



SMAP 2009
**Spectrométrie de Masse
et Analyse Protéomique**
DIJON
Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique 26^{èmes} Journées Françaises de la Spectrométrie de Masse



Localisation de composés xénobiotiques à l'aide de l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS.

Alexandre Seyer¹, Anne Riu², Laurent Debrauwer², Nathalie Bourguès-Abella³, Alain Brunelle¹, Daniel Zalko², Olivier Laprèvote^{1,4}

1. Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, UPR 2301, Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

2. UMR 1089 Xénobiotiques INRA-ENVT, 180 Chemin de Tournefeuille, BP93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France

3. École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 3, France

4. Laboratoire de Toxicologie, IFR 71, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris-Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

SMAP 2009

Plan

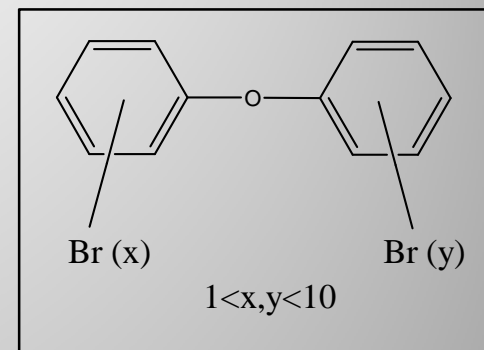
- Les Poly-Bromo-Diphényl Ethers (PBDEs)
- Objectif de l'étude
- Matériels et méthodes
- Résultats
- Conclusion et Perspectives

Les Poly-Bromo-Diphényl Ethers (PBDEs)

Ce sont des retardateurs de flamme bromés (RFB) largement utilisés dans les équipements industriels et domestiques pour limiter les incendies.

En théorie, il existe 209 congénères, du mono au decabromés.

Il sont fabriqués sous 3 formulations : le penta-mix, l'octa-mix et le deca-mix, mais seul le deca-mix est autorisé en Europe.



Il a été démontré que certains présentent une bioaccumulation dans l'environnement. Ils sont retrouvés dans du tissu animal aussi bien qu'humain .

Les PBDEs de faible masse ont été les plus étudiés et il a été démontré que certains ont des effets neurotoxiques chez la souris.

Ceux de plus haute masse pourraient interagir avec le système hormonal thyroïdien .

Chez l'humain, la présence de DBDE a été rapportée dans le lait maternel, le sérum et le tissu adipeux.

Les Poly-Bromo-Diphényl Ethers (PBDEs)

Etude sur la répartition du DBDE et de ses métabolites dans différents organes de souris gestantes *

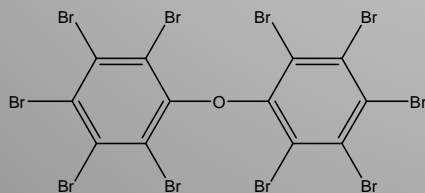
Administration orale chez la souris gestante de 2mg/kg de [¹⁴C]-DBDE chaque jour du 16ème au 19ème jour de gestation.

La majorité de la radioactivité est éliminée dans les selles

Les plus hautes concentrations sont retrouvées dans les glandes surrénales, les ovaires et le foie.

Pas de localisation précise de ce composé dans ces organes.

Deca-Bromo-Diphenyl Ether



C₁₂Br₁₀O
Exact Mass: 949,1783
Mol. Wt.: 959,1678

Four-day metabolic balance study in pregnant Wistar rats force-fed with 2 mg kg⁻¹ [¹⁴C]-DBDE each day from gestational days 16 to 19

	% of administered radioactivity	µg g ⁻¹ (or µg mL ⁻¹) [¹⁴ C]-DBDE equivalents
Faeces	66.29±1.35	
Digestive tract content	5.33±1.50	
Urine	0.11±0.02	0.06±0.01
Adrenals	0.16±0.05	33.03±4.07
Ovaries	0.13±0.02	16.05±2.91
Liver	6.48±1.03	11.16±2.42
Kidneys	0.29±0.05	3.90±0.48
Stomach	0.20±0.07	3.10±0.46
Small intestine	0.64±0.15	2.81±0.79
Heart	0.08±0.01	2.47±0.36
Lung	0.13±0.02	1.93±0.32
Spleen	0.06±0.01	1.82±0.18
Large intestine	0.16±0.04	1.61±0.27
Plasma		1.53±0.12
Uterus	0.24±0.09	1.39±0.28
Adipose tissue		0.79±0.10
Muscle		0.41±0.05
Brain	0.01±0.00	0.11±0.01
Placentas	0.47±0.05	2.48±0.16
Foetuses	0.43±0.03 ^a	0.46±0.05
Amniotic fluid	0.02±0.00	0.11±0.01
Carcass	9.23±1.21	1.11±0.05
Cages	<0.0002	

^a For the whole litter.

