

Offre de stage, 6 mois, 2020, étudiant(e) en master de chimie analytique

Développement d'un protocole de préparation d'échantillon et de mesure par couplages LC-HRMS et GC-HRMS pour la recherche non-ciblée de marqueurs d'exposition halogénés dans les matrices humaines

Unité d'accueil :

LABoratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (**LABERCA**), UMR 1329 Oniris-INRA

Le Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) est une Unité Mixte de Recherche de l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (Oniris), dépendant du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Le LABERCA est placé sous la tutelle de la Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (DGER) et de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, département AlimH). Il est par ailleurs le **Laboratoire National de Référence** (LNR) de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) en ce qui concerne l'analyse des dioxines, des polychlorobiphényles, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des promoteurs de croissance interdits (dont les hormones stéroïde) en élevage. Du point de vue scientifique, le domaine d'activité général du laboratoire est celui de la **sécurité de l'aliment**, et plus précisément celui de l'étude des résidus et contaminants chimiques présents au sein de la chaîne alimentaire, dans une démarche globale d'appréciation du risque depuis l'agrofourniture jusqu'à **l'Homme et sa descendance**. Le LABERCA s'attache en effet à générer des données et des connaissances relatives aux sources, transferts et métabolismes des composés étudiés, afin de caractériser à la fois l'exposition (occurrence dans les denrées) et l'imprégnation (occurrence dans les fluides et tissu biologiques) des consommateurs vis-à-vis de ces polluants chimiques. Du point de vue analytique, les deux principaux domaines de compétence et de reconnaissance du LABERCA sont d'une part le **traitement des échantillons biologiques complexes** en vue de l'isolement des substances étudiées présentes au sein de ces matrices à l'état de trace, et d'autre part la mesure fine de ces composés par diverses techniques et **couplages** basés sur la **spectrométrie de masse**. La reconnaissance de ce savoir-faire du LABERCA dans le domaine de l'analyse de polluants chimiques par des méthodes spécifiques de confirmation est aujourd'hui attestée par les nombreux projets de recherche auxquels celui-ci participe au plan national (DGAI, Anses, INRA) et international (4^{ème} à 7^{ème} PCRD). Le parc instrumental du laboratoire compte parmi les plus remarquables en Europe dans le domaine de la spectrométrie de masse. Celui-ci regroupe ainsi des couplages de type GC-MS (simple quadripôle x2), GC-MS/MS (triple quadripôle x4), LC-MS/MS (triple quadripôle x3), GC-HRMS (secteur électromagnétique x3, Q-Orbitrap™ x1), GC-C-IRMS (x2), LC-HRMS (Q-IMS-TOF x1, Orbitrap™ x1, Q-Orbitrap™ x1), LC-HRMSn (trappe ionique linéaire-Orbitrap™ x1). L'ensemble des activités du laboratoire est conduit sous un système de management de la qualité associant une accréditation selon le référentiel ISO 17025 et une certification (portée flexible de niveau 3) selon le référentiel ISO 9001:2015 pour la conception, conduite et valorisation de projets de recherche.

Description contextuelle du sujet :

Les approches méthodologiques traditionnellement développées et appliquées dans les domaines de la sécurité chimique des aliments, de la biosurveillance, et plus largement de la santé environnementale, sont des approches ciblées où les composés recherchés sont connus. Ces approches permettent ainsi de couvrir une partie de l'exposome chimique de l'Homme. Cependant, la connaissance plus exhaustive de l'exposition de l'Homme demande à dépasser ce niveau de caractérisation actuel. Ceci est dû à l'étendue du nombre de composés présents dans l'environnement et son évolution temporelle, géographique, ou encore entre différents sous-groupes de populations. Ainsi, pour avoir une vision exhaustive de l'exposome chimique de l'Homme et à long terme pour anticiper les problématiques liées à l'apparition de substances émergentes¹, il est nécessaire de développer des approches de profilage non-ciblé où sont recherchés des composés soit connus mais non encore inclus dans les méthodes ciblées, soit encore non identifiés. Pour ce qui concerne plus spécifiquement cette recherche de composés émergents, le LABERCA est impliqué dans le projet européen Human Biomonitoring for European Union² (HBM4EU-Cofund H2020), en tant que responsable du groupe de travail (WP16) dédié à cette problématique. Au sein de ce vaste exposome chimique, les Polluants

