



Université
de Limoges



Développement d'une méthode d'analyse des hormones en vue d'un couplage à l'échantillonnage passif

Rachel MARTINS de BARROS, Sophie LISSALDE, Robin GUIBAL, Marion RABIET, Gilles GUIBAUD
rachel.martins_de_barros@unilim.fr



Établissement public du ministère
chargé du développement durable



Financé avec l'aide du FEDER
Fonds Européen de
Développement Régional

Problématique

❖Hormones

- Rôle de **communication et de régulation** au sein de l'organisme (croissance, reproduction, métabolisme...)

- Plusieurs origines des hormones

- **Hormones naturelles**

- Exemples : estradiol, estrone, progestérone, testostérone...

- **Hormones de synthèse** : contraception, traitement de la ménopause, régulation des cycles de reproduction...

- Exemples : diéthylstilbestrol, éthinylestradiol, norgestrel...

- Plusieurs sources **d'introduction dans le milieu aquatique**

- **L'Homme** : assainissement collectif et non collectif

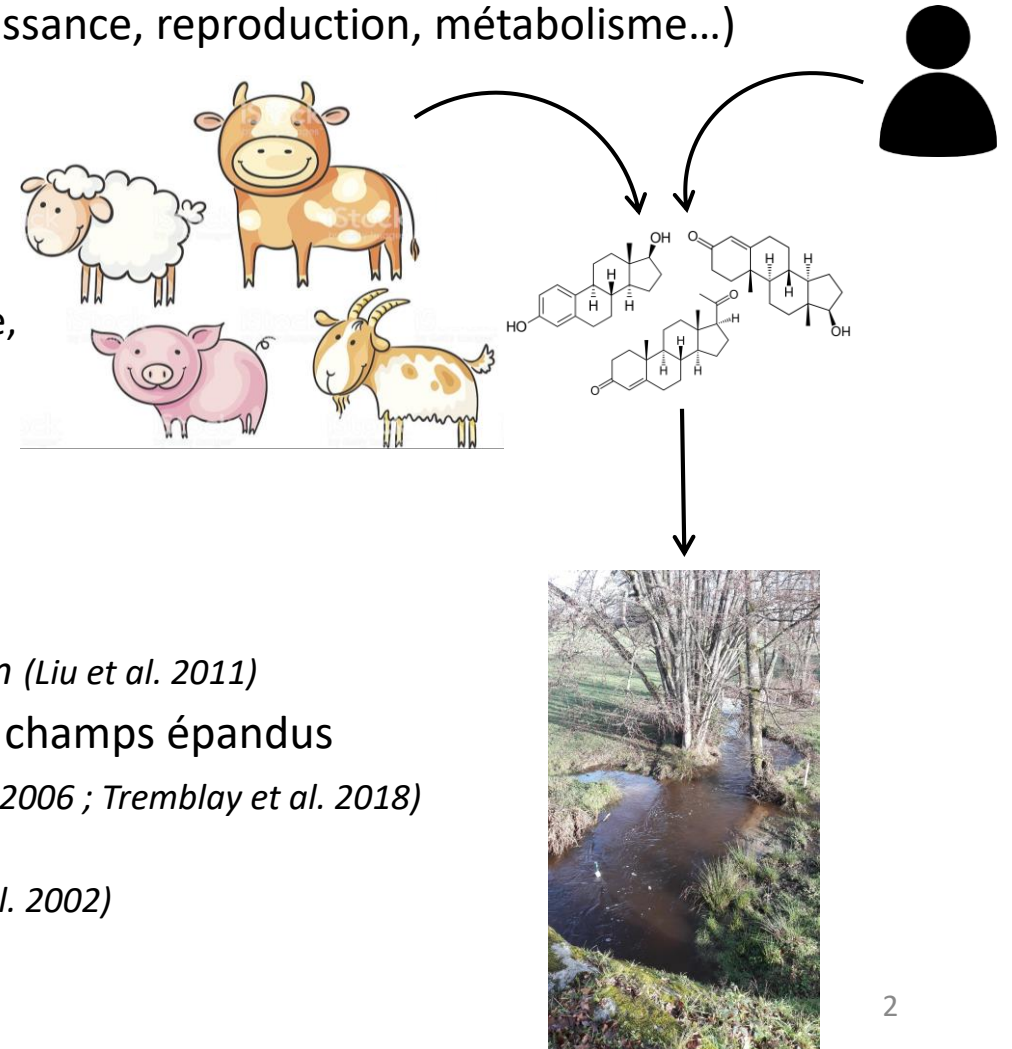
- Exemples : **13,3 ng/L** d'estrone en aval de rejet de station d'épuration (Liu et al. 2011)