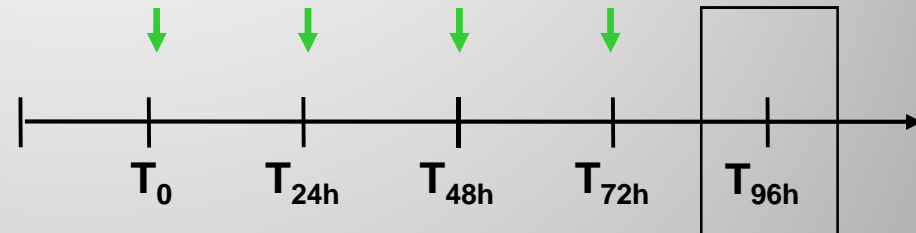
* A. Riu, JP. Cravedi, L. Debrauwer, A. Garcia, C. Canlet, I. Jouanin, D. Zalko. *Environ. Int.* 2008, 34, 318.

Matériel et méthodes

Préparation des échantillons



Dose orale
2 mg/kg
Quotidienne
durant 4 jours



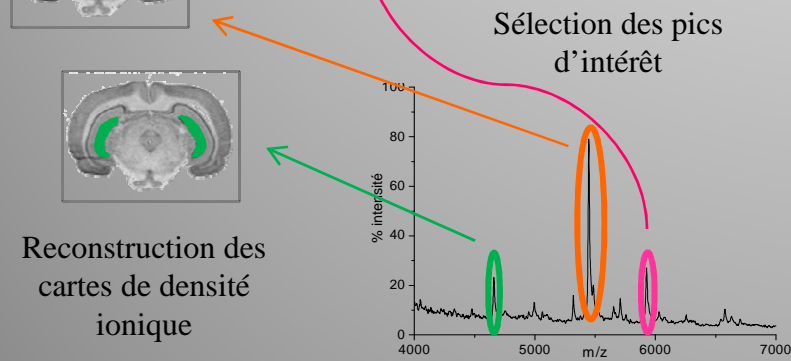
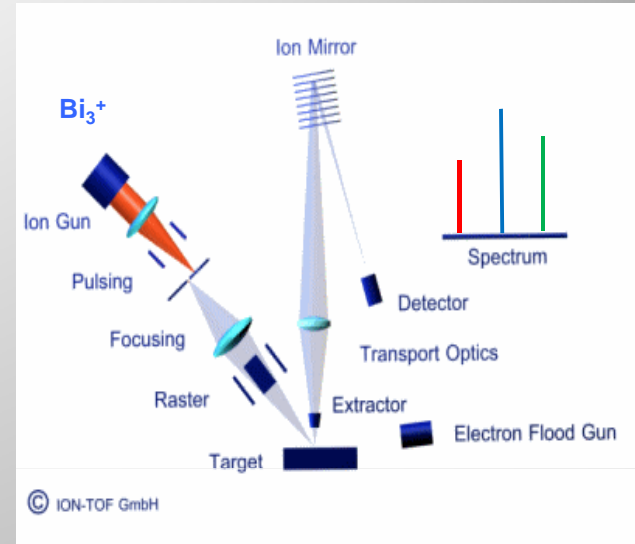
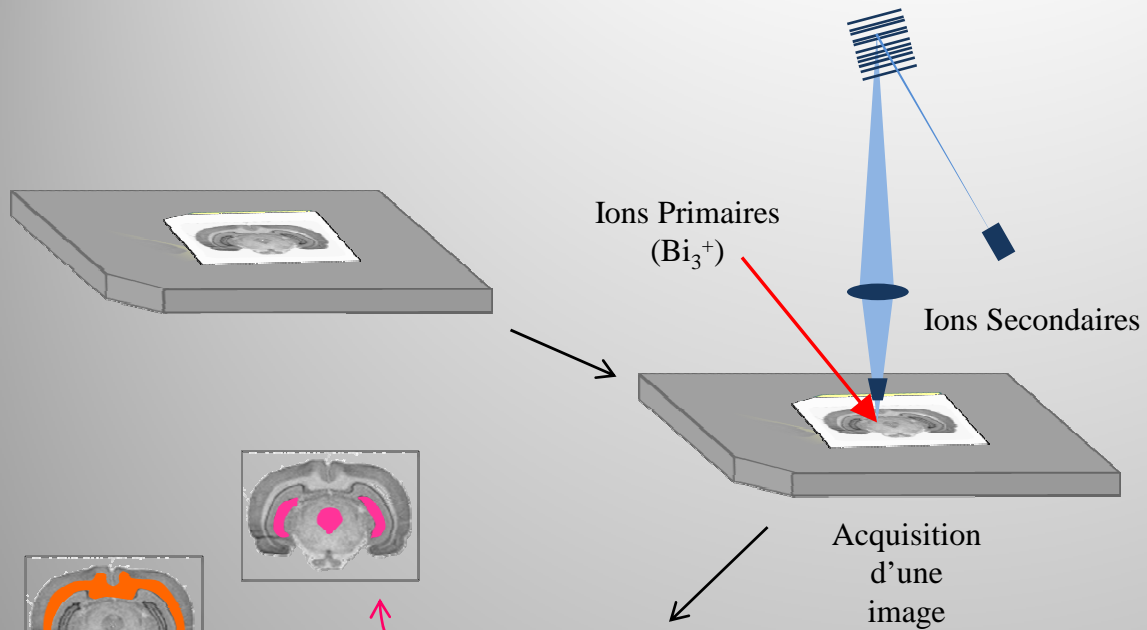
Analyses ToF-SIMS



