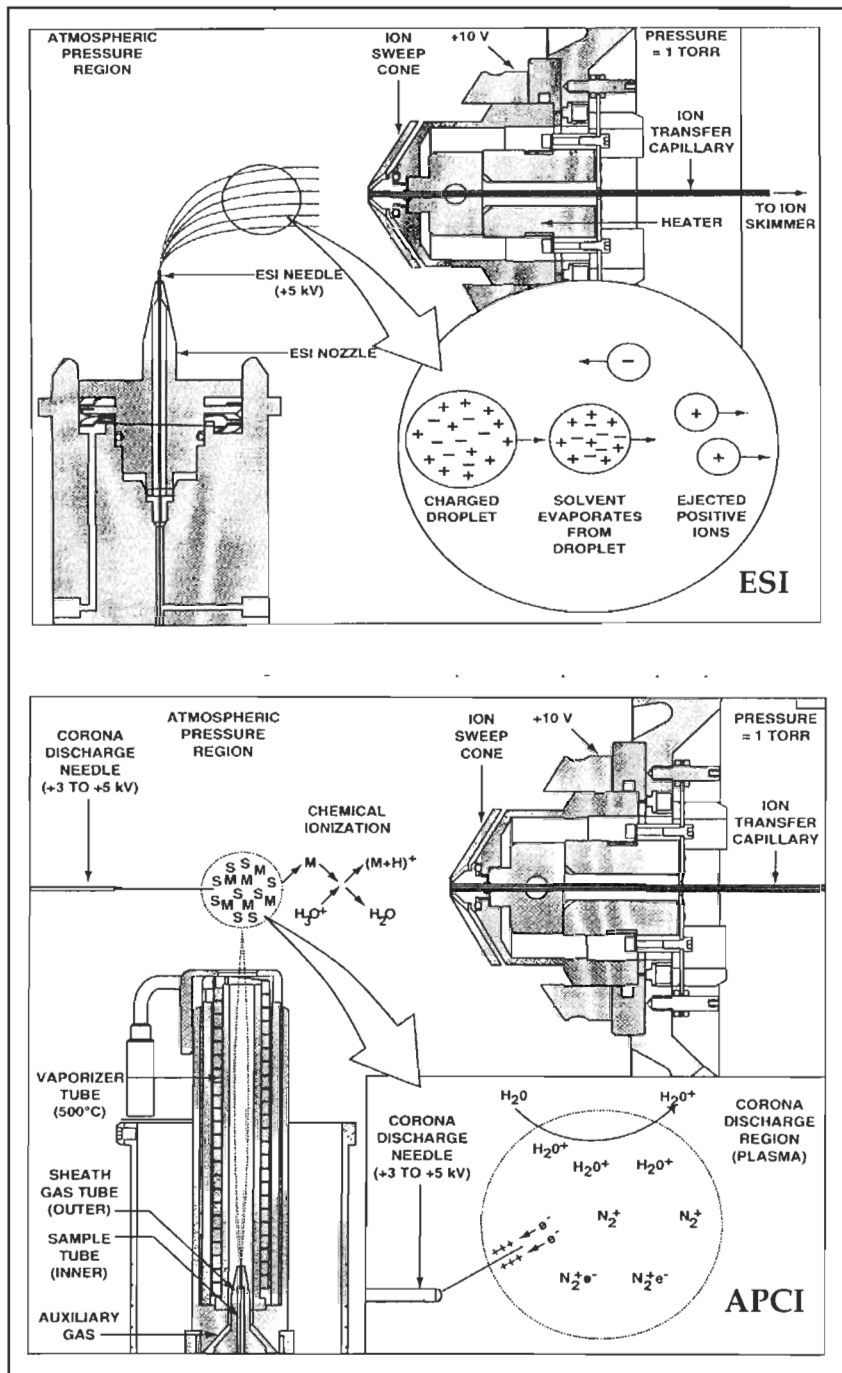


Figure 3. Processus de formation des ions en mode d'ionisation positif, en ESI et en APCI. Tiré de ThermoFinnigan (2001).

En spectrométrie de masse, les ions sont produits, puis séparés et filtrés en fonction de leur ratio masse/nombre de charges (m/z) et détectés. Le détecteur d'ions, relié à l'ordinateur du système, enregistre le nombre d'ions à chaque m/z et produit un spectre de masse qui est un graphe représentant les abondances relatives des ions à chaque valeur de m/z mesurée.

L'ESI et l'APCI produisent une ionisation chimique douce à pression atmosphérique, ne nécessitant pas une autre source d'énergie. Les ions quasi moléculaires sont formés avant d'entrer dans le spectromètre de masse. Dépendamment de la structure chimique du composé à analyser, ces techniques ont l'avantage de fournir des ions polychargés (le nombre de charge z peut dépasser 30), ce qui est utile pour l'établissement des masses moléculaires élevées des biomolécules (105 kDa), telles que les protéines.

La technique d'électronébulisation (*electrospray* ESI) a été décrite au milieu des années 80, par Yamashita et Fenn (1984). Elle repose sur l'introduction d'une solution du composé à analyser par un capillaire très fin porté à haut potentiel. Cette tension crée des charges dans la solution et, à la sortie du capillaire, un nébulisat de fines gouttelettes est formé, favorisé par une nébulisation pneumatique. Dans la source à pression atmosphérique, ces gouttelettes rencontrent un flux d'azote chaud asséchant, à contre-courant, qui conduit à l'évaporation progressive du solvant (désolvatation). La taille des gouttelettes est alors diminuée et la densité des charges au sein de la solution est augmentée. Plusieurs étapes de désintégration progressive génèrent des gouttelettes de plus en plus petites et la densité de charge dans la gouttelette devient telle que le champ électrique local, très intense, conduit à la désorption des ions par effet de champ. Ce mécanisme est entre autre responsable du chargement des gouttelettes, avant l'introduction dans l'analyseur du MS (Ikonomou et al., 1991). Cela

se traduit par la production d'ions en phase gazeuse, physiquement intacts, pouvant porter plusieurs charges.

Dans la technique d'ionisation chimique à pression atmosphérique APCI, l'ionisation prend place à pression atmosphérique et les ions sont extraits dans le spectromètre de masse exactement par le même ensemble d'écumoirs, utilisés pour la technique ESI. La technique est basée sur la source API originale, développée par le groupe de Horning (1973). En APCI, il n'existe pas de voltage appliqué sur le capillaire. Le liquide élué du capillaire dans la chambre de vaporisation chauffée (jusqu'à 500°C). Dans celle-ci, il est introduit dans un nébuliseur pneumatique et enveloppé par un jet d'azote à haute vitesse. La combinaison du gaz nébuliseur et de la chaleur forme un aérosol qui est rapidement évaporé. À la sortie du tube vaporisateur vers l'entrée du MS, une aiguille métallique à haut voltage, agit comme une contre-électrode à décharge-couronne (*corona discharge needle*). Elle produit une décharge électrique lumineuse de 2-3 μA , source d'électrons pour le processus d'ionisation en APCI.

Par comparaison, les ions sont formés par la chimie en solution, dans le processus de l'ESI. Ils sont émis à partir des gouttelettes formées vers la phase gazeuse. En APCI, les ions sont formés par la chimie en phase gazeuse, par décharges-couronne sur un aérosol de solvant (Niessen, 1999). À l'inverse de la technique ESI, l'APCI peut-être utilisée à débit plus élevé.

La désolvatation et la vaporisation des gouttelettes sont des processus rapides. Ceci minimise la décomposition thermique des molécules fragiles et thermolabiles et de ce fait, permet leur détection et leur analyse ainsi que la préservation des espèces

moléculaires. De plus, les interactions non covalentes peuvent survivre à la transition depuis la solution vers la phase gazeuse pour être détectés intacts.

On note souvent la formation d'adduits des molécules dans les processus API, une sorte de solvatation en phase gazeuse (Syage et al., 2004). Tous les ions sont susceptibles de s'associer à des molécules polaires pour former des adduits avec des ions présents en solution et provenant de la phase mobile, e.g. eau, méthanol, acétonitrile, acétate, ammonium, sodium, potassium, etc. Ce processus est favorisé par la formation éventuelle de liaisons hydrogène.

Concernant l'atome d'étain, sa masse atomique est de 118,71 u.a.m. (unité de masse atomique *amu*) et il possède plusieurs isotopes, dont 10 sont stables et observables en spectrométrie de masse. Ceux-ci se présentent sous une distribution caractéristique, présentée dans la figure 4, très utile pour l'identification des composés de l'étain. Pour chaque composé de l'étain (organoétains), correspondant à des groupements organiques liés à l'atome de l'étain, des groupes de masses distinctifs (agrégats ou *cluster*) sont produits en spectrométrie de masse. La plupart des études font le suivi des isotopes les plus abondants; ^{120}Sn , ^{118}Sn et ^{116}Sn .

Des adduits à la phase mobile sont également observés lors de l'analyse des organoétains en LC-API-MS, tel que signalé par certains auteurs (e.g. Lawson et Ostah, 1994; Gonzalez-Toledo et al., 2003). Ces ions peuvent être plus important que les ions moléculaires. Par exemple, si le méthanol (MeOH) est utilisé dans l'éluant, pour la molécule de chlorure de TBT, un groupe de masse avec le patron isotopique de Sn est observé à m/z 323 en mode d'ionisation positive du MS (voir chapitre 1). Ce cation est attribué à l'addition d'une molécule de MeOH à l'ion moléculaire du chlorure de TBT (m/z 291).

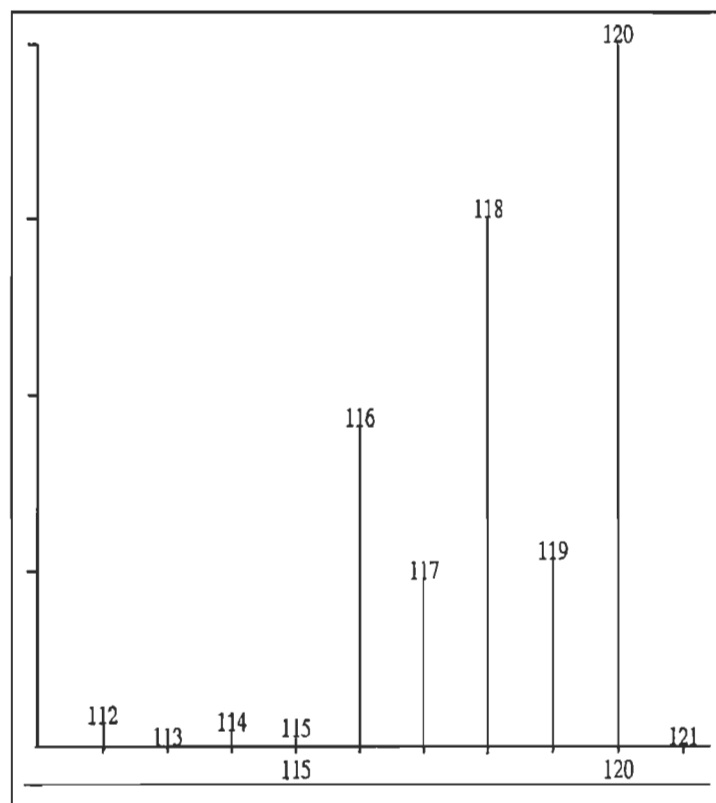


Figure 4. Distribution isotopique caractéristique de l'atome d'étain.

CHAPITRE I

DETERMINATION OF TRIBUTYLTIN AND 4-HYDROXYBUTYLDIBUTYLTIN CHLORIDES IN SEAWATER BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION-MASS SPECTROMETRY.

K. Békri, R. Saint-Louis, É. Pelletier.

(Adapté de *Analytica Chimica Acta*, **578**: 203-212, 2006)

Résumé

Une méthode de chromatographie liquide est décrite pour la détermination simultanée du tributylétain (TBT) et du composé intermédiaire hydroxylé, le 4-hydroxybutyldibutylétain (OHBuDBT). La séparation a été réalisée en phase inversée sur une colonne cyanopropyl avec un gradient d'élution. Plusieurs solvants organiques et additifs ont été testés et la composition optimale de la phase mobile comporte du méthanol, de l'eau et de l'acide formique, ainsi que du tropolone comme agent complexant. La détection des butylétains a été réalisée à l'aide d'une trappe ionique spectromètre de masse couplée au chromatographe liquide par une interface d'ionisation chimique à pression atmosphérique (LC-APCI-MS). L'identification et le patron de fragmentation du chlorure de OHBuDBT en mode de balayage complet d'ions et par MS/MS sont reportés pour la première fois en utilisant la LC-APCI-MS. Le spectre de masse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) du même composé est également présenté pour la première fois pour fin de comparaison. La limite de détection de cette méthode est de 35 et 26 ng mL⁻¹ pour le TBT et l'OHBuDBT, respectivement, en se basant sur des injections successives de 10 µL du blanc d'extraction d'eau de mer. Un protocole d'extraction liquide-liquide, utilisant de l'hexane et de l'acétate d'éthyle, a été développé pour l'extraction simultanée et l'analyse des chlorures de TBT et de l'OHBuDBT dans de l'eau de mer naturelle. Cette méthode a donné des taux de récupération de 72 à 96% pour les deux composés, à trois différents niveaux de contamination.

Abstract

A liquid chromatographic method is described for the simultaneous determination of tributyltin (TBT) and the hydroxylated intermediate 4-hydroxybutyldibutyltin (OHBuDBT). Separation was achieved in reverse phase mode on a cyanopropyl-bonded silica column under a gradient elution. Various organic solvents and additives were tested and the optimum composition of the mobile phase contained methanol, water, formic acid and tropolone as a complexing agent. Butyltin compounds were detected with an ion trap mass spectrometer interfaced to a liquid chromatograph with an atmospheric pressure chemical ionisation source (LC-APCI-MS). Identification and fragmentation pattern of OHBuDBT chloride in full scan MS and MS/MS are reported for the first time using LC-APCI-MS. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) spectrum of the same compound is also reported for the first time for comparison purpose. This method allowed limits of detection (LOD) of 35 and 26 ng mL⁻¹ for TBT and OHBuDBT, respectively, based on successive injections of 10 µL of blank seawater extract. A liquid-liquid extraction procedure using *n*-hexane-ethyl acetate was developed for the simultaneous analysis of TBT and OHBuDBT chlorides in natural seawater and allowed average recoveries from 72 to 96% for the two compounds at three different spiking levels.

1. Introduction

Tributyltin (TBT) is a pesticide used as an anti-fouling agent in paints applied on ship hulls. Introduced on the market in the late 1960s, TBT paints found a world wide application up to early 2000s, but their total ban is scheduled in 2008 by the maritime industry because of their very high toxicity toward aquatic life and under legal pressure by governments of many countries [1]. The legacy of 30 years of continuous and intensive uses of TBT paints is some highly contaminated sediments in marine environments directly impacted by the shipping industries, commercial harbours and intense recreational boating activities. Degradation of TBT in sediments into less toxic monobutyltin and inorganic tin is a slow process, especially in cold waters where its half-life is estimated to be decades [2]. Chemical and biological mechanisms are involved in the degradation process of TBT and many intermediate metabolites are produced on the way to complete dealkylation of the tin atom. Hydroxylated intermediates at positions 1 to 4 of one of the butyl groups from *in vivo* and *in vitro* metabolism by microsomal cytochrome P450 - dependent monooxygenase enzyme were reported [3-11]. Although these polar compounds are suspected to be produced *in situ* [9,11-13], their behaviour in seawater and sediment is completely unknown, but expected to be different from the parent TBT. More polar and water soluble intermediates can generate a positive gradient from the solid phase to porewater and then to the seawater column, and a re-introduction of organotins in the marine environment could occur. Thus, improved analytical methods for monitoring low quantities of TBT polar metabolites in porewater and seawater are needed to understand the long-term fate of this widespread pollutant of aquatic environments. Toxicological studies on metabolism of TBT also request the analysis of low quantities of hydroxylated metabolites in strong ionic biological fluids such as blood from fish and coelomic liquid from marine invertebrates.

Concentrations for TBT chloride in natural seawater were reported to be around 100 ng L⁻¹ as TBT cation, at relatively highly polluted sites, and sometimes rose above 200 ng L⁻¹ [9]. Hydroxylated compounds of TBT are not commonly assessed, but Suzuki et al. [9] reported levels around 14 ng L⁻¹ for 4-hydroxybutyldibutyltin chloride in Aburatsubo Bay, Japan. Up to now, the identification of hydroxylated, oxo-compounds and carboxylated derivatives of TBT has been performed by retention time comparison with synthesized standards by gas chromatography-helium atmospheric pressure microwave induced plasma-atomic emission detection using four different gas chromatographic columns [9]. Mass spectra of hydroxylated derivatives of TBT have never been reported while mass spectra of hydroxylated and carboxylated derivatives of dibutyltin (DBT) have been published [8,14]. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry via atmospheric pressure ionization (LC-API-MS) was more recently applied with success to the study of organotin compounds, without the need for derivatization [15-18]. This tool is considered as a soft ionization technique and can provide helpful information on the structure of elusive molecules. The use of LC-API-MS is still in improvement for environmental studies where complex matrices such as seawater and biological extracts are involved.

As the identification of TBT hydroxylated products with LC-MS has not been yet reported, our aim was to develop a high-performance liquid chromatography method for the separation and characterization of hydroxybutyldibutyltin (OHBuDBT) from TBT compound and from the dealkylated by-product DBT using atmospheric pressure chemical ionization and mass spectrometry (LC-APCI-MS). To illustrate a practical application of the developed LC-MS method, a simple and efficient extraction protocol for TBT and OHBuDBT from natural seawater without derivatization or hydrolysis is proposed. Separation and detection of DBT is also discussed.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions.

Authentic standards of tri-*n*-butyltin chloride (96%) and di-*n*-butyltin dichloride (96%) were purchased from Aldrich chemical Co (Milwaukee, WI, USA). Compound 4-hydroxybutyldibutyltin chloride was synthesized according to the method of Fish et al. [3] with some modifications. Reagents 3-buten-1-ol (96%), benzoyl peroxide (97%), sodium borohydride (NaBH_4 , 99%), tropolone (2-hydroxy-2,4,6-cycloheptatrienone, 98%) were bought from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA) and sodium tetraethylborate (NaBEt_4 min. 98%) was obtained from Strem Chemicals (Newburyport, MA, USA). Ultrapure Milli-Q water with $18.3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ resistivity was used (NANOpure Infinity™, Barnstead, Dubuque, IA, USA). Organic solvents were HPLC grade and all other chemicals were reagent grade or better. Nitrogen gas was of HP+ grade.

Butyltin stock solutions (TBT, DBT and OHBuDBT chlorides) were prepared by dissolving corresponding chloride salts in methanol (MeOH) and stored at 4°C in amber glass bottles. Working standard solutions ($10\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared weekly by dilution of stock solutions in MeOH. Subsequent dilutions and standards for calibration curves were daily prepared. Concentrations used in the text refer to the butyltin ions without their associated chlorine atoms and were corrected for purity.

All glassware used in the experiments were soaked in 10% nitric acid for 24h and rinsed with deionised water.

2.2. Equipment

2.2.1. GC-MS

Monitoring of OHBuDBT chloride synthesis was achieved by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) performed on a Finnigan PolarisQ ion trap (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an autosampler, using a DB-5 MS® fused silica capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA; length, 30 m x 0.32 mm i.d.). Identification and quantification were conducted in the segmented scan mode of the full scan, with a mass-to-charge ratio range from 100 to 400.

2.2.2. Infrared spectroscopy

Infrared (IR) spectra were recorded on a FTIR 1605 Perkin-Elmer spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

2.2.3. LC-APCI-MS

Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS) was used for the determination of the compounds. The mobile phase was delivered by a high pressure liquid chromatograph (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipped with a Surveyor® LC Pump and Autosampler and fitted with a 20 µL injection loop. The HPLC system was coupled to a LCQ Advantage® ion trap mass spectrometer also from ThermoFinnigan (USA), interfaced with an APCI probe. Xcalibur™ software (revision 1.3) was used to operate the system and for data acquisition and processing.

2.2.3.1. Chromatographic conditions

DBT having chemical characteristics and a chromatographic behaviour different from those of TBT and OHBuDBT, particular chromatographic conditions were used for its elution. Separation of butyltins was performed using a Discovery® Cyano (50 x 2.1 mm i.d., 5 μ m) analytical column, coupled to a Discovery® Cyano cartridge of the same material (20 x 2.1 mm i.d., 5 μ m) as a guard column, both from Supelco (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA). Separation was performed using a mobile phase consisting of methanol (MeOH), water and MeOH-formic acid-water (75:5:20) (MEF), supplied by three different channels of the quaternary LCQ™ pump. The column was equilibrated with 50% MeOH/50% water for at least 1 h before a chromatographic run. The gradient program of elution used at a constant flow rate of 0.2 mL min⁻¹ appears in Table 1. The column oven temperature was kept at 35°C and the injection volume was settled at 10 μ L in the full loop mode, with vials kept at 20°C in the autosampler.

With the former mobile phase, DBT does not produce any detectable peak, being strongly adsorbed on the column. For its elution, the addition of tropolone as a polar modifier in the MEF at 0.005% (w/v) was found to be efficient. Otherwise, the same gradient was maintained, with the extension of the plateau of 60% MeOH/40% MEF tropolone between 5 and 13 min, and increasing total run time to 35 min. Analysis of DBT directly with APCI-MS was assayed, bypassing the chromatographic column, and using an isocratic mode of elution (60% MeOH/40% MEF 0.005% tropolone). This method was used to accurately determine the yield of OHBuDBT synthesis.

2.2.3.2. Mass spectrometer conditions

The characterization of analytes was performed with the operating parameters summarized in Table 1. The source and mass spectrometer parameters were optimized by introducing standards (5 μ g mL⁻¹ in MeOH) of each compound directly to the APCI-

MS, using the LC continuous flow mode (MeOH/water 50:50 for TBT and OHBuDBT; MeOH/MEF tropolone 50:50 for DBT), bypassing the chromatographic column, and activating the automatic tune option of the software. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode with an ion injection time of 200 ms. To increase selectivity, the mass spectrometer was programmed to switch between two segments of time, with different APCI-MS parameters, continuing sequentially to the end of run time as described in Table 1. Chromatograms were recorded under the full scan mode, over a range of m/z 240-500. Detection and quantitative measurements were carried out using specific ions m/z 323 and 307 as base peaks to monitor TBT and OHBuDBT, respectively, and m/z 355 for DBT.

2.2.3.3. Quantification

Quantitative determination of analytes was performed by an external standard method. A linear calibration curve established from peak area versus concentrations with six to seven calibration points was bracketed within each sequence. The concentrations in standard solutions ranged from 50 to 3000 ng mL⁻¹ for TBT and OHBuDBT, and linear regression showed r^2 better than 0.982.

2.3. Synthesis of 4-hydroxybutyldibutyltin chloride (4-OHBuDBTCl)

Standards of hydroxylated products of TBT being not commercially available, the 4-OHBuDBTCl was prepared according to the method of Fish et al. [3] with following modifications. Dibutyltin dihydride (DBTH₂) was prepared by reduction of the corresponding dibutyltin dichloride (DBTCl₂) with NaBH₄ in pentane rather than lithium aluminium hydride. Then DBTH₂ was reacted with the DBTCl₂ to produce *in situ* dibutylchlorotin hydride. To this product was added 3-buten-1-ol with benzoyl

Table 1. Optimized APCI-MS operating conditions for TBT, OHBuDBT (segment 1) and DBT (segment 2) analysis and the LC gradient program of elution.

	Value		
Parameter	Segment 1 (0-4 min)	Segment 2 (4-35 min)	
Sheath gas flow, N ₂	54 arbitrary units	96 arbitrary units	
Auxiliary gas flow, N ₂	4 arbitrary units	14 arbitrary units	
Capillary temperature/°C	160	160	
Capillary voltage/V	11	14.5	
Source voltage/kV	6	6	
Source current/μA	5	5	
Source vaporizer temperature/°C	400	400	
Mobile phase gradient program			
Time (min)	MeOH (%)	MEF (%)	Water (%)
0.00	50	0	50
4.00	95	0	5
5.00	60	40	0
8.00	60	40	0
9.00	50	0	50
30.00	50	0	50

peroxide as a free radical initiator in replacement of azo-bis-isobutyronitrile proposed by Fish et al. [3]. The disappearance of the Sn-H stretching band at 1850 cm^{-1} was followed by IR spectroscopy in deuterated chloroform (CDCl_3) solution.

Attempts to purify 4-OHBuDBTCl with the procedure of Fish et al. [3] using silica gel with diisopropyl ether-acetic acid (99:1), or by the method reported by Ishizaka et al. [14] using *n*-hexane-isopropylether (80:20), were unsuccessful due to the co-elution of unreacted DBTCl₂ with the hydroxybutyl derivative. The yield of 4-OHBuDBTCl was estimated to be 64% in the reaction mixture by subtracting the amount of unreacted and side-product DBT species contained in the reaction mixture, as determined by LC-APCI-MS from the initial amounts of DBTCl₂ and DBTH₂ used in the reaction mixture. The flask with the reaction mixture was kept under argon and preserved at -80°C for months without noticeable changes. A standard solution of $2000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ prepared in MeOH was maintained at 4°C for all the experiments and was stable for months.

2.4. Seawater extraction procedure

To illustrate a practical application of the developed LC-APCI-MS method, a liquid-liquid extraction procedure was developed to recover TBT and OHBuDBT from spiked seawater samples. Natural seawater of salinity 29 psu (practical salinity units) was filtered through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ filter and stored at 4°C in the dark before use. To 5 mL of seawater in 15 mL glass tube, TBT and OHBuDBT chlorides were added together at three different concentrations; 0.02, 0.2 and $0.4\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound. These concentrations correspond, respectively, to 0.1, 1.0 and $2.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ levels in a final volume of 1 mL after sample processing. Blank seawater extracts were also determined. A sample of 100 mL seawater was spiked at $0.2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound and then 12 replicate samples of 5 mL were extracted for repeatability study (as intra

day precision). The solution was allowed to equilibrate for 30 min on a rotary shaker in the dark. Samples were then acidified to pH 4 with 15 μ L of 1N HCl. Extraction was performed by adding 1.5 mL of n-hexane-EtOAc (70:30) and shaking mechanically for 10 min. Samples were centrifuged for 2 min at 3000 rpm, cooled on ice (2 min) to allow a phase separation, and centrifuged again for 2 min. The organic layer was recovered and a second extraction was performed with 2 mL of n-hexane- EtOAc (80:20) for an additional 10 min on a mechanical shaker. The organic layer was recovered and combined with the first extract. This organic phase was then washed with 1.25 mL of Milli-Q water to eliminate most sea salts and other water soluble residues. After mechanical shaking for 10 min, centrifugation and cooling as before, the organic layer was transferred to a precision tube and concentrated nearly to dryness at 30°C, under a gentle stream of nitrogen. Samples were then dissolved in methanol to 1.0 mL final volume before chromatographic separation.

3. Results and discussion

3.1. Mass spectra description

In the following discussion of mass spectra, the m/z ratio of each peak cluster (with a characteristic tin isotope pattern) refers to the most intense ion corresponding to isotope ^{120}Sn . Fig. 1 illustrates the mass spectra of OHBuDBT, TBT and DBT. All m/z ions were investigated by MS/MS.

The most intense cluster observed for OHBuDBT, with different mobile phases and operating conditions of the APCI-MS, is the ion $[\text{OHBuDBT}]^+$. Under optimized conditions of the ion source, the mass spectrum obtained for OHBuDBT exhibited intense m/z 307 peak (Fig. 1A) attributable to the loss of one chlorine atom from the hydroxybutyldibutyltin chloride $[\text{M}-\text{Cl}]^+$.

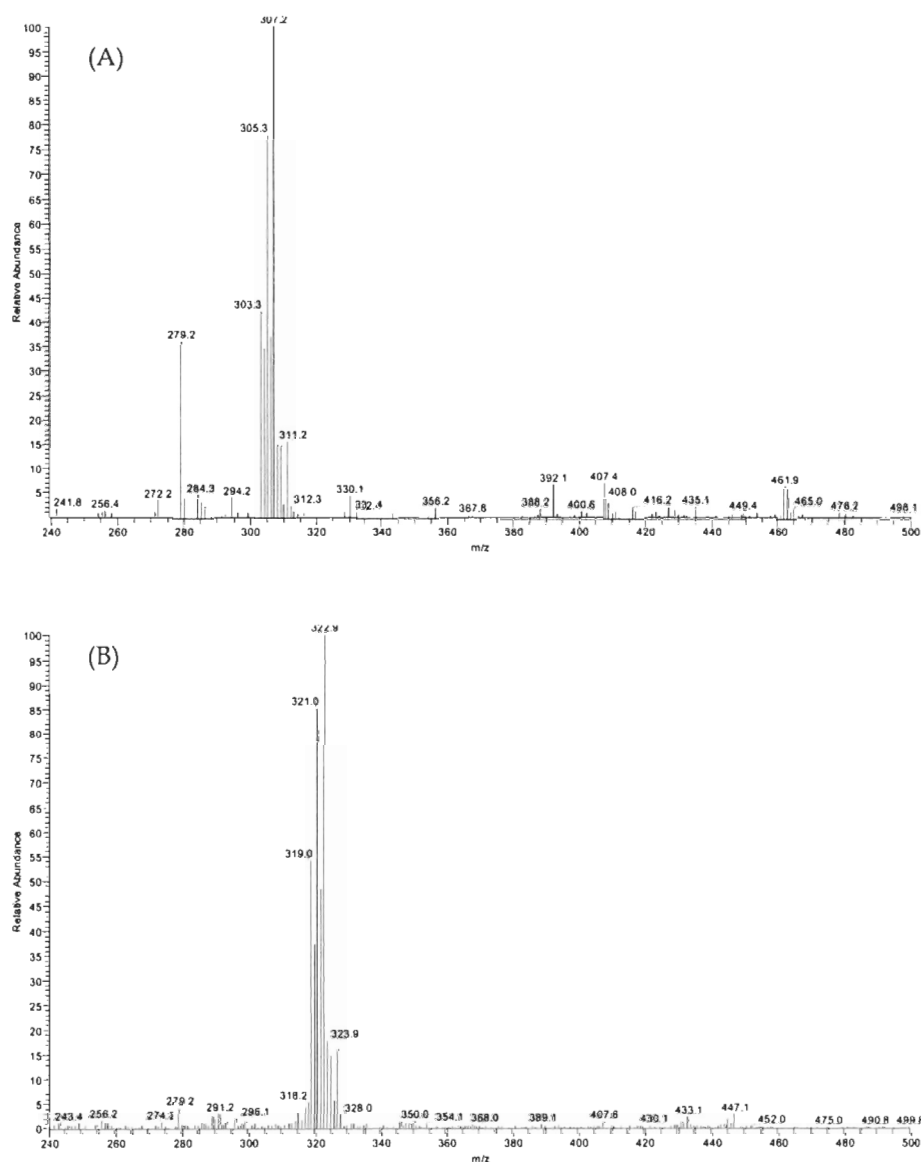


Fig. 1. Mass spectra showing the main ion group of OHBuDBT (A), TBT (B) and DBT (C, using mobile phase without tropolone and D, using tropolone in the mobile phase) acquired in the positive mode of full scan of the MS using the APCI source of the LC-MS.

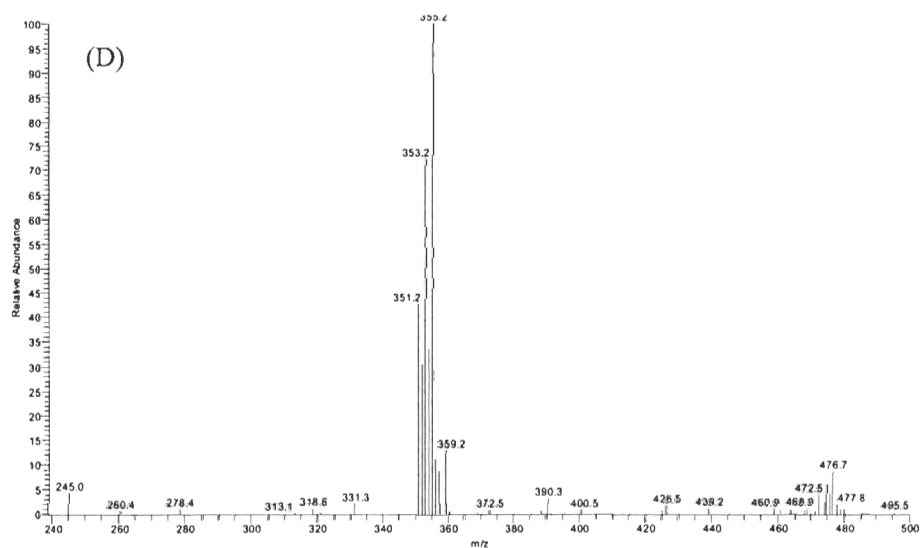
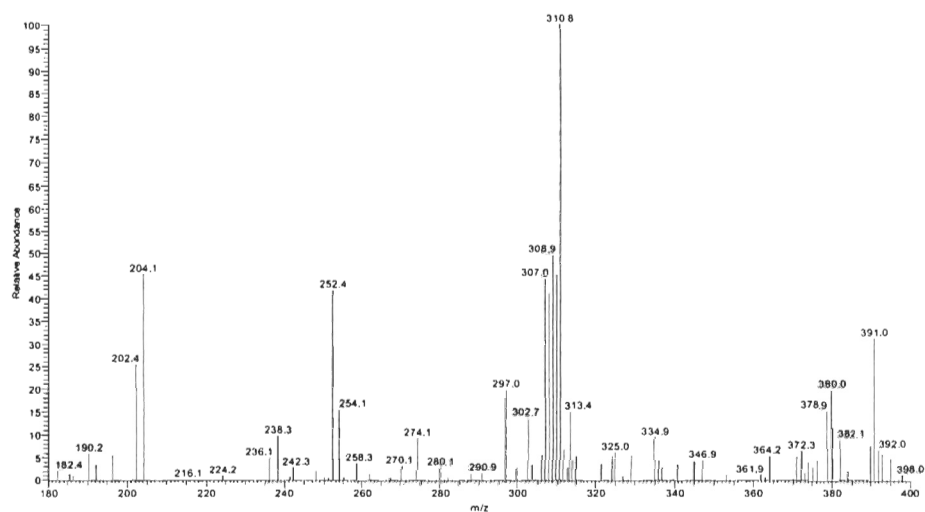


Fig. 1. (Continued).

Results of GC-MS and LC-APCI-MS analysis confirmed the identity of the investigated compound was the OHBuDBT. The GC-MS spectrum, as shown in Fig. 2A, illustrates m/z fragment peaks from successive losses of the butylated and/or the ethylated group, which are characteristic of the ethylated product. Fig. 2B shows the chemical structure and main fragmentation of the OHBuDBT diluted in MeOH and acquired in APCI positive ion mode in the full scan mode of the MS/MS, with a relative collision energy (CID) of 30-40 on the m/z 305 and $m/z = 10$ mass isolation width, between m/z 100-340. This process provides a further confirmation of the identity of the OHBuDBT. All m/z ions and fragments were investigated by MS/MS full scan. On the other hand, OHBuDBT was also prepared in MeOH, in acetonitrile and in water to confirm the identity of fragment ions. The spectrum shows breakdown ions: 283, 268, 251, 235, 212, 195, 177, 135 and all of them exhibit the typical tin isotopic pattern. The m/z 283 results from the loss of one butyl group and the addition of one MeOH and one proton $[M-Cl-C_4H_9+MeOH+H]^+$; The m/z 268 is attributed to the loss of one butyl group of the OHBuDBT cation with an addition of a hydroxyl group from the mobile phase and the addition of one proton $[M-Cl-C_4H_9+OH+H]^+$; m/z 251, the most abundant fragment, resulted from the loss of one butyl group from OHBuDBT cation and the addition of one proton $[M-Cl-C_4H_9+H]^+$; m/z 235 corresponds to the loss of a butanol group from the OHBuDBT and the addition of one proton $[M-Cl-C_4H_8OH+H]^+$; m/z 212 is produced by the loss of two butyl groups from the OHBuDBT cation and the addition of a hydroxyl group from the mobile phase and two protons $[M-Cl-2 C_4H_9+OH+2H]^+$; m/z 195 is produced by a loss of two butyl groups from OHBuDBT cation and the addition of two protons $[M-Cl-2 C_4H_9+2H]^+$; finally, m/z 177 is attributed to the loss of a butyl group and a butanol group from the OHBuDBT cation $[M-Cl-C_4H_9-C_4H_8OH]^+$. The mass spectrum of OHBuDBT acquired by APCI-MS/MS is mainly similar to that obtained by GC-MS. Most of the cluster ions are present in both spectra with few differences mainly due to the difference in the

ionisation mode between the two processes and to the derivatization process in GC-MS analysis.

For TBT (mol. wt = 326 Da, M is referring to [TBTCl]), the base peak ion m/z 323 is attributed to the loss of a chlorine atom from the tributyltin chloride molecule and formation of an adduct ion with MeOH $[M-Cl+MeOH]^+$ (Fig. 1B).

DBT (mol. wt = 304 Da) exhibited an intense ion cluster at m/z 311 from the loss of two chlorine atoms and the addition of one MeOH and formate $[M-2Cl+MeOH+HCO_2]^+$ (Fig. 1C). With the use of tropolone in the mobile phase, spectra presented more stable base ion at m/z 355 corresponding to the loss of two chlorine atoms from $DBTCl_2$ and the addition of one tropolonium ion and one proton $[M-2Cl+C_7H_5O_2+H]^+$ (Fig. 1D). Additional m/z 477 of lower intensity was observed, corresponding to an adduct ion with two tropolonium ions $[M-2Cl+2(C_7H_5O_2)]^+$.

Finally, some interfering ions such as m/z 279, 295, 338 and 391 from the mobile phase and the polyether ether ketone (PEEK) capillary tubing were present in the spectrum of all the injected samples, including the solvent blanks. These background ions were sometimes present at a higher intensity than the base ions of the investigated analytes. Otherwise, they were generally not present in the subtracted spectra of the analytes when using the background subtraction tool of the Xcalibur™ software.