- **L'élevage** : épandage de lisiers, ruissellement sur les pâtures et champs épandus

- Exemples : **0,1 à 5 ng/L** d'estrone en aval d'élevage (Matthiessen et al. 2006 ; Tremblay et al. 2018)

- **Effet reprotoxique** : apparition d'anomalies chez le poisson (Young et al. 2002)

- Exemple : féminisation des poissons



Problématique

❖ Perturbateurs endocriniens

Substances ou mélanges exogènes qui **altèrent les fonctions du système endocrinien** et qui induisent en conséquence des **effets nocifs** sur la santé d'un organisme ou de ses descendants (*OMS, 2002*)

Exemples : *phtalates, alkylphénols, HAP, dérivés phénoliques, pesticides*

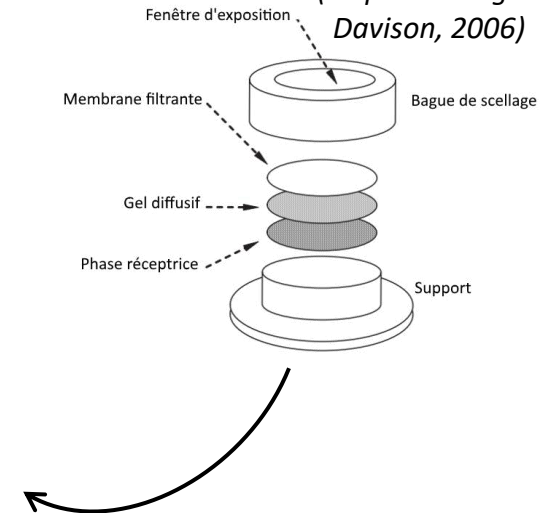
❖ Caractérisation du milieu aquatique vis-à-vis de la contamination en hormones (d'après Zhang et Davison, 2006)

➔ Développement d'une méthode d'analyse en LC-MS/MS (triple quadripôles)

- Utilisation en routine
- Analyse de plusieurs familles d'hormone en une injection

➔ Possibilité de **couplage avec échantillonnage passif** (*Guibal et al. 2015*)

- Aspect accumulatif et intégratif
(*Davison et Zhang 1994 ; Vrana et al. 2005 ; Guibal et al. 2019*)



Développement d'une méthode d'analyse

❖ Optimisation de la méthode d'analyse

Spectrométrie de masse QqQ

Agilent technology 6470 triple Quad

Recherche des transitions

précurseurs/ions fils :

- Plusieurs familles :
 - 6 œstrogènes
 - 4 progestatifs
 - 2 androgènes
 - 1 prostaglandine
- Différentes origines :
 - Naturelles
 - Synthétiques

Optimisation des paramètres :

- D'ionisation et transmission des précurseurs :
 - Température et débit de gaz
 - Tension du capillaire
 - Pression du nébuliseur
- De fragmentation des précurseurs
- De transmission des ions fils

Chromatographie liquide

Agilent technology 1290 Infinity II

Différents éluants :

- MeOH
- ACN
- Ajout d'acide
- Ajout de tampon

3 colonnes :

- C18
- Biphenyl

Plusieurs gradients,
températures de colonnes et
débits d'éluant

Développement d'une méthode d'analyse

❖ Optimisation de la méthode d'analyse

Spectrométrie de masse QqQ

Agilent technology 6470 triple Quad

Recherche des transitions

précurseurs/ions fils :

- Plusieurs familles :
 - 6 œstrogènes
 - 4 progestatifs
 - 2 androgènes
 - 1 prostaglandine
- Différentes origines :
 - Naturelles
 - Synthétiques