Coupes de 10 μ m
d'épaisseur à -20°C

Stockage à -80°C
(glandes
surrénales, ovaires
et foie)

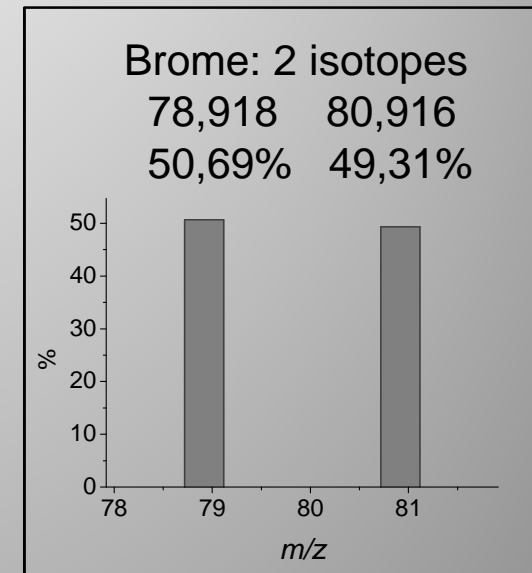
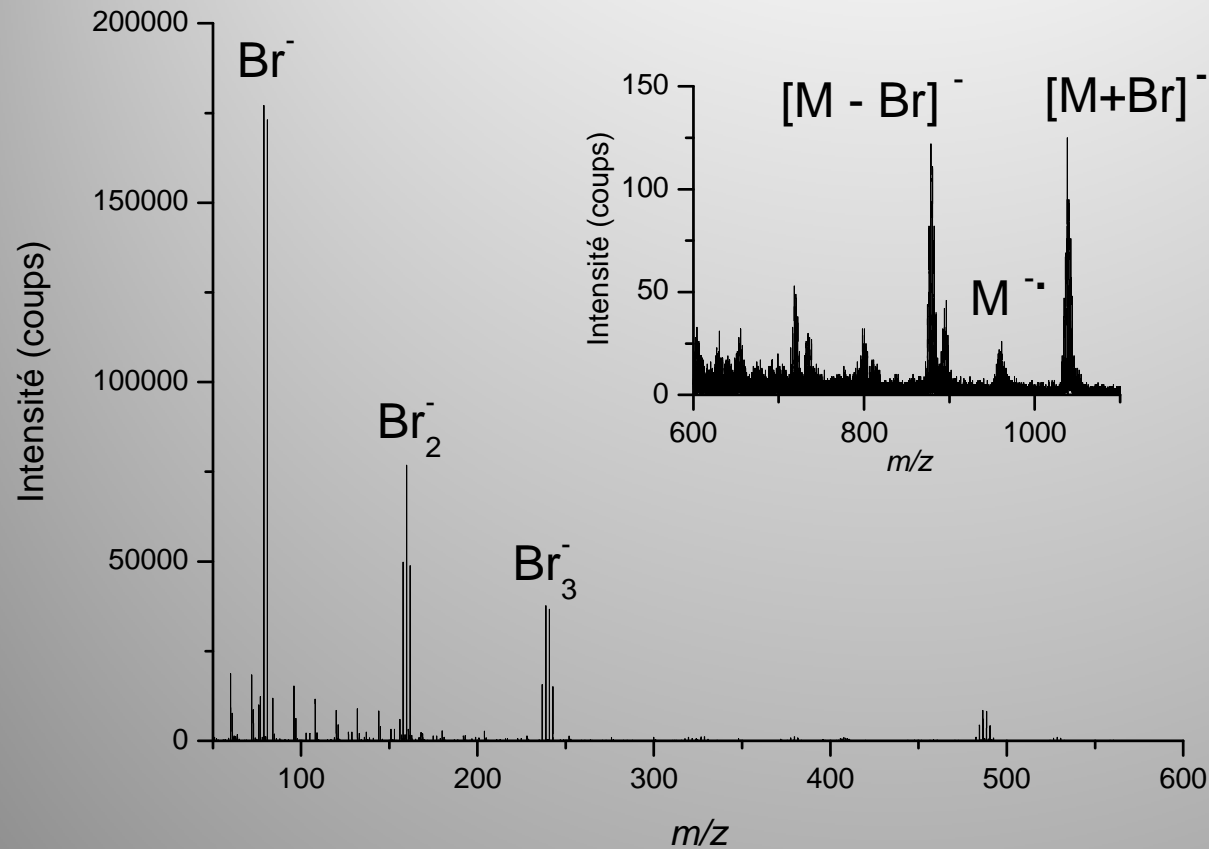
Matériel et méthodes