3.2. Optimization of chromatographic separation

Different analytical columns have been described in the literature for organotin analysis by LC-APCI-MS [15-18]. In the present study, a cyanopropyl bonded silica column was used especially to improve the elution of DBT as this stationary phase was used successfully in the past by other authors [19,20] for the separation of organotin compounds by liquid chromatography. In order to optimize the separation of the three compounds of interest, a series of trials were performed to adjust the composition of

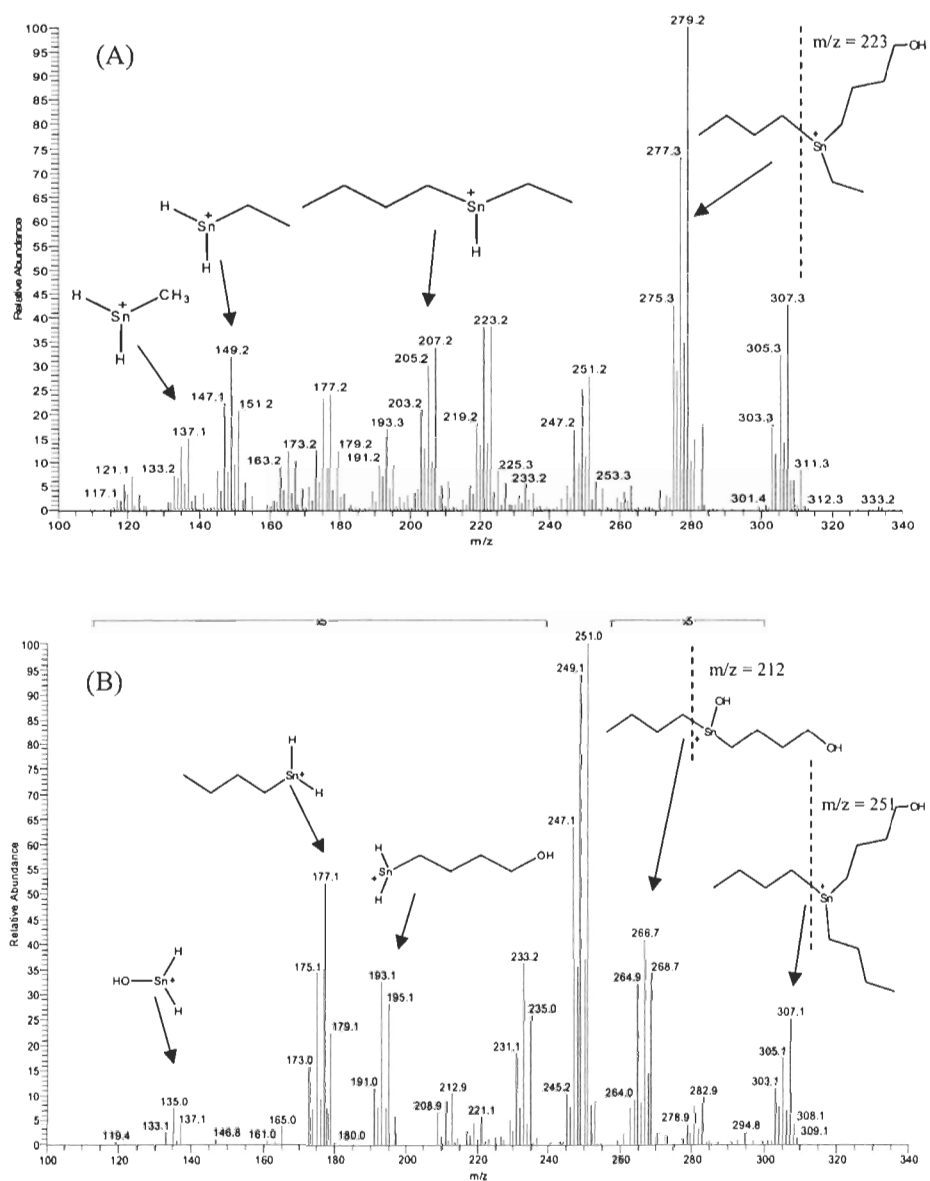


Fig. 2. GC-MS mass spectrum (A) and APCI-MS/MS spectrum (B) of 4-OHBuDBT acquired in the full scan mode.

the mobile phase and the gradient of elution. MeOH was used as an organic modifier giving a higher sensitivity with the APCI source. For TBT and OHBuDBT, whichever the eluent used, peaks displayed a regular shape and eluted from the stationary phase without tailing. However, DBT presented a number analytical problems. Its elution was hardly obtained as it adsorbed strongly to the active sites of the column. Most studies using HPLC encountered problems associated with the adsorption of alkyltin chlorides or related compounds by residual silanol groups, making tailing problems [21].

The use of volatile ion-pairing reagents (e.g. acids) and chelating agents helps to reduce tailing due to adsorption to residual silanol groups present on columns. The reactivity of tin atom is considerably reduced in chelates where it is six coordinated [20]. The use of low volatility ion-pairing reagents and complexing agents is not recommended with APCI-MS system. However, like other authors [16,19], elution and detection of DBT were achieved by incorporating tropolone (0.005% w/v) to the MEF (MeOH, water and formic acid). So, chromatographic separation was performed using a gradient of MeOH, water and MEF (75:20:5, with or without tropolone) supplied by three different channels, as given in the experimental section. Butyltins eluted in the order OHBuDBT (around RT = 1.70 min), TBT (around RT = 1.90 min) and DBT was eluted at a RT around 10.40 min when using tropolone. Fig. 3A illustrates a typical chromatogram of 20 ng on column of each compound. The peak appearing around 1.26 min corresponds to the solvent front. For HPLC users, resolution of TBT and OHBuDBT peaks may appear relatively poor. One must take into account that MS can differentiate between compounds by their m/z signal if they can not be separated chromatographically. An improved resolution of TBT and OHBuDBT peaks can be achieved by increasing the duration of the gradient MeOH/water in the beginning of elution. However, this resulted in higher retention times and longer run time (> 30 min).

After repeated injections, tropolone overloaded the column and enhanced the spectral background. Direct injection to the APCI-MS, bypassing chromatographic column, was examined for DBT analysis. This mode gave reproducible results similar to those with LC-APCI-MS (results not shown). Tropolone was no longer used for chromatography as it was not suitable for routine analysis.

The chromatography of analytes was then focussed on the determination of TBT and OHBuDBT. Fig 3B shows one of the representative chromatograms of blank seawater extracts and Fig. 3C shows a chromatogram of extract of $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ spiked seawater. After each chromatographic run and sample analysis, the column was washed for at least 30 min at 0.4 mL min^{-1} with 40% MEF/60% MeOH and an additional 30 min at the same flow rate with 50% MeOH/50% water. In this manner, the overloading of DBT on the column and build up on the capillary inlet and the cone voltage can be avoided.

Many authors [15,22] used a 10% acetic acid to overcome the adsorption problem and to improve DBT peak shape. Increasing acid content was out of the specifications of the column manufacturer. Even 2% acetic acid generated unwanted behaviour that can lead to the damage of source components: generation of sparkles on the cone and an electric arch between the cone and the skimmer, thus resulting in an overall loss in sensitivity. Wahlen and Catterick [22] working on organotin compounds proposed the use of stationary phase with lower nominal silanol activity, and a reduced particle size ($3 \mu\text{m}$). Future improvement could come through the choice of mixed-mode stationary phases. They can separate a wide range of polar and non-polar compounds by different separation modes, based only on eluent selection. Ionizable compounds interact with the stationary phase by reversed-phase, ion-exchange or ion-exclusion mechanisms.

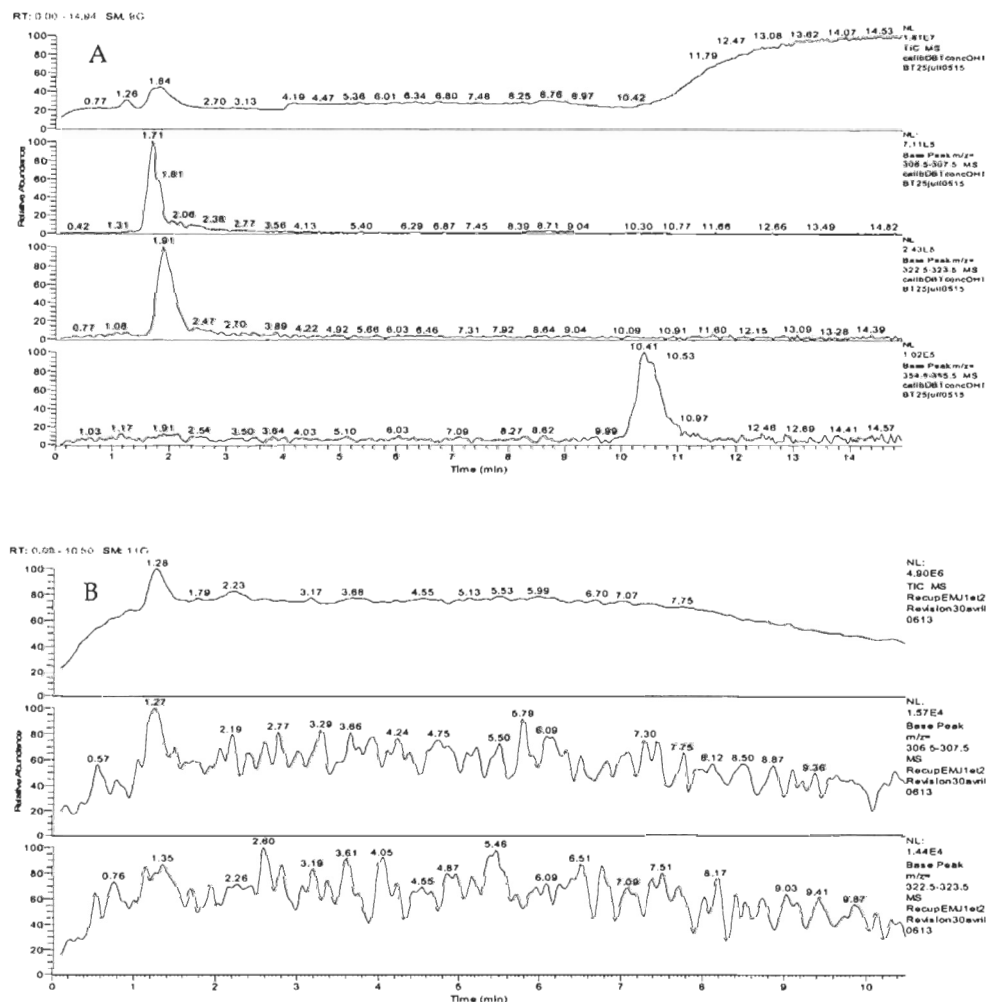


Fig. 3. Typical LC-APCI-MS chromatograms for (A) butyltin standard (2 µg mL⁻¹) using a Discovery® Cyano column: OHBuDBT (RT= 1.71 min); TBT (RT = 1.91 min) and DBT (RT = 10.41 min); (B) analytical blank extract, and (C) a sample of seawater spiked at 0.4 µg mL⁻¹ of both analytes (RT= 3.31 min for OHBuDBT and RT = 3.96 min for TBT).

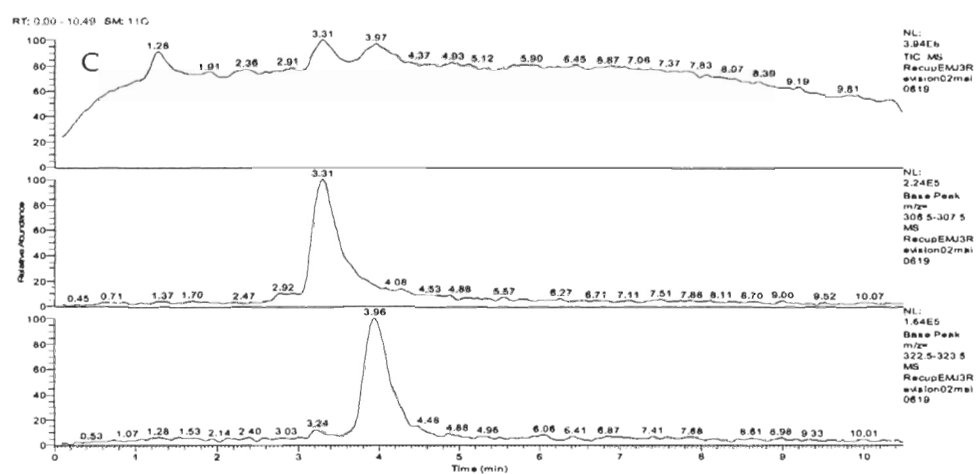


Fig. 3. (Continued)

3.3. Analytical performance

The precision of the method was determined by repeatability and reproducibility studies, expressed as the percent of the relative standard deviation (RSD%). Repeatability was assessed by extraction and analysis on the same day of seawater spiked at $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 12$ sample extraction replicates), and RSD% was 20% for TBT and 18% for OHBuDBT. The between-day precision (reproducibility) was tested by extraction and analysis of 5 mL seawater samples spiked at the same concentrations of the recoveries, for three alternate days. Replicated ($n = 9$ and 18) samples were all run and the RSD% value was calculated for each compound (Table 2).

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated according to Currie [23] using the standard deviation of the blank extract SB of 12 replicates (Table 2). With an injection volume of $10 \mu\text{L}$, LOD values are 35 ng mL^{-1} for TBT (350 pg injected) and 26 ng mL^{-1} for OHBuDBT (or 260 pg injected). These values correspond to 143 pg TBT as S_n and to 101 pg OHBuDBT as S_n . The limits of quantification (LOQ) were 79 ng mL^{-1} for TBT and 98 ng mL^{-1} for OHBuDBT. From a practical point of view, these LOQ mean that the method can quantify about 0.08 to $0.1 \mu\text{g}$ of each compound in one litre of seawater. These values are in the range of reported LODs for butyltins in LC-MS. White et al. [15] reported a LOD (based on a $50 \mu\text{L}$ injection volume) of approximately 100 ng mL^{-1} for TBT and DBT, in SIM mode, for extracts from sediment with LC-APCI-MS. Jones-Lepp et al. [16] obtained a LOD of 780 pg for TBT and 970 pg for DBT analyzed by $\mu\text{-LC-ESI-MS}$ in the full scan mode. Using LC-APCI-MS in the full scan mode, Rosenberg et al. [17] reported a LOD of 750 pg for TBT and 1600 pg for DBT. González-Toledo et al. [18] reported a mass detection limit of 200 pg TBT as S_n and a LOQ of 800 pg for a $100 \mu\text{L}$ injection volume using LC-ESI-MS in SIM mode.

Table 2. Mean extraction recoveries ($\pm$ S.D.) and RSD% from seawater samples before and after extraction at spiking levels 0.02, 0.2 and 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and calibration curve parameters for TBT and OHBuDBT limits of detection (LOD) and quantification (LOQ).

Seawater samples (5 mL) (Recovery levels in 1 mL final volume)	TBT			OHBuDBT		
	Concentration found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD%	Recoveries (%)	Concentration found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD%	Recoveries (%)
0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (9)	0.082 ± 0.023	28	87 ± 7	0.097 ± 0.023	24	84 ± 15
1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (9)	0.744 ± 0.114	15	82 ± 15	0.861 ± 0.162	19	96 ± 24
2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (18)	1.487 ± 0.454	31	72 ± 20	1.908 ± 0.258	14	94 ± 11
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (12)		0.035			0.026	
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (12)		0.079			0.098	
Calibration curves						
Slope		2.26×10^6			1.91×10^6	
Intercept		-1.04×10^4			5.61×10^4	
Correlation coefficient		0.9979			0.9982	

Numbers in parentheses are replicates number.

3.4. Extraction recoveries.

In conjunction with this new LC-APCI-MS method, an extraction protocol was developed for the analysis of TBT and OHBuDBT in a natural seawater matrix where both molecules can be present at low concentrations during a phase I biodegradation process. Preliminary attempts to a simultaneous extraction of both compounds showed that neutral solvents such as *n*-hexane extracted over 86% of TBT but less than 15% of OHBuDBT, whereas more polar solvents such as diethyl ether (Et₂O) and ethyl acetate (EtOAc) extracted over 80% of OHBuDBT, but less than 30% of TBT.

Using two successive extractions with *n*-hexane:EtOAc (70:30) and (80:20) as described in the experimental section, the mean extraction recoveries (three spiking levels in triplicate for three non consecutive days) were in the range 72 to 96 % for the two compounds (Table 2). The reproducibilities of this method represented by the RSD% at each fortification level are summarized in Table 2.

4. Conclusion

Hydroxybutyldibutyltin chloride and tributyltin chloride have been successfully separated and quantified with a new LC-APCI-MS method developed in the course of this work. A liquid-liquid extraction method was successful to simultaneously extract TBT and OHBuDBT from seawater with good recoveries and reproducibility. Cyanopropyl-bonded phase provided excellent peak shapes, good selectivity and fast separation of the related compounds using gradient elution. The main advantage of the method is the simultaneous and direct analysis of hydroxybutyldibutyltin and TBT without derivatization. This method is currently used in studying phase I metabolism of TBT by bivalves and fish where hydroxybutyldibutyltin is expected to be found in a conjugated form.

Acknowledgements

This work was supported in part by a Discovery operating grant (É.P.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by the Canadian Research Chair Program (É. P.).

Authors thank D. Bérubé (Chemistry and Biology Department of University of Québec at Rimouski) for the infrared spectroscopy in OHBuDBTCl synthesis. Thanks are also due to G. Canuel and J. Morissette for their technical supports, and M.-A. Dion for helpful suggestions in liquid extraction.

References

- [1] IMO meetings. Focus on IMO, Antifouling systems: moving toward the non-toxic solution. Report of International Maritime Organisation, UK, April 1999.
[<http://www.imo.org/imo/meetings/assembly/21/listsumm.htm>].
- [2] L. Viglino, É. Pelletier, R. St-Louis, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (2004) 2673.
- [3] R. H. Fish, E. C. Kimmel, J. E. Casida, *J. Organomet. Chem.*, 118 (1976) 41.
- [4] E. C. Kimmel, R. H. Fish, J. E. Casida, *J. Agric. Food Chem.*, 25 (1977) 1.
- [5] R. F. Lee, *Proceedings of the Oceans '86 Organotin Symposium*, Washington, Sept. 23-25 (Marine Technology Society, Vol. 4), Washington, DC (USA), 1986, p. 1182.
- [6] T. Suzuki, R. Matsuda, Y. Saito, *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 1437.
- [7] T. Suzuki, R. Matsuda, Y. Saito, H. Yamada, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 216.
- [8] R. Matsuda, T. Suzuki, Y. Saito, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 489.
- [9] T. Suzuki, H. Yamada, I. Yamamoto, K. Nishimura, K. Kondo, M. Murayama, M. Uchiyama, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 3989.
- [10] T. Suzuki, I. Yamamoto, H. Yamada, N. Kaniwa, K. Kondo, M. Murayama, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 304.
- [11] I. Yamamoto, K. Nishimura, T. Suzuki, K. Takagi, H. Yamada, K. Kondo, M. Murayama, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 1437.
- [12] R. J. Orsler, G. E. Holland, *Int. Biodeterior Bull.*, 18 (1982) 95.
- [13] P. F. Seligman, A. O. Valkirs, P. M. Stang, R. F. Lee, *Mar. Pollut. Bull.*, 19 (1988) 531.
- [14] T. Ishizaka, T. Suzuki, Y. Saito, *J. Agric. Food Chem.*, 37 (1989) 1096.
- [15] S. White, T. Catterick, B. Fairman, K. Webb, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 211.
- [16] T. L. Jones-Lepp, K. E. Varner, M. McDaniel, L. Riddick, *Appl. Organomet. Chem.*, 13 (1999) 881.
- [17] E. Rosenberg, V. Kmetov, M. Grasserbauer, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 400.
- [18] E. González-Toledo, R. Companó, M. D. Prat, M. Granados, *J. Chromatogr. A*, 946 (2002) 1.
- [19] A. Astruc, M. Astruc, R. Pinel, M. Potin-Gautier, *Appl. Organometal. Chem.*, 6 (1992) 39.
- [20] W. Langseth, *Talanta*, 31 (1984) 975.
- [21] C. F. Harrington, G. K. Eigendorf, W. R. Cullen, *Appl. Organometal. Chem.*, 10 (1996) 339.
- [22] R. Wahlen, T. Catterick, *J. Chromatogr. B*, 783 (2003) 221.
- [23] L. C. Currie, *Anal. Chim. Acta*, 391 (1999) 105.

CHAPITRE II

ÉTUDE DU MÉTABOLISME DU TRIBUTYLÉTAIN (TBT) PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE.

1. INTRODUCTION

Le tributylétain (TBT) est un contaminant retrouvé dans plusieurs milieux aquatiques et son accumulation ainsi que son métabolisme ont été démontrés chez plusieurs organismes. Son utilisation dans les peintures anti-salissures ainsi que celle d'autres composés organoétains pour d'autres usages industriels a été interdite dans plusieurs pays. La cause est que ces composés chimiques ont une faible dégradabilité dans l'environnement, un taux d'accumulation généralement élevé et une toxicité à long terme (Hoch, 2001). Le TBT constitue encore aujourd'hui une préoccupation environnementale car plusieurs sites marins, principalement les sédiments ainsi que les voies de navigation à trafic intense de pétroliers et grands cargos, forment une source non négligeable de contamination aux organoétains (Davies et al., 1998; Hashimoto et al., 1998; Viglino et al., 2004).

La capacité des organismes aquatiques, aussi bien vertébrés qu'invertébrés, à accumuler et métaboliser le TBT est bien documentée (Lee, 1996). Le métabolisme de ce composé chez ces deux groupes d'organismes est relié au système d'enzymes cytochrome P450 et probablement d'enzymes de conjugaison (Fish et al., 1976; Ohhira et al., 2006a; Mortensen et Arukwe, 2007). La fonction générale de ce complexe multi-enzymatique est de convertir le TBT ou tout autre composé chimique hydrophobe en métabolites hydrosolubles, par un processus métabolique en deux phases. Les enzymes de phase I, tels que les cytochromes P450, introduisent un groupe fonctionnel (hydroxyle, carboxyle, amine, oxyde, etc.) au composé initial. À celui-ci, les glucuronyltransférases, les sulfotransférases ou d'autres enzymes de phase II attachent un groupement polaire (acide glucuronique, sulfate, acide aminé, glutathion, etc.), permettant ainsi le transport et l'excrétion des composés de l'organisme (Lee, 1996).

Plusieurs études se sont intéressées aux produits de dégradation du TBT simplement déalkylés, tel que le dibutylétain (DBT) et le monobutylétain (MBT), ainsi qu'à leur accumulation et élimination par les organismes. Par contre, les rares études réalisées principalement en laboratoire se sont penchées sur le métabolisme intermédiaire du TBT et ont révélé la présence de métabolites hydroxylés de phase I, ainsi que d'autres dérivés métaboliques carboxylés ou oxygénés chez les mammifères, les poissons et les bivalves (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Lee, 1986; Matsuda et al., 1993; Yamamoto et al., 1997; Suzuki et al., 1998). Le métabolisme de phase I du TBT est assez bien documenté et les voies biochimiques impliquées dans son métabolisme de phase II n'ont pas été rapportées, jusqu'à ce jour. Des preuves de la présence de métabolites polaires, identifiés comme des dérivés conjugués de phase II du TBT, ont été rapportées principalement dans les travaux de Lee (1986) mais sans la caractérisation précise d'aucune molécule conjuguée.

La détoxification est un processus qui consiste généralement en une série de réactions par lesquelles une substance étrangère à l'organisme est convertie en un composé ou des composés plus facilement excrété(s) et relativement non toxique(s). Les xénobiotiques et les hormones suivent les mêmes voies métaboliques ce qui pourrait engendrer des interactions importantes et des effets toxiques (Lee, 1996). Également dans le cas du TBT, il a été signalé que son métabolisme hépatique peut être associé à l'induction de l'hépatotoxicité (Ueno et al., 1997). De ce fait, le but majeur des recherches sur la détoxification est l'élucidation des voies formant les métabolites plus polaires que les composés parents.

Dans le présent travail, notre objectif était d'explorer le métabolisme *in vitro* et *in vivo* (de phases I et II) du TBT en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par l'intermédiaire d'une interface d'ionisation à pression atmosphérique (LC-API-MS). L'interface API permet une ionisation douce, faisant de la LC-MS une méthode efficace pour l'analyse des molécules polaires telles que les

conjugués hydrosolubles de diverses composés. La LC-MS est une méthode analytique qui permet d'obtenir des informations considérables sur la structure des métabolites polaires peu volatils ou thermiquement fragiles, difficilement observables par d'autres techniques analytiques (e.g. la GC-MS) et dont les standards ne sont pas toujours disponibles.

2. MÉTHODOLOGIE

2.1. Réactifs et solutions

Composés biochimiques: Les composés β -glucuronidase de type B-1 de foie de bovins (libre d'activité de sulfatase), sulfatase de type VI de *Aerobacter aerogenes* (activité β -glucuronidase $< 10 \text{ U.mL}^{-1}$), tricine méthanesulphonate (MS-222), β -NADP⁺ de sodium, D-glucose-6-phosphate (G-6-P), glucose-6-phosphate déshydrogénase de sodium (G6P-DH) de type XV, chlorure de magnésium (MgCl_2), l'acide D-saccharique-1,4 lactone et la solution d'antibiotiques/antimycotiques (contenant $10\,000 \text{ U.mL}^{-1}$ de pénicilline G, $10\,000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de streptomycine sulfate et $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'amphotéricine B dans un tampon citrate, concentrée 100 x) ont été obtenus de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA). L'éthoxyrésorufine a été obtenu de Molecular Probe (Eugène, OR, USA). Les autres composés utilisés étaient de la plus haute pureté disponible chez Sigma-Aldrich, sauf lorsque indiqué.

Composés chimiques: Le standard de chlorure de tri-*n*-butylétain (TBT, 96%) a été acheté de Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI, USA). Le chlorure de 4-hydroxybutyl-dibutylétain (4-OHBuDBT, 64%) a été synthétisé selon la méthode de Fish et al. (1976) modifiée par (Békri et al. 2006). L'eau Milli-Q ultrapure de résistivité $18,2\text{-}18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a été utilisée (NANOpure Infinity™, Barnstead, Dubuque, IA, USA). Les autres

composés chimiques utilisés ont été obtenus de sources décrites précédemment (chapitre I) et étaient de la meilleure qualité commercialement disponible. Les solvants organiques étaient de grade HPLC et tous les autres composés chimiques étaient de qualité *reagent* ou de qualité supérieure.

Les solutions stock de butylétains (BTs) ont été préparées en dissolvant les sels de chlorures correspondants dans l'éthanol (EtOH) et entreposés à 4°C dans des bouteilles en verre ambré. Pour les expérimentations *in vitro*, une solution mère à 5 mM de chlorure de TBT a été préparée. Les solutions de travail (0,5-1,0 mM) ont été préparées par dilution de la solution mère dans l'eau Milli-Q pour les expérimentations *in vitro*. D'autres solutions de travail de 10-100 µg.mL⁻¹ de chlorure de TBT et de 4-OHBuDBT ont été préparées dans l'EtOH ou l'*iso*-propanol (propOH), toutes les semaines. Des dilutions subséquentes ainsi que des standards pour les courbes d'étalonnage ont été préparés quotidiennement, pour l'analyse des BTs dans l'eau de mer.

Les concentrations utilisées dans le texte réfèrent aux composés BTs sans les atomes de chlores associés. Par ailleurs, la pureté des standards de BTs a été prise en compte et les valeurs corrigées en conséquence.

2.2 Expériences *in vitro*

Les expériences *in vitro* ont été réalisées avec des préparations microsomaes de foie de poissons, dans des tubes en Téflon à large ouverture et d'une capacité de 40 mL.

Préparation des microsomes de foies de poissons

Dix ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) mâtures (5 mâles et 5 femelles, 187-430 g poids total; 2,5 ans d'âge) provenant de la station aquicole de Pointe-au-Père (Rimouski, QC) ont été anesthésiés profondément avec du MS-222 (160 mg.L⁻¹), puis sacrifiés par section cervicale de la colonne vertébrale. Le foie de chaque individu a été

immédiatement prélevé, pesé, rincé avec du 1,15% KCl froid (154 mM), puis rapidement congelé dans l'azote liquide avant stockage à -80°C, pour une courte période.

Les microsomes ont été préparés à partir de pools de foies de poissons du même sexe. Au laboratoire, les foies ont été décongelés, émincés et homogénéisés manuellement, à l'aide d'un homogénéisateur de type Dounce, dans 4 volumes de tampon 50 mM Tris-HCl froid (pH 7,4) contenant 154 mM KCl. Les microsomes ont été obtenus par centrifugation séquentielle à 9 000 x g pendant 30 min à 2-4°C, et le surnageant post-mitochondrial résultant a été centrifugé à 100 000 x g durant 60 min à 2-4°C. Les microsomes rincés ont été resuspendus dans une solution cryoprotectrice (tampon 50 mM Tris-HCl froid (pH 7,4) contenant 1 mM dithiothreitol (DTT) et 20% glycérol (v/v)) à une concentration de protéines de 15-20 mg.mL⁻¹, puis rapidement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C. La concentration des protéines a été déterminée par le test de Bio-Rad basé sur la méthode de Bradford (1976), en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

La compétence métabolique des microsomes de foie, basée sur l'activité EROD liée au cytochrome P450 1A, a été déterminée à l'aide de la méthode de Kennedy et al. (1995).

Incubations des microsomes et hydroxylation du TBT

Les microsomes ont été incubés avec une solution de TBT qui a été préparée dans l'EtOH puis dans l'eau Milli-Q. Le solvant de la solution d'exposition a été évaporé au maximum sous jet d'azote et le volume réajusté avec de l'eau Milli-Q, avant le début des expositions. La solution d'exposition a été analysée en même temps que les échantillons.

Le mélange réactionnel standard comprenait les microsomes (2-3 mg de protéines par mL) et 5 ou 10 μ M TBT fraîchement préparés dans l'eau Milli-Q (EtOH inférieur à 0,5% v/v), dans un volume final de 2 mL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4; 10 mM MgCl_2). À ces concentrations, le TBT n'inhibe pas l'activité EROD du CYP450 (Fent et Bucheli, 1994; Stegeman). Le substrat a été pré-incubé avec les microsomes 10 min à 30°C, avant l'ajout du système régénérateur de NADPH (5 mM NADP^+ , 10 mM G-6-P, 2U G6P-DH) pour initier la réaction. Des incubations contrôles ont été réalisées simultanément en absence, soit de NADP^+ ou de microsomes, ainsi qu'avec des microsomes dénaturés à la chaleur (10 min dans un bain d'eau à 80-100°C). Toutes les incubations ont été réalisées à 30°C dans un bain-marie avec agitation, durant 3 h et à l'air (tubes ouverts). Les réactions ont été terminées par refroidissement des tubes sur glace et congélation à -80°C, pour extraction immédiate ou jusqu'au lendemain.

2.3. Expériences *in vivo*

Les poissons: traitements et échantillonnage

Des ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), sexuellement immatures, ont été obtenus de la station aquicole de Pointe-au-Père (Rimouski, QC, CA). Les poissons (102-233 g de poids total, 23,0-27,5 cm et 1 an d'âge) ont été maintenus au nombre de 4 animaux dans deux aquariums de 90 L en circuit ouvert, munis de colonnes de dégazage et alimentés d'eau courante (température 4 à 4,5°C, débit 4,5 L.min⁻¹) filtrée sur charbon activé pour éliminer le chlore. Le cycle de lumière était de 9 h 30 et suivait la photopériode naturelle. Les poissons ont d'abord été acclimatés et alimentés pour une période de 17 jours avant le début de l'expérience. La nutrition a été interrompue durant l'expérience de 72 h pour favoriser l'accumulation de la bile dans la vésicule biliaire.

Les poissons anesthésiés au MS-222 (100 mg.L^{-1}) ont reçu une injection péritonéale de TBT (10 mg.kg^{-1}) solubilisé dans l'huile de maïs, alors que les poissons contrôles ont reçu uniquement de l'huile de maïs (2 mL.kg^{-1}).

À la fin des 72 h d'exposition, les poissons profondément anesthésiés (160 mg.L^{-1} de MS-222) ont été pesés et leur taille totale mesurée. Ils ont été sacrifiés par section cervicale de la colonne vertébrale pour prélèvement des tissus. La vésicule biliaire a été excisée avec soin et la bile récoltée dans un pilulier ambré à l'aide d'une seringue. Le foie a été retiré, pesé et rincé à l'aide de 1,15% KCl froid (154 mM) et mis dans un pilulier à scintillation. Les tissus ont été rapidement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C , jusqu'à analyse.

Les moules bleues: traitements et échantillonnage

Des moules bleues *Mytilus edulis* ($12,1\text{-}42,8 \text{ g}$ poids total, $3,1\text{-}14,1 \text{ g}$ poids de chair humide et $5,0\text{-}6,9 \text{ cm}$ longueur totale) ont été récoltées à marée basse sur les berges du Saint-Laurent, à Ste-Luce et à la limite de Ste-Flavie (Rimouski, QC). Leurs coquilles ont été frottées soigneusement avant leur pesée, pour éliminer le maximum d'épibiontes. Elles ont été réparties dans 6 béciers en verre contenant de l'eau de mer aérée, de salinité 29 psu, filtrée à $0,5 \mu\text{m}$, à laquelle a été ajouté $1,25 \text{ mL.L}^{-1}$ de la solution d'antibiotiques/antimycotiques. Une période d'acclimatation de 8 jours à 15°C leur a été allouée, entre autres pour réparation du byssus avant le début des expériences. Pendant cette période, l'eau de mer a été changée tous les trois jours. La photopériode était de 12 h pendant l'expérience.

Le contaminant et le solvant ont été injectés sous la surface de l'eau. Les traitements au TBT ont été réalisés dans trois béciers de 1,8 L contenant chacun 8 moules. Deux groupes de moules contaminées ont reçu une quantité de TBT (dans l'EtOH) de manière à atteindre une concentration théorique de $3 \mu\text{g TBT.g}^{-1}$ de poids

de chair humide. Le troisième groupe a servi de contrôle et a reçu une quantité équivalente d'EtOH. Un contrôle négatif sans moules a été inclus pour évaluer la dégradation éventuelle du TBT. Durant les expérimentations, l'eau de mer des béciers avec moules a été changée une fois. Les conditions de température et de photopériode étaient les mêmes qu'à la période d'acclimatation. À chaque période d'échantillonnage, 4 moules ont été prélevées par bécier: à 4 jours (96 h) et 15 jours d'exposition.

La disparition du TBT a été suivie par extraction à partir de l'eau de mer. Des échantillons de 100 mL par bécier ont été prélevés au premier jour, 10 min après l'addition du TBT et du solvant à l'eau de mer dans les différents traitements, également juste avant le changement d'eau de mer et au 15^{ème} jour. À la fin de l'expérience, les béciers ont été rincés 3 fois à l'aide de 20 mL de *n*-hexane pour récupérer d'éventuels BTs adsorbés aux parois.

2.4. Procédures d'extraction du TBT et ses métabolites

Afin d'éviter l'adsorption des BTs et leurs métabolites, la verrerie utilisée pour les extractions a été trempée 24 h dans un bain d'acide nitrique 10%, puis rincée à l'eau déionisée avant utilisation.

Extraction des incubations de microsomes.

Plusieurs procédures ont été tentées et finalement, les incubations des microsomes de poissons exposés au TBT ont été extraites 5 fois à l'aide de 5 mL d'EtOAc, en se basant sur l'étape d'extraction de la méthode de Lee (1986). Le reste de la procédure a été développé dans le cadre de ce travail. Après 10 min d'agitation mécanique, les tubes ont été centrifugés 5 min à 3 000 rpm. La fraction organique a été passée sur du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄). Les fractions organiques de chaque traitement (tubes avec cofacteur, ceux sans cofacteur, etc.) ont été combinées et le solvant évaporé

sous vide avec un évaporateur rotatif, à pression réduite et à 35°C. Le résidu a été purifié sur une colonne de verre (1,1 cm d.i.) préparée avec 5 cm d'une suspension de Florisil (activée à 120°C, Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, USA) dans de l'éthyléther (Et₂O). La colonne a été rincée avec de l'Et₂O (10 mL), l'échantillon a été appliqué et élué avec de l'acide acétique (HAc)-Et₂O (0,5: 99,5 v/v; 25 mL) qui a été évaporé presque à sec, à l'aide d'un évaporateur rotatif, à faible pression et à 35°C. Cette étape de purification a été adaptée de la procédure de Suzuki et al. (1992). Le résidu a été transféré dans des tubes gradués à l'aide de 5 mL d'ACN, concentré sous faible jet d'azote puis filtré sur un filtre Millex®-GV PVDF 0,22 µm (Durapore de Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Finalement, il a été reconstitué dans 0,5 mL de propOH pour analyse par LC-API-MS.

Procédure d'extraction de l'eau de mer des béciers

La méthode est essentiellement tirée des travaux réalisés pour le chapitre 1 et adaptée pour de plus grands volumes. Seul le *n*-hexane a été utilisé car le but était de suivre la disparition du TBT. Les échantillons d'eau de mer d'exposition des moules (100 mL) ont été déposés dans des ampoules à décantation, puis acidifiés à pH 4 à l'aide de 300 µL de 1N HCl. Ils ont été extraits à l'aide de 2 x 20 mL de *n*-hexane, par agitation manuelle douce pendant 5 min puis décantation, pendant quelques minutes. Les fractions organiques récupérées suite aux deux étapes d'extraction ont été combinées et concentrées jusqu'à un volume de 2 mL, à l'aide d'un évaporateur rotatif, à pression réduite et à 35°C. Le résidu a été transféré dans un tube en verre à l'aide de 3 mL de *n*-hexane, ensuite rincé avec 2 mL d'eau Milli-Q pour éliminer les sels. La phase organique résultante a été récupérée et concentrée presque à sec, sous faible jet d'azote. Les extraits ont été reconstitués dans du MeOH à un volume final de 1 mL,

pour les échantillons du jour 1 et ceux du contrôle positif, et à 0,2 mL pour les autres échantillons, avant analyse par LC-APCI-MS.

Procédure d'extraction de la bile de poisson

La méthode a été développée au cours de ce travail. Les échantillons de bile d'un volume de 30-100 μ L ont été dilués dans 200 μ L d'un tampon acétate de sodium (200 mM, pH 5) puis extraits 5 fois avec 7 mL de chloroforme. Suite à 10 min d'agitation mécanique, les tubes ont été centrifugés 5 min à 3 000 rpm. La phase organique, en dessous, a été récupérée et asséchée sur une colonne de Na_2SO_4 (3 cm, 1 cm d.i.), rincée au chloroforme. Les fractions organiques ont été combinées et le solvant évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, à pression réduite. Le résidu a été récupéré avec 5 mL de chloroforme, concentré presque à sec, sous faible jet d'azote puis reconstitué dans 0,5 mL de propOH.

La fraction aqueuse a été passée sur une cartouche d'extraction en phase solide échangeuse d'anions SAX (200 mg/4,0 mL, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA), en utilisant une chambre à vide, avec une méthode dérivée de la procédure du fournisseur. Ainsi, le pH des échantillons a d'abord été ajusté à pH 7,4-7,6 avec 52 μ L de 0,1 N NaOH, afin d'augmenter l'ionisation des analytes. La cartouche a été conditionnée avec 1 mL de MeOH, ensuite avec 5 mL d'eau Milli-Q avant l'application de l'échantillon. Après une étape de lavage avec 3 mL d'eau Milli-Q, l'échantillon a été élué avec 5 mL de 5% MeOH / 20 mM de tampon d'acétate d'ammonium à pH 4. Le pH de cette fraction a été ajusté à 8, à l'aide de 5% NH_4OH / 50% MeOH. Après concentration sous faible jet d'azote, à 20-35°C, le résidu a été reconstitué dans 0,4 mL de propOH, avant analyse par LC-API-MS.

Procédure d'extraction des foies de poissons et des tissus de moules

La méthode d'extraction utilisée pour l'isolation du TBT ainsi que ses métabolites à partir des tissus humides a été modifiée de celle de Suzuki et al. (1992). Les foies de poissons ont été analysés individuellement et les moules ont été traitées en combinant 2 individus issus du même traitement. Les tissus ont d'abord été homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur Kekmar™ (Tekmar Company, Cincinnati, OH, USA), puis répartis dans des tubes en Téflon de 40 mL, avant de procéder aux différentes étapes d'extraction, d'isolation fractionnée et de purification tel que présenté dans le schéma de la figure 1. Pour les tissus d'autres moules, une seconde méthode a été développée au cours de ce travail l'extraction des BTs et les étapes suivies sont présentées dans le schéma de la figure 2. Dans cette méthode, l'extraction a été réalisée à l'aide de solvants polaires et des cartouches d'extraction en phase solide ont été utilisées pour la purification des extraits. La première est une Supelclean ENVI-C18 (3 mL Supelco, Bellefonte, PA, USA) et la deuxième est une échangeuse d'anions SAX (200 mg/4,0 mL, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA). Elles ont été utilisées selon une méthode dérivée de la procédure du fournisseur.