Organiques Persistants³ (POPs) suscitent une attention particulière en raison de leurs caractères persistants, bioaccumulables (principalement lipophile), toxiques et mobiles. De ce fait, ils sont attendus dans les compartiments de stockage et/ou d'excrétion plutôt riches en lipides, tels que le tissu adipeux, le lait maternel, le placenta etc. Certains d'entre eux ont la particularité d'être chlorés et/ou bromés et peuvent présenter une toxicité suspectée voire avérée (retardateurs de flamme bromés, pesticides, dioxines, PCBs, etc), d'où l'importance de les étudier. Ce caractère chimique permet de les repérer en spectrométrie de masse grâce à leurs massifs isotopiques et à leur défaut de masse.

Objectifs :

Dans ce contexte, le présent sujet de stage s'inscrit dans un travail de thèse initié fin 2017 sur le développement d'approches de profilage non ciblé pour la mise en évidence de dangers chimiques émergents, appliqué à l'identification de nouveaux marqueurs d'exposition chez l'Homme au service de la biosurveillance et de l'étude du lien entre exposition chimique et santé humaine. La priorité est mise dans ce projet sur la **recherche de substances émergentes halogénées** dans les **matrices de stockages et/ou d'excrétion**. Un premier protocole a déjà été développé à partir de prélèvements de lait maternel et basé sur une mesure par couplage LC-HRMS. **L'objectif de ce présent stage est d'étendre l'applicabilité de ce protocole non-ciblé à d'autres matrices humaines (placenta, tissu adipeux)**. Dans un premier temps, la préparation d'échantillon déjà développée sera adaptée pour être applicable à une autre matrice humaine (tissu adipeux, placenta) que le lait maternel. Ensuite, des conditions de profilage par couplage **UHPLC-ESI-Q-Orbitrap** et **GC-EI-Q-Orbitrap** seront appliquées et/ou développées afin de caractériser les extraits préparés. Enfin, les données générées seront retraitées via une application informatique développée au laboratoire, **HaloSeeker**⁴, qui cartographie les composés chlorés et bromés et rend l'interprétation plus aisée. Si certains composés sont annotés, une démarche d'identification avec l'analyse d'un standard de référence et la génération de spectres de fragmentation MS/MS sera engagée.

1- Sauve, S.; Desrosiers, M., A review of what is an emerging contaminant. *Chem Cent J* **2014**, 8 (1), 15.

2- UBA, G. E. A. HBM4EU science and policy for a healthy future. <https://www.hbm4eu.eu/>.

3- Stockholm Convention. <http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/Default.aspx>.

4- Léon, A.; Cariou, R.; Hutinet, S.; Hurel, J.; Guittou, Y.; Tixier, C.; Munsch, C.; Antignac, J.-P.; Dervilly-Pinel, G.; Le Bizec, B., HaloSeeker 1.0, a user-friendly software to highlight halogenated chemicals in non-targeted high resolution mass spectrometry datasets. *Analytical chemistry* **2019**, 91 (5), 3500-3507.

Description des objectifs du stage :

1. Réaliser une revue de la bibliographie permettant une immersion dans le sujet et la rédaction détaillée du plan de travail
2. Maîtriser les étapes de la préparation d'échantillon sur le lait maternel pour la transposer à de nouvelles matrices
3. Analyser les échantillons par couplage LC-HRMS et GC-HRMS et évaluer la complémentarité de deux instruments
4. Générer des données de biosurveillance et prioriser les composés à investiguer
5. Rédiger un rapport de stage et préparer une soutenance

Contacts :

Dr. Jean-Philippe ANTIGNAC, directeur de recherche, jean-philippe.antignac@oniris-nantes.fr

Mme Mariane POURCHET, doctorante, mariane.pourchet-gellez@oniris-nantes.fr

LABERCA - ONIRIS

Route de Gachet - CS 50707 - 44307 Nantes Cedex 3

Tel : +33 2 40 68 78 80