Gamme de masse	0 - 1000
Résolution en masse	5000 (FWHM)
Résolution spatiale	300 nm - 2 μm
Préparation d'échantillon	aucune
Type de molécules détectées	Lipides Métabolites

Résultats

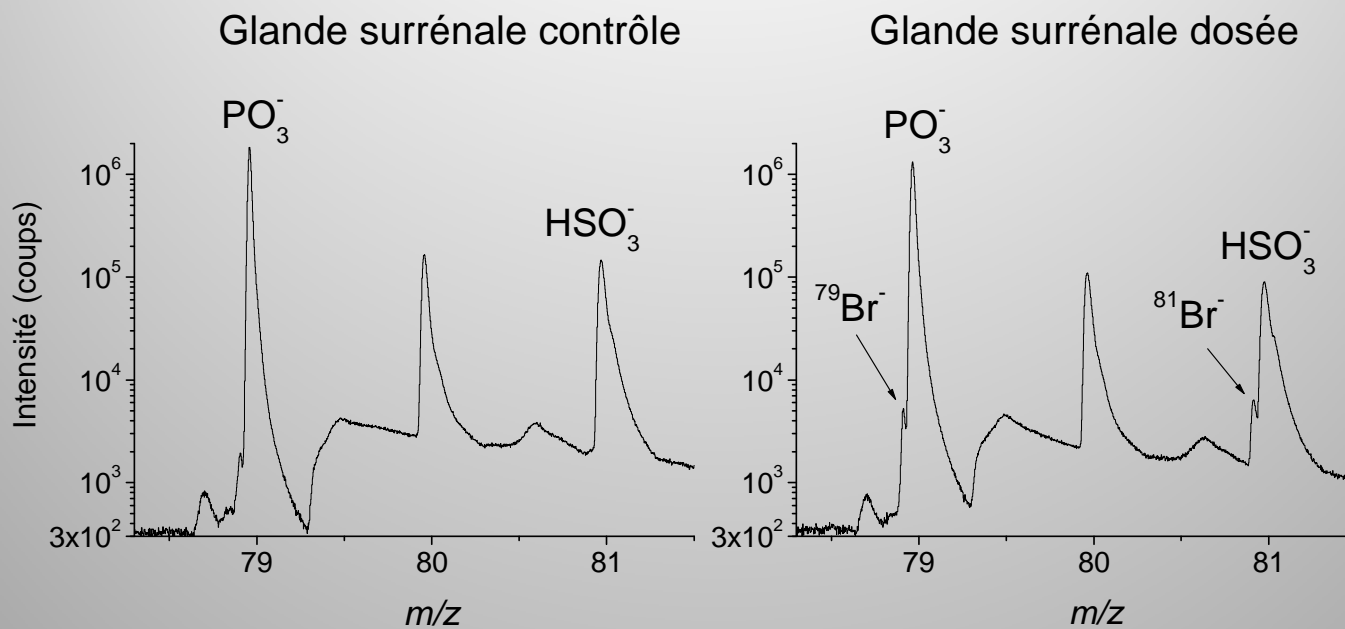
Analyse des spectres



- Le DECA intact n'est détecté que très faiblement.
- Présence de nombreux fragments, dont le plus intense : $^{79}\text{Br}^-$ et $^{81}\text{Br}^-$

Résultats

Analyse des spectres



	⁷⁹ Br ⁻ Dev (ppm)	⁸¹ Br ⁻ dev (ppm)
Glandes surrénales	10,8	5,2
Ovaires	14,3	7,4
	12,5	6,6

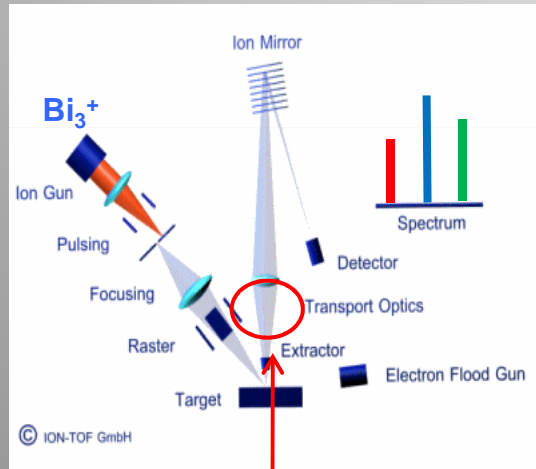
- Détection des ions à m/z 78.9 (⁷⁹Br⁻) et 80.9 (⁸¹Br⁻) dans les tissus de rates dosées.
- Le pic de l'ion PO₃⁻ étant très intense, la localisation de l'isotope ⁷⁹Br est faussée.
- L'isotope ⁸¹Br a donc été sélectionné pour tracer le DBDE.