Hydrolyse enzymatique des extraits de foie de poissons

À partir de l'extrait de foie de poisson, deux fractions séparées de 100 µL ont été isolées dans des tubes différents. Le solvant a été évaporé et l'extrait dilué dans un tampon d'acétate de sodium (500 µL; 200 mM, pH 5). Un volume de 200 µL de chaque enzyme (2 000 U de β -glucuronidase; 10 U de sulfatase, concentration finale), préparée dans du tampon, a été ajouté dans les tubes respectifs. Dans les incubations avec la sulfatase, 20 µL de 10% D-saccharo-1,4 lactone ont été ajoutés pour inhiber une quelconque activité de la β -glucuronidase présente avec l'enzyme. Les échantillons ont été incubés 12 h à 37°C sur un agitateur rotatif, puis extraits avec l'EtOAc (3,5 mL). Le

Homogénéisation

5 g tissus de moules ou de poissons humides
10 mL d'une solution de 0,9% NaCl

Extraction n° 1

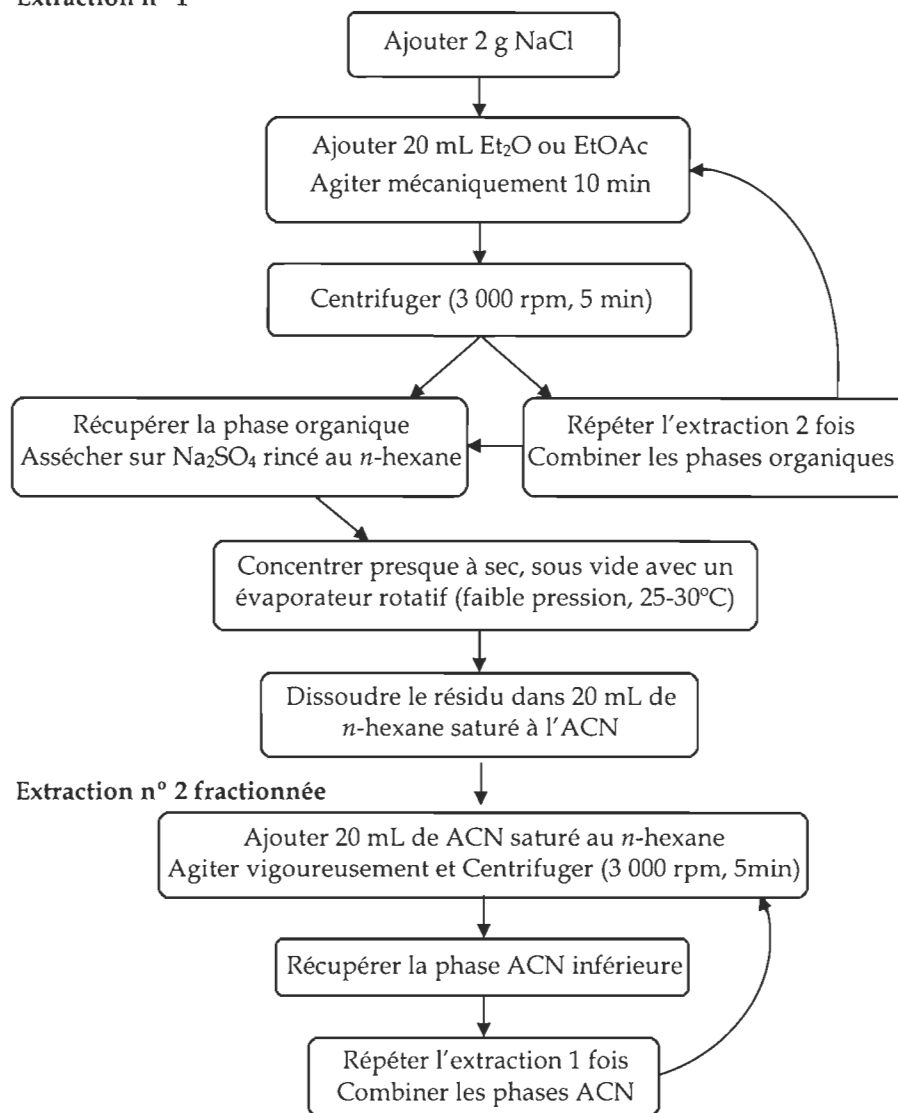


Figure 1. Protocole d'extraction des butylétains des foies de poissons et des tissus de moules, selon la procédure de Suzuki et al. (1992).

Purification

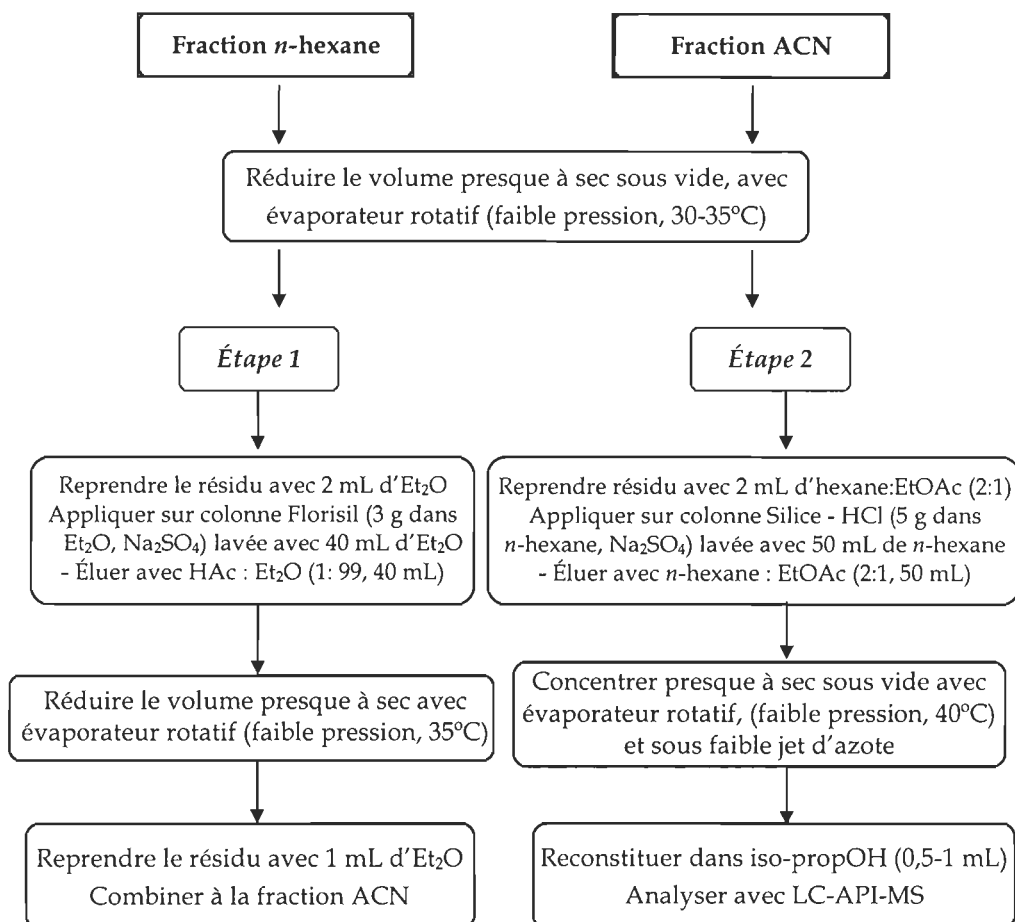


Figure 1. (Suite) Protocole d'extraction des butylétains des foies de poissons et des tissus de moules, selon la procédure de Suzuki et al. (1992).

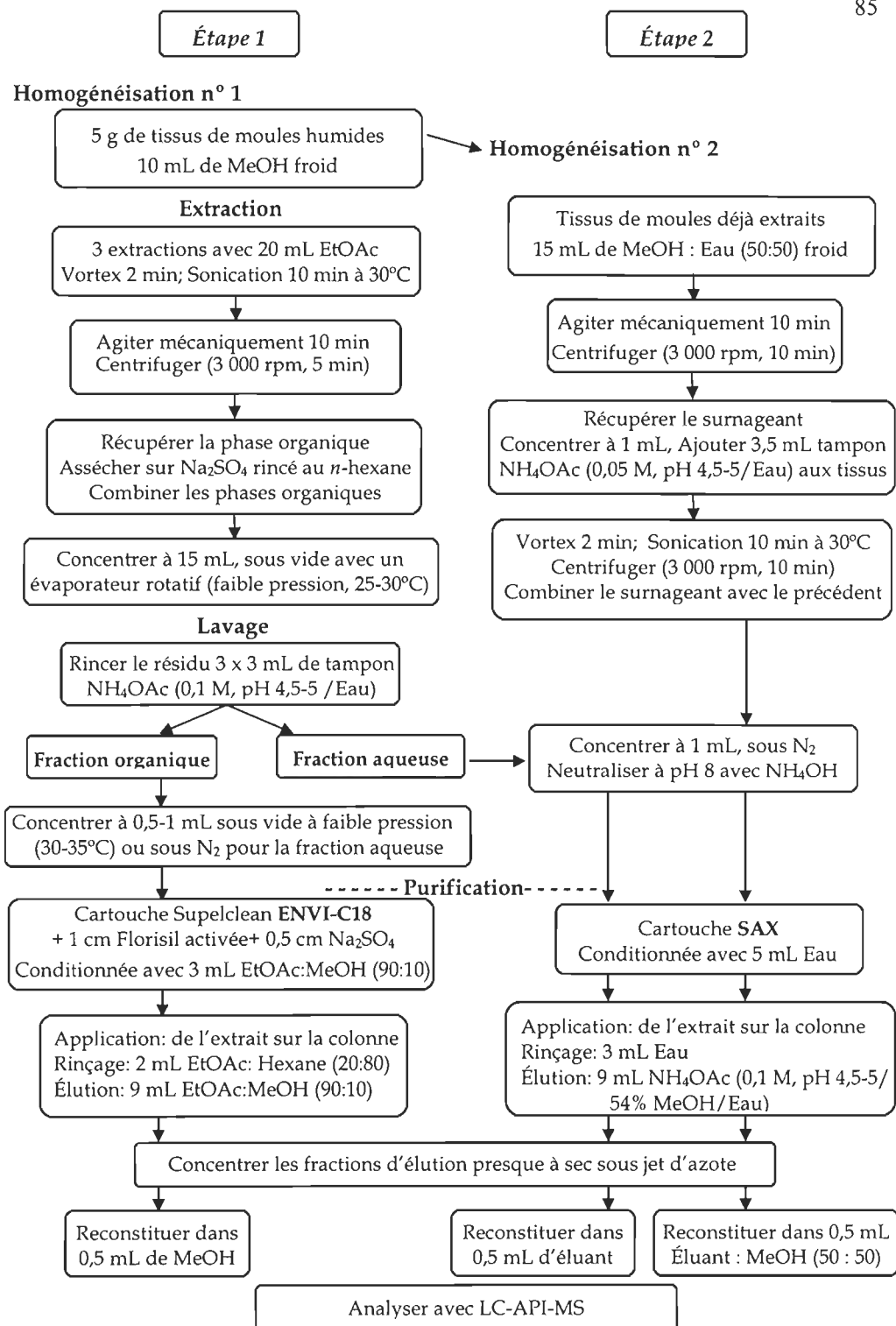


Figure 2. Second protocole d'extraction des butylétains des tissus de moules, développé au cours de ce travail.

solvant a été évaporé presque à sec, ensuite le résidu reconstitué dans du propOH, avant analyse par LC-MS.

2.5. Analyse LC-APCI/ESI -MS

La chromatographie liquide- ionisation à pression atmosphérique - spectrométrie de masse (LC-API-MS) a été utilisée pour la détermination des composés. La phase mobile a été délivrée par un chromatographe liquide à haute pression (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) équipé d'une pompe LC et d'un échantillonneur automatique *Autosampler Surveyor*® et muni d'une boucle d'injection de 20 µL. Le système HPLC a été couplé à une trappe à ions LCQ Advantage® de ThermoFinnigan (USA), soit par l'intermédiaire d'une source à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou d'une source à électronébulisation (ESI). Le logiciel Xcalibur™ (version 1.3) a été utilisé pour contrôler le système et pour l'acquisition des données et leur traitement.

Conditions chromatographiques

La séparation des BTs a été réalisée en chromatographie en phase inverse à l'aide d'une colonne analytique Discovery® Cyano (50 x 2,1 mm d.i., 5 µm), couplée à une cartouche Discovery® Cyano de même matériel (20 x 2,1 mm d.i., 5 µm) comme colonne de garde, les deux de Supelco Inc. (Sigma-Aldrich, USA). Une deuxième colonne de type Kromasil-C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm) de Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA), permettant l'utilisation de phases mobiles de pH situés dans une gamme de 2 à 8, contrairement à la colonne Cyano dont le pH d'opération est situé entre 4 et 8. Des programmes différents de gradients d'élution et des phases mobiles différentes ont été utilisés. Le tableau 1 représente les programmes du gradient d'élution pour chaque colonne, avec des débits constants de 0,2 mL.min⁻¹ pour la Discovery® Cyano et de 0,5 mL.min⁻¹ pour la Kromasil C-18. La séparation sur la colonne Discovery® Cyano a été réalisée en utilisant une phase mobile contenant du méthanol (MeOH), de l'eau et du MeOH-acide formique-eau (75: 5: 20) (MEF), fournis par trois différents canaux de

Tableau 1. Gradients d'élution pour la séparation des BTs.

a. Programme de gradient pour l'élution avec la colonne Discovery® Cyano.

Temps (min)	MeOH (%)	Eau (%)	MEF (%)
0,00	50	50	0
4,00	95	5	0
5,00	50	0	50
8,00	50	0	50
9,00	50	50	0
25,00 ou 30,00	50	50	0

b. Programme de gradient d'élution avec la colonne Kromasil C-18.

Temps (min)	ACN (%)	Eau (%)	AEF (%)
0,00	45	50	5
4,00	45	50	5
18,00	90	5	5
22,00	45	50	5
35,00 ou 40,00	45	50	5

c. Second programme de gradient d'élution avec la colonne Kromasil C-18.

Temps (min)	ACN (%)	Eau (%)	AEF (%)
0,00	50	50	0
12,00	95	5	0
14,00	40	0	60
19,00	40	0	60
21,00	50	50	0
35,00	50	50	0

la pompe LCQ™ quaternaire. La colonne a été équilibrée avec 50% MeOH/50% eau à 35°C, pour un maximum de 1 h avant le début des analyses. Dans le cas de la colonne Kromasil-C18, la phase mobile consistait en de l'ACN, de l'eau et de l'ACN-acide formique-eau (75: 5: 20) (AEF). Celle-ci a été équilibrée avec 5% AEF/ 45% ACN/ 50% eau, à 35°C, pendant 1 h avant les analyses. Les deux différents solvants utilisés pour chacune des colonnes (le MeOH et l'ACN) permettaient d'avoir des pressions plus basses et une meilleure ligne de base (moins de bruit chimique). La température de la chambre de la colonne a été fixée à 35°C, le volume d'injection fixé entre 10-15 µL dépendamment des analyses et ce, en mode complet (full loop mode), et les piluliers des échantillons gardés dans l'échantillonneur automatique, à 20°C pour l'eau de mer et à 10°C pour les autres matrices biologiques.

Conditions d'opération du spectromètre de masse

La caractérisation du TBT et de ses métabolites a été réalisée en utilisant les conditions d'opération du API-MS résumées dans le tableau 2. Les paramètres de la source API et de la trappe ionique ont été optimisés par introduction des standards de butylétains (5 µg.mL⁻¹ dans le MeOH) de TBT et du 4-OHBuDBT directement dans l'APCI-MS ou l'ESI-MS, en utilisant le LC en mode de flux continu (MeOH/eau 50: 50) et en activant l'option automatique "tune" de calibration du logiciel. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode d'ionisation positive mais aussi en mode négatif, uniquement pour le 4-OHBuDBT, avec un temps d'injection d'ions de 200 ms. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode de balayage complet d'ions, dans les gammes de m/z 240-500 pour l'analyse des extraits d'eau de mer, en mode positif, et m/z 70-800 pour l'analyse des métabolites avec les deux modes d'ionisation, positif et négatif. La détection et les mesures quantitatives du TBT ont été réalisées en utilisant comme pics de base les ions spécifiques m/z 332 et m/z 350 avec la phase mobile

Tableau 2. Conditions optimisées de fonctionnement de l'APCI-MS et de l'ESI-MS pour l'analyse du TBT et du 4-OHBuDBT ainsi que d'autres métabolites.

Paramètre	Valeur	
	APCI	ESI
Flux du gaz nébulisant, N ₂	54 u.a.	27 u.a.
Flux du gaz auxiliaire, N ₂	4 u.a.	13 u.a.
Température du capillaire /°C	160	220
Voltage du capillaire /V	11	15
Voltage de la source /kV	6	4,5
Courant de la source /μA	5	
Source, température du vaporisateur /°C	400	

u.a.: unités arbitraires.

contenant de l'ACN (colonne Kromasil C-18) et l'ion m/z 323 avec la phase mobile au MeOH (colonne Cyano et principalement pour l'analyse des extraits d'eau de mer). Les ions m/z 307 et m/z 345 ou 347 les plus intenses ont été utilisés pour le suivi du 4-OHBuDBT en mode positif, et les ions m/z 387 et 397 et d'autres ions de moindre intensité tel que l'ion m/z 351 et parfois l'ion à m/z 533, pour le suivi du 4-OHBuDBT en mode négatif.

3. RÉSULTATS

Dans la description des spectres de masse qui suit, le ratio m/z de chaque groupe de pics appelé *cluster* (avec le patron isotopique caractéristique de l'étain) réfère à l'ion le plus intense correspondant à l'isotope ^{120}Sn . Chaque figure présente: 1) le courant ionique total (TIC); 2) le courant ionique des ions d'intérêt pour cette étude; et 3) les spectres de masse des principaux pics chromatographiques d'intérêt. En ordonnée sont représentées les abondances relatives des pics, en fonction du temps de rétention en minutes pour les chromatogrammes et en fonction du ratio m/z , pour les spectres de masse. Par ailleurs, certains ions d'interférence peuvent apparaître dans les spectres de masse. Ceux-ci peuvent provenir des solvants ou des tubes capillaires introduisant l'échantillon dans l'appareil, tel que l'ion à m/z 391 correspondant au PEEK® (ou *polyether-etherketone*) et l'ion à m/z 279 probablement causé par les phtalates de dibutyle, en mode positif (voir chapitre I).

3.1. Spectres de masse des standards de TBT et du 4-OHBuDBT

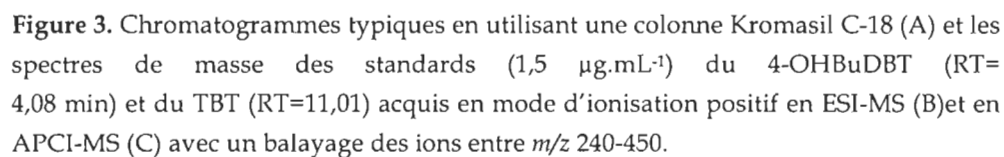
Cette section décrit les résultats LC-MS obtenus avec deux modes d'ionisation, positif et négatif. Il est également à noter que lors des analyses, le TBT et le 4-OHBuDBT ont présenté les mêmes groupements de masse avec les deux interfaces, ESI et APCI, et suivaient le même patron de fragmentation.

En mode d'ionisation positif

La figure 3 illustre les chromatogrammes et les spectres de masse des standards de TBT (RT 11,01min) et du 4-OHBuDBT (RT 4,08 min), en mode d'ionisation positif, obtenus en APCI- et ESI-MS. Tous les ions m/z ont été étudiés en utilisant le mode MS/MS du spectromètre de masse.

Avec les différentes phases mobiles et les gradients d'élution utilisés, ainsi que les paramètres optimisés des deux différentes interfaces du MS (APCI et ESI), le groupe de masse le plus intense observé pour le composé 4-OHBuDBT correspond à l'ion $[\text{OHBuDBT}]^+$. Sous les conditions optimisées de la source, le spectre de masse obtenu pour le 4-OHBuDBT présente le pic m/z 307 le plus intense. Celui-ci résulte de la perte de l'atome de chlore de la molécule de chlorure d'hydroxybutyl-dibutylétain $[\text{M} - \text{Cl}]^+$. Deux autres groupes d'ions à m/z 348 (voire 346) et m/z 366 sont des ions adduits présents en intensités beaucoup plus faibles que l'ion de base à m/z 307. L'ion à m/z 348 est attribuable à la perte d'un atome de chlore de la molécule de chlorure de OHBuDBT et la formation d'un ion adduit d'ACN $[\text{M} - \text{Cl} + \text{ACN}]^+$. L'ion m/z 366 correspond à l'addition d'une molécule d'eau au précédent $[\text{M} - \text{Cl} + \text{ACN} + \text{H}_2\text{O}]^+$.

Pour le TBT dont le poids moléculaire est de 326 Da, M correspond au chlorure de tributylétain $[\text{TBTCl}]$. L'ion m/z 332, qui est le pic de base, correspond à la perte d'un atome de chlore de la molécule de chlorure de TBT et la formation d'un ion adduit avec l'ACN $[\text{M} - \text{Cl} + \text{ACN}]^+$. Un second pic à m/z 350 est présent à une moindre intensité et correspond à l'addition d'une molécule d'eau à l'ion précédent $[\text{M} - \text{Cl} + \text{ACN} + \text{H}_2\text{O}]^+$.



En mode d'ionisation négative: spectre de masse du 4-OHBuDBT

L'injection et la détection du standard de 4-OHBuDBT en mode d'ionisation négative, avec les deux interfaces API (APCI et ESI) révèlent un pic qui élué au même temps de rétention que le pic du même standard observé en mode positif. La figure 4 présente le spectre de masse du 4-OHBuDBT en mode de balayage complet (*full scan*) du MS obtenu en mode négatif. Deux groupes d'ions avec le patron isotopique typique de l'étain à m/z 387 et 397 sont présents, en abondances relatives importantes. Dans ce cas, l'ion 4-OHBuDBT doit former des adduits avec des composantes de la phase mobile, générant ainsi des anions observables en mode négatif.

3.2. Hydroxylation du TBT par les microsomes de foies de poissons

L'analyse des extraits d'incubation des microsomes de foie de poissons avec du TBT par LC en phase inverse a révélé la présence du TBT à $RT = 10,71$ min. Dans la zone d'élution du standard de 4-OHBuDBT, on note la présence d'un autre pic de très faible intensité à $RT = 3,96$ min. Ce pic n'a pas été observé dans les incubations contrôles, soit en absence de microsomes ou en absence du système régénératif de NADPH. En mode d'ionisation positive de l'ESI, le spectre de masse correspondant au pic à $RT = 3,96$ min est présenté dans la figure 5 B. Quoique ce pic pourrait être attribué à un composé hydroxylé OHBuDBT, son signal MS est proche du bruit chimique de l'analyse et de ce fait, la composition chimique à m/z 307 ne peut lui être assignée avec confirmation. À titre indicatif, en comparant les aires sous le pic de TBT, entre les incubations de microsomes témoins sans NADPH et les incubations avec NADPH, le pourcentage de disparition de TBT serait approximativement de 30%. En mode d'ionisation négative, aucun composé avec le patron isotopique de l'étain n'a été détecté avec la source ESI ou la source APCI du MS.

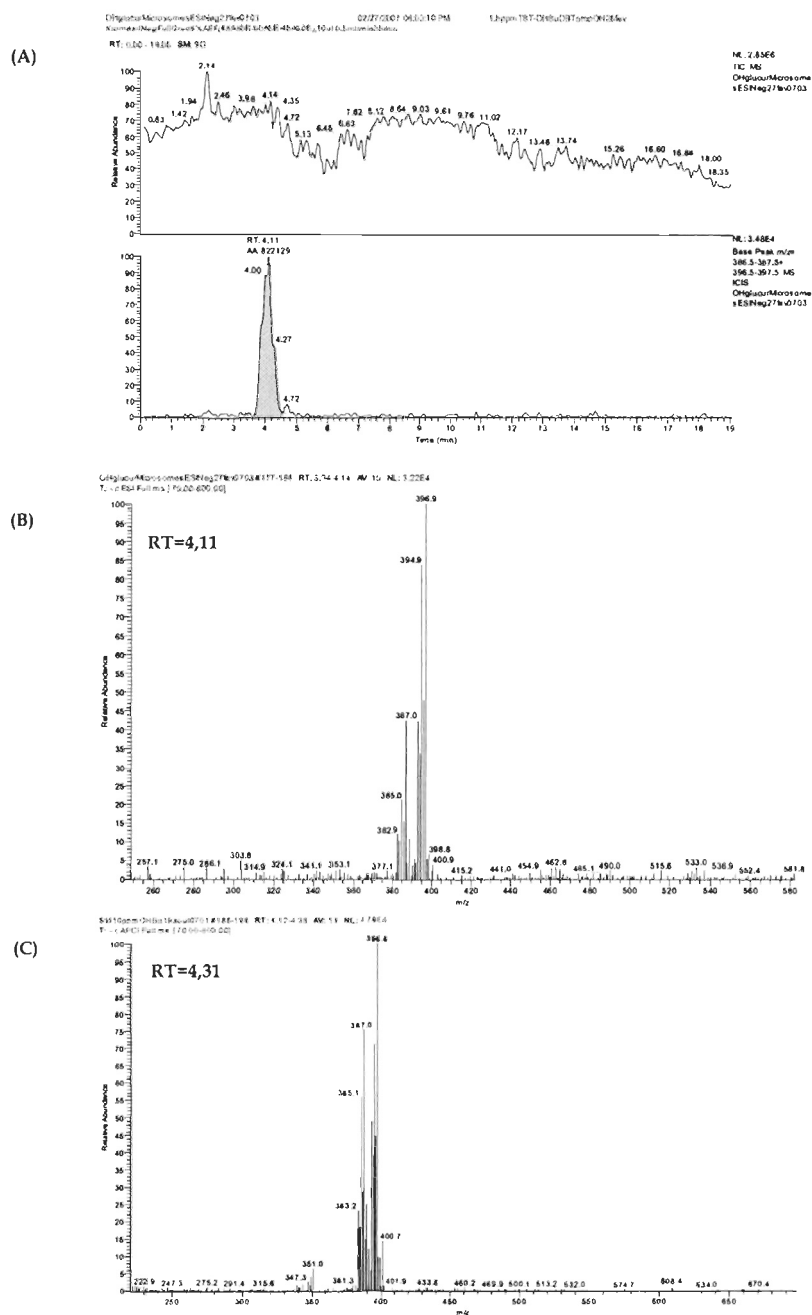


Figure 4. Chromatogrammes typiques (A) du standard 4-OHBuDBT (RT= 4,11 min; 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) élué sur une colonne Kromasil C-18 et ses spectres de masse ESI-MS (B) et APCI-MS (C), acquis en modes d'ionisation négative et de balayage complet du MS [m/z 70-800].

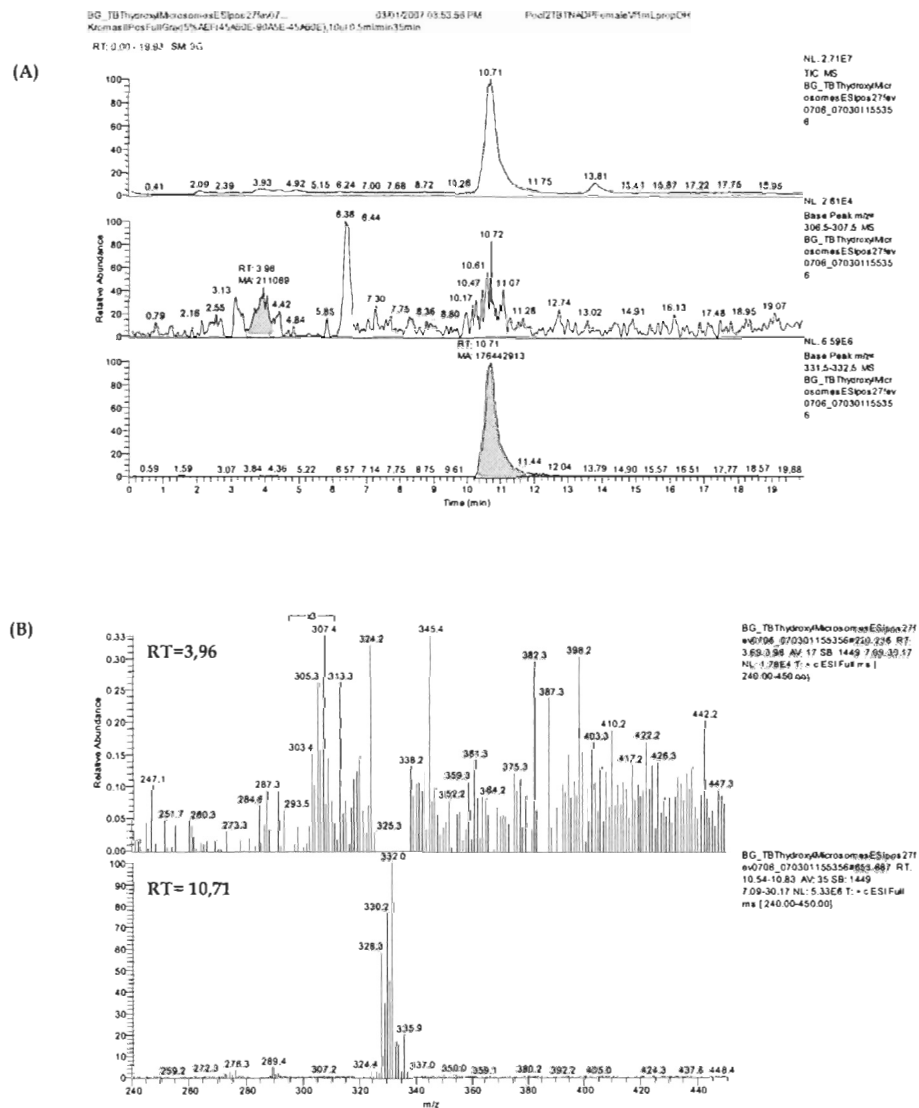


Figure 5. Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI positive (B) d'un extrait de microsomes de foie de poissons exposés à 10 μ M TBT (RT= 10,71 min) et du composé OHBuDBT à RT= 3,96 min en présence de NADP⁺, en mode de balayage complet du MS [m/z 240-450].

3.3. Métabolisme du TBT *in vivo* par les moules bleues

La figure 6 représente un chromatogramme et un spectre de masse typique d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$), exposées pendant 96 h au TBT via l'eau de mer, traités selon la méthode d'extraction modifiée de Suzuki et al. (1992). Le chromatogramme révèle la présence du pic du composé parent, le TBT, à $RT=11,47$ min et dont le spectre de masse montre la présence du pic de base m/z 332 caractéristique ainsi que m/z 350, en très faible intensité. Le spectre de masse du pic à $RT= 6,78$ min révèle la présence des ions à m/z 307 et 347 (voire 348), avec le patron isotopique typique de l'étain, qui sont caractéristiques d'un composé hydroxylé de phase I, le OHBuDBT.

Le spectre de masse de ce composé est similaire à celui du standard 4-OHBuDBT synthétisé chimiquement, car il révèle, en mode d'ionisation positive de l'ESI- et de l'APCI-MS les ions caractéristiques, le pic de base le plus intense à m/z 307, et l'ion m/z 348 (adduit de l'ACN) en intensité relative plus faible (Figure 6 en B). Par contre, le temps de rétention de ce OHBuDBT est différent de celui du standard 4-OHBuDBT dont le RT est situé autour de 4,08 min, pour la même journée d'analyse. Le composé OHBuDBT produit biologiquement par les moules est présent en très faible quantité dans les extraits de tissus. Par analyse des aires intégrées sous les pics chromatographiques (figure 6 A), ce composé représente approximativement 1,49% de l'aire sous le pic du TBT. Par ailleurs, aucun composé avec le patron isotopique de l'étain n'a été détecté en mode d'ionisation négative, que ce soit avec la source APCI ou la source ESI du MS.

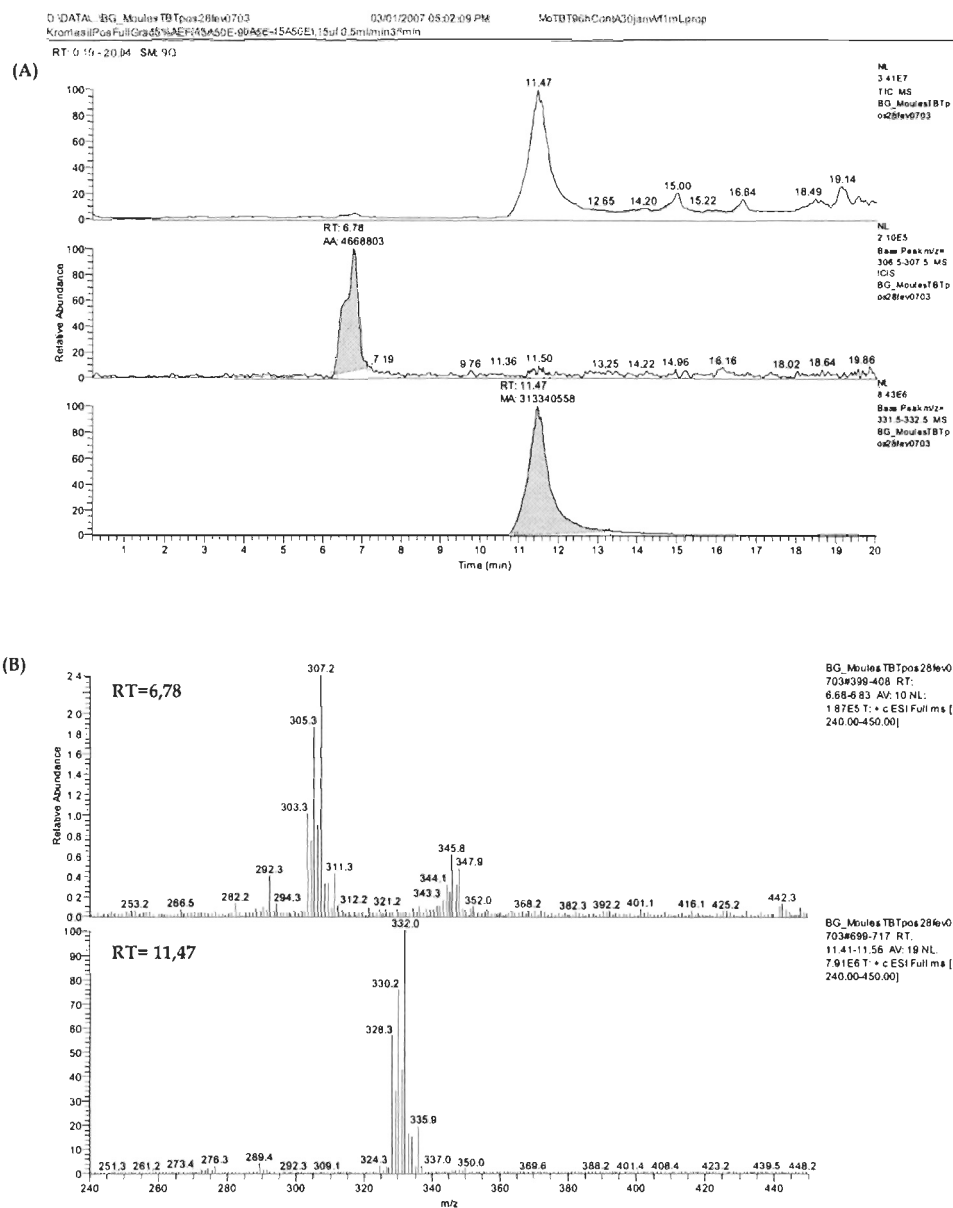


Figure 6. Chromatogrammes (A) d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées au TBT (RT= 11,47 min), ainsi que son métabolite de phase I, le OHBuDBT (RT= 6,78 min), élués sur une colonne Kromasil C-18, et spectres de masse APCI (B) positive en mode de balayage complet du MS [m/z 240-650].

Avec la seconde méthode d'extraction développée au cours de ce travail, l'analyse APCI-MS en mode d'ionisation négative a révélé des ions observés dans les tissus de moules exposés 96 h et celles exposées 15 jours au TBT. Toutes les fractions d'élution des échantillons sur les cartouches d'extraction en phase solide (ENVI-C18 et SAX) ont été analysées. Seules les fractions de l'éluant (EtOAc: MeOH, 90 : 10) sur les cartouches ENVI-C18 ont révélé des composés avec le patron isotopique de l'étain, détectables en mode d'ionisation négative.

Le chromatogramme des extraits de moules exposées 96 h au TBT ($n=2$) révèle un pic à $RT= 6,01$ min de faible intensité (Figure 7 A). Le spectre de masse, acquis en mode d'ionisation négative de l'APCI-MS, montre la présence d'un composé avec le patron isotopique de l'étain à m/z 517 et 603 (Figure 7 B). Ce pic est absent dans les extraits de moules exposées durant 15 jours au TBT (Figure 8 A). Par contre le spectre de masse correspondant au pic à $RT= 7,15$ min (Figure 8 B), révèle la présence d'un composé avec le patron isotopique de l'étain à m/z 351, 365, 389 et 397. Ce pic n'est pas détecté dans les extraits de moules exposées 96 h au TBT. Tous ces pics n'ont pas été caractérisés par MS/MS à cause de la faible quantité des extraits obtenus. Après analyse du spectre de masse du standard de 4-OHBuDBT qui est élué autour de $RT= 4,25$ min, le composé du pic à 7,15 min pourrait être un composé hydroxylé OHBuDBT qui est différent du standard. En général, dans toutes les analyses effectuées dans ce travail, les OHBuDBT générés biologiquement n'ont pas été détectés en mode d'ionisation négative, à l'inverse du standard 4-OHBuDBT synthétisé chimiquement. Ici, le groupe de masse associé à m/z 351 est plus intense pour le pic à $RT= 7,15$ min, en comparaison avec celui du standard. Ceci est dû au fait que la proportion de la phase

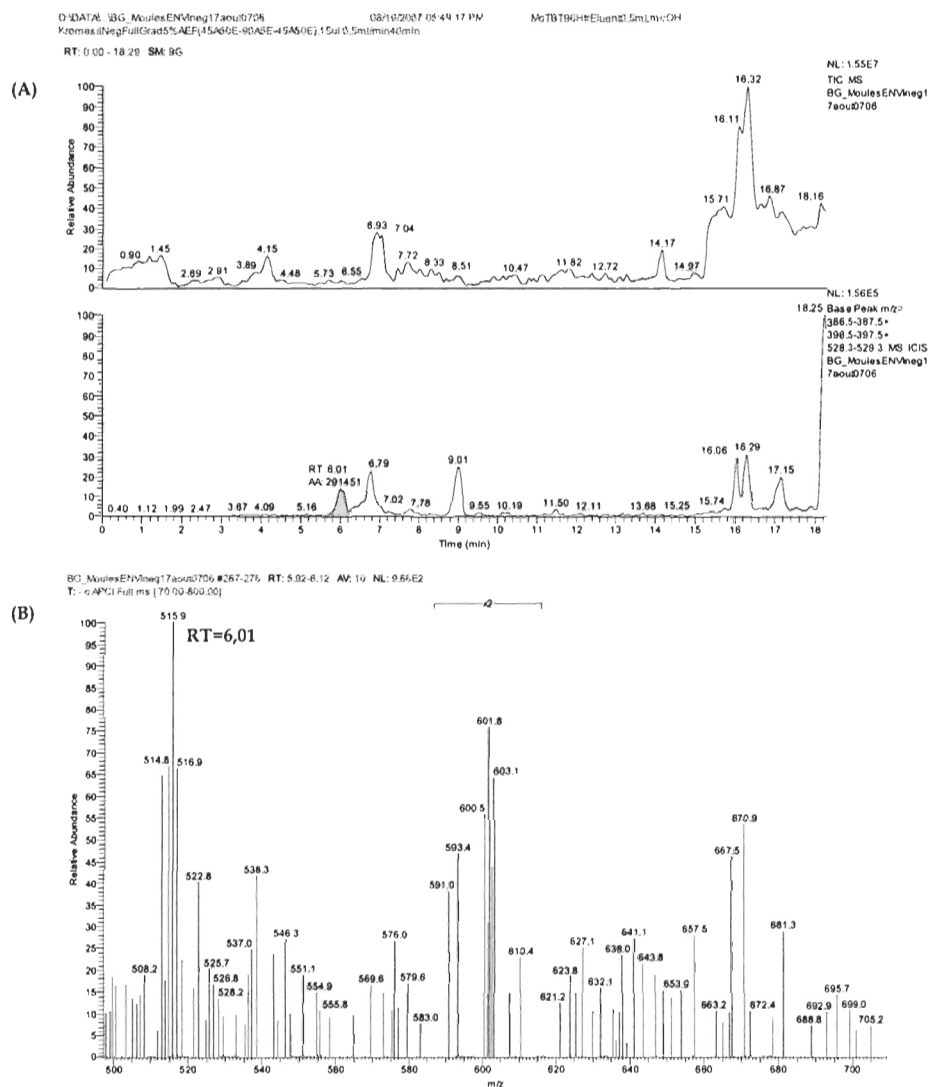


Figure 7. Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B) d'un extrait de tissus de moules ($n=2$) exposées 96 h au TBT, et le métabolite non identifié à RT= 6,01 min, avec les ions à m/z 517 et m/z 603 en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800].