Optimisation des paramètres :

- D'ionisation et transmission des précurseurs :
 - Température et débit de gaz
 - Tension du capillaire
 - Pression du nébuliseur
- De fragmentation des précurseurs
- De transmission des ions fils

Chromatographie liquide

Agilent technology 1290 Infinity II

Différents éluants :

- MeOH
- **ACN**
- Ajout d'acide
- Ajout de tampon

3 colonnes :

- C18
- **Biphenyl (Macherey Nagel)**

(35 °C ; 0,25 mL/min)

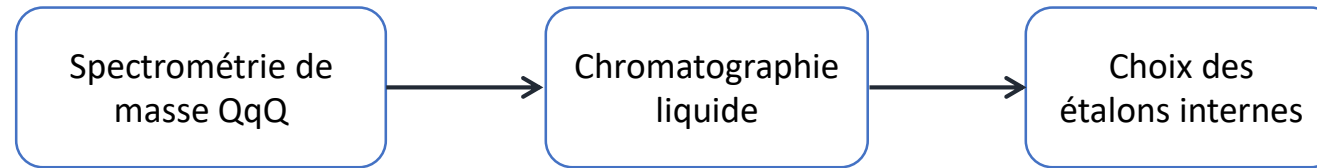
Choix des étalons internes

6 choisis selon :


- Temps de rétention
- Familles d'hormones

Développement d'une méthode d'analyse

❖ Optimisation de la méthode d'analyse

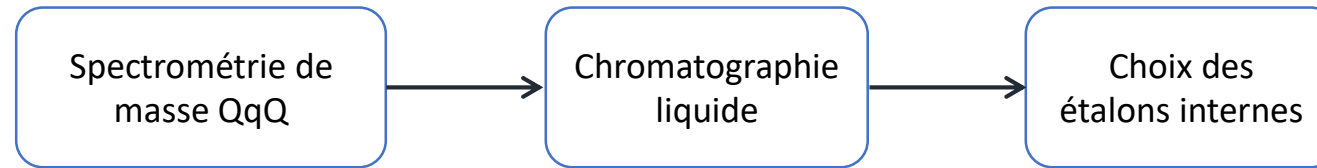


❖ Validation de la méthode selon la norme NF T90-210

Etude	Objectif	Déroulement	Traitement des résultats
Etude de la fonction d'étalonnage	Vérifier la linéarité Déterminer le domaine d'application	Solutions de 0,1 à 20 µg/L 5 	Test Fisher (risque 1%)

Développement d'une méthode d'analyse

❖ Optimisation de la méthode d'analyse

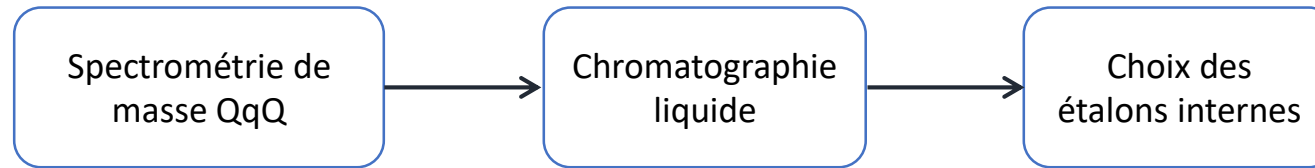


❖ Validation de la méthode selon la norme NF T90-210

Etude	Objectif	Déroulement	Traitement des résultats
Etude de la fonction d'étalonnage	Vérifier la linéarité Déterminer le domaine d'application	Solutions de 0,1 à 20 µg/L 5	Test Fisher (risque 1%)
Etude des limites de quantification (LQ)	Détermination des LQ instrumentales	Solutions de 30 à 500 ng/L 10 injections à la LQ supposées 1	$[\mu \pm 2\sigma] \in [LQ_{\text{supposée}} \pm 60\% LQ_{\text{supposée}}]$ $\rightarrow LQ_{\text{supposée}} = LQ_{\text{instrumentale}}$