Résultats

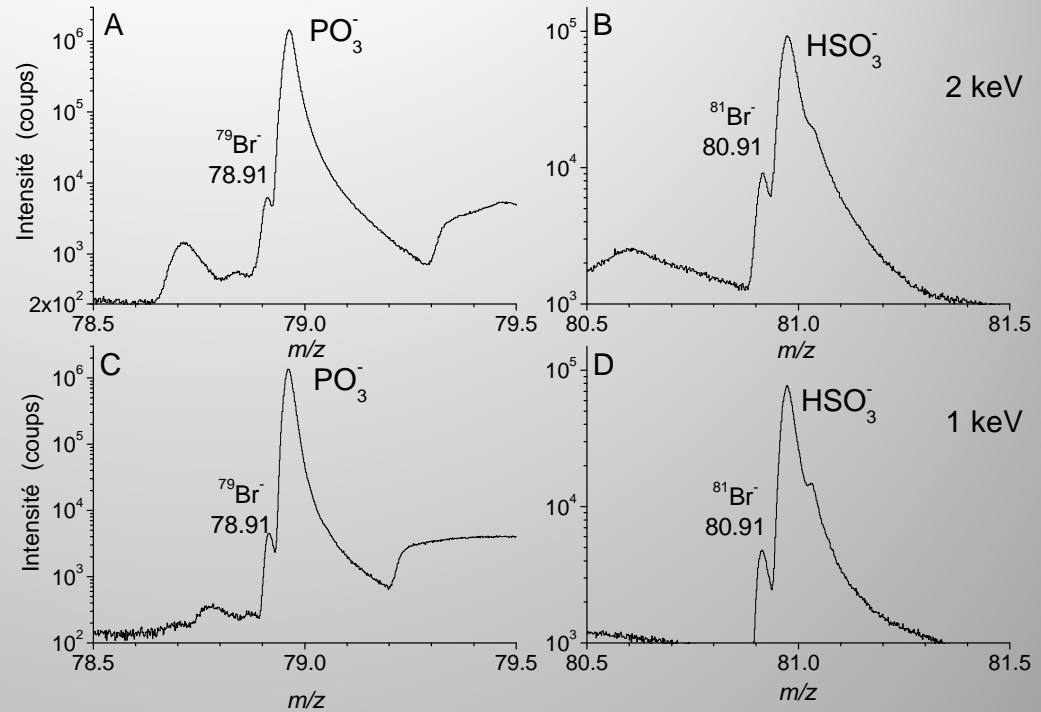
Energie cinétique des ions à 1keV

Augmentation du temps de vol, pour un rapport m/z donné, d'un facteur $\sqrt{2}$.

Augmentation de la séparation



1 keV



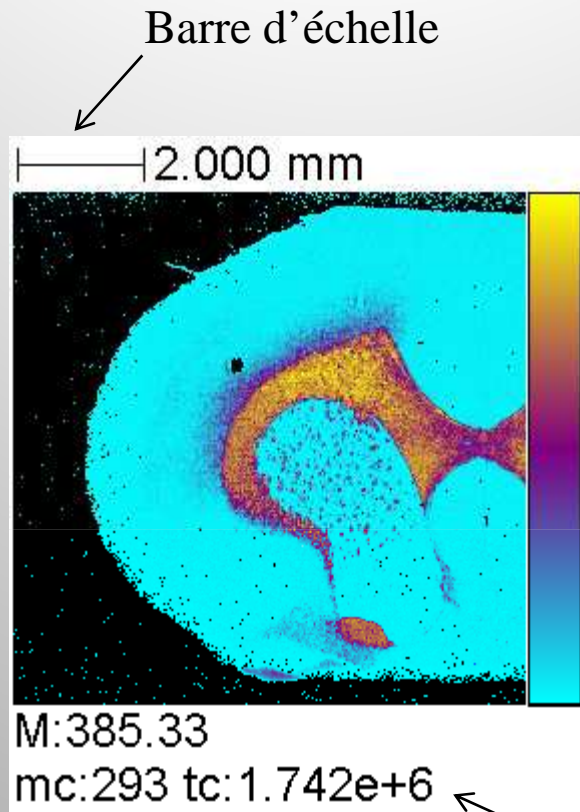
	$^{79}\text{Br}^-$	$^{81}\text{Br}^-$
	Intensité (coups)	Intensité (coups)
2 keV	13000	9800
1 keV	4800	4500

- Légère augmentation de la résolution en masse
- Baisse de l'intensité des ions $^{79}\text{Br}^-$ et $^{81}\text{Br}^-$