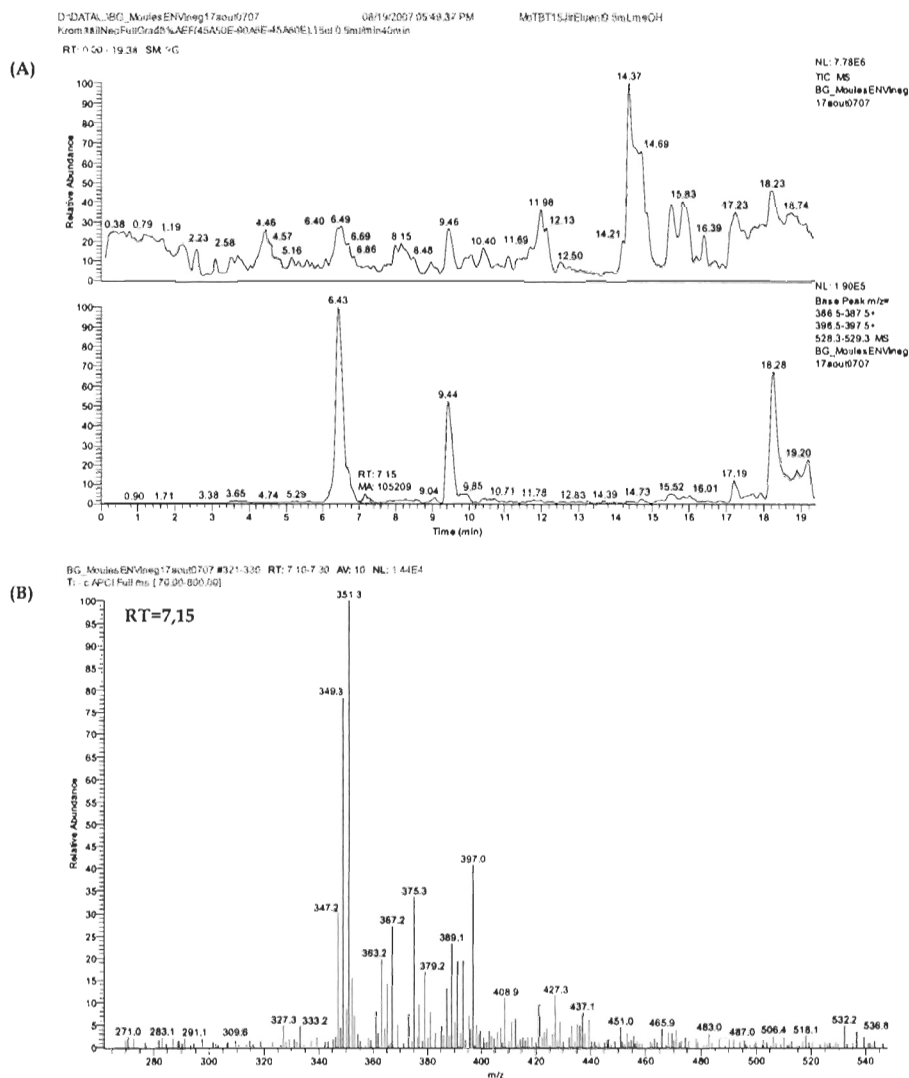


Figure 8. Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B) d'un extrait de tissus de moules ($n=2$) exposées 15 jours au TBT, et le composé à RT= 7,15 min avec m/z 351, 365, 389 et 397, en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800]. Noter l'absence du pic à RT= 6,01 min présent dans la figure 7 (Moules exposées 96 h).

mobile à cette étape de l'élution sur la colonne n'est pas la même qu'à 4 min (voir tableau 1 b du programme d'élution).

Les données d'eau de mer des expériences avec les moules exposées au TBT sont présentées dans le tableau 3. Aucun autre composé d'étain n'a été détecté. Les extraits du témoin positif au 15^{ème} (dernier jour) de l'expérience révèle une très faible proportion de TBT récupérée, probablement à cause de la volatilisation et/ou la forte adsorption sur les parois du bécher.

3.4. Métabolisme du TBT *in vivo* par les poissons

Analyse des foies de poissons

Les extraits de foies de poissons ont été analysés par LC uniquement avec l'APCI-MS, en utilisant les modes d'ionisation positif et négatif. Deux méthodes d'élution différentes avec des temps d'analyse différents ont été également utilisées. La première est la méthode décrite dans le tableau 1 en b et utilisée tout au long de ce travail, avec une proportion de la phase mobile AEF (5%) fixe pendant toute l'analyse. Dans la seconde méthode (tableau 1 c), la proportion de cette même phase mobile changeait durant l'élution, d'où les variations dans les temps de rétention des standards de BTs entre les deux méthodes. La figure 9 représente le chromatogramme et les spectres de masse des standards de TBT et de 4-OHBuDBT en mode d'ionisation positive, avec ce gradient d'élution.

La figure 10 représente un chromatogramme et un spectre de masse typique d'un extrait de foie d'un poisson exposé pendant 72 h au TBT, après injection péritonéale. Le chromatogramme, obtenu avec la seconde méthode d'élution, révèle la présence de trois pics d'intérêt: un petit pic à RT= 3,68 min, un grand pic à RT= 7,56 min et d'un autre pic plus petit à RT= 9,22 min. Le spectre de masse, acquis en mode d'ionisation positive de l'APCI-MS, correspondant à ces deux derniers pics révèle la présence des

Tableau 3. Données des concentrations du TBT en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ extrait de l'eau de mer, ayant servi à l'exposition des moules ainsi que ceux du témoin positif (contrôle sans moules, avec le TBT).

Traitement	Concentration initiale	J0 (10 min)	J1 (24 h)	J6 (144 h)	J15
Groupe contaminé A	2,965 (1 mL)	2,989 (1 mL)	0,073 (1 mL)	n.d.	0,090 (0,2 mL)
Groupe contaminé B	3,203 (1 mL)	2,390 (1 mL)	0,067 (1 mL)	n.d.	0,120 (0,2 mL)
Témoin négatif	2,987 (1 mL)				
Réplicat 1		4,786 (1 mL)	3,940 (1 mL)	—	0,329 (1 mL)
Réplicat 2		3,363 (1 mL)	3,955 (1 mL)	—	0,228 (1 mL)
moyenne		4,075 (1 mL)	3,948 (1 mL)	—	0,279 (1 mL)

n.d. non détecté.

— : non analysé.

Les chiffres entre parenthèses représentent le volume final de l'échantillon, avant analyse.

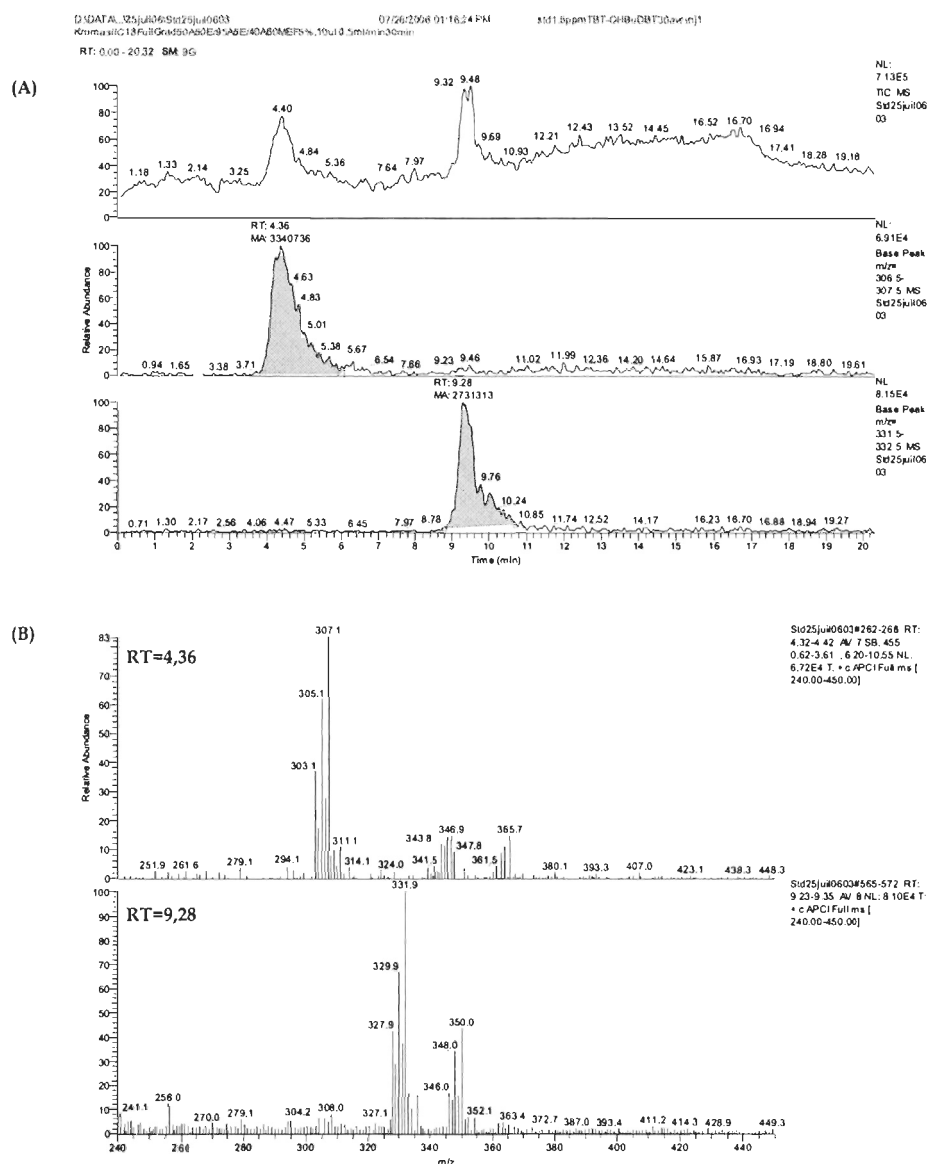


Figure 9. Chromatogrammes (A) en utilisant le second gradient d'élution sur la colonne Kromasil C-18 et les spectres de masse APCI (B) en mode d'ionisation positive des standards (1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) du 4-OHBuDBT (RT= 4,36 min) et du TBT (RT= 9,28 min), acquis en mode de balayage complet du MS [m/z 240-450].

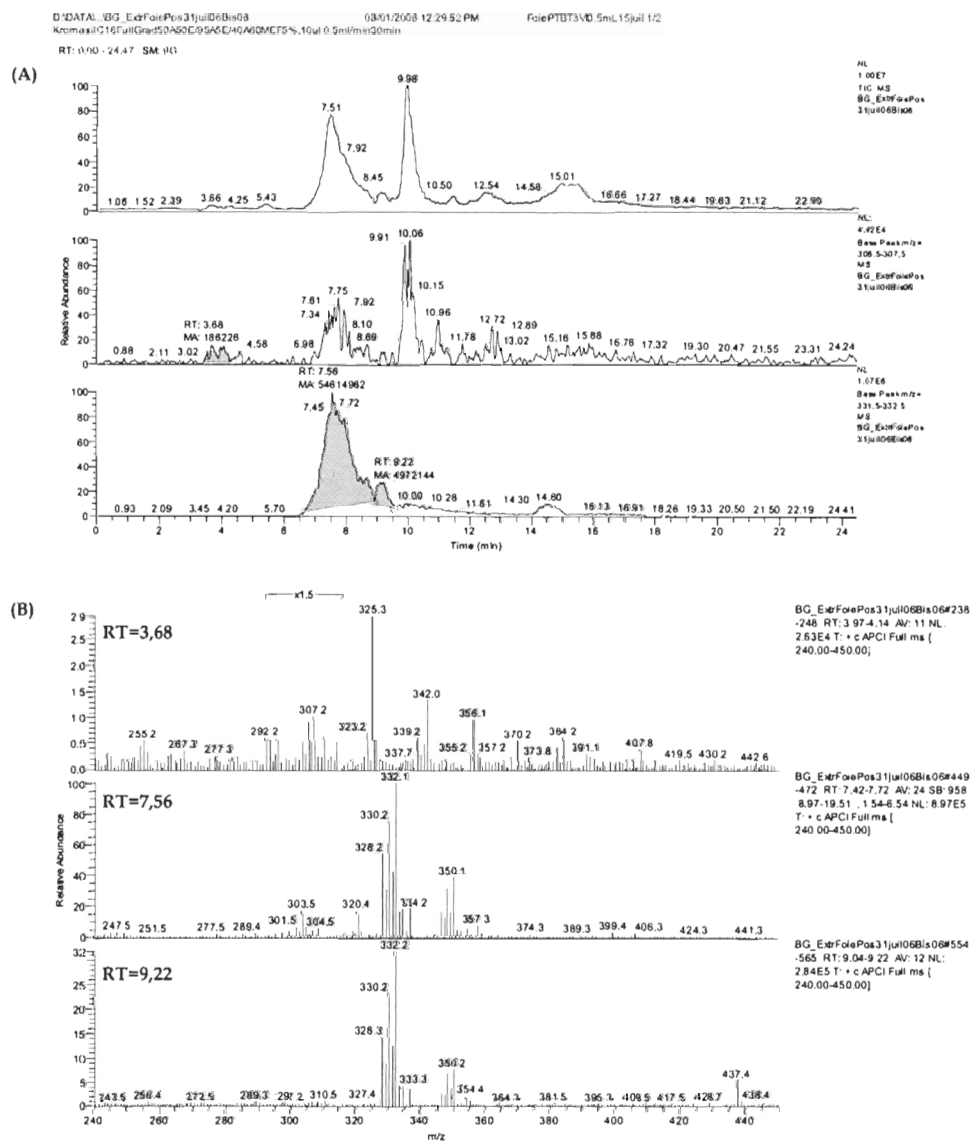


Figure 10. Chromatogrammes (A) obtenus sur une colonne Kromasil-C18 et spectres de masse APCI positive (B) d'un extrait de foie de poisson exposé au TBT (RT= 7,56 et 9,22 min et m/z 332 et 350) et le métabolite de phase I, le OHBuDBT (RT= 3,68 min et m/z 307), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-450].

ions à m/z 332 et m/z 350, caractéristiques du composé TBT. Au pic présent à $RT= 3,68$ (3,68-4,07) min correspond l'ion m/z 307 avec le patron isotopique de l'étain, en très faible intensité, qui est caractéristique d'un composé hydroxylé de phase I, un OHBuDBT produit *in vivo*. Ce dernier représente 0,34% de l'aire sous le grand pic à $RT= 7,56$ min et 3,74% du petit pic à $RT= 9,22$ min. Cependant, le signal est trop faible pour confirmer la structure chimique du composé.

La figure 11 représente les chromatogrammes et le spectre de masse du même extrait de foie de poisson, analysé avec la méthode habituelle d'élution sur la colonne Kromasil C-18 (tableau 1 b). Avec celle-ci, les standards de 4-OHBuDBT et de TBT sont élués à $RT= 3,85$ min et $RT= 9,94$ min, respectivement. Deux pics d'intérêt sont présents à $RT= 5,82$ min et à $RT= 9,49$ min dans les chromatogrammes de l'extrait de foie. Le spectre de masse correspondant aux deux premiers composés révèle principalement la présence de l'ion à m/z 307 ainsi que l'ion à m/z 345, avec une intensité faible, typiques d'un composé hydroxylé OHBuDBT et similaire à celui du standard 4-OHBuDBT. Le second pic montre les ions à m/z 332 et 350 caractéristiques du TBT. En utilisant les aires intégrées sous les pics chromatographiques (figure 11 A), le pic à $RT= 5,82$ min représente approximativement 0,18% de l'aire sous le pic du TBT accumulé dans le foie.

En mode d'ionisation négative de l'APCI avec acquisition en balayage complet entre m/z 240 et 800, un pic est présent à $RT = 9,61$ min (entre 9,10 et 10,77 min), élué avec la méthode habituelle. Le spectre de masse lui correspondant révèle la présence des ions m/z 371 et m/z 381 présents en très faible abondance relative et présentant un patron isotopique typique de l'étain (Figure 12). En comparaison au RT du standard du TBT (en mode positif) et avec la même méthode d'élution, ce pic chevauche celui du TBT acquis en mode d'ionisation positive.

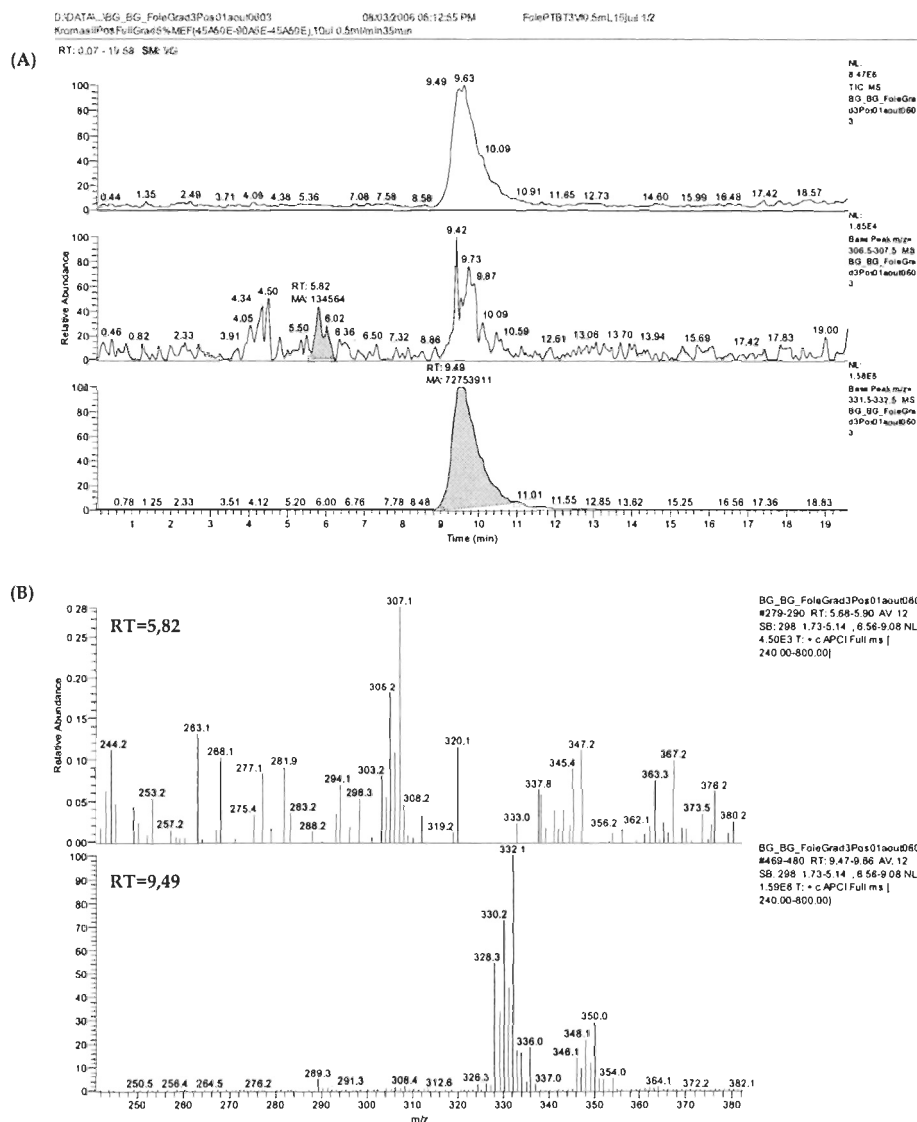


Figure 11. Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI positive (B) de l'extrait de foie de poisson exposé au TBT (RT= 9,49 min et m/z 332 et 350) et le métabolite de phase I, le OHBuDBT (RT= 5,82 min et m/z 307, 345), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-800].

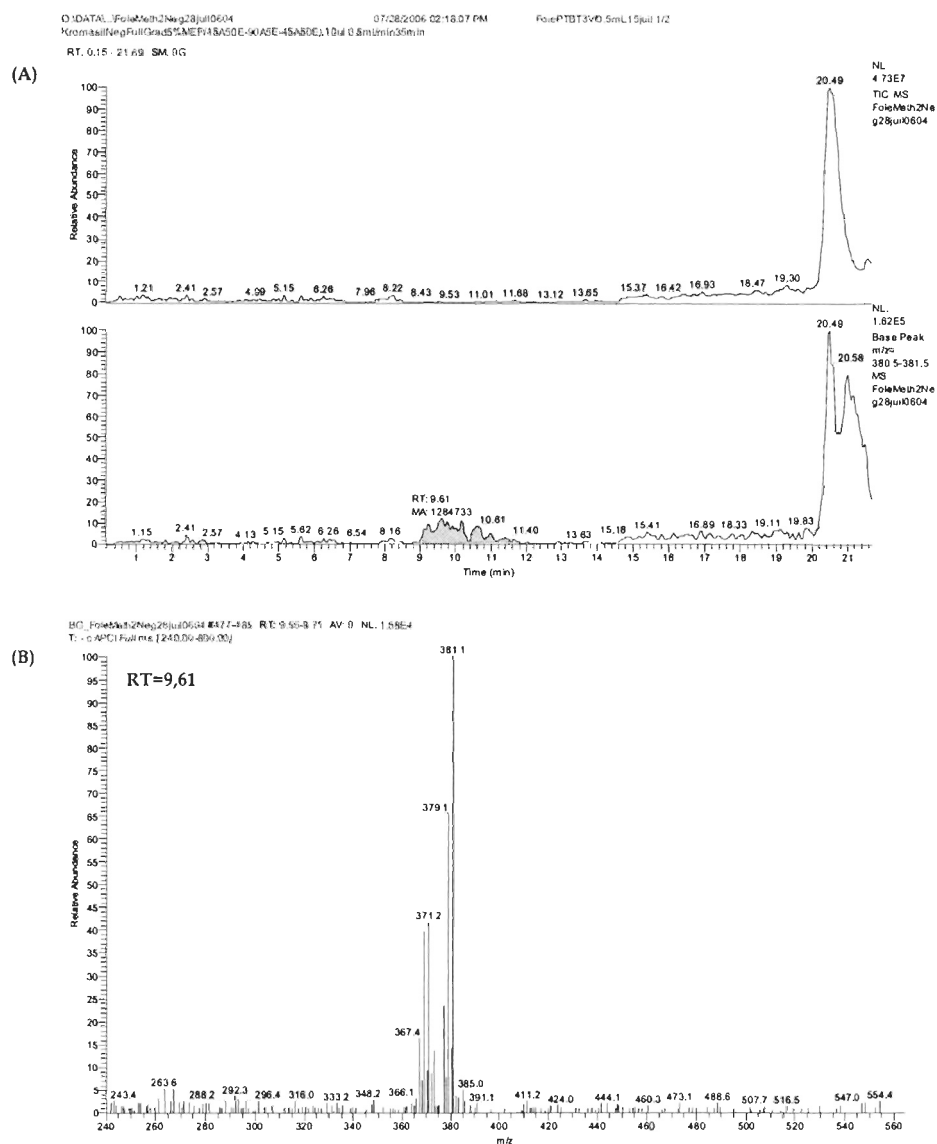


Figure 12. Chromatogrammes (A) et spectre de masse APCI négative (B) de l'extrait de foie de poisson exposé au TBT. Le(s) composé(s) inconnu(s) à RT= 9,61 min avec m/z 371 et m/z 381, en mode de balayage complet du MS [m/z 240-800].

Les pics d'ions à m/z 371 et m/z 381 ont été investigués par des expérimentations MS/MS, en mode de balayage complet du MS [m/z 100-500] (Figure 13). En appliquant une énergie de collision normalisée de 15% (unité arbitraire) et une largeur de fenêtre d'isolation de masse de 6 amu autour de l'ion à m/z 371, celui-ci génère un ion fragment mineur à m/z 325. La quantité d'extrait étant faible, la caractérisation de cet ion n'a pas pu être réalisée. Pour l'ion à m/z 381, une énergie de collision de 30% et une largeur de fenêtre d'isolation de masse de 6 amu ont été appliquées. Les ions fragments générés sont présents autour des masses à m/z 349, 331, 291. Ces ions correspondent aux ions caractéristiques du TBT observés habituellement en mode d'ionisation positive du MS, mais avec un proton de moins pour les ions à m/z 331 et m/z 349. L'ion à m/z 291 correspond à l'ion moléculaire du TBT.

Les expérimentations d'hydrolyse enzymatique à l'aide de la sulfatase et de la glucuronidase sur le même extrait de foie de poisson exposé au TBT n'ont révélé aucun autre composé avec le patron isotopique de l'étain.

Analyse des extraits de biles de poissons

Avec la méthode décrite dans la section méthodologie ainsi que toutes les méthodes testées, le TBT n'a pas été détecté dans les extraits de biles et ceux des vésicules biliaires analysées des poissons exposés au TBT. Par ailleurs, aucun composé avec le patron isotopique de l'étain n'a été détecté, que ce soit en mode d'ionisation positive ou négative.

Le sommaire des ions détectés par LC-API-MS dans les différentes matrices utilisées dans ce travail est présenté dans le tableau 4.

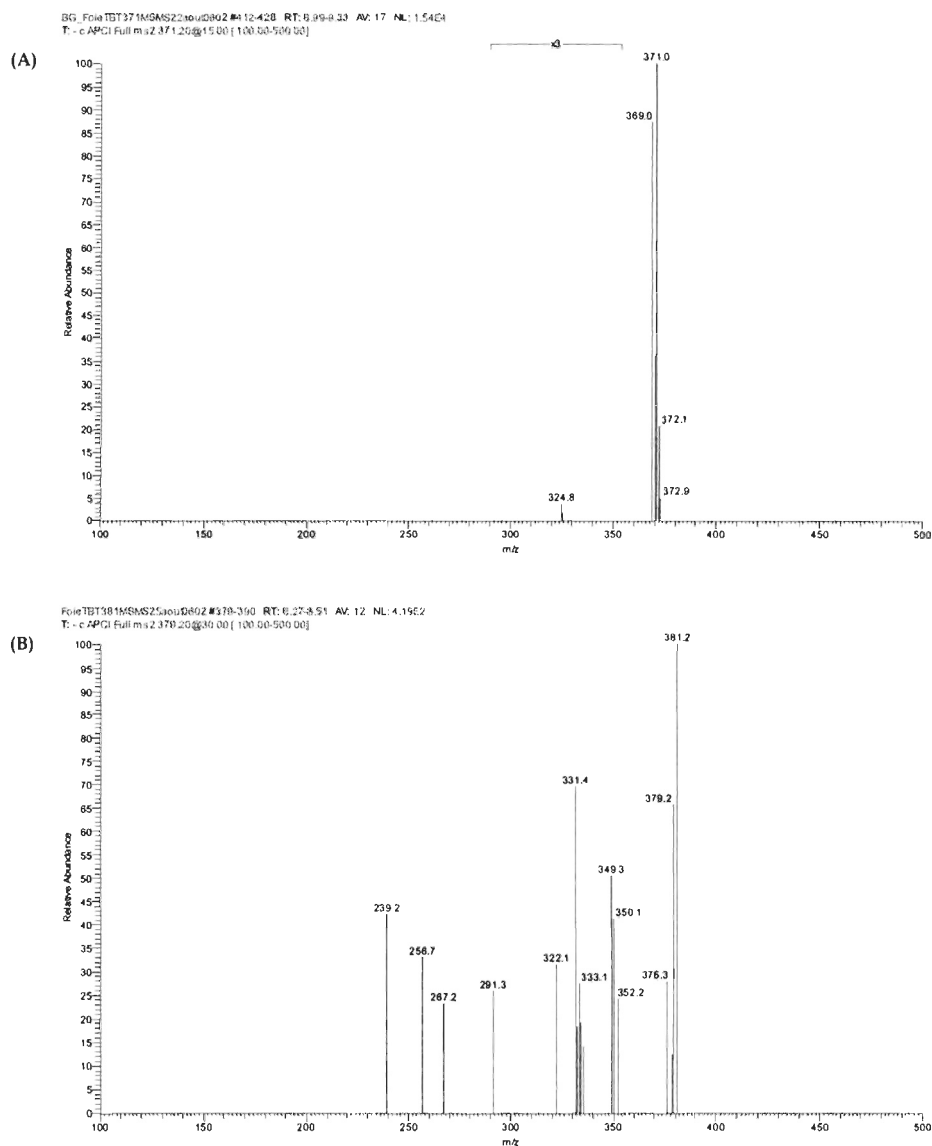


Figure 13. Spectres de masse APCI-MS/MS des ions m/z 371 (A) et m/z 381 (B) de l'extrait de foie de poisson exposé au TBT, avec une fenêtre d'isolation de masse de 6 amu et en mode de balayage complet du MS [m/z 100-500].

Tableau 4. Sommaire des données de spectres de masse des composés observés en balayage complet du MS chez les poissons, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que chez les moules, *in vivo*, exposés au TBT.

	Temps de rétention (min)	Ions observés en mode positif (m/z)	Temps de rétention (min)	Ions observés en mode négatif (m/z)	Structure proposée
<i>Microsomes</i>					
	3,96	307	—	—	OHBuDBT produit
<i>Foie</i>					
	3,68 ¹ /4,48 et 5,82 ²	307 ¹ / et 345 ²	—	—	OHBuDBT produit
	7,56 et 9,22 ¹ /9,49 ²	332, 350 ¹ et ²	9,61	371 (325)*/381 (349, 331, 291)*	inconnu/TBT absorbé
<i>Moules</i>					
Moules 96 h ^a	6,78	307, 348	—	—	OHBuDBT produit
	11, 54	332, 350	—	—	TBT accumulé
Moules 96 h ^b	—	pas de données	6,01	517, 603	inconnu
Moules 15 j ^b	—	pas de données	7,15	351, 389, 397	OHBuDBT produit

¹ et ² Programmes d'élution différents lors de la séparation sur la colonne Kromasil C-18. ¹ correspond au programme du tableau 1 c et ² à celui du tableau 1 b.

* Les ions fragments après analyse MS/MS.

^a et ^b Échantillons différents ($n=2$) traités avec deux différentes méthodes d'extraction.

4. DISCUSSION

Dans le présent travail, le métabolisme intermédiaire du TBT par deux espèces animales, l'omble de fontaine *Salvelinus fontinalis* et la moule bleue *Mytilus edulis*, a été étudié. À la différence des études précédentes publiées sur le sujet, la détection et l'identification des composés ont été réalisées à l'aide de la LC-API-MS, comme outil analytique. Le tableau 5 résume les principales méthodes analytiques utilisées dans la littérature, ainsi que les résultats obtenus par les différents auteurs chez diverses espèces animales. Ces études ont analysé les métabolites intermédiaires du TBT par comparaison au temps de rétention des standards authentiques de ces composés, synthétisés selon la méthode de Fish et al. (1976).

Les tests d'exposition des moules et des poissons (*in vivo*) ainsi que des microsomes de foie de poissons (*in vitro*) au TBT ont révélé, en plus du TBT, la présence d'autres composés. Ceux-ci ont été séparés et ionisés par LC-API et détectés et identifiés par spectrométrie de masse, grâce à leur patron isotopique typique de l'étain.

Nos données *in vivo* montrent que le TBT a été transféré depuis la cavité péritonéale vers le foie via la veine porte chez les poissons et bioaccumulé à partir de l'eau de mer chez les moules, avant d'être biotransformé. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent principalement des métabolites intermédiaires hydroxylés de phase I, hydroxybutyldibutylétain (OHBuDBT). En se basant sur les temps de rétention, les composés hydroxylés OHBuDBT générés biochimiquement, *in vitro* et *in vivo*, sont différents de l'hydroxybutyldibutylétain synthétisé chimiquement (4-OHBuDBT), dans notre laboratoire. Cependant, la similarité de leurs spectres de masse avec le standard ne laisse aucun doute sur leur identité.

Tableau 5. Comparaison des méthodes analytiques utilisées dans la littérature pour l'étude du métabolisme du TBT.

Méthodes analytiques	Organismes	Métabolites de TBT détectés	Références
LC-API-MS (colonnes Cyano et Kromasil 100-C18)	Poisson salmonidé <i>Salvelinus fontinalis</i> (foie, bile, microsomes de foie), Moules marines <i>Mytilus edulis</i> (chair totale). Injection intrapéritonéale, <i>in vivo</i> (poissons) exposition dans l'eau de mer (moules)	HydroxyButylDBT, autres métabolites non identifiés.	La présente étude
TLC (plaques de gel de silice) et CIMS. GLC (pour mesure indirecte d'un des composés)	Rats albinos (microsomes de foie).	1-, 2-, 3-, 4- hydroxyButylDBT et la cétone 3-oxoButylDBT.	^b Fish et al., 1976
TLC (plaques de gel de silice 60) et CIMS. GLC (pour mesure indirecte d'un des composés)	Rats albinos, Lapins, Souris (microsomes de foie), Souris albinos Swiss Webster (<i>in vivo</i> , foie, urine, fèces). Administration par un tube dans l'estomac.	DBT, MBT, 2-, 3-, 4- hydroxyButylDBT et la cétone 3-oxoButylDBT, métabolites polaires.	^b Kimmel et al., 1977
TLC (plaques de gel de silice) et GLC-MS.	Poisson <i>Leiostomus xanthurus</i> , Crabe bleu <i>Callinectes sapidus</i> , Crevette royale grise <i>Penaeus aztecus</i> (estomac, haemolymph, sang, hépatopancréas, foie, branchies, muscle/microsomes de foie de poissons et d'estomac de crabes), Huître <i>Crassostrea virginica</i> (chair totale). Exposition dans l'eau de mer et par la nourriture (sauf les huîtres et les crevettes).	DBT, MBT, (2-, 3-, 4-) hydroxyButylDBT et des métabolites polaires. Le 2-hydroxyButylDBT dominant parmi les composés hydroxylés.	^b Lee, 1986
GC-FPD (*DB-5) et GC-MS/SIM (*HP-1)	Différentes espèces de poissons (foie, muscle, œufs) et de mollusques bivalves et gastéropodes (chair totale).	DBT, MBT, dérivés oxygénés en position 3- et 4- (oxoButyl, hydroxyButyl, carboxyPropyl) du TBT et du DBT. Les (3-carboxyPropyl) et (3-hydroxyButyl) DBT dominants parmi les dérivés.	^b Suzuki et al., 1992
<i>Dérivation: bromure de méthylmagnésium.</i>	Milieu naturel.		

Tableau 5. Suite

Méthodes analytiques	Organismes	Métabolites de TBT détectés	Références
GC-FPD (^a DB-5), GC-MS et GC-MS/SIM (^a HP-1) et LC-Fluorescence (colonne Unisil Q CN). <i>Dérivation: bromure de méthylmagnésium.</i>	Rats Wistar (foie, rein, rate, cerveau, sang et urine). Administration orale.	DBT, MBT, dérivés oxygénés en position 3- et 4- (oxoButyl, hydroxyButyl, carboxyPropyl) du TBT et du DBT. Les (3-carboxyPropyl) et (3-hydroxy Butyl) Butylétain dominants parmi les dérivés.	^b Matsuda et al., 1993
GC-MIP-AED (^a DB-5; ^a HP-1; ^a DB-1701; ^a DB-225) <i>Dérivation: bromure de méthylmagnésium.</i>	Poisson marin <i>Pagrus major</i> . (muscle, foie, branchies, tractus digestif). Exposition dans l'eau de mer.	DBT, MBT, dérivés oxygénés en position 3- et 4- (oxoButyl, hydroxyButyl, carboxyPropyl) du TBT et du DBT.	^b Yamamoto et al., 1997
GC-MIP-AED (^a DB-5; ^a HP-1; ^a DB-1701; ^a DB-225) <i>Dérivation: bromure de méthylmagnésium.</i>	Moules marines <i>Mytilus edulis</i> et <i>M. graynus</i> (chair totale). Exposition en milieu naturel.	DBT, MBT, dérivés oxygénés en position 3- et 4- (oxoButyl, hydroxyButyl, carboxyPropyl) du TBT et du DBT.	^b Suzuki et al., 1998
GC-FPD (^a Bonded SE-54) <i>Dérivation: bromure d'hexylmagnésium.</i>	Poissons marins <i>Pleuronectes vetulus</i> et <i>Platichthys stellatus</i> (foie, bile, muscle, rein, rate). Injection intermusculaire.	DBT, MBT.	^b Krone et Stein, 1999
GC-MS (^a DB-5). Injection intrapéritonéale, <i>in vivo</i>	Poisson salmonidé <i>Salvelinus fontinalis</i> (foie, bile). Injection intrapéritonéale, <i>in vivo</i>	DBT, MBT	^b Padrós et al., 2000

TLC : Chromatographie sur couches minces.

CIMS : Ionisation chimique – spectrométrie de masse.

GLC-MS : Chromatographie gaz-liquide (correspond à la chromatographie gazeuse actuelle) – spectrométrie de masse.

GC-FPD : Chromatographie gazeuse – détection à photométrie de flamme.

GC-MS : Chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse.

SIM : Détection d'ions sélectionnés.

GC-MIP-AED : Chromatographie gazeuse – plasma d'hélium induit par micro-onde – spectrométrie à émission atomique.

LC : Chromatographie liquide haute performance.

^a Colonnes capillaires GC en polymères siliconés: HP-1: méthyle polysiloxane (silicone); DB-5: 5% phényle méthyle polysiloxane; DB-1701: 14% cyanopropylphényle méthyle polysiloxane; DB-225: 50% cyanopropylphényle méthyle polysiloxane; Bonded SE-54: quartz fondu (*fused silica*).^b Les standards de calibration (excluant les TBT, DBT et MBT) ont été synthétisés et purifiés par les auteurs.^c La GLC-MS a été utilisée par l'auteur uniquement pour vérifier la structure des standards synthétisés.

Dans le présent travail, parmi les quatre composés hydroxylés connus du TBT, nous avons choisi de synthétiser uniquement le composé hydroxylé en position C4, le 4-OHBuDBT. La raison est que les quatre composés OHBuDBT cationiques ont la même masse moléculaire (307) (Fish et al., 1976), d'une part. D'autre part, la procédure de synthèse du 4-OHBuDBT selon la méthode de Fish et al. (1976) est la plus simple en comparaison à celles des autres composés. L'identification des composés OHBuDBT s'est basée sur la similarité des spectres de masse avec le composé 4-OHBuDBT synthétisé chimiquement dans notre laboratoire, et révélant l'ion m/z 307. Ce résultat correspond aux données de Fish et al. (1976) concernant la composition des OHBuDBT. Par ailleurs, les composés hydroxylés détectés chez les poissons salmonidés et leurs microsomes de foie, ainsi que chez les moules bleues représentent une proportion très faible, par rapport au composé parent; le TBT. De plus, ils ne sont pas retenus de la même façon que le 4-OHBuDBT sur les colonnes chromatographiques et sont élués après lui, démontrant certainement une différence de polarité, malgré la similarité de leur spectre de masse. La séparation des composés a été réalisée en chromatographie en phase inverse, ce qui implique que les composés plus polaires sont élués avant les produits moins polaires.

Les travaux de Kimmel et al. (1977) ont montré que les quatre dérivés OHBuDBT du TBT diffèrent dans la position des taches *spot* chromatographiques les représentant sur les plaques de silice utilisées pour leur séparation en chromatographie sur couche mince (TLC). Cependant, les taches les représentant sur les plaques de silice restent proches les unes des autres, en comparaison au TBT et au DBT et la polarité augmente à partir du 2- vers le 4-OHBuDBT. La cétone 3-COBuDBT est encore plus polaire. Dans la présente étude, la position exacte du groupement hydroxyle sur l'une des chaînes butyles de la molécule n'a pas pu être identifiée. En se basant sur des études antérieures (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Lee, 1986), il est assez probable que l'hydroxyle se trouve soit sur le carbone 2 ou sur le carbone 3 de l'une des chaînes

butyles, donnant ainsi les 2-OHBuDBT et 3-OHBuDBT, respectivement. Mais, d'après ces mêmes auteurs, le 2-OHBuDBT est généralement observé qu'à l'état de traces car il est très sensible au pH acide.

