

## Résumé

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

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

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

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

## Abstract

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

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

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

In a third part, after the validation of a spiked placental perfusion solution at 1  $\mu\text{M}$  with 16 US-EPA PAHs, an *ex vivo* human cotyledon perfusion model was carried out to evaluate the PAH placental transfer. In addition, human trophoblast cell cultures with a spiked DMSO solution at 1  $\mu\text{M}$  with 16 US-EPA PAHs were carried out to evaluate the impact of PAH exposure on placental functions.