Résultats

Images de 256x256 pixels
= 65 536 pixels

Valeur de m/z
à laquelle
l'image
correspond



mc

Barre d'intensité

Jaune: très forte intensité

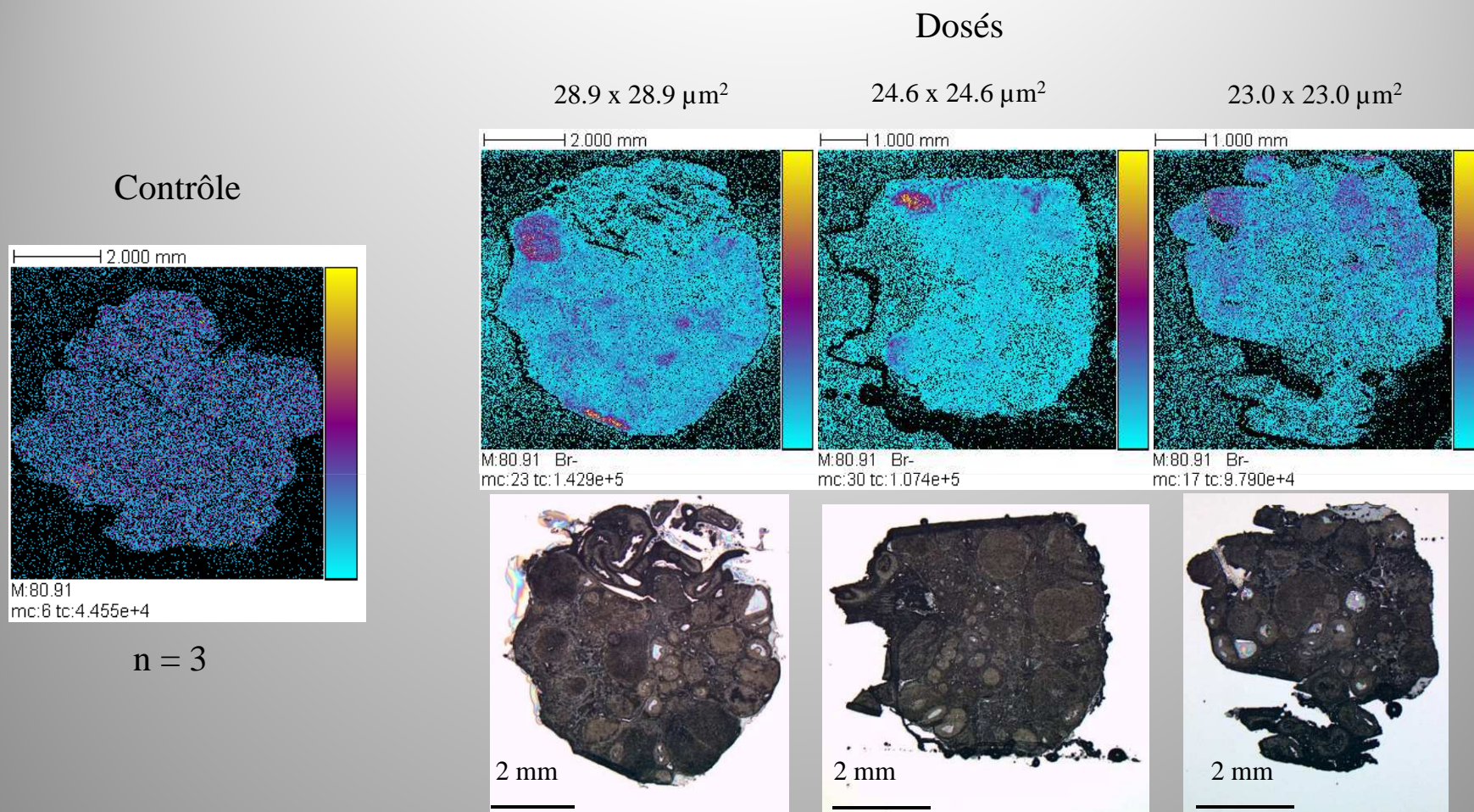
Bleu: Très faible intensité

1

mc = max counts =
Nombre de coups dans
le pixel le plus intense

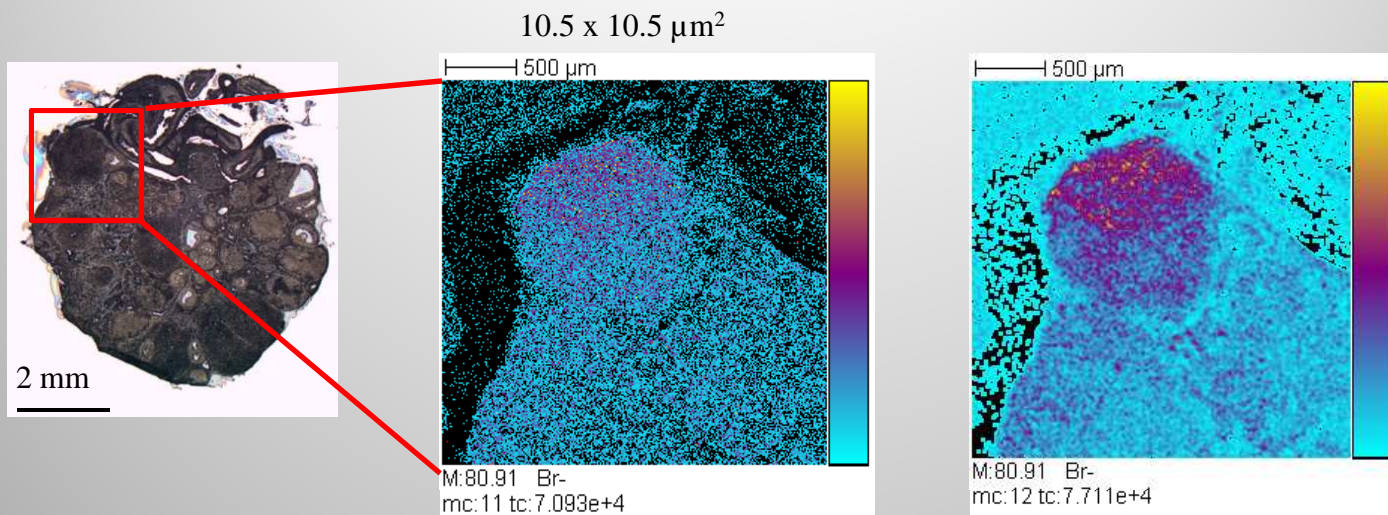
tc = total counts = Nombre
de coups total dans
l'ensemble de l'image