Les études antérieures sur le métabolisme du TBT ont montré que cette molécule était tout d'abord oxydée *in vitro* par le système des monooxygénases à fonction mixte pour générer des métabolites hydroxybutyl- dibutylétains (OHBuDBT), hydroxylés en positions 1, 2, 3 et 4 d'un des carbones d'une des chaînes butylées, ainsi que la 3- cétone correspondante (Fish et al., 1976; Lee, 1986). L'instabilité des deux premiers composés, le 1- et le 2- OHBuDBT, mène à leur dégradation pour générer du DBT. Les autres composés formés via l'oxydation en position 3 ou 4 du TBT sont beaucoup plus stables selon ces auteurs et peuvent donc être détectés (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Lee, 1986). Parmi les composés de TBT étudiés (sous forme de chlorure, d'acétate et autres), Fish et al. (1976) ont également utilisé l'acétate du [1-¹⁴C] TBT pour quantifier les métabolites générés (1-, 2-, 3- et 4- OHBuDBT et la cétone 3-COBuDBT). L'identification de ces métabolites a été réalisée par co-chromatographie avec des standards synthétisés, purifiés ou non, en utilisant la TLC. La spectrométrie de masse par ionisation chimique (CIMS) a été utilisée pour obtenir le spectre de masse des standards et des métabolites 3-, 4- hydroxylés et de la 3-cétone, qui n'ont pas été présentés par les auteurs. Les deux premiers composés ont révélé l'ion m/e 307, $[M - \text{acétate (OAc)}]^+$ caractéristique et la cétone présentait l'ion m/e 305, $[M - \text{OAc}]^+$. Les auteurs ont utilisé la chromatographie gaz-liquide (GLC; similaire à la chromatographie en phase gazeuse actuelle GC) pour quantifier le composé hydroxylé en position 2, par une méthode indirecte de mesure du 1-butène. Ce dernier est formé par dégradation du 2-OHBuDBT, en condition acide. C'est cette procédure qui permet aux auteurs de conclure que le composé hydroxylé en position 2 est le produit majoritaire.

Donc, selon Fish et al. (1976) et Kimmel et al. (1977), le TBT est métabolisé *in vitro* par le système enzymatique des microsomes de foie de rat albinos pour générer du DBT, du 3-OHBuDBT, du 3-oxoBuDBT et du 4-OHBuDBT. Par ailleurs, Lee (1986) a montré que parmi les métabolites du ^{14}C -TBT, le composé 2-OHBuDBT était l'un des produits majoritaires avec le DBT et le MBT qui sont générés aussi bien *in vitro* par les microsomes de foie de poissons *Leiostomus xanthurus* et d'estomac du crabe bleu *Callinectes sapidus* que *in vivo* par ces deux classes d'animaux. Le 2-OHBuDBT est également produit en plus grande proportion par les microsomes de foie de rat albinos (50% du composé parent; Fish et al., 1976), de lapin (4% de la radioactivité initial du composé parent [^{14}C]TBT acétate; Kimmel et al., 1977) et *in vivo* par les souris (autour à 0,1% de la radioactivité initiale du [^{14}C]TBT acétate; Kimmel et al., 1977). Par contre, le 3-OHBuDBT ne semble pas être produit en quantité importante (14% du composé initial) et le 4-OHBuDBT encore moins (8% selon Fish et al., 1976).

À la lumière de ces résultats et avec les données actuelles, il n'est pas possible de déterminer lequel des métabolites hydroxylés du TBT (le 1-, 2-, ou 3- OH) est présent dans les tissus que nous avons analysés.

Chez les bivalves, le métabolisme intermédiaire du TBT a été moins exploré. Ces organismes sont en général considérés comme des espèces sentinelles qui ne possèdent pas de mécanismes efficaces de dépuration des contaminants et donc une faible activité enzymatique pour métaboliser les xénobiotiques (e.g. Livingstone et Farrar, 1985). Pour cette raison, ils ont depuis plusieurs années servi d'organismes pour le suivi environnemental des contaminants, entre autres celui des organoétains (e.g. Laughlin et al., 1986). Toutefois, les bivalves possèderaient les voies de dégradation similaires à ceux des poissons (Suzuki et al. 1998). Dans le présent travail et après analyse des tissus de moules témoins ainsi que les béciers contenant uniquement l'eau de mer et le

TBT, il apparaît clairement que les moules exposées au TBT l'ont métabolisé en produit hydroxylé, c'est-à-dire un composé OHBuDBT qui est différent du 4- OHBuDBT en se basant sur son temps de rétention. Ces métabolites ont été produits après 96 h d'exposition au TBT et sont retrouvés également dans les tissus de moules analysés après 15 jours d'exposition. D'autres composés ont été détectés, mais aucune information n'est disponible sur leur identité (ions m/z 517 et m/z 603).

Dans une étude antérieure, Lee (1986) a exposé en laboratoire des huîtres *Crassostrea virginica* au ^{14}C -TBT, dans l'eau de mer pour une période de 8 jours d'accumulation et de dépuraction. Cet auteur a rapporté une capacité limitée de ces bivalves à dégrader le TBT et n'ont retrouvé qu'une faible quantité de TBT métabolisé et dégradé en DBT, au 4^{ème} jour d'exposition.

Suzuki et al. (1998) ont exposé des moules marines *Mytilus edulis* et *Mytilus graynus* dans des baies marine contaminées aux organoétains, pour des expériences d'accumulation, de métabolisme et de dépuraction dans des conditions naturelles, sur une période de 60 à 70 jours. Ces milieux naturels Ils ont utilisé la GC-MIP-AED et la détection des composés a été réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des standards synthétisés, en utilisant 4 colonnes capillaires différentes. Parmi les métabolites d'organoétains accumulés à partir de l'eau de mer et retrouvés dans les tissus des moules marines *Mytilus graynus*, le MBT, le DBT, le (3-hydroxybutyl) butylétain et le (3-oxobutyl) dibutylétain ont été accumulés relativement à de forts niveaux. Le (3-oxobutyl) dibutylétain représentait le métabolite principal du TBT *Mytilus edulis* et a été retrouvé durant la période de dépuraction. Sa durée de demi-vie, relativement plus longue, était de 8,13 jours, alors que celle du 3-OHBuDBT, un métabolite mineur, était plus courte (3,98 jours) par rapport à celle du composé parent TBT (demi-vie = 4,82 jours). Les études d'accumulation et de dépuraction de Laughlin et al. (1986), réalisées une dizaine d'années auparavant, ont montré que la durée de demi-vie du TBT était de 14 jours.

Dans la présente étude, aucun métabolite conjugué du TBT n'a été identifié, que ce soit dans les tissus et fluide analysés de poissons (foie et bile), ni ceux des moules. D'un point de vue analytique, il est également possible que les méthodes d'extraction utilisées n'aient pas été adaptées pour l'analyse des métabolites conjugués. Les analyses LC-MS des extraits de tissus issus des expériences *in vivo* que ce soit en mode d'ionisation positif ou négatif n'ont pas révélé des composés issus du métabolisme de phase II. Les métabolites conjugués aux sulfates ou aux glucuronides d'un composé se détectent en mode négatif d'ionisation et ceux conjugués au glutathion se détectent en mode positif.

Par ailleurs, il est probable que les métabolites de phase II aient été générés *in vivo*, mais leur concentration a été très faible pour permettre leur détection en LC-MS. Cette hypothèse est appuyée par les informations fournies par Lee (communication personnelle) qui suggère que ces composés seraient produits en très faible quantité puis éliminés rapidement par le rein/l'urine, d'où leur faible concentration dans les autres tissus. Cet auteur (Lee, 1996) a trouvé des indications chez le crabe bleu *Callinectes sapidus* montrant l'existence de conjugués du TBT au GSH, en utilisant la chromatographie sur couche mince. Un jour après avoir contaminé des crabes bleus au ^{14}C -TBT *via* la nourriture, Lee (1989, 1996) a rapporté la formation de conjugués aux dérivés hydroxylés du TBT, retrouvés principalement dans le cytosol des cellules hépatopancréatiques. Les données préliminaires de cet auteur, basées sur des analyses en TLC suggèrent la présence de conjugués aux sulfates et au GSH (Lee, communication personnelle), mais aucun composé conjugué du TBT n'a été clairement identifié par spectrométrie de masse.

5. CONCLUSION

Malgré nos efforts répétés d'identification des métabolites de phase I et II du TBT en utilisant les techniques les plus modernes à notre disposition, il nous a été impossible de confirmer la présence de plusieurs métabolites de phase I déjà rapportés par quelques auteurs, sauf les composés du type hydroxybutyl dibutylétain (OHBuDBT) qui sont bien présents dans toutes les matrices biologiques analysés. Par ailleurs, il a aussi été impossible de retrouver les composés de phases II. D'autres composés avec le patron isotopique typique de l'étain ont été détectés, mais leur identification n'a pas été possible à cause de la faible quantité des extraits obtenus.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation APCU et ESI n'a pas permis d'identifier et de quantifier les composés conjugués proposés par Lee (1996), comme nous l'espérions au départ. Il est possible que ces composés soient 1) trop faiblement présents ou 2) trop fragiles pour être extraits et quantifiés par les méthodes développées dans ce travail, ou encore 3) réellement absents.

CHAPITRE III

MÉTABOLISME *IN VITRO* ET *IN VIVO* DU 4-HYDROXYBUTYL-DIBUTYLÉTAÏN (4-OHBUDBT)

1. INTRODUCTION

Les réactions métaboliques sont un processus important, car elles contribuent entre autres à la détoxification et à l'élimination d'une variété de xénobiotiques chez les organismes. Il n'existe que de très rares études qui se sont intéressées au métabolisme intermédiaire du tributylétain (TBT) ainsi que celui d'un de ses produits de dégradation, le dibutylétain (DBT). Des études réalisées au cours des années 1970-80 ont montré que le TBT est métabolisé par le système des cytochromes P-450, enzymes de phase I, en produits hydroxylés en position 1-, 2-, 3- ou 4- de l'une des chaînes butyles de la molécule (Fish et al., 1976; Kimmel et al. 1977; Lee, 1986). Des études plus récentes ont révélé la présence d'autres produits carboxylés et oxydés (Matsuda et al., 1993; Yamamoto et al., 1997; Suzuki et al., 1998).

Par ailleurs, le métabolisme conjugatif, de phase II, du TBT n'a pas été formellement identifié jusqu'à ce jour. Le but de cette phase du métabolisme est de conjuguer les espèces générées par oxydation en phase I, à des molécules endogènes telles que des sucres, des sulfates ou des acides aminés afin de faciliter leur élimination (George, 1994).

Dans le présent travail, des expérimentations ont été réalisées *in vitro* à l'aide de microsomes de foie de poisson salmonidé, l'omble de fontaine *Salvelinus fontinalis*, ainsi qu'*in vivo* en utilisant des ombles de fontaine et des moules bleues *Mytilus edulis*, afin d'étudier le métabolisme de conjugaison du TBT. Les incubations des microsomes et l'exposition des animaux *in vivo* ont été réalisées en utilisant un des métabolites intermédiaires du TBT, le delta-hydroxybutyl dibutylétain (4-OHBuDBT), synthétisé chimiquement dans notre laboratoire. Ce composé est produit *in vivo* et *in vitro* par les enzymes de phase I (Fish et al., 1976; Lee, 1986; Yamamoto et al., 1997).

Les expositions *in vivo* avaient comme but de connaître la capacité des deux classes d'animaux à produire différents types de métabolites conjugués du TBT, via

différentes voies enzymatiques de phase II, pour son élimination. Étant donné que la glucurono-conjugaison est la réaction de phase II la plus importante chez les poissons (Clarke et al., 1991), les réactions *in vitro* visaient la synthèse biochimique d'un composé glucuronidé du TBT, notamment le 4-OHBuDBT-glucuronide. Celui-ci serait utilisé comme standard d'analyse chimique pour les analyses *in vivo*. L'identification des composés a été réalisée en utilisant la LC-API-MS comme outil d'analyse chimique.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La méthodologie utilisée dans ce travail est essentiellement la même que celle décrite dans le chapitre 2 (métabolisme du TBT; section 2.). Les expérimentations *in vivo* sont similaires et diffèrent uniquement dans les doses utilisées et les solvants de dilution du 4-OHBuDBT lors des expositions. Les conditions chromatographiques et de spectrométrie de masse des analyses LC-APCI/ESI-MS sont les mêmes. Toutes les différences sont notées ci-dessous ainsi que la méthodologie utilisée pour les expérimentations *in vitro*.

2.1. Réactifs et solutions L'acide UDP-glucuronique de sodium UDPGA et le Triton X-100 ont été obtenus de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA). Pour les expérimentations *in vitro*, une solution mère à 2 mM de chlorure de 4-OHBuDBT dans l'EtOH a été préparée. La solution d'exposition des microsomes a été préparée dans l'EtOH puis dans l'eau Milli-Q. Le solvant a été évaporé au maximum sous jet d'azote (pas à sec car les BTs ne sont pas solubles dans l'eau). Le volume a été réajusté avec de l'eau Milli-Q, avant le début des expositions. Cette solution a été analysée en même temps que les échantillons.

2.2. Incubations des microsomes avec le 4-OHBuDBT

Les microsomes de poissons (2-3 mg de protéines par mL) ont d'abord été activés 25 min sur glace à l'aide de 0,1% Triton X-100 dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4; 10 mM MgCl₂), car le site actif de l'enzyme UDP-GT est localisé dans la lumière des microsomes. À cette concentration de microsomes, aucune liaison non spécifique du substrat aux protéines n'a été notée. Pour inhiber l'activité des glucuronidases, 5 mM de D-saccharo-1,4 lactone ont été ajoutés à la réaction. Le substrat 4-OHBuDBT (10 ou 25 µM, EtOH à 0,5% v/v) a été ajouté et préincubé avec les microsomes 10 min à 30°C, avant l'ajout de 3 mM UDP-GA pour initier la réaction. Le volume final du mélange réactionnel était de 2 mL. Des contrôles ont été réalisés simultanément, en absence soit du cofacteur ou des microsomes ainsi qu'avec des microsomes dénaturés à la chaleur (10 min à 80-100°C) et ont été incubés dans les mêmes conditions. Toutes les incubations ont été réalisées à 30°C dans un bain-marie avec agitation, durant 3 h et à l'air (tubes ouverts). Les réactions ont été terminées par refroidissement sur glace et traitées soit le jour même ou congelées à -80°C jusqu'au lendemain, pour extraction tel que décrit dans la section 2.4.

2.3. Expériences *in vivo*

Les poissons

Les ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), anesthésiés au MS-222 (100 mg.L⁻¹) ont reçu une injection intrapéritonéale de 4-OHBuDBT (7 mg.kg⁻¹) solubilisé dans l'huile de maïs, les poissons contrôles ayant reçu uniquement de l'huile de maïs (2 mL.kg⁻¹). Le temps d'exposition était de 72 h.

Les moules bleues

Les traitements au 4-OHBuDBT ont été réalisés dans trois béciers de 3 L contenant chacun 8 moules. Deux groupes de moules contaminées ont reçu une quantité de 4-OHBuDBT (dans le MeOH) de manière à atteindre une concentration théorique de $2,5 \mu\text{g 4-OHBuDBT.g}^{-1}$ de poids de chair humide. Le groupe contrôle a reçu une quantité équivalente de MeOH. Un contrôle négatif sans moules a été inclus pour évaluer la dégradation éventuelle du 4-OHBuDBT, sans la présence des moules. À la fin de l'expérience (15 jours), les béciers ont été rincés à l'EtOAc pour récupérer d'éventuels BTs adsorbés aux parois. Quatre moules ont été prélevés après 96 h d'exposition et les quatre autres restantes au bout de 15 jours.

2.4. Procédures d'extraction du 4-OHBuDBT et ses métabolites

Les méthodes d'extraction des tissus de moules, des foies et de la bile de poissons ainsi que les hydrolyses enzymatiques sont identiques. Une méthode d'extraction de la vésicule biliaire a été également testée et les résultats sont exposés.

Extraction des incubations de microsomes de foie.

Deux procédures d'extraction ont été utilisées. Dans la première, les réactions ont été terminées par addition de 6 mL de ACN-0,5% acide acétique froid, congelées 15 min à -80°C , puis centrifugées 10 min à $14\,000 \times g$ (12 000 rpm) à 2°C . Dans la seconde, les réactions ont été acidifiées à pH 2,5, puis extraites 3 fois à l'aide de 6 mL d'EtOAc. Les tubes ont été agités mécaniquement durant 10 min, puis centrifugés 5 min à 3 000 rpm. Dans les deux cas, les phases organiques de chaque traitement (avec cofacteur, sans cofacteur, etc.) ont été combinées, asséchées sur du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis concentrées sous vide presque à sec, à l'aide d'un évaporateur rotatif, à faible pression et à 35°C . Le résidu, récupéré et concentré presque à sec sous

faible jet d'azote, a été reconstitué dans 0,5 mL d'*iso*-propanol (propOH), avant analyse par LC-API-MS.

Extraction de l'eau de mer des béciers

Les échantillons d'eau de mer (100 mL) des expositions de moules, acidifiés à pH 4 à l'aide de 300 µL de 1N HCl, ont été extraits à l'aide de 2 x 20 mL d'EtOAc puis traités tel que décrit en section 2.4. du chapitre 2. L'EtOAc permet la récupération de plus de 80% de 4-OHBuDBT (voir chapitre 1).

Procédure d'extraction de la vésicule biliaire de poisson

Les vésicules biliaires d'un poisson témoin et celle d'un poisson contaminé ont subi une extraction similaire à celle de la figure 1 du chapitre 2, mais sans l'étape d'extraction fractionnée. Brièvement, les échantillons ont été homogénéisés, puis acidifié à l'aide 12N HCl, avant l'extraction n°1. Le produit de cette étape a été purifié de la même manière que dans l'étape 1 et le résidu reconstitué dans un volume final de 0,8 mL de propOH, avant analyse par LC-API-MS.

La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide de la colonne Discovery®Cyano en utilisant le gradient d'élution LC décrit dans le chapitre 2 (tableau 1 a).

3. RÉSULTATS

Dans les spectres de masse qui suivent, le ratio m/z de chaque groupe de pics (avec la distribution isotopique caractéristique de l'étain) réfère à l'ion le plus intense correspondant à l'isotope ^{120}Sn . Chaque figure représente le courant ionique total (TIC) et le courant ionique des ions d'intérêt pour cet étude, ainsi que les spectres de masse.

En ordonnée sont représentées les abondances relatives des pics, en fonction du temps en minute, pour les chromatogrammes et en fonction du ratio m/z , pour les spectres de masse. Par ailleurs, certains ions d'interférence peuvent apparaître dans les spectres de masse, tel qu'il a été signalé dans les chapitres précédents. Les données d'analyses LC-API-MS des standards de TBT et du 4-OHBuDBT ainsi que leurs spectres de masse sont identiques à celles présentées dans le chapitre 2 et les figures 3 et 4 du même chapitre.

3.1. Microsomes de foie de poissons exposés au 4-OHBuDBT

Les différentes tentatives de synthèse biochimique du glucuronide du 4-OHBuDBT à l'aide des expérimentations *in vitro* n'ont abouti à aucun résultat.

Cependant, un pic a été détecté dans les extraits des incubations contrôles avec microsomes sans le cofacteur UDP-GA et celles avec UDP-GA, au même temps de rétention que le standard de TBT ($RT = 11,10$ min) en mode d'ionisation positive de l'ESI-MS. Les spectres de masse correspondants à ce pic dans les deux échantillons sont présentés dans la figure 1 et révèlent principalement l'ion à m/z 332, caractéristique du TBT, en plus de l'ion à m/z 307 caractéristique du 4-OHBuDBT.

3.2. Métabolisme *in vivo* du 4-OHBuDBT par les moules bleues

Les figures 2 et 3 représentent les chromatogrammes d'extraits de tissus de moules ($n = 2$) exposées respectivement 96 h et 15 jours au 4-OHBuDBT synthétisé chimiquement, via l'eau de mer, ainsi que les spectres de masse acquis en mode positif de l'ESI. Des pics d'intérêt (avec la distribution isotopique typique de l'étain) sont présents dans les deux extraits, 96 h et 15 jours, à $RT = 4, 24$ et $3,97$ min, $RT = 4,77$ et $4,49$ min et à $RT = 12,10$ et $11,74$ min, respectivement. Les spectres de masses correspondant à ces pics révèlent la présence des ions à m/z 307, m/z 321 et m/z 332 respectivement, en

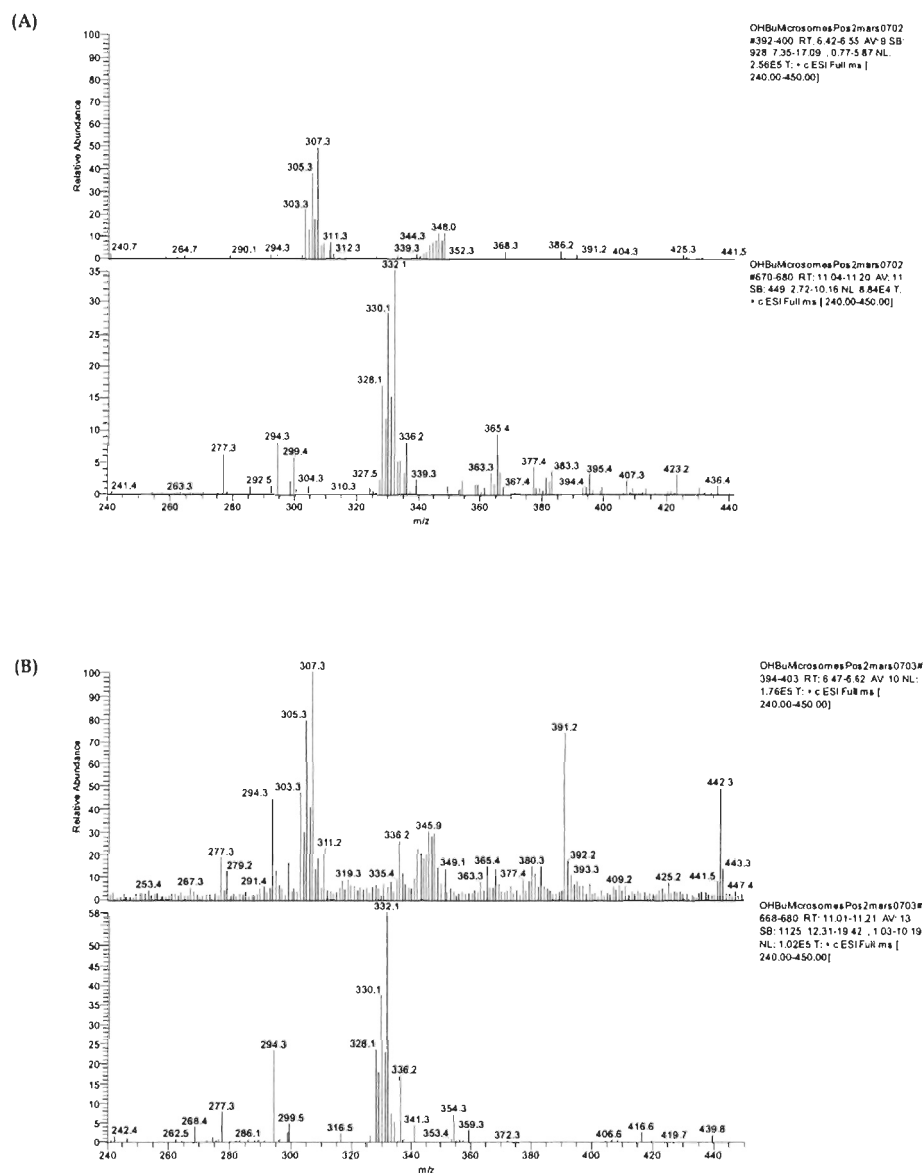


Figure 1. Spectres de masse ESI positive des extraits de microsomes de foie de poissons incubés pendant 3 h avec du 4-OHBuDBT (m/z 307), sans cofacteur UDP-GA (A) et avec UDP-GA (B), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-450]. Noter la présence de l'ion à m/z 332 caractéristique du TBT

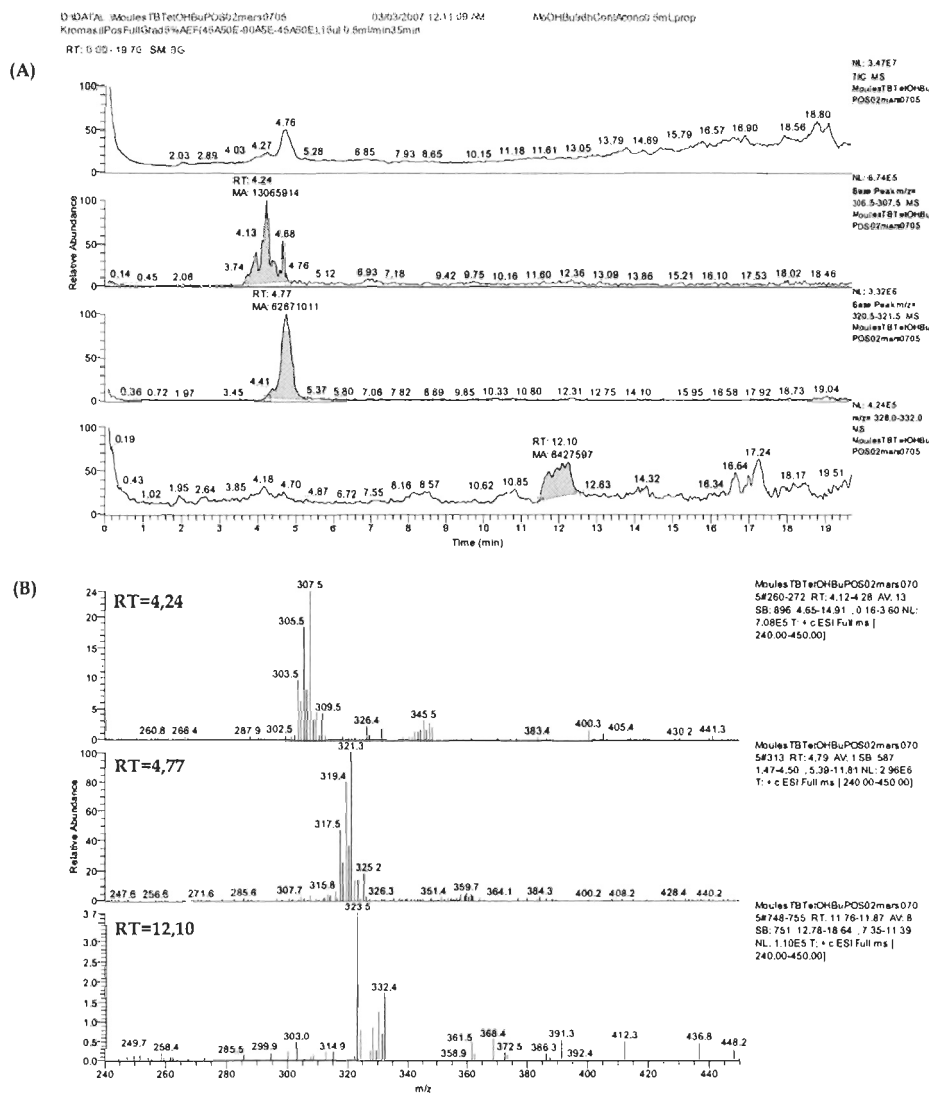


Figure 2. Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI positive (B) d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 96 h au 4-OHBuDBT (RT= 4,24 min), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-450]. Le pic à RT= 12,10 min correspond au TBT (m/z 332) et le pic à (RT= 4,77 min) est un composé inconnu (m/z 321).

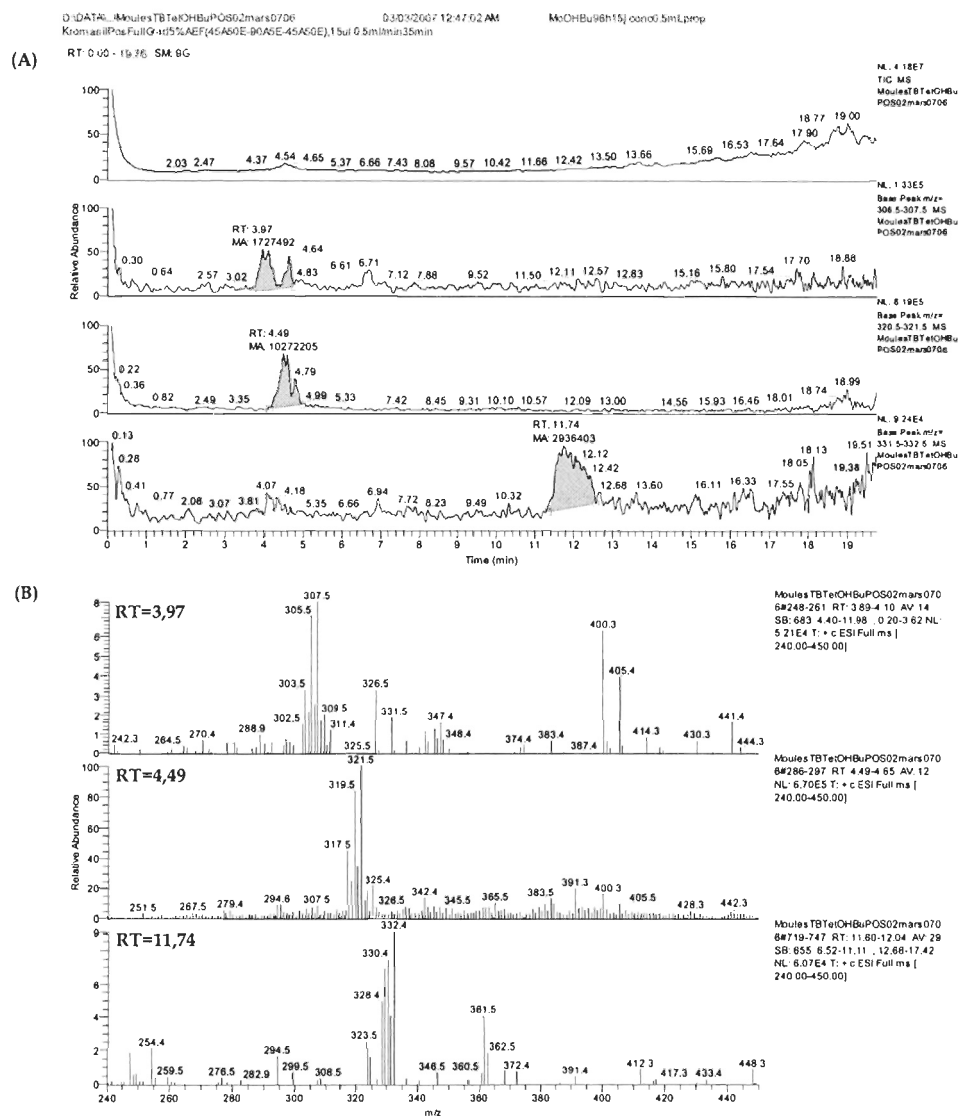


Figure 3. Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI positive (B) d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 15 jours au 4-OHBUDBT (RT= 3,97 min), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-450]. Le pic à RT= 11,74 min correspond au TBT (m/z 332) et le pic à (RT= 4,49 min) est un composé inconnu (m/z 321).

abondances relatives importantes. En analysant les aires sous les pics de la figure 2, l'aire du pic relié à m/z 321 représente 4,8 fois celle de l'aire sous le pic relié à m/z 307. Celle du pic à m/z 332 représente quasiment la moitié de l'aire sous le pic correspondant à m/z 307. Dans l'extrait de moules exposées pendant 15 jours, l'aire sous le pic relié à m/z 321 représente à peu près 5,9 fois celle de l'aire sous le pic relié à m/z 307. L'aire sous le pic relié à m/z 332 représente 1,7 fois celle de ce dernier.

L'identification de l'ion à m/z 321 n'a pas été possible, car la quantité de l'extrait généré était insuffisante pour les mesures en MS/MS. Les deux autres ions à m/z 307 et m/z 332, sont caractéristiques des composés 4-OHBuDBT et TBT, respectivement. Ce dernier, présent dans les extraits de moules, possède le même temps de rétention et le même spectre de masse que le standard de TBT. Le mélange réactionnel utilisé pour les expositions ne comportait pas de TBT. Ces données montrent que les moules exposées au 4-OHBuDBT ont accumulé le composé 4-OHBuDBT et l'ont transformé en un autre composé non caractérisé à m/z 321 ainsi que du TBT. Par ailleurs, l'ion à m/z 321 accompagné de l'ion à m/z 435 (adduit de l'ion m/z 321 avec des composantes de la phase mobile) a été détecté dans un extrait d'eau de mer de l'un des béciers répliqués ayant servi à l'exposition des moules au 4-OHBuDBT, au jour 6 (144 h), suggérant son excrétion dans l'eau de mer. L'aire sous le pic correspondant à cet ion montre qu'il est présent en forte concentration (figure 4). Il est élué au tout début, en même temps et après le volume mort. Dans ce même extrait, le 4-OHBuDBT n'a pas été détecté.

En mode d'ionisation négative de l'ESI, le chromatogramme de l'extrait de moules exposées durant 96 h (figure 5) révèle la présence de deux pics inconnus qui se chevauche à RT entre 4,58 et 4,98 min et RT= 4,81 min, après le pic du standard de 4-OHBuDBT (RT= 4,27 min). L'analyse des spectres de masse montre la présence des ions à m/z 387 et 397 caractéristiques du 4-OHBuDBT en mode d'ionisation négative (voir chapitre 2). Ces ions sont présents en très faible intensité en mode négatif dans

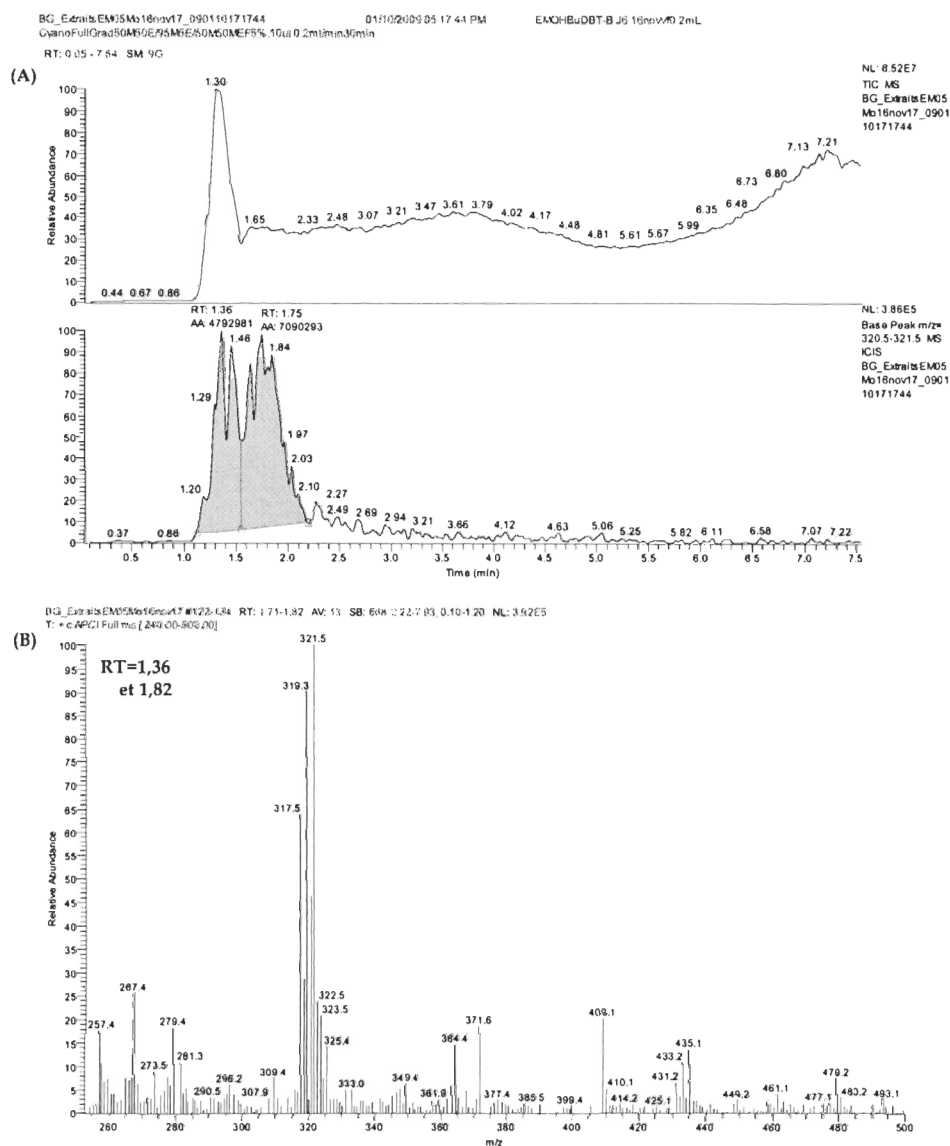


Figure 4. Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI négative (B) d'un extrait d'eau de mer ayant servi à l'exposition des moules au 4-OHBuDBT, au jour 6. Le pic inconnu à RT= 1,36 et 1,82 min (méthode avec la colonne Discovery®Cyano) correspond à m/z 321 avec l'ion adduit à m/z 435, en mode de balayage complet du MS [m/z 240-500].

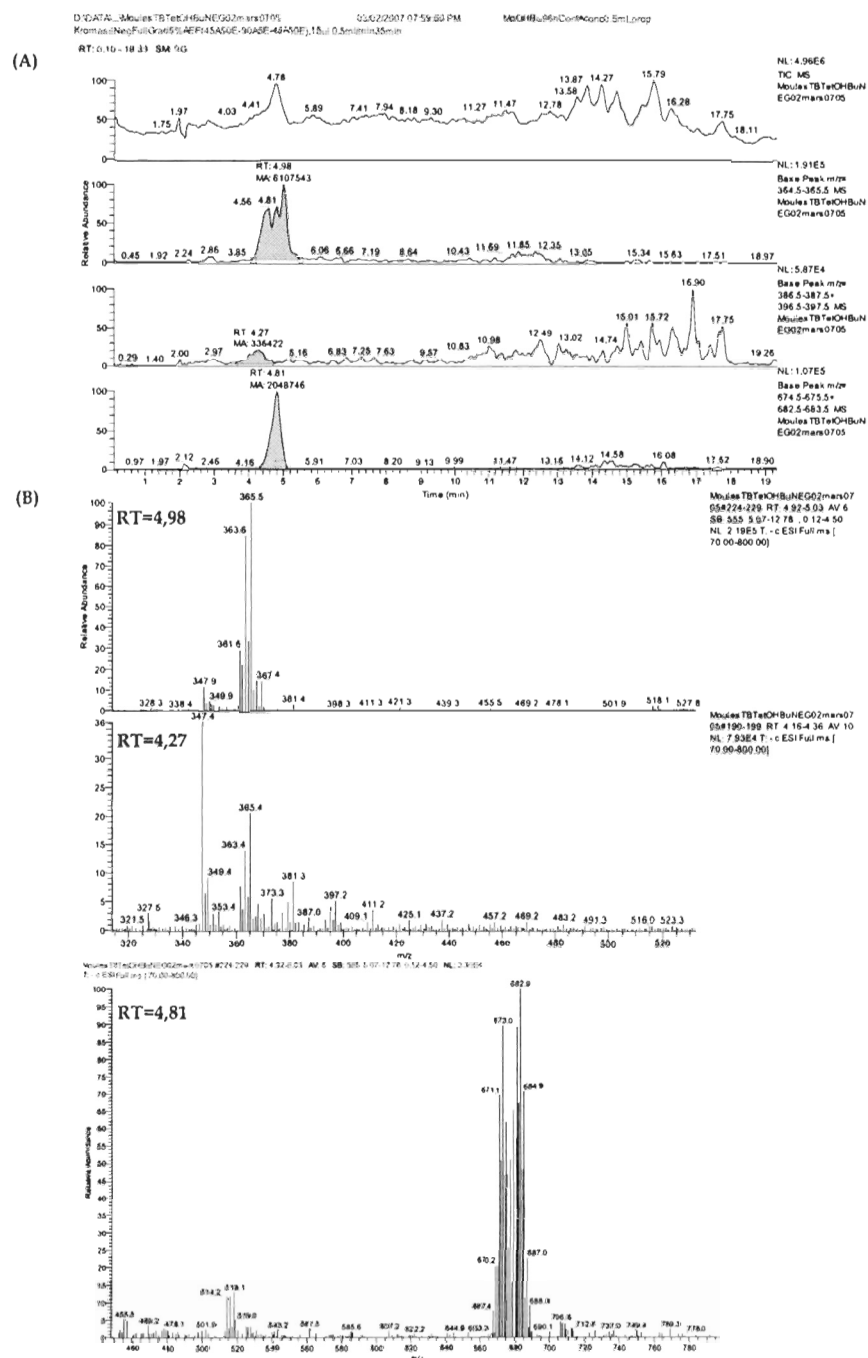


Figure 5. Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI négative (B) d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées pendant 96 h au 4-OHBUDBT (RT=4,27 min; m/z 387, 397) et le pic inconnu (RT= 4,98 min; m/z 365) et les m/z 518, 673 et 683 (RT= 4,81), en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800].

l'extrait de moules exposées pendant 15 jours (figure 6, RT= 3,73 min). Le spectre de masse correspondant au pic à RT= 4,98 min (RT= 4,19 min pour les moules exposées 15 jours) révèle un ion à m/z 365, pour les moules prélevées après 96 h et 15 jours d'exposition au 4-OHBuDBT. La quantité des extraits n'étant pas suffisante, la caractérisation par MSⁿ n'a pas été complétée. En considérant les temps de rétention sur la colonne Kromasil C-18 utilisée, ce pic correspond au pic élué à RT= 4,51 min avec m/z = 321, acquis en mode d'ionisation positive avec le même gradient d'élution. L'analyse ultérieure en APCI-MS/MS d'un autre extrait de moules comportant l'ion m/z 365, en appliquant une énergie de collision normalisée de 45% (unité arbitraire) et une largeur de fenêtre d'isolation de masse de 10 amu, montre un ion fragment majeur à m/z 321 (figure 7). L'ion à m/z 365 correspondrait à un adduit de l'ion m/z = 321 avec un groupement carboxyle (44 amu) de l'acide formique provenant de la phase mobile. Le spectre de masse du pic à RT= 4,81 min (4,19 min pour les moules exposées 15 jours) révèle la présence d'ions à m/z 518 ainsi que m/z 673 et m/z 683 avec le patron isotopique typique de l'étain, mais qui n'ont pas été caractérisés. Le pic correspondant à ces ions est présent en plus faible intensité dans l'extrait de moules exposées pendant 15 jours.

En analysant les aires sous les pics, l'aire de ce pic ne représente que 2% de celle du pic de l'extrait de moules exposées pendant 96 h. De même, l'aire du pic correspondant à l'ion m/z 365 de l'extrait de moules exposées pendant 15 jours représente à peu près 36% de celle de l'extrait de moules exposées durant 96 h.

Dans le témoin négatif (tableau 1, ce chapitre), auquel le 4-OHBuDBT a été ajouté dans l'eau de mer en absence de moules, du TBT a été retrouvé uniquement dans les deux réplicats d'extraits d'eau mer, prélevés 10 min après ajout du composé 4-OHBuDBT en début d'expérience. Sa concentration (moyenne des deux réplicats = 0,112 ng.μL⁻¹) représentait approximativement 6% de la concentration du 4-OHBuDBT du même extrait. Le composé 4-OHBuDBT a été retrouvé à la fin de l'expérience dans

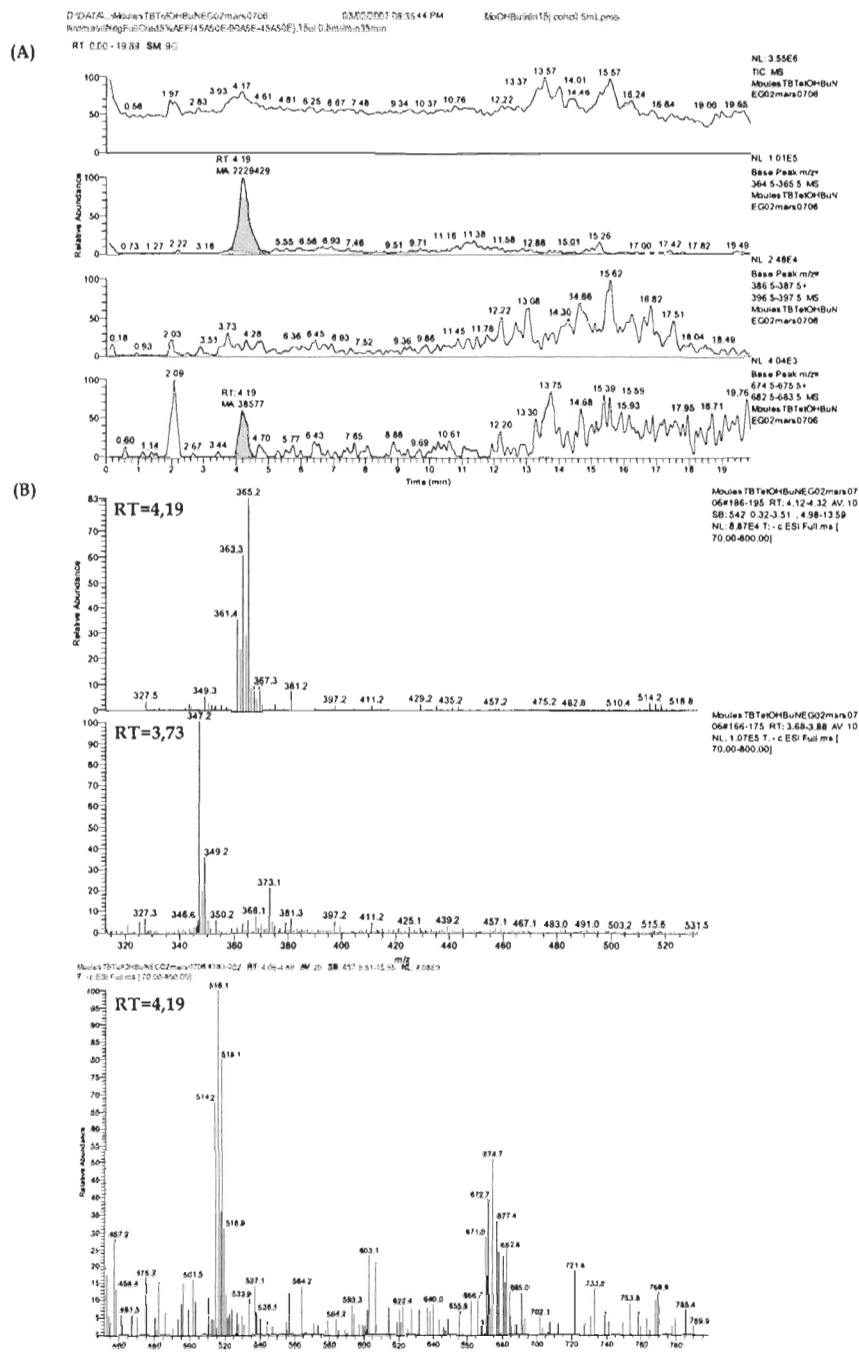


Figure 6. Chromatogrammes (A) et spectres de masse ESI négative (B) d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 15 jours au 4-OHBuDBT (RT= 3,73 min) et les pics inconnus (RT= 4,19 min; m/z 365) et les m/z 518, 673 et 683, en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800].

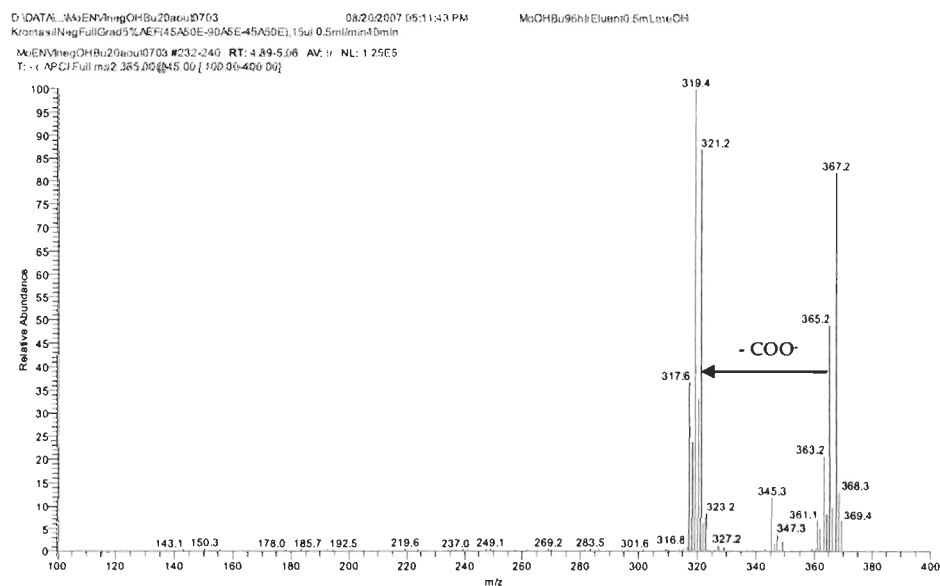


Figure 7. Spectre de masse APCI-MS/MS négatif de l'ion m/z 365 d'un extrait de tissus de moules ($n = 2$) exposées 96 h au 4-OHBuDBT, en mode de balayage complet du MS [m/z 100-400] et en appliquant une énergie de collision de 45% (unité arbitraire) et une fenêtre d'isolation de masse de 10 amu.

Tableau 1. Données des concentrations du 4-OHBuDBT en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et d'autres composés d'étain extraits de l'eau de mer, ayant servi à l'exposition des moules et ceux du témoin positif (contrôle sans moules, avec le 4-OHBuDBT).

Traitement	Concentration initiale	J0 (10 min)	J1 (24 h)	J6 (144 h)	J15
Groupe contaminé A	2,999 (1 mL)	3,989 (1 mL)	0,038 (1 mL)	n.d.	n.d.
Groupe contaminé B	2,907 (1 mL)	1,880 (1 mL)	0,039(1 mL)	n.d./ <i>m/z</i> 321	n.d.
Témoin négatif	2,953 (1 mL)				
Réplicat 1		1,171/0,108* (1 mL)	0,273 (1 mL)	—	0,944 (1 mL)
Réplicat 2		2,544/0,115* (1 mL)	0,350 (1 mL)	—	2,263 (1 mL)
moyenne		1,858/0,112* (1 mL)	0,312 (1 mL)	—	1,604 (1 mL)

n.d. non détecté.

— : non analysé.

* Concentrations du TBT.

le témoin négatif.

Avec la seconde méthode d'extraction (voir chapitre 2), le chromatogramme d'un extrait d'autres moules ($n = 2$) exposées 96 h au 4-OHBuDBT (figure 8), révèle la présence de deux pics d'intérêt en mode d'ionisation négatif, à $RT = 4,88$ min et $RT = 18,26$ min, dans la fraction d'élution sur la cartouche ENVI-C18 (EtOAc : MeOH, 90 : 10). Le spectre de masse montre la présence de l'ion à m/z 365 correspondant au premier pic et un ion à m/z 529 accompagné des ions à m/z 571 et m/z 596 correspondant au second pic. Ces ions restent non identifiés.

3.3. Métabolisme *in vivo* du 4-OHBuDBT par les poissons

Analyse des foies

Les extraits de foies de poissons ont été analysés par LC-APCI-MS en utilisant les deux modes d'ionisation, positif et négatif. Par ailleurs, les foies de poissons témoins, n'ayant été injecté qu'avec de l'huile, leurs extraits ne présentaient aucun pic d'étain, montrant l'absence d'une contamination accidentelle de ces poissons.

La figure 9 représente le chromatogramme et le spectre de masse d'un extrait de foie de poisson exposé au 4-OHBuDBT, acquis en mode d'ionisation positive de l'APCI-MS. Le chromatogramme révèle la présence d'un pic important à $RT = 4,20$ min. Celui-ci correspond à l'ion de base m/z 307 ainsi que les ions à m/z 347 et m/z 366, caractéristiques du 4-OHBuDBT transféré depuis la cavité péritonéale vers le foie du poisson, via la veine porte. Un autre pic est élué à $RT = 5,08$ min dont le spectre de masse correspondant montre la présence de l'ion m/z 321, comme celui observé chez les moules exposées au 4-OHBuDBT. L'aire sous le pic correspondant à m/z 321 représente presque 4,5% de l'aire sous les pics du 4-OHBuDBT. Par ailleurs, le spectre de masse acquis

en

mode

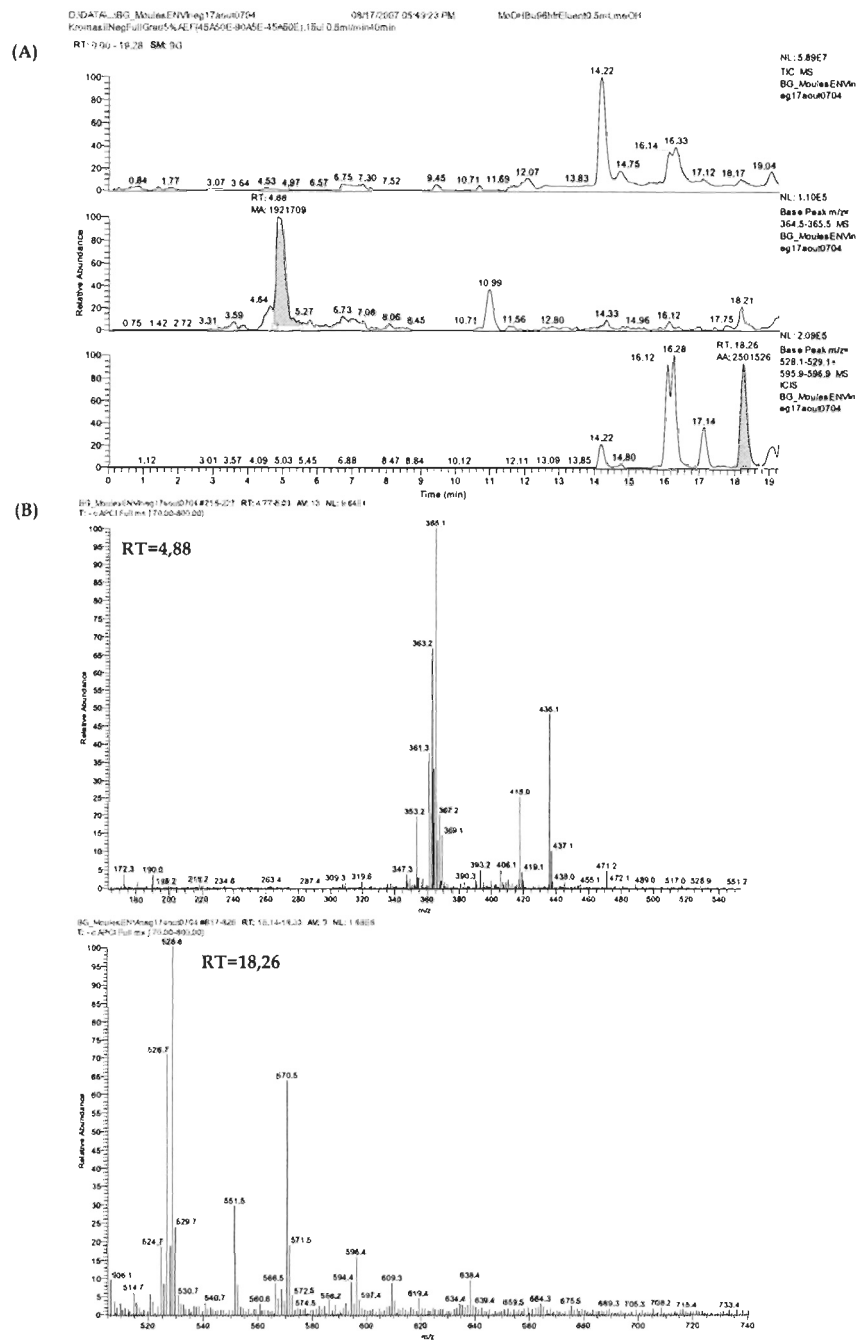


Figure 8. Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B) d'un extrait de tissus de moules ($n=2$) exposées 96 h au 4-OHBUDBT révélant des pics inconnus à RT= 4,88 min (m/z 365) et RT= 18,26 (m/z 528), en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800].

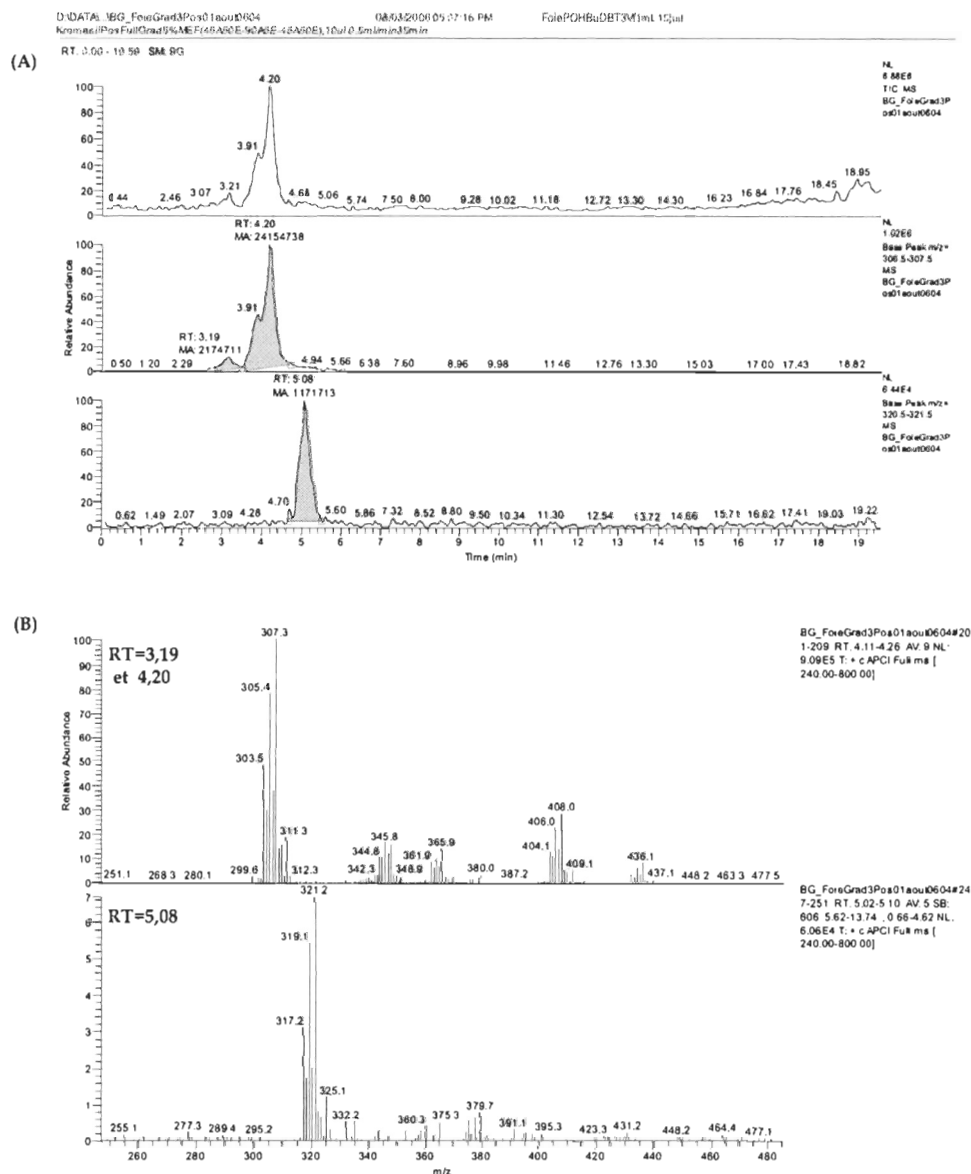


Figure 9. Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI positive (B) d'un extrait de foie de poisson exposé au 4-OHBuDBT (RT= 3,19 et 4,20 min; m/z 307) et le métabolite non identifié (RT= 5,08 min; m/z 321), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-800].

d'ionisation positive ne révèle pas d'autres groupes de masses avec le patron isotopique de l'étain.

En mode d'ionisation négative, le chromatogramme (figure 10) de l'extrait révèle un pic à $RT = 4,10$ min. Le spectre de masse correspondant montre la présence des ions m/z 387 et m/z 397 caractéristiques du 4-OHBuDBT injecté au poisson et transféré au foie, depuis la cavité péritonéale. Un autre pic est présent à $RT = 5,28$ min révélant l'ion à m/z 365 et l'aire sous ce pic représente 22,6% de l'aire sous le pic à $RT = 4,10$ min. Par ailleurs, ce pic correspond au pic élué au même temps de rétention en mode positif et présentant l'ion à m/z 321. Des expérimentations en MS^2 ont été effectuées pour étudier les ions fragments et les relier par la suite à la structure de la molécule mère. En appliquant une énergie de collision allant de 15 à 30 % (unité arbitraire) et une fenêtre d'isolation de masse de 6 amu, l'ion m/z 365 génère un ion principal à m/z 321 (figure 11). Des expérimentations MS^3 ont été également effectuées pour identifier l'ion fragment à m/z 321, mais la quantité d'extrait étant insuffisante, la caractérisation n'a pas été possible.

Les expérimentations d'hydrolyse enzymatique à l'aide de la sulfatase et de la glucuronidase sur le même extrait de foie de poisson injecté au 4-OHBuDBT n'ont pas révélé d'autres pics, ni d'ions avec le patron isotopique typique de l'étain différents de ceux existant dans l'extrait original.

Extraits de bile et de vésicule biliaire

L'analyse de l'éluat de bile sur la cartouche d'extraction en phase solide SAX échangeuse d'anions, révèle un pic à $RT = 3,75$ min (figure 12). Le spectre de masse correspondant à ce pic et acquis en mode d'ionisation négative de l'APCI-MS

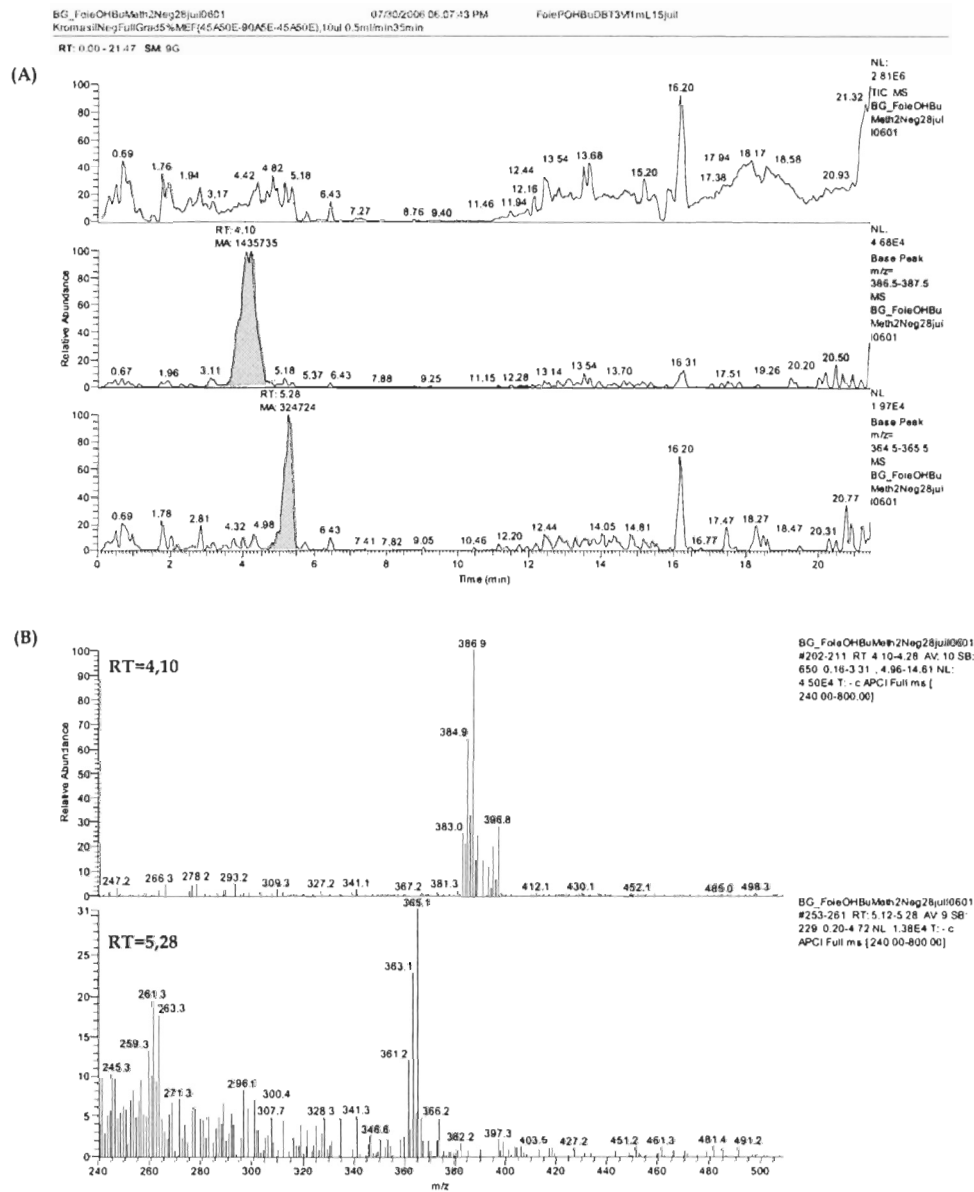


Figure 10. Chromatogrammes (A) et spectres de masse APCI négative (B) de l'extrait de foie de poisson exposé au 4-OHBuDBT (RT= 4,10 min; m/z 387 et m/z 397) et le métabolite non identifié (RT= 5,28 min et m/z 365 et m/z 263), en mode de balayage complet du MS [m/z 240-800].

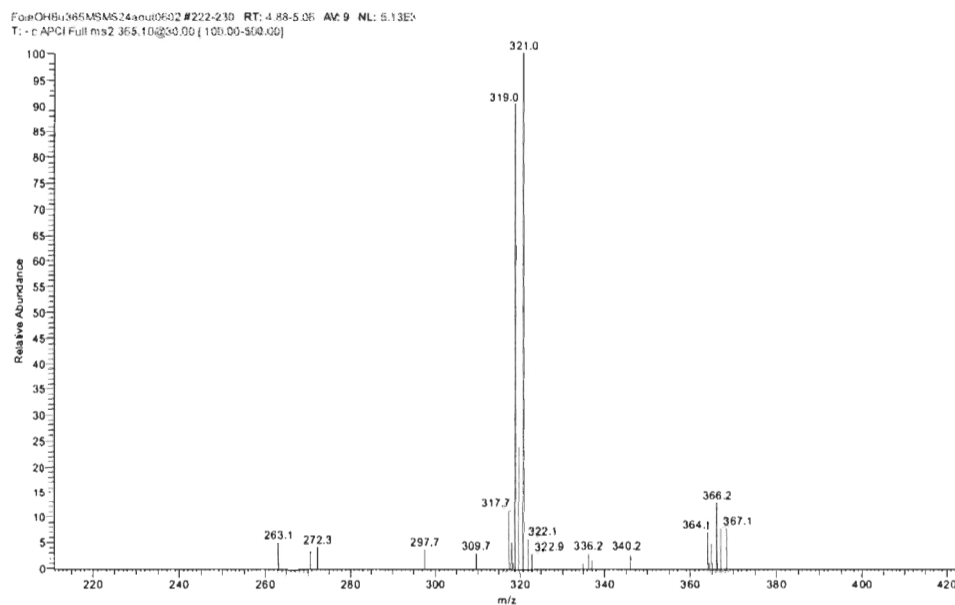


Figure 11. Spectre de masse MS/MS en APCI négative de l'extrait de foie de poisson exposé au 4-OHBuDBT révélant les ions fragments du pic à m/z 365, en mode de balayage complet du MS [m/z 100-500] en appliquant une énergie de collision de 30% (unité arbitraire) et une fenêtre d'isolation de masse de 6 amu.

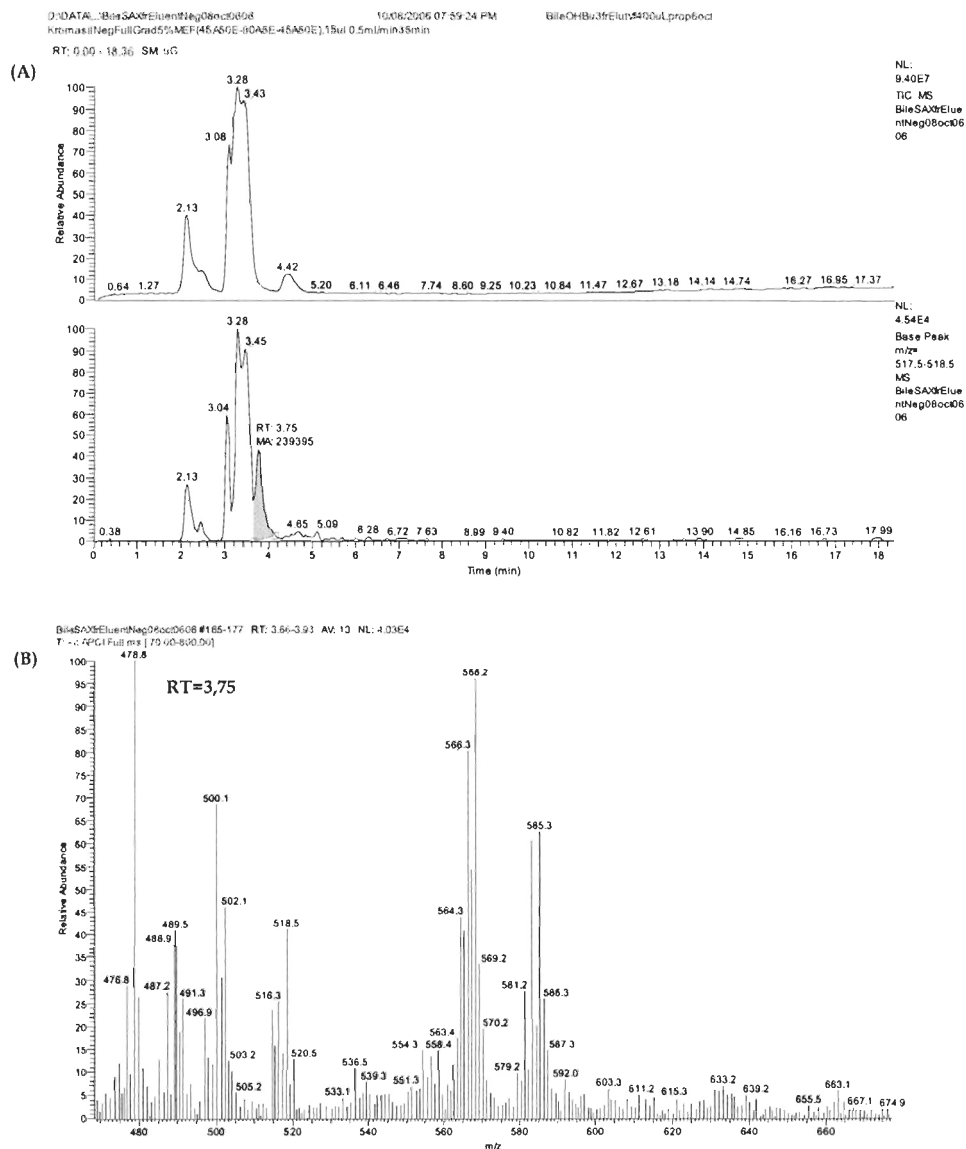


Figure 12. Chromatogrammes (A) et spectre de masse APCI négative (B) de l'extrait de bile de poisson exposé au 4-OHBuDBT révélant la présence d'un pic à RT= 3,75 min, correspondant à des ions non identifiés à m/z 518, 558, 568 et 585, en mode de balayage complet du MS [m/z 70-800].

montre la présence d'ions avec le patron isotopique typique de l'étain à m/z 518 accompagné d'autres ions à m/z 558, 568 et 585, non identifiés. L'ion à m/z 585 pourrait correspondre à un adduit de l'ion à m/z 568 avec une molécule d'eau (+17 amu).

Avec les différentes méthodes d'extraction testées et utilisées pour l'analyse de biles, aucun autre ion avec le patron isotopique de l'étain n'a été détecté que ce soit en mode d'ionisation négative ou positive.

L'analyse LC-APCI-MS positive de l'extrait de la vésicule biliaire d'un autre poisson, exposé au 4-OHBuDBT et traité avec la méthode d'extraction décrite dans ce chapitre, révèle la présence d'un pic à $RT = 7,92$ min. Ce pic est élué au même temps de rétention que le standard 4-OHBuDBT analysé avec la méthode de séparation sur la colonne Discovery® Cyano (tableau 1 a, chapitre 2). Son spectre de masse révèle l'ion caractéristique du 4-OHBuDBT à m/z 307 (figure 13). Ceci montre le transfert de ce composé depuis la cavité péritonéale et son excrétion vers la bile/vésicule biliaire, après passage dans le foie.

Le tableau 2 représente une synthèse des ions détectés avec le patron isotopique de l'étain par LC-API-MS dans les différentes matrices biologiques analysées, suite à l'exposition au composé 4-OHBuDBT.

4. DISCUSSION

Les tests d'exposition des moules et des poissons *in vivo* ainsi que des microsomes de foie de poissons à un intermédiaire métabolique de phase I du TBT, le 4-OHBuDBT synthétisé chimiquement dans notre laboratoire, avaient comme but de contourner une étape dans le métabolisme du TBT. Cette procédure a été utilisée dans

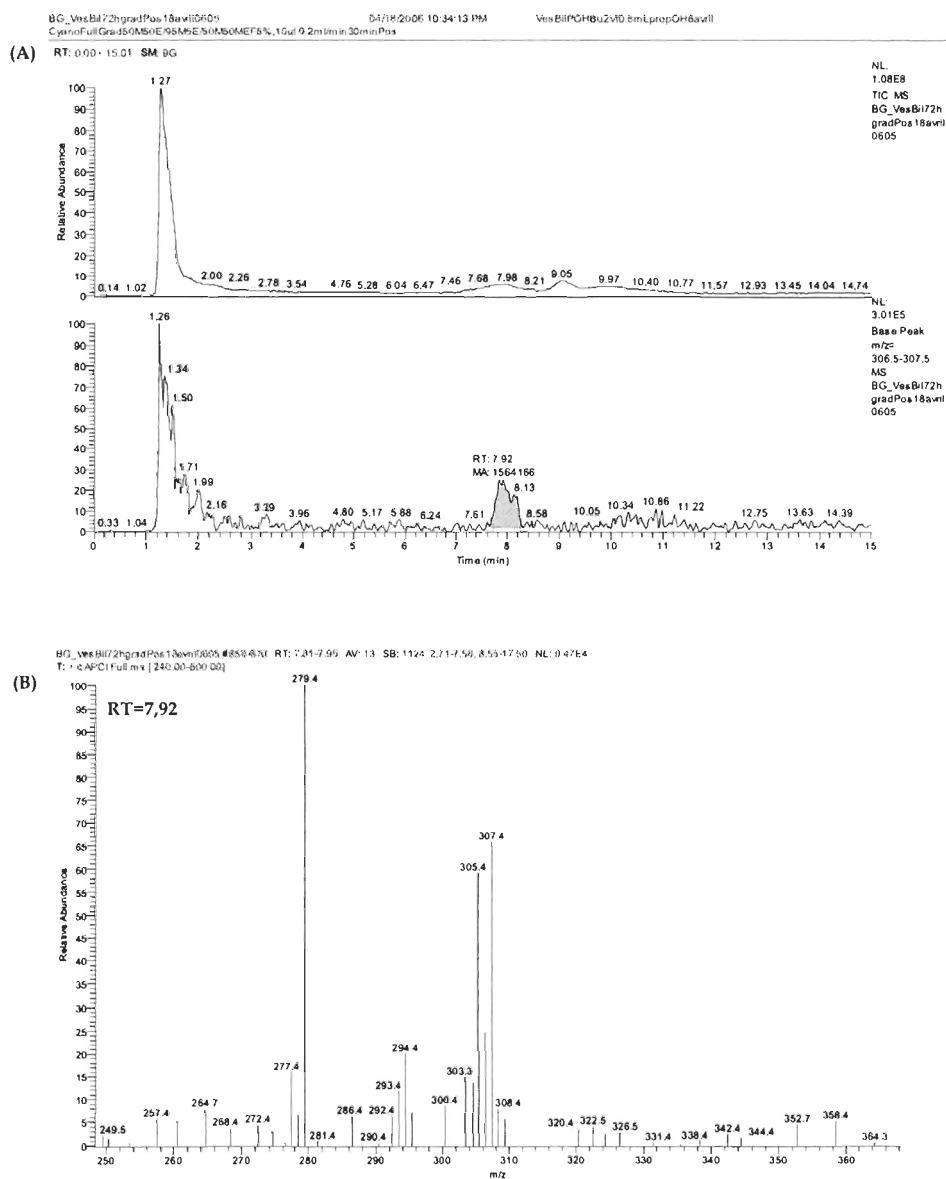


Figure 13. Chromatogrammes (A) et spectre de masse APCI positive (B) de l'extrait de vésicule biliaire de poisson exposé au 4-OHBUDBT révélant la présence d'un pic à RT= 7,92 min, correspondant à l'ion à m/z 307, en mode de balayage complet du MS [m/z 240-500].

la perspective de détecter des métabolites de phase II qui seraient conjugués à des sucres, des sulfates, du glutathion ou tout autre composé endogène *in vivo*, pour l'élimination de ce composé. Par ailleurs, les expérimentations *in vitro* ont été effectuées pour synthétiser biochimiquement un métabolite conjugué à un glucuronide, vu l'importance de la glucurono-conjugaison chez les poissons (Clarke et al., 1991). Toutes les analyses chimiques ont été réalisées à l'aide de la LC-API-MS.

Le métabolisme enzymatique ou non du 4-OHBuDBT par les deux espèces après son accumulation a révélé la présence de 5 métabolites avec le patron isotopique de l'étain, mais qui n'ont pas été clairement identifiés et caractérisés. L'identité possible d'un des métabolites détectés *in vivo* en mode positif à m/z 321 est suggérée en se basant sur une étude précédente.

Parmi les composés avec le patron isotopique de l'étain, certains ont été détectés aussi bien dans les tissus de moules que dans les foies de poissons. D'autres composés détectés en mode négatif ont été détectés uniquement dans les tissus de moules ou alors uniquement dans la bile de poisson (tableau 2).

Par ailleurs, la présence du TBT dans les extraits de moules, d'eau de mer du témoin négatif et les microsomes de foies de poissons, exposés au 4-OHBuDBT, a été notée. La détection du TBT a soulevé des interrogations et a mené à l'énoncé d'une hypothèse de redistribution (réarrangement ou disproportionation) concernant sa présence dans les extraits.

Parmi les études répertoriées dans le tableau 5 (chapitre 2), Matsuda et al. (1993) ont exposé par injection intrapéritonéale des rats à des dérivés métaboliques du TBT (dont le 4-OHBuDBT et le 3-carboxypropyl dibutylétain $\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ de masse 321), synthétisés chimiquement en laboratoire. Ces auteurs ont montré que le 4-OHBuDBT est principalement transformé en $\text{BuSn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ (masse 264) et en 4-OHBu butylétain. Il subirait une hydroxylation en position C-3 d'une seconde chaîne

Tableau 2. Sommaire des données de spectres de masse des composés observés en balayage complet du MS chez les poissons, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que chez les moules, *in vivo*, exposés au 4-OHBuDBT.

	Temps de rétention (min)	Ions observés en mode positif (<i>m/z</i>)	Temps de rétention (min)	Ions observés en mode négatif (<i>m/z</i>)	Structure proposée
Poissons					
Microsomes	11,10	332/307	—	—	TBT
Foie	4,20	307/347/366	4,10	387, 397	4-OHBuDBT absorbé
	5,08	321	5,28	365 (321*)	Bu ₂ Sn ⁺ (CH ₂) ₃ COOH
Bile	—	—	3,75	518, 558, 568, 585	inconnu
Vésicule biliaire	7,92	307	—	—	4-OHBuDBT excrété
Moules					
Moules 96 h ^a	4,24	307	4,27	387, 397	4-OHBuDBT absorbé
	4,77	321	4,56-4,98	365	Bu ₂ Sn ⁺ (CH ₂) ₃ COOH
	12,10	332	4,81	518, 673, 683	TBT _{pos.} et inconnu <i>neg.</i>
Moules 15 j	3,97	307	3,73	387, 397	4-OHBuDBT absorbé
	4,49	321	4,19	365	Bu ₂ Sn ⁺ (CH ₂) ₃ COOH
	11,74	332	4,19	518, 673, 683	TBT _{pos.} et inconnu <i>neg.</i>
Moules 96 h ^b			4,88	365 (321*)	Bu ₂ Sn ⁺ (CH ₂) ₃ COOH
	pas de données	pas de données	18,26	529, 571, 596	inconnu

pos. : en mode positif et *neg.* : en mode négatif.