Résultats : Ovaires



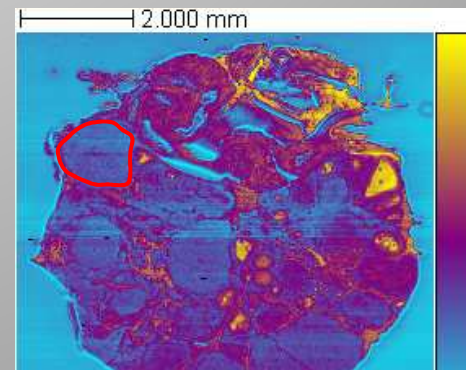
- L'ions ^{81}Br n'est pas détecté dans les ovaires de rates témoins
- Il semble s'accumuler dans une zone particulière des ovaires de rates dosées.

Résultats : Ovaires



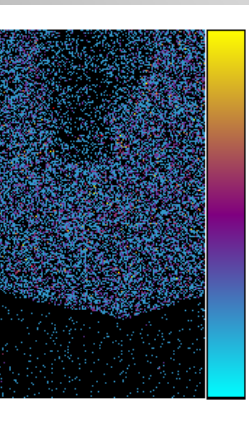
zone où s'accumule l'isotope 81 du brome semble être
ns corps progestatifs.

tte structure a pour fonction de sécréter de la
stérone sous contrôle d'une hormone hypophysaire, la
ni a pour rôle essentiel de déclencher l'ovulation.



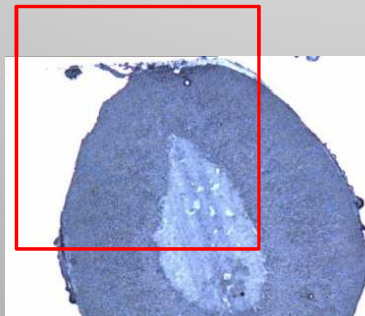
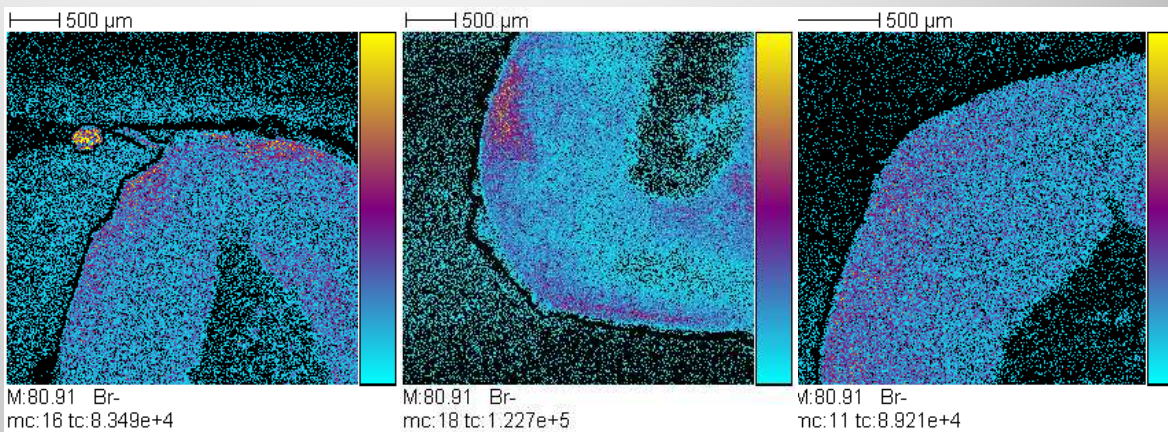
Résultats : Glandes surrénales

Contrôle



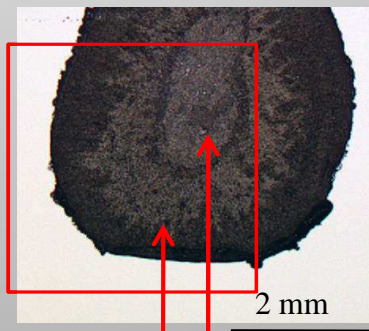
n = 3

Dosées



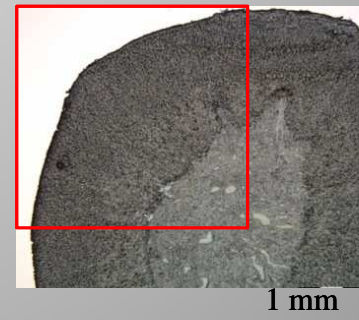
2 mm

Corticosurrénale



2 mm

Médullosurrénale



1 mm

Résolution Spatiale :
13.7 x 13.7 µm²

Résultats : Glandes surrénales

La corticosurrénale a une fonction différente de la médullosurrénale :