* Les ions fragments après analyse MS/MS.

L'ion à *m/z* 321 a été détecté au 6^{ème} jour dans un des béchers répliqués d'exposition des moules.

^a et ^b Échantillons différents (*n*=2) traités avec deux méthodes d'extraction différentes.

butyle intacte de la molécule, pour donner un métabolite secondaire intermédiaire hypothétique qui est un 3,4 diol à deux fonctions hydroxyles. Ce diol subirait ultérieurement l'oxydation du CH_2OH en COOH , ensuite l'élimination du groupement 3-OHBu, suite à l'hydroxylation en position 1- ou 2-, pour générer un 3-carboxypropyl butylétain $\text{BuSn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$. D'après ces mêmes auteurs, l'hydroxylation en position 4 du TBT, administré oralement à des rats (formation du 4-OHBuDBT), donnerait principalement le 3-carboxypropyl butylétain ($\text{BuSn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$), en partie par formation de 3-carboxypropyl DBT ($\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$) et principalement via le 3,4-diol, un intermédiaire hypothétique. Ces auteurs ont utilisé la GC-FPD et la GC-MS/SIM pour confirmer l'identité des composés trouvés dans les tissus des rats, par comparaison des temps de rétention avec ceux des standards synthétisés ainsi que les données m/z des spectres de masse de chaque composé, après dérivation au bromure de méthylmagnésium. Les spectres de masses n'ont pas été présentés. Il est à noter que l'existence du 3,4 diol a été seulement suggérée.

Dans le foie de souris albinos exposées oralement au TBT, Ueno et al. (1997) ont retrouvé une proportion importante de 3-carboxypropyl DBT ($\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$) et une plus faible quantité du 3-carboxypropyl butylétain ($\text{BuSn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$), ainsi que du 3- et 4- OHBuDBT en moindre quantité, en utilisant la chromatographie gazeuse-plasma d'hélium induit par micro-onde -spectrométrie à émission atomique (GC-MIP-AED), après dérivation au bromure de méthylmagnésium. Aucune confirmation formelle des composés en spectrométrie de masse n'a été réalisée.

Chez les organismes marins, une étude antérieure (Suzuki et al., 1992) a révélé la présence du 3-carboxypropyl DBT ($\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$) parmi les organoétains analysés en proportion plus importante que les composés hydroxylés et oxydés dérivés du TBT (le 3- et 4- OHBuDBT et le 3-oxoBuDBT), dans différents tissus de plusieurs espèces de poissons et dans les tissus de deux espèces de bivalves (palourdes), pris dans les poissonneries de la région de Tokyo. Ces auteurs se sont basés sur la coïncidence des temps de rétention en GC-FPD des extraits d'organoétains méthylés au

bromure de méthylmagnésium avec ceux des standards synthétisés et méthylés. Ils ont également confirmé l'identité des composés par comparaison des données GC-MS/SIM des masses spectrales (m/z) des organoétains retrouvés dans les différents tissus avec celles des standards. Cependant, pour certains composés dérivés du DBT, aucun spectre de masse des différents composés dérivés du TBT n'a été fourni.

Le composé à m/z 321, détecté dans ce travail en mode positif, pourrait donc correspondre au 3-carboxypropyl dibutylétain ($\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$), retrouvé chez les différentes espèces étudiées dans les études précédentes (Matsuda et al., 1993; Suzuki et al., 1992; Ueno et al., 1997). En l'absence d'analyses MS/MS supplémentaires, son identité reste inconnue. Il en est de même, pour les autres composés retrouvés dans les tissus de moules ainsi que dans la bile de poisson (voir tableau 2, chapitre III). Cependant, ces derniers composés ont en commun d'être plus polaires que le 4-OHBuDBT, sauf pour le composé éluant à 18,26 min (m/z 529). Ils ont également été détecté uniquement en mode négatif et ont principalement des m/z supérieurs à 500. Ces informations pourraient suggérer que ces composés, présentant une distribution isotopique typique de l'étain, soient des métabolites de phase II non identifiés.

Les expérimentations réalisées *in vitro*, dans le cadre du métabolisme de phase II à l'aide des microsomes de foie de poissons, pour la synthèse biochimique du glucuronide de TBT, n'ont révélé aucun métabolite d'intérêt avec le patron isotopique de l'étain. Selon Élisabeth Perdu (Insitut National de Recherche agronomique, France, comm. pers.), le composé hydroxylé 4-OHBuDBT pourrait être un faible substrat pour les UDP-GT *in vitro*, car c'est un composé hydroxylé en bout de chaîne (alcool primaire). Il subirait une oxydation supplémentaire pour générer un autre métabolite secondaire pour former un aldéhyde, puis un acide carboxylique. Par la suite, il pourrait y avoir conjugaison. L'autre possibilité serait que la réaction de glucuronidation aurait eu lieu *in vitro*, et qu'une très faible quantité de composé soit

générée et non détectée avec les méthodes d'extraction et d'analyse développées dans ce travail.

La détection du TBT dans les extraits de tissus des moules exposées au 4-OHBuDBT, dans l'eau de mer du contrôle positif ainsi que dans les extraits de microsomes de foie de poissons a été une surprise. Des vérifications minutieuses ont montré que ce TBT ne provient pas du milieu réactionnel et qu'il n'a pas été introduit en même temps que le 4-OHBuDBT. Par contre, il est certain que le milieu réactionnel du 4-OHBuDBT contient du DBT, soit sous la forme d'hydruure ou de chlorure (voir chapitre 1). Le DBT est difficile à observer avec la méthode utilisée ici et il est normal qu'il n'ait pas été détecté. Sur le plan chimique, une transbutylation est possible en principe en milieu aquatique, à l'exemple de la transméthylation déjà rapportée par Chau et al. (1987). L'échange peut se faire selon la réaction:



Ce mécanisme est une simple redistribution des groupements butyles entre les Sn (IV) et apparaît possible dans un environnement aquatique ou même dans un organisme biologique, sans qu'aucun processus biochimique ne soit impliqué (Chau et al., 1987). Il est aussi possible qu'une telle réaction se soit produite lors du traitement des échantillons avant injection sur le HPLC (Brunori et al., 2006).

5. CONCLUSION

Dans la présente étude, le métabolisme *in vivo* du 4-OHBuDBT, par les poissons et les moules, a révélé principalement le métabolite à m/z 321, de phase I et détecté en mode d'ionisation positif. En mode d'ionisation négatif, lui correspond le composé à m/z 365. En se basant sur la seule étude publiée sur le métabolisme du 4-OHBuDBT

(Matsuda et al., 1993), et nos données de caractérisation non finalisée du composé à m/z 365 (mode négatif) et l'identité possible du composé à m/z 321 (mode positif), il est assez probable que le composé 4-OHBuDBT ait subi une oxydation supplémentaire pour générer l'acide carboxylique 3-carboxypropyle dibutylétain de masse 321.

Les autres composés détectés dans les tissus de moules et ceux retrouvés dans la bile de poisson n'ont pas pu être identifiés, principalement à cause de la faible quantité des extraits générés.

Les métabolites conjugués recherchés dans ce travail n'ont pas été identifiés de façon formelle, pour différentes raisons.

- Suite aux expérimentations *in vitro*, le 4-OHBuDBT pourrait être un faible substrat pour les glucuronyltransférases.

- Par ailleurs, il est possible que les conjugués du TBT formés par les enzymes de phase II ne soient pas produits à cette étape du métabolisme.

- Il est également possible que les métabolites de phase I produits *in vivo* soient excrétés puis réabsorbés, par exemple par l'intestin dans le cas des poissons (cycle entéro-hépatique), pour subir des étapes supplémentaires d'oxydation, d'hydrolyse et de transformation de phase I avant que les métabolites générés ne soient conjugués.

- Cependant, il est également assez probable que les métabolites de phase II soient générés dans le foie et excrétés dans la bile *in vivo*, mais qu'une très faible quantité se retrouve dans les tissus, les rendant difficilement détectables avec la méthode utilisée.

- Si ces composés sont produits, alors ils peuvent avoir été éliminés rapidement via le rein dans l'urine, non étudiée dans ce travail.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Le métabolisme du TBT a été étudié chez plusieurs organismes aquatiques. En plus du TBT, composé parent, retrouvé dans les tissus et/ou les fluides biologiques analysés des différentes espèces étudiées, les principaux métabolites retrouvés et auxquels la majorité des auteurs se sont intéressés sont les produits simplement déalkylés: le DBT, le MBT et l'étain inorganique (Sn IV), (e.g. Tsuda et al., 1988; Martin et al., 1989; Krone et Stein, 1999). Cependant, quelques auteurs ont étudié les métabolites intermédiaires dérivés principalement des réactions enzymatiques de phase I et qui sont des composés hydroxylés, oxydés ou carboxylés (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Lee, 1986; Matsuda et al. 1993; Ueno et al., 1997; Yamamoto et al., 1997). Seuls Lee (1986) et Krone et Stein (1999) se sont penchés sur le métabolisme de phase II du TBT. Le premier auteur a signalé la présence de métabolites polaires dans le foie du poisson spot et l'hépatopancréas du crabe bleu et a suggéré que ces composés étaient des conjugués du TBT, en utilisant la chromatographie sur couches minces (TLC) mais sans identification formelle des composés. En utilisant la GC-FPD, les seconds auteurs ont suggéré la présence de métabolites du TBT dans la bile des poissons plats étudiés, sous une forme non extractible avec la méthode testée et ont suggéré que les composés étaient des métabolites conjugués de phase II qu'ils n'ont pas réussi à hydrolyser à l'aide des glucuronidase et sulfatase ou avec l'acide HCl.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier le métabolisme *in vivo* et *in vitro* du TBT en utilisant la LC-(APCI et/ou ESI)-MSⁿ, technique d'analyse assez récemment utilisée en chimie environnementale. Deux modèles biologiques ont été utilisés pour

les expériences *in vivo*: le poisson salmonidé *Salvelinus fontinalis* et la moule bleue *Mytilus edulis*. De plus, les microsomes de foie de poissons ont été utilisés comme modèle *in vitro*. Il s'agissait entre autres de développer des méthodes analytiques d'extraction, de purification, de séparation et d'identification des butylétains (BTs) à partir de ces matrices complexes (foie, bile et tissus mous de bivalves) et issus des réactions métaboliques de phase I et II.

1. Développement d'une méthode LC-API-MS

Dans le premier chapitre, nous avons développé une méthode d'analyse des butylétains par LC-APCI-MS avec séparation par gradient d'élution en phase inverse, sur une colonne cyanopropyle de polarité moyenne. La majorité des études publiées ont utilisé principalement l'ionisation par électrospray (ESI) et une séparation par LC en mode d'élution isocratique.

Nous avons d'abord synthétisé chimiquement en laboratoire un des composés dérivés du métabolisme de phase I du TBT, le chlorure de 4-hydroxybutyl dibutylétain (4-OHBuDBT), composé plus polaire que le TBT. Le choix de la synthèse de ce composé parmi les quatre métabolites de phase I hydroxylés du TBT s'est basée principalement sur le fait que la procédure de sa préparation soit la moins laborieuse. De plus, étant donné que les quatre composés hydroxylés ont la même composition chimique avec la masse du cation égale à 307 (Fish et al., 1976), le 4-OHBuDBT a été choisi pour être utilisé comme standard d'analyse. Par la suite, nous avons développé une méthode analytique par LC-APCI-MS de séparation et de détection simultanée des deux composés, ainsi qu'un dérivé du TBT simplement déalkylé, le DBT. Cette méthode a été par la suite utilisée comme méthode de base, pour l'analyse des BTs issus du métabolisme *in vitro* et *in vivo* du TBT. L'identification complète du composé hydroxylé 4-OHBuDBT a été réalisée par LC-APCI-MS et MS/MS sans dérivation,

mais aussi par GC-MS après éthylation et les spectres de masse ont été présentés. Les limites de détections (LOD) de la méthode pour les deux composés (le TBT et le 4-OHBDT) sont comparables aux valeurs publiées de LOD pour les BTs en LC-API-MS.

Finalement, nous avons développé une méthode d'extraction liquide-liquide d'échantillons d'eau de mer additionnée des deux composés de polarité différente. Ensuite, nous avons analysé et quantifié les BTs des extraits avec la méthode LC-API-MS développée, pour en illustrer une application. Cette méthode a permis des taux de récupération de l'ordre 72-96% pour les deux composés. Les valeurs des limites de quantification (LOQ) révèlent que notre méthode analytique permet de mesurer approximativement 0,08-0,1 µg de chaque composé dans 1 L d'eau de mer, ce qui est comparable aux méthodes publiées dans la littérature après analyse LC-API-MS.

La principale limitation de la méthode est la difficulté de réaliser des analyses en routine du DBT, ce qui est comparable aux études publiées. Nous avons réussi à le détecter et le quantifier mais en utilisant des additifs dans la phase mobile (le tropolone comme agent chélateur), ce qui est dommageable au système LC et à la source APCI-MS. Le tropolone servant à augmenter l'ionisation en API (e.g. Jones-Lepp et al., 1999) et que nous avons utilisé comme agent complexant du DBT a causé une augmentation importante du bruit de fond, après des injections répétées. Son utilisation dans l'éluant, comme dans le présent travail (chapitre I), est déconseillée. Afin d'éviter la contamination du système HPLC, tel que nous l'avons observé, il est conseillé de l'utiliser en post-colonne (Kromidas, 2005). Selon Rosenberg et al. (2000), l'utilisation d'agents complexants (e.g. tropolone ou morin) n'est pas compatible avec la détection APCI-MS. Nous avons également testé d'autres agents dans la phase mobile tels que le triéthylamine (TEA) et l'acide trifluoroacétique (TFA), décrits dans la littérature pour la séparation et la détection des organoétains par LC-API-MS, pour

aider à la détection du DBT, mais sans succès. Seule l'addition d'une large fraction de l'acide acétique (entre 5 et 10%) comme d'autres auteurs (e.g. White et al. 1998) avait permis une bonne élution et détection du DBT avec une bonne résolution du pic, mais cette procédure est non recommandée pour la détection avec le système APCI-MS, car l'acide acétique est moins volatile. Quelques injections répétées ont provoqué un arc électrique au sein de la source APCI, ce qui est dommageable pour la source, tel que décrit dans le chapitre I.

Nous avons également testé d'autres colonnes pour la détection du DBT simultanément aux deux autres composés, telles que la Symmetry® C8 de Waters Corporation, la Zorbax® Stable Bond-C18 d'Agilent Technologies, non présentées dans la thèse, et par la suite la Kromasil 100-C18 de Supelco utilisée dans les 2 autres chapitres avec différents gradients de phases mobiles, mais sans réussir à éluer correctement le DBT. Toutes ces raisons nous ont contraints à ne pas considérer le DBT dans nos analyses ultérieures.

Pour terminer, la LC-API-MS est en général moins sensible que la GC-MS et la chromatographie liquide-ionisation par plasma couplée à la spectrométrie de masse (LC-ICP-MS) qui sont ironiquement destructrices des molécules polaires/conjugués devant être identifiés. Par contraste, la technique LC-API-MS préserve l'intégrité des analytes et reste plus utile dans les analyses de spéciation pour la caractérisation, entre autres, de molécules organiques polaires et fragiles comme les composés recherchés dans cette thèse. La LC-ICP-MS ne donne que des informations sur les ions métalliques et ne fournit de ce fait aucun renseignement sur le ligand organique. Selon González-Toledo et al. (2003), même si la LC-API-MS a été difficilement appliquée à l'analyse des organoétains, elle peut être considérée comme un outil prometteur et puissant pour l'identification de ces composés sans ambiguïté, en se basant sur les valeurs m/z , la distribution isotopique et le temps de rétention.

2. Métabolisme du TBT

Dans le second chapitre, l'étude du métabolisme *in vitro* et *in vivo* du TBT a révélé essentiellement que ce composé est métabolisé, aussi bien *in vivo* par la moule bleue *Mytilus edulis* que par l'omble de fontaine *Salvelinus fontinalis*, qu'*in vitro* par les microsomes de foie, en composés hydroxylés de phase I, hydroxybutyl-dibutylétain (OHBuDBT). La position de l'hydroxyle sur l'une des chaînes butyles n'a pas été identifiée. Cependant, l'hydroxylation du TBT montre que ce composé est un substrat pour le cytochrome P450, tel qu'il a été démontré par d'autres auteurs chez d'autres espèces marines (Lee, 1986; Yamamoto et al., 1997) et chez les mammifères (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Matsuda et al. 1993; Ueno et al., 1997). À notre connaissance, notre étude est la seule à montrer la présence de métabolites hydroxylés et d'autres métabolites générés *in vivo* chez un mollusque marin et chez un poisson salmonidé, par analyse LC-APCI- et ESI- MS. Lee (1986), qui s'est intéressé au métabolisme intermédiaire du TBT chez plusieurs classes d'organismes marins, a exposé des huîtres *Crassostrea virginica* au ^{14}C -TBT. Il n'a détecté que du TBT au 2^{ème} jour d'exposition et en plus un peu de DBT au 4^{ème} jour, en utilisant la chromatographie sur couches minces (TLC). La formation de métabolites oxygénés peut être considérée comme une voie de détoxification.

D'autres composés sont détectés en mode d'ionisation négative (tableau 4, chapitre II), m/z 517, 603, dans les tissus de moules exposées 96 h au TBT, avec la seconde méthode qui n'a pas été utilisée pour tous les tissus de moules analysés ni les foies de poissons. Leurs spectres de masses révèlent sans aucun doute que ce sont des composés d'étain à cause de leur distribution isotopique typique de l'étain. Cependant, leur identité n'ayant pas été établie, il nous est impossible de savoir s'ils sont issus du métabolisme de phase I ou de phase II. Cependant, le fait que ces composés avec la distribution typique de l'étain aient une valeur m/z supérieure à 500, suggère des métabolites conjugués.

3. Métabolisme du 4-OHBuDBT

Suite aux résultats obtenus dans le chapitre II et la non identification de métabolites de phase II du TBT, il nous est apparu judicieux d'exposer les moules et les poissons ainsi que les microsomes de foie au composé 4-OHBuDBT synthétisé dans notre laboratoire. Plusieurs études pharmacologiques et environnementales réalisées en laboratoire utilisent cette approche d'exposition à des dérivés de phase I au lieu du composé parent, afin de contourner le métabolisme de phase I et générer les métabolites conjugués de phase II. Le composé 4-OHBuDBT est un composé intermédiaire du TBT et sa production *in vivo* et *in vitro* par des poissons, des crabes, des rats, des souris ainsi que des lapins a déjà été rapportée par d'autres auteurs (Fish et al., 1976; Kimmel et al., 1977; Lee, 1986; Matsuda et al. 1993; Ueno et al., 1997; Yamamoto et al., 1997).

Dans le chapitre III, nos tentatives répétées de synthétiser biochimiquement un composé glucuronidé du composé 4-OHBuDBT à l'aide des expérimentations *in vitro* ont été infructueuses, même si nous avons testé plusieurs méthodes d'extraction qui étaient normalement adaptées à l'extraction de composés hydrosolubles. Par ailleurs, nos expérimentations d'hydrolyses enzymatiques des extraits de foie de poissons avec la β -glucuronidase et la sulfatase n'ont pas révélé d'autres composés différents de ceux des extraits non hydrolysés. Ce composé serait un faible substrat pour l'UDP-GT des poissons. Les données *in vivo* appuieraient cette hypothèse. En effet, l'exposition des moules et des poissons au 4-OHBuDBT a révélé la présence principalement d'un composé avec m/z 321 en mode d'ionisation positive et un autre avec m/z 365 en mode négatif correspondant au composé précédant, selon les données MS/MS. En nous basant sur les données d'autres auteurs et la communication personnelle d'un chercheur d'un autre laboratoire (É. Perdu du Laboratoire du professeur J.P. Cravedi, INRA-France), nous avons conclu que ce composé serait issu de l'hydroxylation supplémentaire du 4-OHBuDBT pour générer un composé carboxylé, le

$\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$. Par ailleurs, d'autres composés avec le patron isotopique typique de l'étain ont été détectés en mode négatif, dans la bile d'un poisson et d'autres différents dans les tissus de moules (tableau 2, chapitre III). La caractérisation de ces composés, dont la plupart sont très polaires) n'a pas été possible à cause des faibles quantités d'extraits générés.

En somme, les données du chapitre III suggèrent que le 4-OHBuDBT est oxydé par les enzymes de phase I et serait un faible substrat pour la glucuronidation *in vitro*.

Les métabolites de phase II des xénobiotiques sont des molécules conjuguées à des produits endogènes tels que des sucres, des sulfates, du glutathion ou des acides aminés. Ce sont des molécules dont la polarité est plus importante que la molécule initiale, ce qui les rend plus hydrosolubles. À partir des données des chapitres II et III, la non détection de molécules conjuguées du TBT aurait 4 raisons théoriquement possibles: 1) les métabolites sont réellement absents; Si nous supposons que le métabolisme de phase II du TBT a eu lieu chez les moules et chez les poissons, 2) il est assez probable qu'ils aient été produits en très faible concentration, rendant leur détection difficile avec la méthode LC-API-MS (pas assez sensible); 3) la méthode d'extraction principale utilisée dans notre travail pour les tissus a été adaptée de la méthode de Suzuki et al. (1992) qui a été également utilisée par d'autres auteurs. Nous avons également utilisé des solvants différents de l'isopropyl-éther, tel que le chloroforme, de la même manière que Fish et al. (1976) et Lee (1986), et nous avons encore obtenu des résultats similaires. Cette méthode pourrait ne pas avoir permis l'extraction des métabolites plus polaires (hydrosolubles) que les composés de phase I. Les caractéristiques chimiques de ces composés ne sont pas connues mais théoriquement ce sont principalement des molécules acides, d'où l'ajustement du pH lors des différentes étapes d'extraction et l'utilisation de phases mobiles acides. La

seconde méthode développée au cours de ce travail a permis la détection d'autres composés polaires, en mode d'ionisation négatif, présents dans les tissus de moules exposés au 4-OHBuDBT. Cette méthode comporte une étape d'homogénéisation dans du MeOH et aussi dans le MeOH/eau.

Selon la communication personnelle de Lee, il aurait utilisé en 1986 ou durant des années ultérieures une méthode d'extraction de Bligh-Dyer (Bligh et Dyer, 1959). La principale caractéristique de cette dernière réside dans l'étape d'homogénéisation des tissus, différente des méthodes que nous avons utilisées. Avec cette méthode les tissus sont homogénéisés dans du MeOH : eau : chloroforme, ce qui génère un système à deux phases. La phase organique comporterait principalement le TBT et les métabolites de phase I, alors que la seconde phase aqueuse renfermerait les métabolites de phase II.

Deux autres raisons faisant suite aux trois premières peuvent être évoquées: 4) les métabolites sont excrétés dans l'urine, qui n'a pas été analysée au cours de ce travail; et finalement 5) les métabolites biliaires sont sécrétés dans l'intestin, où ils seraient hydrolysés par les glucuronidases ou les sulfatases.

D'un point de vue environnementale, si les métabolites conjugués sont réellement formés, ils seraient alors peu ou pas présents dans l'environnement aquatique, même s'ils sont considérés biodisponibles, à cause de leur solubilité dans l'eau. Cependant, il est certain que les métabolites hydroxylés ou oxygénés de phase I sont retrouvés dans l'environnement aquatique. Suzuki et al. (1996) ont mesuré et étudié la distribution saisonnière de ces composés et celles d'autres composés BTs, dans la baie d'Aburatsubo au Japon. Leur étude ultérieure *in situ* (Suzuki et al., 1998) a montré que ces composés sont accumulés par des bivalves marins via l'eau de mer montrant ainsi leur biodisponibilités pour d'autres organismes aquatiques. Une ancienne étude (Aldridge et al., 1977) a montré que les composés hydroxybutyl-dibutylétain et oxobutyl-dibutylétain (la cétone), issus du métabolisme du TBT par les

microsomes, étaient moins toxiques que le TBT. Ils ont inhibé la synthèse d'ATP et provoqué le gonflement des mitochondries de souris, mais avec une activité moins importante que celle du TBT.

Chez les bivalves, certaines études réalisées sur le métabolisme de certains hydrocarbures aromatiques polycycliques ont montré leur conjugaison au glucuronide et au sulfate chez ces organismes, suggérant la similarité des processus enzymatiques avec ceux des poissons et des mammifères (Michel et al., 1995: métabolisme du benzo(a)pyrène chez *Mytilus galloprovincialis*; Simpson et al., 2002: métabolisme du pyrène chez *Mya arenaria* et *Protothaca staminea*).

4. Perspectives de recherche

Le défi principal qui s'est présenté durant tout ce travail et qui reste à surmonter dans des études futures, est la production d'extraits suffisants pour les analyses de détection et de caractérisation. Il n'existe pratiquement aucune publication qui traite de l'extraction des métabolites conjugués de contaminants et encore moins d'organoétains dans les tissus et fluides d'animaux marins. D'autres stratégies restent à explorer et sont présentées dans les paragraphes suivants.

Premièrement, en ce qui concerne les expositions *in vivo* des poissons, nous n'avons pas prélevé l'urine, par manque d'expertise mais aussi à cause de la petite taille des poissons. Le choix d'un poisson plus gros et dont la vessie urinaire aurait une forme qui permettrait la pose d'un cathéter pour la récolte d'urine serait intéressante. Une partie des métabolites de phase II des xénobiotiques sont éliminés *via* le rein et l'urine. Dans la même idée, le plasma sanguin pourrait également être prélevé pour étudier les métabolites provenant du foie.

Deuxièmement, les microsomes d'animaux terrestres disponibles dans le commerce, tels que ceux du foie de cochon d'Inde induits au phénobarbital ont des activités CYP450 et UDP-GT supérieure à celle des rats et des poissons. Il serait intéressant d'envisager leur utilisation pour l'étude du métabolisme du TBT. Les réactions à l'aide de ces microsomes permettraient de synthétiser biochimiquement les standards de conjugués recherchés pour continuer l'étude du métabolisme du TBT chez les organismes aquatiques.

Parallèlement ou alternativement, l'utilisation d'enzymes recombinantes, disponibles dans le commerce, serait d'une très grande utilité. Ce sont plus précisément de l'ADN complémentaire (cDNA) recombiné exprimant une isoforme d'enzymes de la large famille des CYP450 ou celles des UDP-GTs, celles des SULTs et GSH n'étant pas encore disponibles. Ces fractions microsomales proviennent des systèmes cellulaires d'insectes infectés au baculovirus, exprimant des enzymes du métabolisme soit d'humains ou de rats modifiés. Selon la compagnie BD Biosciences, les fractions cellulaires sont idéales pour la production de métabolites en grande proportion, pour l'identification structurale et l'étude des composés dont le métabolisme est lent. Elles sont également très utiles pour identifier les isozymes P450 impliquées dans le métabolisme d'un composé. Les auteurs Ohhira et al. (2006a, b) les ont utilisées pour identifier quelques isoformes de CYP450 impliquées dans le métabolisme du TBT chez le rat et l'homme.

L'autre modèle biologique qui est très utilisé en sciences pharmaceutiques, mais également en sciences aquatiques, pour les expériences *in vitro* est l'hépatocyte. Le principal avantage de l'utilisation d'hépatocytes fraîchement isolés ou cryo-préservés, en suspension, par rapport aux microsomes ou aux supersomes est que les réactions métaboliques sont simultanées et n'ont pas besoin d'ajout de cofacteurs des enzymes. Cette approche a été utilisée sans succès au tout début de ce travail de recherche. Une

alternative pour augmenter la quantité des métabolites de TBT formés serait d'incuber à grande échelle des hépatocytes en suspension avec le TBT (e.g. 25 mL avec 5×10^6 cellules.mL⁻¹).

Dans notre étude, nous avons conclu que le 4-OHBuDBT était un faible substrat pour les UDP-GTs, principalement *in vitro*. Nos données *in vivo* viennent supporter cette suggestion. En effet, le 4-OHBuDBT subit une oxydation pour produire le composé carboxylé $\text{Bu}_2\text{Sn}^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$. Il serait probable que ce soit ce dernier qui subirait les réactions de conjugaisons subséquentes. Par ailleurs, les données de certains auteurs (e.g. Fish et al., 1976; Yamamoto et al., 1997, voir la discussion du chapitre II) montrent que ce composé est généré biologiquement aussi bien *in vitro* que *in vivo*, en plus faible proportion que les autres composés de phase I et principalement par rapport au composé 3-OHBuDBT qui est assez stable. À la lumière de ces informations, la synthèse chimique de ce composé hydroxylé en C3, quoique plus laborieuse que celle du 4-OHBuDBT, donnerait plus de chance de produire des métabolites de phase II.

Par la suite et puisque nous oeuvrons dans le domaine environnementale aquatique, l'utilisation de poissons traités préalablement au β -naphthoflavone permettrait l'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme du TBT. Selon Förlin et Haux (1985), le β -naphthoflavone induit l'activité de plusieurs enzymes hépatiques dont le CYP450 (1A) et augmente l'activité des UDP-GT chez les poissons, e.g. chez la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*, mais aussi l'activité de la GST. Certes, le CYP450 1A n'est pas reconnu pour être impliqué dans le métabolisme du TBT (Oberdörster et al., 1998; Ohhira et al., 2006a, b) l'induction pourrait se faire avec un autre substrat qui induirait les isozymes tel que le CYP 2C et le 3A4, chez les poissons. Par ailleurs, suite à cette étape d'induction, la quantité des métabolites de phase II

serait augmentée et celles des conjugués de TBT qui seraient excrétés éventuellement dans la bile et l'urine. Ceci pourrait maximiser les chances de les détecter.

Enfin, conjointement aux recommandations précédentes et concernant la sensibilité des méthodes en général, beaucoup d'auteurs utilisent des substrats radioactifs pour augmenter la sensibilité de détection des composés métaboliques. L'utilisation de TBT marqué au carbone 14 (^{14}C -TBT) ou au tritium (^3H -TBT) serait souhaitable, couplée au LC-MS. La LC-API-MS est une méthode qui est utilisée pour l'analyse des fractions métaboliques purifiées par HPLC-détection radioactive. Une autre alternative serait l'utilisation de cofacteurs marqués au ^{14}C pour certaines réactions enzymatiques de phase II. L'acide UDP[U- ^{14}C] glucuronique (^{14}C -UDP-GA) pourra être utilisée à la place du cofacteur non marqué (voire chapitre III), dans les réactions de glucuronidation avec les microsomes et les fractions cellulaires citées plus hauts. La voie de la sulfatation catalysée par les sulfotransférases SULTs pourrait être étudiée, en utilisant également le cofacteur adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS, donneur de groupement sulfonate) marqué au soufre 35 (^{35}S -PAP).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aldridge, W.N., 1976. The influence of organotin compounds on mitochondrial functions. Dans: J.J. Zuckerman (éditeur). Organotin compounds: new chemistry and applications. Advances in Chemistry series, vol. **157**, American Chemical Society, Washington, DC: 186-196.
- Aldridge, W.N., J.E. Casida, R.H. Fish, E.C. Kimmel et B.W. Street, 1977. Action on mitochondria and toxicity of metabolites of tri-*n*-butyltin derivatives. *Biochemical Pharmacology*, **26**: 1997-2000.
- Al-Ghais, S.M. et B. Ali, 1999. Inhibition of glutathione S-transferase catalyzed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **62**: 207-213.
- Al-Ghais, S.M., S. Ahmad et B. Ali, 2000. Differential inhibition of xenobiotic-metabolizing carboxylesterases by organotins in marine fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**: 258-264.
- Aluoch, A.O., S.O. Odman-Ghazi et M.M. Whalen, 2006. Alteration of an essential NK cell signaling pathway by low doses of tributyltin in human natural killer cells. *Toxicology*, **224**: 229-237.
- Alzieu, C., Y. Thibaud, M. Héral et B. Boutier, 1980. Evaluation des risques dus à l'emploi des peintures antisalissures dans les zones conchyliques. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **44**: 301-349.
- Astruc, A., M. Astruc, R. Pinel et M. Potin-Gautier, 1992. Speciation of butyltin compounds by on-line HPLC-ETAA of tropolone complexes in environmental samples. *Applied Organometallic Chemistry*, **6**: 39-47.
- Balk, L., J. Meijer, J. Seidegard, R. Morgenstein et J. DePierre, 1980. Initial characterization of drug-metabolizing systems in the liver of the Northern Pike, *Esox lucius*. *Drug Metabolism and Disposition*, **8**: 98-103.
- Batel, R., N. Bihari, B. Rinkevich, J. Dapper, H. Schäcke, H.C. Schröder et W.E.G. Müller, 1993. Modulation of organotin-induced apoptosis by the water pollutant methyl mercury in a

- human lymphoblastoid tumor cell line and a marine sponge. *Marine Ecology Progress Series*, **93**: 245-251.
- Bentivegna, C.S. et T. Piatkowski, 1998. Effects of tributyltin on medaka (*Oryzias latipes*) embryos at different stages of development. *Aquatic Toxicology*, **44**: 117-128.
- Benya, T.J., 1997. Bis(tributyltin)oxide toxicology. *Drug Metabolism Reviews*, **29**: 1189-1284.
- Betowski, L.D. et T.L. Jones, 1996. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Organotin Compounds. Dans: D. Barcelo (éditeur). *Applications of LC-MS in environmental chemistry*. New York, Elsevier. **59**: 399-414.
- Blair, W.R., G.J. Olson, T.K. Trout, K.L. Jewett, R.B. Laughlin, H.E. Guard, 1988. Accumulation and fate of tributyltin species in microbial biofilms. *NISTIR Report 88/3852*, 1668-1672.
- Bligh, E.G. et W.J. Dyer, 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**: 911-917.
- Blunden, S.J. et A. Chapman, 1986. Organotin compounds in the environment. Dans: P.J. Craig (éditeur). *Organometallic Compounds in the Environment*. Longman Group, Harlow: 111-159.
- Bouchard, N., É. Pelletier et M. Fournier, 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**: 519-522.
- Bridges, J.W., D.S. Davies et R.T. Williams, 1967. The fate of ethyltin and diethyltin derivatives in the rat. *Biochemical Journal*, **105**: 1261-1267.
- Brown, D.J., G.C. Clark et R.J. Van Beneden, 1998. A new cytochrome P450 (Cyp30) family identified in the clam, *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part C, **121**: 351-360.
- Brunori, C., I. Ipolyi, P. Massanisso et R. Morabito, 2006. New trends in sample preparation methods for the determination of organotin compounds in marine matrices. *The Handbook of Environmental Chemistry, Part O*, **5**: 51-70
- Bryan, G.W., P.E. Gibbs, L.G. Hummerstone et G.R. Burt, 1989. Uptake and transformation of ¹⁴C-labelled Tributyltin Chloride by the dog-whelk, *Nucella lapillus*: importance of absorption from the diet. *Marine Environmental Research*, **28**: 241-245.

- Bryan, G.W., G.W. Bryan, P.E. Gibbs, L.G. Hummerstone et G.R. Burt, 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **66**: 611-640.
- Buhler, D.R. et J.-L. Wang-Buhler, 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **121**: 107-137.
- Buhler, D. R. et D. E. Williams, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animals: Oxidative enzymes (or Phase I enzymes). Dans: U. Varanasi (éditeur). *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment*. Boca Raton, FL, CRC Press: 151-184.
- Buhler, D. R. et D. E. Williams, 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquatic Toxicology*, **11**: 19-28.
- Burchell, B., C.H. Brierley, G. Monaghan et D.J. Clarke, 1998. The structure and function of the UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Advances in Pharmacology*, **42**: 335-338.
- Casida, J. E., E. C. Kimmel, B. Holm et G. Widmark, 1971. Oxidative dealkylation of Tetra-, Tri-, and Dialkyltins and Tetra- and Trialkylleads by Liver microsomes. *Acta Chemica Scandinavica*, **25**: 1497-1499.
- Chambers, J.E. et J.D. Yarbrough, 1976. Xenobiotic biotransformation system in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **55**: 77-84.
- Champ, M.A., 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *The Science of the Total Environment*, **258**: 21-71.
- Chau, Y.K., F. Yang et M. Brown, 1997. Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue. *Analytica Chimica Acta*, **338**: 51-55.
- Chau, Y.K., P.T.S. Wong, C.A. Mojesky et A.J. Carty. Transmethylation of metals in aquatic systems. *Applied Organometallic Chemistry*, **1**: 235-239.
- Chicano, J.J., A. Ortiz, J.A. Teruel, et F.J., Aranda, 2001. Organotin compounds alter the physical organization of phosphatidylcholine membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1510**: 330-341.

- Chliamovitch, Y.-P. et C. Kuhn, 1977. Behavioural, haematological and histological studies on acute toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide on *Salmo gairdneri* Richardson and *Tilapia rendalli* Boulenger. *Journal of Fish Biology*, **10**: 575-585.
- Cima, F. et L. Ballarin, 2000. Tributyltin induces cytoskeleton alterations in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* phagocytes via interaction with calmodulin. *Aquatic Toxicology*, **48**: 419-429.
- Cima, F., R. Spinazzi et L. Ballarin, 1998. Possible tributyltin-calmodulin interaction in morpho-functional alterations of Ascidian phagocytes. *Fresenius Environmental Bulletin*, **7**: 396-401.
- Clark, E.A., R.M. Sterritt et J.N. Lester, 1988. The fate of tributyltin in the aquatic environment. A look at the data. *Environmental Science and Technology*, **22**: 600-604.
- Clarke, D.J., B. Burchell et S.G. George, 1992. Differential expression and induction of UDP-glucuronosyltransferase isoforms in hepatic and extrahepatic tissues of a fish, *Pleuronectes platessa*: Immunochemical and functional characterization. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **115**: 130-136.
- Clarke, D.J., S.G. George et B. Burchell, 1991. Glucuronidation in fish. *Aquatic Toxicology*, **20**: 35-56.
- Cleary, J.J. et A.R.D. Stebbing, 1985. Organotin and total tin in coastal waters of southwest England. *Marine Pollution Bulletin*, **16**: 350-355.
- Cooke, G. M., 2002. Effect of organotins on human aromatase activity *in vitro*. *Toxicology Letters*, **126**: 121-130.
- Coughtrie, M.W.H., S. Sharp, K. Maxwell et N.P. Innes, 1998. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chemico-Biological Interactions*, **109**: 3-27.
- Cravedi, J.P., E. Perdu-Durand, M. Baradat et J. Tulliez, 1989. Hydroxylation of Pristane by isolated hepatocytes of rainbow trout: a comparison with *in vivo* metabolism and biotransformation by liver microsomes. *Marine Environmental Research*, **28**: 15-18.
- Currie, L.A., 1999. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, **391**: 105-126.