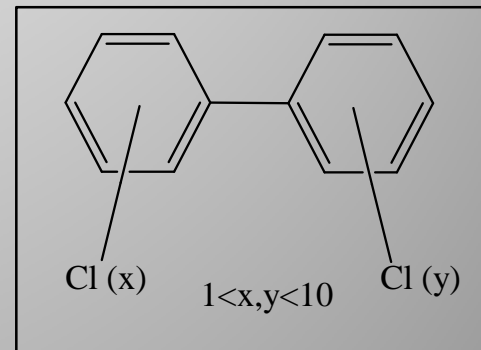
- Cortisol
- Androgènes comme la Testostérone
- Aldostérone

L'structure chimique du DBDE est proche de celle des PCB (Poly-Chloro-Diphényl), dont la toxicité est plus largement documentée.

et d'autres,

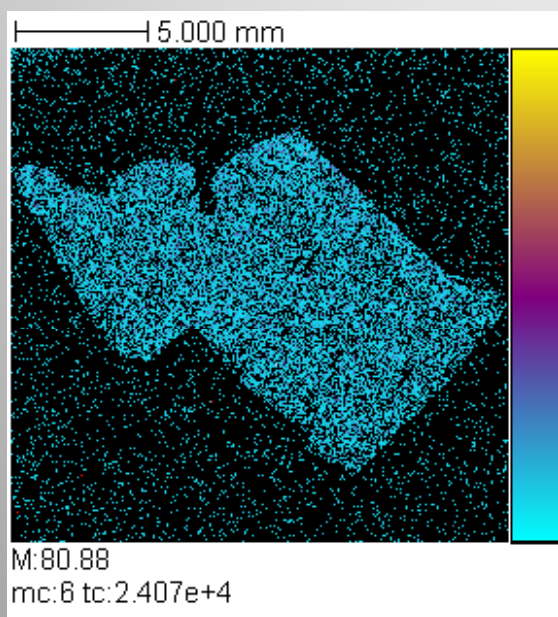
Les PCB ainsi que ses métabolites hydroxylés, ciblent les glandes surrénales des mammifères marins entraînant une immunodéficience déclenchée par une hyperplasie de la zone corticale¹.

Une immunotoxicité a été démontrée chez le rat², le système immunitaire étant régulé par les hormones corticostéroïdiennes



Résultats : Foie

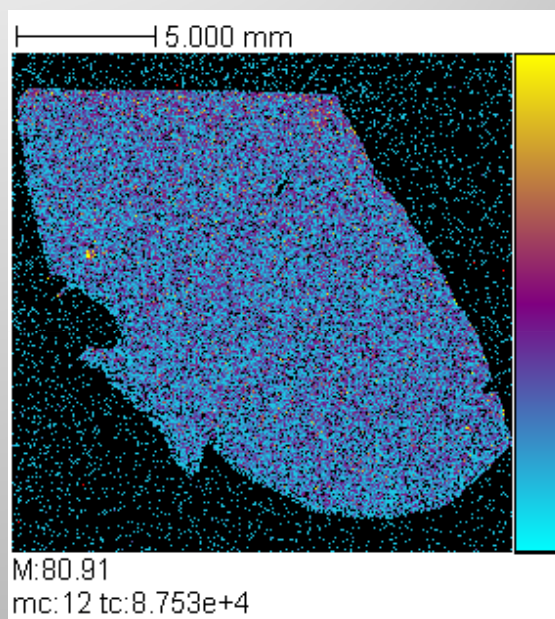
contrôle



n = 3

dosé

69.5 x 69.5 μm^2



n = 3

➤ L'isotope ^{81}Br est détecté

Conclusion et Perspectives

Imagerie ToF-SIMS a permis de tracer un composé xénobiotique présent à très faible concentration (33 ppm dans les glandes surrénales et 16 ppm dans les ovaires) dans des coupes fines.

Les résidus de DBDE ont une localisation spécifique, ce qui suggère fortement les liens possibles entre les propriétés perturbatrices du système endocrinien des BDE et la localisation préférentielle de ces résidus dans les parties spécifiques des deux glandes endocrines.

Perspectives :

Expériences de microdissection

Faire la même étude sur des analogues moins bromés (BDE-47)

Temps d'exposition plus long

Remerciements

A toute l'équipe de Spectrométrie de Masse



A l'ICSN pour ma bourse de thèse



A tous les collaborateurs :

Anne Riu, Nathalie Bourgès-
Abella, Laurent Debrauwer et
Daniel Zalko



Merci de votre attention