- Dady, J.M., S.P. Bradbury, A.D. Hoffman, M.M. Voit. et D.L. Olson, 1991. Hepatic microsomal N-hydroxylation of aniline and 4-chloroaniline by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, **21**: 1605-1620.
- Davies, I.M., S.K. Bailey et M.J.C. Harding, 1998. Tributyltin inputs to the North Sea from shipping activities, and potential risk of biological effects. *ICES Journal of Marine Science*, **55**: 34-43.
- de Mora, S.J., 1996. The tributyltin debate: ocean transportation versus seafood harvesting. Dans: S.J. de Mora, Ed. Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge University Press, Cambridge: 1-20.
- den Besten, P.J., 1998. Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **121**: 139-146.
- Elferink, J.G.R., M. Deierkauf et J. van Steveninck, 1986. Toxicity of organotin compounds for polymorphonuclear leukocytes: the effect on phagocytosis and exocytosis. *Biochemical Pharmacology*, **35**: 3727-3732.
- Ema, M., T. Itami et H. Kawasaki, 1991. Teratogenicity of di-*n*-butyltin dichloride in rats. *Toxicology Letters*, **58**: 347-356.
- Ema, M., R. Kurosaka, H. Amano et Y. Ogawa, 1995. Further evaluation of the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. *Toxicology*, **96**: 195-201.
- Falcioni, M.L., M. Pellei et R. Gabbianelli, 2008. Interaction of tributyltin (IV) chloride and a related complex [Bu₃Sn(LSM)] with rat leukocytes and erythrocytes: Effect on DNA and on plasma membrane. *Mutation Research*, **653**: 57-62.
- Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, **26**: 1-117.
- Fent, K. et T.D. Bucheli, 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins in vitro in freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, **28**: 107-126.
- Fent, K. et J. Hunn, 1995. Organotins in freshwater harbors and rivers: temporal distribution, annual trends and fate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**: 1123-1132.
- Fent, K. et J.J. Stegeman, 1993. Effects of tributyltin *in vivo* on the hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. *Aquatic Toxicology*, **24**: 219-240.
- Fent, K. et J.J. Stegeman, 1991. Effects of tributyltin chloride *in vitro* on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquatic Toxicology*, **20**: 159-168.

- Fent, K., B.R. Woodin et J.J. Stegeman, 1998. Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **121**: 277-288.
- Ferraro, M.V.M., A.S. Fenocchio, M.S. Mantovani, C.A. Oliveira Ribeiro et M.M. Cestari, 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, **27**:103-107.
- Fish, R. H., 1984. Bioorganotin chemistry: A commentary on the reactions of organotin compounds with a cytochrome P-450 dependent monooxygenase enzyme system. *Neurotoxicology*, **5**: 159-162.
- Fish, R.H., E.C. Kimmel et J.E. Casida, 1976. Biorganotin chemistry: reactions of tributyltin derivatives with cytochrome P-450 dependent monooxygenase enzyme system. *Journal of Organometallic Chemistry*, **118**: 41-54.
- Fitzpatrick, P.J., D. Sheehan et D.R. Livingstone, 1995. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. *Marine Environmental Research*, **39**: 241-244.
- Förlin, L. et C. Haux, 1985. Increased excretion in the bile of 17 β -[^3H]estradiol-derived radioactivity in rainbow trout treated with β -naphthoflavone. *Aquatic Toxicology*, **6**: 197-208.
- Foureman, G.L., 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animals: Hydrolysis and Conjugation enzymes (or Phase II enzymes). Dans: U. Varanasi (éditeur). *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment*. Boca Raton, FL, CRC Press: 185-202.
- Foureman, G.L., O. Hernandez, A. Bhatia et J.R. Bend, 1987. The stereoselectivity of four hepatic glutathione S-transferases purified from a marine elasmobranch (*Raja erinacea*) with several K-region polycyclic arene oxide substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, **914**: 127-135.
- Frouin, H., M. Lebeuf, R. Saint-Louis, M. Hammill, É. Pelletier et M. Fournier, 2008. Toxic effects of tributyltin and its metabolites on harbour seal (*Phoca vitulina*) immune cells *in vitro*. *Aquatic Toxicology*, **90**: 243-251.
- Fry, J.R., 1987. Influence of substrate concentration on the phase I and phase II metabolism of 4-methoxybiphenyl by rat isolated hepatocytes. *Xenobiotica*, **17**: 751-758.

- George, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. Dans: D. C. Malins et G. K. Ostrander (éditeurs). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL: 37-85.
- George, S.G. et G. Buchanan, 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiology and Biochemistry*, **8**: 437-449.
- George, S.G. et B. Taylor, 2002. Molecular evidence for multiple UDP-glucuronosyltransferase gene families in fish. *Marine Environmental Research*, **54**: 253-257.
- Ghoneum, M., A.E. Hussein, G. Gill et L.J. Alfred, 1990. Suppression of murine natural killer cell activity by tributyltin: *in vivo* and *in vitro* assessment. *Environmental Research*, **52**: 178-186.
- Giam, C.S., L.E. Ray, R.S. Anderson, C.R. Fries, R. Lee, J.M. Neff, J.J. Stegeman, P. Thomas et M.R. Tripp, 1987. Pollutant responses in marine animals: the program. Dans: C.S. Giam et L.E. Ray (éds). *Pollutant Studies in Marine Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL: 1-21.
- Gibbs, P.E., P.L. Pascoe et G.R. Burt, 1988. Sex change in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **68**: 715-731.
- Gielen, M., M. Biesemans et R. Willem, 2005. Organotin compounds: from kinetics to stereochemistry and antitumour activities. *Applied Organometallic Chemistry*, **19**: 440-450.
- Giessing, A.M.B. et T. Lund, 2002. Identification of 1-hydroxypyrene glucuronide in tissue of marine polychaete *Nereis diversicolor* by liquid chromatography/ion trap multiple mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**: 1521-1525.
- Giessing, A.M.B., L.M. Mayer et T.L. Forbes, 2003. 1-hydroxypyrene glucuronide as the major aqueous pyrene metabolite in tissue and gut fluid from the marine deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**: 1107-1114.
- Girard, J.-P., C. Ferrua et D. Pesando, 1997. Effect of tributyltin on Ca^{2+} homeostasis and mechanisms controlling cell cycling in sea urchin eggs. *Aquatic Toxicology*, **38**: 225-239.
- Glatt, H., 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, **129**: 141-170.

- Goksoyr, A. et L. Förlin, 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, **22**: 287-312.
- Gooneratne, R., C.L. Miranda, M.C. Henderson et D.R. Buhler, 1997. β -Naphthoflavone induced CYP1A1 and 1A3 proteins in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, **27**: 175-187.
- Gonzalez, F.J., 1997. Overview of experimental approaches for study of drug metabolism and drug-drug interactions. Dans: A.P. Li (éditeur). *Drug-drug interactions. Scientific and regulatory perspectives. Advances in Pharmacology*, vol. **43**, Academic Press, New York: 255-277.
- González-Toledo, E., R. Companó, M. Granados et M.D. Prat, 2003. Detection techniques in speciation analysis of organotin compounds by liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**: 26-33.
- González-Toledo, E., R. Companó, M.D. Prat et M. Granados, 2002. Determination of triorganotin species in water samples by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **946**: 1-8.
- González-Toledo, E., M. Benzi, R. Companó, M. Granados et M.D. Prat, 2001. Speciation of organotin compounds in shellfish by liquid chromatography-fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, **443**: 183-190.
- Gowland, B.T.G., A.D. McIntoch, I.M. Davies, C.F. Moffat et L. Webster, 2002. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Marine Environmental Research*, **54**: 231-235.
- Gray, B.H., M. Porvaznik, C. Flemming et L.H. Lee, 1987. Tri-n-butyltin: a membrane toxicant. *Toxicology*, **47**: 35-54.
- Gregus, Z., J.B. Watkins, T.N. Thompson, J.M. Harvey, K. Rozman et C.D. Klassen, 1983. Hepatic phase I and phase II biotransformation in quail and trout: comparison to other species commonly used in toxicity testing. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **67**: 430-441.
- Grinwis, G. C. M., A. Boonstra, E. J. van den Brandhof, J. A. M. A. Dormans, M. Engelsma, R. V. Kuiper, H. van Loveren, P. W. Wester, M. A. Vaal, A. D. Vethaak et J. G. Vos, 1998. Short-term toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in flounder (*Platichthys flesus*): Pathology and immune function. *Aquatic Toxicology*, **42**: 15-36.

- Grondin, M., M. Marion, F. Denizeau et D.A. Averill-Bates, 2007. Tributyltin induces apoptotic signaling in hepatocytes through pathways involving the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **222**: 57-68.
- Guard, H.E., A.B. Cobet et W.M. Coleman, III, 1981. Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. *Science*, **213**: 770-771.
- Guruge, K.S., S. Tanabe, H. Iwata, R. Tatsukawa et S. Yamagishi, 1996. Distribution, biomagnification and elimination of butyltin compound residues in common cormorants (*Phalacrocorax carbo*) from Lake Biwa, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**: 210-217.
- Hagger, J. A., A. S. Fisher, S.J. Hill, M.H. Depledge et A.N. Jha, 2002. Genotoxic, cytotoxic and ontogenetic effects of tri-*n*-butyltin on the marine worm, *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae). *Aquatic Toxicology*, **57**: 243-255.
- Hansen, L.G. et B.S. Shane, 1994. Xenobiotic metabolism. Dans: L. G. Cockerham et B. S. Shane (éditeurs). *Basic environmental toxicology*. Boca Raton, CRC Press: 49-105
- Harazano, A., M. Ema et Y. Ogawa, 1996. Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. *Toxicology Letters*, **89**: 185-190.
- Harino, H., M. Fukushima et S. Kawai, 2000. Accumulation of butyltin and phenyltin compounds in various fish species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**: 13-19.
- Harino, H., S.C.M. O'Hara, G.R. Burt, B.S. Chesman et W.J. Langston, 2005. Distribution of organotin compounds in tissues of mussels *Mytilus edulis* and clams *Mya arenaria*. *Chemosphere*, **58**: 877-881.
- Harrington, C.F., G.K. Eigendorf et W.R. Cullen, 1996. The use of high-performance liquid chromatography for the speciation of organotin compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, **10**: 339-362.
- Hashimoto, S., M. Watanabe, Y. Noda, T. Hayachi, Y. Kurita, Y. Takasu et A. Otsuki, 1998. Concentration and distribution of butyltin compounds in a heavy tanker route in the Strait of Malacca and in Tokyo Bay. *Marine Environmental Research*, **45**: 169-177.
- Hayes, J.D. et D.J. Pulford, 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology*, **30**: 445-600.

- Heidrich, D.D., S. Steckelbroeck et D. Klingmuller, 2001. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids*, **66**: 763-769.
- Henry, R.A. et K.H. Byington, 1976. Inhibition of glutathione S-aryltransferase from rat liver by organogermanium, lead and tin compounds. *Biochemistry and Pharmacology*, **25**: 2291-2295.
- Hermosin, M.C., P. Martin et J. Cornejo, 1993. Adsorption mechanisms of monobutyltin in clay minerals. *Environmental Science and Technology*, **27**: 2606-2611.
- Hinfray, N., J.-M. Porcher et F. Brion, 2006. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **144**: 252-262.
- Hoch, M., 2001. Organotin compounds in the environment – an overview. *Applied Geochemistry*, **16**: 719-743.
- Horning, E.C., M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic et R.N. Stillwell, 1973. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *Analytical Chemistry*, **45**: 936-943.
- Hua, J. et S.-M. Liu, 2008. Ballasting outside port to prevent spread of butyltin from merchant ships. *Ocean Engineering*, **35**: 1505-1511.
- Hwang, H.M., J.R. Oh, S.H. Kahng et K.W. Lee, 1999. Tributyltin compounds in mussels, oyster and sediment of Chinae Bay, Korea. *Marine Environmental Research*, **47**: 61-70.
- Ikonomou, M.G., A.T. Blades et P. Kebarle, 1991. Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance. *Analytical chemistry*, **63**: 1989-1998.
- IMO, 1999. IMO Meetings. Focus on IMO, Antifouling system: moving toward the non-toxic solution. Report of International Maritime Organization. UK, April 1999. <http://www.imo.org/imo/meetings/assembly/21/listsum.htm>
- Ishizaka, T., T. Suzuki et Y. Saito, 1989. Metabolism of dibutyltin dichloride in male rats. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **37**: 1096-1101.
- Iwai, H., O. Wada et Y. Arakawa, 1981. Determination of tri-, di-, and monobutyltin and inorganic tin in biological materials and some aspects of their metabolism in rats. *Journal of Analytical Toxicology*, **5**: 300-306.

- Iwai H, O. Wada, Y. Arakawa et T. Ono, 1982. Intestinal uptake site, enterohepatic circulation, and excretion of tetra- and tri-alkyltin compounds in mammals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **9**: 41-49.
- Iwata, H., S. Tanabe, N. Miyazaki et R. Tatsukawa, 1994. Detection of butyltin compounds residues in blubber of marine mammals. *Marine Pollution Bulletin*, **28**: 607-612.
- Jacobson, A.H. et G.L. Willingham, 2000. Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Science of The Total Environment*, **258**: 103-110.
- James, M.O. et S.M. Boyle, 1998. Cytochromes P450 in crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **121**: 157-172.
- James, M.O. et K.M. Kleinow, 1994. Trophic transfer of chemicals in the aquatic environment. Dans: D. C. Malins et G. K. Ostrander (éditeurs). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Boca Raton, Lewis Publishers: 1-35.
- Janer, G. et C. Porte, 2007. Sex steroid and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology*, **16**: 145-160.
- Jensen, K.G., A. Önfelt, M. Wallin, V. Lidums et O. Anderson, 1991. Effects of organotin compounds on mitosis, spindle structure, toxicity and *in vitro* microtubule assembly. *Mutagenesis*, **6**: 409-416.
- Jones-Lepp, T., K.E. Varner, M. McDaniel et L. Riddick, 1999. Determination of organotins in water by micro liquid chromatography-electrospray/ion trap mass spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*, **13**: 881-889.
- Kannan, K. et J. Falandysz, 1997. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **34**: 203-207.
- Kennedy, C.J., 1994. Xenobiotics: designing an *in vitro* system to study enzymes and metabolism. Dans: P.W. Hochachka et T.P. Mommsen (éditeurs). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. **3**, Analytical techniques. Elsevier, Amsterdam: 417-430.
- Kennedy, S.W., S.P. Jones et L.J. Bastien, 1995. Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. *Analytical Biochemistry*, **226**: 362-370.

- Kimmel, E.C., R.H. Fish et J.E. Casida, 1977. Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal mono-oxygenase systems and in mammals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **25**: 1-9.
- Koster, H., I. Halsema, E. Scholtens, M. Knippers et G.J. Mulder, 1981. Dose dependent shifts in the sulfation and glucuronidation of phenolic compounds in the rat *in vivo* and in isolated hepatocytes: The role of saturation of phenolsulfotransferase. *Biochemical Pharmacology*, **30**: 2569- 2575.
- Kromidas, S., 2005. More practical problem solving in HPLC. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, R.F.A.: 178 p.
- Krone, C. A. et J. E. Stein 1999. Species dependent biotransformation and tissue distribution of tributyltin in two marine teleosts. *Aquatic Toxicology*, **45**: 209-222.
- Krone, C.A., D.W. Brown, D.G. Burrows, R.G. Bogar, S.-L. Chan et U. Varanasi, 1989. A method for analysis of butyltin species and measurement of butyltins in sediment and english sole livers from Puget Sound. *Marine Environmental Research*, **27**: 1-18.
- Kuhl, A.J. et M. Brouwer, 2006. Antiestrogens inhibit xenoestrogen-induced brain aromatase activity but do not prevent xenoestrogen-induced feminization in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, **114**: 500-506.
- Langseth, W., 1984. Determination of diphenyltin and dialkyltin homologues by HPLC with morin in the eluent. *Talanta*, **31**: 975-978.
- Langston, W.J. et N.D. Pope, 1995. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, **31**: 32-43.
- Langston, W.J., G.W. Bryan, G.R. Burt et P.E. Gibbs, 1990. Assessing the impact of tin and TBT in estuaries and coastal regions. *Functional Ecology*, **4**: 433-443.
- Laughlin, R.B., Jr, 1996. Bioaccumulation of TBT by aquatic organisms. Dans: M.A. Champ et P.F. Seligman (éditeurs). *Organotin: environmental fate and effects*. Chapman et Hall, New York: 331-355.
- Laughlin, R.B., Jr, H.E. Guard et W.M. Coleman, III, 1996. Tributyltin in seawater: speciation and octanol-water partition coefficient. *Environmental Science and Technology*, **20**: 201-204.
- Laughlin, R.B., Jr, A.B. Cobet et H.E. Guard, 1987. Mechanisms of triorganotin toxicity to macroinvertebrates and the role of the biofilm as a controlled release medium. Dans: M.-

- F. Thompson, R. Sarojini et R. Nagabhushanam (éditeurs). Marine biodeterioration: Advanced Techniques Applicable to the Indian Ocean. Oxford and IBH Co, New Delhi: 757-767.
- Laughlin, R.B., Jr., W. French et H.E. Guard, 1986. Accumulation of bis(tributyltin)oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Science and Technology*, **20**: 884-890.
- Lawson, G. et N. Ostah, 1994. Ion-molecule reactions of environmentally significant organotin compounds in a triple quadrupole mass spectrometer system. *Applied Organometallic Chemistry*, **8**: 525-532.
- Leaver, M.J., D.J. Clarke et S.G. George, 1992. Molecular studies of the phase II xenobiotic conjugative enzymes of marine Pleuronectid flatfish. *Aquatic Toxicology*, **22**: 265-278.
- Lee, R.F., 1998. Annelid cytochrome P-450. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **121**: 173-179.
- Lee, R.F., 1996. Metabolism of tributyltin by aquatic organisms. Dans: M.A. Champ et P.F. Seligman (éditeurs). *Organotin: Environmental fate and effects*. Chapman et Hall, New York: 369-382.
- Lee, R.F., 1986. Metabolism of bis(tributyltin)oxide by estuarine animals. Dans: *Proceedings of the Oceans '86 Organotin Symposium, Oceans '86 Conference, September 23-25*. Marine Technology Society, Washington, DC, **4**: 1182-1188.
- Lee, R.F., 1981. Mixed function oxygenase (MFO) in marine invertebrates. *Marine Biological Letters*, **2**: 87-105.
- Le Pennec, G. et M. Le Pennec, 2003. Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquatic Toxicology*, **64**: 131-142.
- Li, A.P., 1997. Primary hepatocyte cultures as an *in vitro* experimental model for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions. Dans: A.P. Li (éditeur). *Drug-drug interactions. Scientific and regulatory perspectives*. *Advances in Pharmacology*, vol. **43**, Academic Press, New York: 103-130.
- Liu, H.-G., Y. Wang, L. Lian et L.-H. Xu, 2006. Tributyltin induces DNA damage as well as oxidative damage in rats. *Environmental Toxicology*, **21**: 166-171.

- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A*, **120**: 43-49.
- Livingstone, D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. Dans: R. Gilles (éditeur). *Advances in comparative and environmental physiology*, vol. **7**, Springer-Verlag, Berlin: 45-185.
- Maguire, R.J., 1992. Environmental assessment of tributyltin in Canada. *Water Science and Technology*, **25**: 125-132.
- Maguire, R.J., P.T.S. Wong et J.S. Rhamey, 1984. Accumulation and metabolism of tri-*n*-butyltin cation by a green alga, *Ankistrodesmus falcatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **41**: 537-540.
- Mannervik, B. et U.H. Danielson, 1988. Glutathione transferases – structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **23**: 283-337.
- Martin, R. C., D. G. Dixon, J.R. Maguire, P.V. Hodson, R.J. Tkacz, 1989. Acute toxicity, uptake, depuration and tissue distribution of tri-*n*-butyltin in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquatic Toxicology*, **15**: 37-52.
- Martin-Skilton, R., M.W.H. Coughtrie et C. Porte, 2006. Sulfotransferase activities towards xenobiotics and estradiol in two marine fish species (*Mullus barbatus* and *Lepidorhombus boscii*): Characterization and inhibition by endocrine disrupters. *Aquatic Toxicology*, **79**: 24-30.
- Matsuda, R., T. Suzuki et Y. Saito, 1993. Metabolism of tri-*n*-butyltin chloride in male rats. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **41**: 489-495.
- Matthiessen, P. et P.E. Gibbs, 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**: 37-43.
- McAllister, B.G. et D.E. Kime, 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, **65**: 309-316.
- McVey, M.J. et G.M. Cooke, 2003. Inhibition of rat testis microsomal 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity by tributyltin. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **86**: 99-105.

- Meador, J.P., C.A. Krone, D.W. Dyer et U. Varanasi, 1997. Toxicity of sediment-associated tributyltin in infaunal invertebrates: species comparison and the role of organic carbon. *Marine Environmental Research*, **41**: 219-241.
- Michel, P. et B. Averty, 1999. Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 update. *Marine Pollution Bulletin*, **38**: 268-275.
- Michel, X. R., C. Beasse et J. F. Narbonne, 1995. In-vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **28**: 215-222.
- Micic, M., N. Bihari, Z. Jaksic, W.E.G. Müller et R. Batel, 2002. DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, **53**: 243-262.
- Miranda, C.L., J.-L. Wang, M.H. Henderson et D.R. Buhler, 1990. Immunological characterization of constitutive isozymes of cytochrome P450 from rainbow trout. Evidence for homology with phenobarbital-induced rat P450s. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1037**: 155-160.
- Miranda, C.L., J.L. Wang, M.C. Henderson, X. Zhao, F.P. Guengerich et D.R. Buhler, 1991. Comparison of rainbow trout and mammalian cytochrome P450 enzymes: evidence for structural similarity between trout P450 LMC5 and human P450III A4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **176**: 558-563.
- Morcillo, Y., G. Janer, S.C.M. O'Hara, D.R. Livingstone et C. Porte, 2004. Interaction of tributyltin with hepatic cytochrome P450 and uridine diphosphate-glucuronosyl transferase systems of fish: *in vitro* studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**: 990-996.
- Morrison, H., P. Young et S. George, 1985. Conjugation of organic compounds in isolated hepatocytes from a marine fish, the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Biochemical Pharmacology*, **34**: 3933-3938.
- Mortensen, A.S. et A. Arukwe, 2007. Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT). *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **145**: 431-441.
- Nebert, D.W., D. Nelson, M.J. Coon, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, Y. Fujii-Kuriyama, F.J. Gonzalez, F.P. Guengerich, I. Gunsalus, E. Johnson, J. Loper, R. Sato, M.R. Waterman et D. Waxman, 1991. The P450 superfamily : update on new sequences, Gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology*, **10**: 1-14.

- Nielsen, J. B. et J. Strand 2002. Butyltin compounds in human liver. *Environmental Research*, **88**: 129-133.
- Niessen, W.M.A., 1999. State-of-the-art in liquid chromatography-masse spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **856**: 179-197.
- Oberdörster, E., D. Rittschof et P. McClellan-Green, 1998. Induction of cytochrome P450 3A and heat shock protein by tributyltin in blue crab *Callinectes sapidus*. *Aquatic Toxicology*, **41**: 83-100.
- Ohhira, S., M. Enomoto et H. Matsui, 2006a. Sex difference in the principal cytochrome P-450 for tributyltin metabolism in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **210**: 32-38.
- Ohhira, S., M. Enomoto et H. Matsui, 2006b. In vitro metabolism of tributyltin and triphenyltin by human cytochrome P-450 isoforms. *Toxicology*, **228**: 171-177.
- Ohkimoto, K., Y. Sakakibara, M. Suiko, H. Yoshikawa, M.-C. Liu et H. Tamura, 2005. Biocides, tributyltin and triphenyltin, as possible inhibitors of the human sulfotransferase involved in the estrogen homeostasis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **81**: 32-38.
- Okada, Y., Y. Oyama, L. Chikahisa, M. Satoh, K. Kanemaru, H. Sakai et K. Noda, 2000. Tri-*n*-butyltin-induced change in cellular level of glutathione in rat thymocytes: a flow cytometric study. *Toxicology Letters*, **117**: 123-128.
- Oliveira Ribeiro, C.A., J. Padrós, F.X. Valdez Domingos, F.M. Akaishi et É. Pelletier, 2007. Histopathological evidence of antagonistic effects of tributyltin on benzo[a]pyrene toxicity in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Science of the Total Environment*, **372**: 549-553.
- Oliveira Ribeiro, C.A., M. Schatzmann, H.C. Silva de Assis, P.H. Silva, É. Pelletier et F.M. Akaishi, 2002. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish. (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **51**: 161-167.
- Omae, I., 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry*, **17**: 81-105.
- Orsler, R.J., G.E. Holland, 1982. Degradation of tributyltin oxide by fungal culture filtrates. *International Biodeterioration Bulletin*, **18**: 95-98.

- Ortiz, A., J.A. Teruel, et F.J. Aranda, 2005. Effect of triorganotin compounds on membrane permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1720**: 137-142.
- Padrós, J., É. Pelletier et C.A. Oliveira Ribeiro, 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in Artic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term *in vivo* study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **192**: 45-55.
- Padrós, J., É. Pelletier, S. Reader et F. Denizeau, 2000. Mutual *in vivo* interactions between benzo[a]pyrene and tributyltin in Brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**: 1019-1027.
- Pelletier, É. et C. Normandeau, 1997. Distribution of butyltin residues in mussels and sea stars of the St. Lawrence estuary. *Environmental Technology*, **18**: 1203-1208.
- Penninks, A.H., Snoeij, N.J., Pieters, R.H.H. et Seinen, W., 1990. Effect of organotin compounds on lymphoid organs and lymphoid functions: an overview. Dans: A.D. Dayan, R.F. Hertel, E. Heseltine, G. Kazantzis, E.M. Smith et M.T. van der Venne (éditeurs.). *Immunotoxicity of metals and immunotoxicology*, Plenum Press, NY: 191-207.
- Porte, C., P. Lemaire, L.D. Peters et D.R. Livingstone, 1995. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research*, **39**: 21-31.
- Porvaznik, M., B.H. Gray, D. Mattie, A.G. Jackson et R.E. Omlor, 1986. The ultrastructural localization of tri-*n*-butyltin in human erythrocyte membranes during shape transformation leading to hemolysis. *Laboratory Investigation*, **54**: 254-267.
- Prasad, R. et G.C. Schafran, 2006. Characterization of tributyltin in shipyard waters and removal through laboratory and full-scale treatment. *Water Research*, **40**: 453-462.
- Prouse, N.J. et D.V. Ellis, 1997. A baseline survey of dogwhelk (*Nucella lapillus*) imposex in eastern Canada (1995) and interpretation in terms of tributyltin (TBT) contamination. *Environmental Technology*, **18**: 1255-1264.
- Raffray, M., D. McCarthy, R.T. Snowden et G.M. Cohen, 1993. Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes: relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **119**: 122-130.
- Reader, S., V. Moutardier et F. Denizeau, 1999. Tributyltin triggers apoptosis in trout hepatocytes: the role of Ca²⁺, protein kinase C and proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1448**: 473-485.

- Rewitz, K., B. Styris have et O. Andersen, 2003. CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **310**: 252-260.
- Rice, S.D., J.W. Short et W.B. Stickle, 1989. Uptake and catabolism of tributyltin by blue crabs fed TBT contaminated prey. *Marine Environmental Research*, **27**: 137-145.
- Ronis, M.J.J. et A.Z. Mason, 1996. The metabolism of testosterone by the Periwinkle (*Littorina littorea*) *in vitro* and *in vivo*: effects of tributyl tin. *Marine Environmental Research*, **42**: 161-166.
- Rosenberg, D.W. et G.S. Drummond, 1983. Direct *in vitro* effects of bis(tri-*n*-butyltin)oxide on hepatic cytochrome P-450. *Biochemical Pharmacology*, **32**: 3823-3829.
- Rosenberg, D.W., G.S. Drummond et A. Kappas, 1981. The influence of organometals on heme metabolism *in vivo* and *in vitro* studies with organotins. *Molecular Pharmacology*, **21**: 150-158.
- Rosenberg, D.W., G.S. Drummond, H.C. Cornish et A. Kappas, 1980. Prolonged induction of hepatic haem oxygenase and decreases in cytochrome P-450 content by organotin compounds. *Biochemical Journal*, **190**: 465-468.
- Rosenberg, E., 2003. The potential of organoc (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, **1000**: 841-889.
- Rosenberg, E., V. Kmetov et M. Grasserbauer, 2000. Investigating the potential of high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry as an alternative method for the speciation analysis of organotin compounds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **366**: 400-407.
- Saint-Louis, R., 1994. Rôle du phytoplancton dans le devenir des organoétains à l'interface air-mer. Thèse de Philosophie Doctor ès Sciences en Océanographie, numéro 13, Université du Québec à Rimouski, Québec: 118 p.
- Saint-Louis, R., S.J. de Mora, É. Pelletier, B. Doidge, D. Leclair, I. Mikaelian, D. Martinau, 2000. Hepatic butyltin concentrations in Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence Estuary and northern Quebec, Canada. *Applied Organometallic Chemistry*, **14**: 218-226.
- Saint-Louis, R., C. Gobeil et E. Pelletier, 1997. Le Tributylétain et ses produits de dégradation dans l'estuaire du Saint-Laurent (Canada). *Environmental Technology*, **18**: 1209-1218.

- Satoh, K., F. Nagai et N. Aoki, 2001. Several environmental pollutants have binding affinities for both androgen receptor and estrogen receptor α . *Journal of Health Science*, **47**: 495-501.
- Sauer, J.-M., E.R. Stine, L. Gunawardhana, D.A. Hill et I.G. Sipes, 1997. The liver as a target for chemical-chemical interactions. Dans: A.P. Li (éditeur). *Drug-drug interactions. Scientific and regulatory perspectives. Advances in Pharmacology*, vol. **43**, Academic Press, New York: 37-63.
- Schmidt, K., G.B.O. Staaks, S. Pflugmacher et C. E.W. Steinberg, 2005. Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, **71**: 49-59.
- Schwaiger J., F. Bucher et H. Ferling, W. Kalbfus, R.D. Negele, 1992. A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **23**: 31-48.
- Seligman, P.F., A.O. Valkirs, P.M. Stang et R.F. Lee, 1988. Evidence for rapid degradation of tributyltin in marina. *Marine Pollution Bulletin*, **19**: 531-534.
- Shlenk, D., 1998. Occurrence of flavin-containing monooxygenases in non mammalian eukaryotic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **121**: 185-195.
- Shofer, S.L. et R.S. Tjeerdema, 1993. Comparative disposition and biotransformation of pentachlorophenol in the oyster (*Crassostrea gigas*) and abalone (*Haliotis fulgens*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **46**: 85-95.
- Simpson, C.D., W.R. Cullen, Y.T. He, M. Ikonomou et K.J. Reimer, 2002. Metabolism of pyrene by two clam species, *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*. *Chemosphere*, **49**: 315-322.
- Snoeiij, N.J., A.H. Penninks et W. Seinen, 1988. Dibutyltin and tributyltin compounds induce thymus atrophy in rats due to a selective action on thymic lymphoblasts. *International Journal of Immunopharmacology*, **10**: 891-899.
- Snoeiij, N.J., A.H. Penninks et W. Seinen, 1987. Biological activity of organotin compounds - an overview. *Environmental Research*, **44**: 335-353.
- Spooner, N., P.E. Gibbs, G.W. Bryan et L.J. Goad, 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Marine Environmental Research*, **32**: 37-49.

- St-Jean, S.D., É. Pelletier et S.C. Courtenay, 2002. Very low levels of waterborne butyltins modulate hemocyte function in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, **236**: 155-161.
- Stegeman, J.J., 2000. Cytochrome P450 gene diversity and function in marine animals: past, present, and future. *Marine Environmental Research*, **50**: 61-62.
- Stegeman, J.J., 1993. Cytochrome P450 forms in fish. Dans: J. B. Schenkman et H. Greim (éditeurs). *Cytochrome P450*. Berlin, Springer-Verlag. **105**: 279-291.
- Stegeman, J.J. et M.E. Hahn, 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. Dans: D. C. Malins et G. K. Ostrander (éditeurs). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton: 87-206.
- Stephenson, M.D. et D.R. Smith, 1988. Determination of tributyltin in tissues and sediments by graphite furnace AA spectrometry. *Analytical Chemistry*, **60**: 696-698.
- Sugahara, T., C.-C. Liu, G. Carter, T.G. Pai et M.-C. Liu, 2003. cDNA cloning, expression, and functional characterization of a zebrafish SULT1 cytosolic sulfotransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **414**: 67-73.
- Sullivan, J.J., J.D. Torkelson, M.M. Wekell, T.A. Hollingworth, W.L. Saxton, G.A. Miller, K.W. Panaro et A.D. Uhler, 1988. Determination of tri-*n*-butyltin and di-*n*-butyltin in fish as hydride derivatives by reaction gas chromatography. *Analytical Chemistry*, **60**: 626-630.
- Suzuki, T., K. Kondo, M. Uchiyama et M. Murayama, 1999. Some sulfur-containing metabolites of tri-*n*-butyltin chloride in male rats. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **47**: 4791-4798.
- Suzuki, T., R. Matsuda et Y. Saito, 1992. Molecular species of tri-*n*-butyltin compounds in marine products. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **40**: 1437-1443.
- Suzuki, T., R. Matsuda, Y. Saito et H. Yamada, 1994. Application of helium microwave-induced plasma emission detection system to analysis of organotin compounds in biological samples. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **42**: 216-220.
- Suzuki, T., H. Yamada, I. Yamamoto, K. Nishimura, K. Kondo, M. Murayama et M. Uchiyama 1996. Chemical speciation of organotin compounds in seawater and their seasonal variations. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **44**: 3989-3995.

- Suzuki, T., I. Yamamoto, H. Yamada, N. Kaniwa, K. Kondo et M. Murayama, 1998. Accumulation, metabolism, and depuration of organotin compounds in the marine mussels *Mytilus graynus* and *Mytilus edulis* under natural conditions. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **46**: 304-313.
- Syage, J.A., K.A. Hanold, T.C. Lynn, J.A. Horner et R.A. Thakur, 2004. Atmospheric pressure photoionization: II. Dual source ionization. *Journal of Chromatography A*, **1050**: 137-149.
- Thain, J.E. et M.J. Waldock, 1985. The growth of bivalve spats exposed to organotin leachates from antifouling paints. *International Council for the Exploration of the Sea*, CM1985/E:28: 6 p.
- ThermoFinnigan (2001). LCQ™ Advantage, hardware manual. Revision A 97133-97003. ThermoFinnigan Technical Publications, San Jose, CA.
- Thibaut, R. et C. Porte, 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **92**: 485-494.
- Truscott, B., 1983. Steroid metabolism in fish: II. Testosterone metabolites in the bile of the marine winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*, and the freshwater Atlantic salmon *Salmo salar*. *Genetic and Comparative Endocrinology*, **51**: 460-470.
- Trute, M., B. Gallis, C. Doneanu, S. Shaffer, D. Goodlett et E. Gallagher, 2007. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, **81**: 126-136.
- Tsuda, T., S. Aoki, M. Kojima et H. Harada, 1991. Accumulation of tri-*n*-butyltin chloride and triphenyltin chloride by oral and via gill intake of goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **99**: 69-72.
- Tsuda, T., H. Nakanishi, S. Aoki et J. Takebayashi, 1988. Bioconcentration and metabolism of butyltin compounds in carp. *Water Research*, **22**: 647-651.
- Tsuda, T., H. Nakanishi, T. Morita et J. Takebayashi 1986. Simultaneous gas chromatographic determination of dibutyltin and tributyltin compounds in biological and sediment samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **69**: 981-984.
- Ueno, S., T. Kashimoto, N. Susa, M. Ishii, T. Chiba, K.-I. Mutoh, F. Hoshi, T. Suzuki et M. Sugiyama, 2003a. Comparison of hepatotoxicity and metabolism of butyltin compounds in the liver of mice, rats and guinea pigs. *Archives of Toxicology*, **77**: 173-181.

- Ueno, S., T. Kashimoto, N. Susa, Y. Shiota, M. Okuda, K.-I. Mutoh, F. Hoshi, K. Watanabe, S. Tsuda, S. Kawazoe, T. Suzuki et M. Sugiyama, 2003b. Effects of butyltin compounds on mitochondrial respiration and its relation to hepatotoxicity in mice and guinea pigs. *Toxicological Sciences*, **75**: 201-207.
- Ueno, S., T. Suzuki, N. Susa, Y. Furukawa et M. Sugiyama, 1997. Effect of SKF-525A on liver metabolism and hepatotoxicity of tri- and dibutyltin compounds in mice. *Archives of Toxicology*, **71**: 513-518.
- Ueno, S., N. Susa, Y. Furukawa et M. Sugiyama, 1995. Role of cytochrome P450 in hepatotoxicity induced mono-, di-, and tributyltin compounds in mice. *Archives of Toxicology*, **69**: 655-658.
- Unger, M., W.G. McIntyre et R.J. Huggett, 1988. Sorption behavior of tributyltin on estuarine and freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **7**: 907-915.
- van den Hurk, P. et M.O. James, 2000. Sulfatation and glucuronidation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol in intestinal mucosa of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Environmental Research*, **50**: 11-15.
- van der Oost, R., J. Beyer et N.P.E. Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57-149.
- Vermeulen, N.P.E., 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. Dans: C. Ioannides (éditeur). *Cytochrome P450: metabolic and toxicological aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL: 29-53.
- Vidal, M.L. et J.F. Narbonne, 2000. Characterization of glutathione S-transferase activity in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **64**: 455-462.
- Viglino, L., É. Pelletier et R. Saint-Louis, 2004. Highly persistent butyltins in northern marine sediments: a long-term threat for the Saguenay fjord (Canada). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**: 2673-2681.
- Vos, J.G., A. de Klerk, E.I. Krajnc, H. van Loveren et J. Rozing, 1990. Immunotoxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in the rat: effects on thymus-dependent immunity and on nonspecific resistance following long-term exposure in young versus aged rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **105**: 144-155.
- Wahlen, R. et T. Catterick, 2003. Comparison of different liquid chromatography conditions for the separation and analysis of organotin compounds in mussel and oyster tissue by

liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **783**: 221-229.

Wester, P.W., J.H. Canton, A.A.J. Van Iersel, E.I. Krajnc et H.A.M.G. Vaessen 1990. The toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) and di-*n*-butyltin dichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecelia reticulata* (guppy). *Aquatic Toxicology*, **16**: 53-72.

Whalen, M.M., S.A. Green et B.G. Loganathan, 2002. Brief butyltin exposure induces irreversible inhibition of the cytotoxic function on human natural killer cells, *in vitro*. *Environmental Research*, **88**: 19-29.

White, I.N.H., 1988. A continuous fluorometric assay for cytochrome P-450-dependent mixed function oxidases using 3-cyano-7-ethoxycoumarin. *Analytical Biochemistry*, **172**: 304-310.

White, S., T. Catterick, B. Fairman et K. Webb, 1998. Speciation of organo-tin compounds using liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry and liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry as complementary techniques. *Journal of Chromatography A*, **794**: 211-218.

Widdows, J. et D.S. Page, 1993. Effects of tributyltin and dibutyltin on the physiological energetics of the mussel, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, **35**: 233-249.

Williams, R.T., 1959. *Detoxication Mechanisms, The metabolism and detoxication of drugs, toxic substances, and other organic compounds*. 2nd ed., John Willey and Sons, New York: 734 p.

Williams, D.E. et D.R. Buhler, 1983. Comparative properties of purified cytochrome P-448 from β -naphthoflavone-treated rats and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part **C**, **75**: 25-32.

Wootton, A.N., C. Herring, J. A. Spry, A. Wiseman, D.R. Livingstone et P.S. Goldfarb, 1995. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp. *Marine Environmental Research*, **39**: 21-26.

Yamada, H., M. Tateishi et K. Takayanagi, 1994. Bioaccumulation of organotin compounds in the red sea bream (*Pagrus major*) by two uptake pathways: dietary uptake and direct uptake from water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**: 1415-1422.

- Yamaguchi, T., S. Ohtake, K. Kimata et O. Habuchi, 2007. Molecular cloning of squid *N*-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-*O*-sulfotransferase and synthesis of a unique chondroitin sulfate containing E-D hybrid tetrasaccharide structure by the recombinant enzyme. *Glycobiology*, **17**: 1365-1376.
- Yamamoto, I., K. Nishimura, T. Suzuki, K. Takagi, H. Yamada, K. Kondo et M. Murayama, 1997. Accumulation, transformation, and elimination of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in red sea bream, *Pagrus major*, under laboratory conditions. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **45**: 1437-1446.
- Yamashita, M. et J.B. Fenn, 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, **88**: 4451-4459.
- Zhang, J., Z. Zuo, R. Chen, Y. Chen et C. Wang, 2008. Tributyltin exposure causes brain damage in *Sebasticus marmoratus*. *Chemosphere*, **73**: 337-343.
- Zucker, R.M., K.H. Elstein, D.J. Thomas et J.M. Rogers, 1994. Tributyltin and dexamethasone induce apoptosis in rat thymocytes by mutually antagonistic mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **127**: 163-170.