Développement d'une méthode d'analyse

❖ Optimisation de la méthode d'analyse



❖ Validation de la méthode selon la norme NF T90-210

Etude	Objectif	Déroulement	Traitement des résultats
Etude de la fonction d'étalonnage	Vérifier la linéarité Déterminer le domaine d'application	Solutions de 0,1 à 20 µg/L En duplicat 5	Test Fisher (risque 1%)
Etude des limites de quantification (LQ)	Détermination des LQ instrumentales	Solutions à 1, 10 et 20 µg/L (Références) En duplicat 5	$[\mu \pm 2\sigma] \in [LQ_{\text{supposée}} \pm 60\% LQ_{\text{supposée}}]$ $\rightarrow LQ_{\text{supposée}} = LQ_{\text{instrumentale}}$
Etude de l'exactitude	Vérifier la justesse et la justesse	Solutions à 1, 10 et 20 µg/L (Références) En duplicat 5	$[\mu \pm 2\sigma] \in [\text{Réf} \pm 30\% \text{ Réf}]$ \rightarrow Exactitude correcte

Etalonnage interne

Méthode validée

Pour **10 hormones** sur les 13 ciblées :
Méthode validée selon la norme **NF T90-210**

		Etude de la fonction d'étalonnage	
		Domaine (µg/L)	r ²
Œstrogènes	17α-estradiol	0,1 - 20	0,98
	17β-estradiol	0,1 - 20	0,97
	17α-éthinyloestradiol	0,5 - 20	0,98
	estriol	0,1 - 20	0,99
	estrone	0,1 - 20	1,00
	diéthylstilbestrol	0,1 - 20	0,98
Progestatifs	progestérone	0,1 - 20	0,95
	noréthistérone	0,1 - 20	0,99
Androgène	testostérone	0,1 - 20	0,99
Prostaglandine	cloprosténol	0,1 - 20	0,97

- Fonctions linéaires avec $r^2 > 0,95$
- Domaine de 0,1 à 20 µg/L sauf pour l'éthinyloestradiol (0,5 à 20 µg/L)

Méthode validée

Pour **10 hormones** sur les 13 ciblées :
Méthode validée selon la norme **NF T90-210**

		Etude de la fonction d'étalonnage		Etude des LQ
		Domaine (µg/L)	r ²	LQ instrumentale (µg/L)
Œstrogènes	17α-estradiol	0,1 - 20	0,98	0,05
	17β-estradiol	0,1 - 20	0,97	0,10
	17α-éthinyloestradiol	0,5 - 20	0,98	0,20
	estriol	0,1 - 20	0,99	0,10
	estrone	0,1 - 20	1,00	0,05
	diéthylstilbestrol	0,1 - 20	0,98	0,05
Progestatifs	progestérone	0,1 - 20	0,95	0,03
	noréthistérone	0,1 - 20	0,99	0,10
Androgène	testostérone	0,1 - 20	0,99	0,03
Prostaglandine	cloprosténol	0,1 - 20	0,97	0,03

■ Variables de 0,03 à 0,20 µg/L

Méthode validée

Pour **10 hormones** sur les 13 ciblées :
Méthode validée selon la norme **NF T90-210**

- Correcte pour l'ensemble des niveaux (1, 10 et 20 µg/L)

		Etude de la fonction d'étalonnage		Etude des LQ	Etude de l'exactitude
		Domaine (µg/L)	r ²	LQ instrumentale (µg/L)	
Œstrogènes	17α-estradiol	0,1 - 20	0,98	0,05	Correcte
	17β-estradiol	0,1 - 20	0,97	0,10	Correcte
	17α-éthinyloestradiol	0,5 - 20	0,98	0,20	Correcte
	estriol	0,1 - 20	0,99	0,10	Correcte
	estrone	0,1 - 20	1,00	0,05	Correcte
	diéthylstilbestrol	0,1 - 20	0,98	0,05	Correcte
Progestatifs	progestérone	0,1 - 20	0,95	0,03	Correcte
	noréthistérone	0,1 - 20	0,99	0,10	Correcte
Androgène	testostérone	0,1 - 20	0,99	0,03	Correcte
Prostaglandine	cloprosténol	0,1 - 20	0,97	0,03	Correcte

Méthode non validée

Pour les **3 autres hormones** :

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

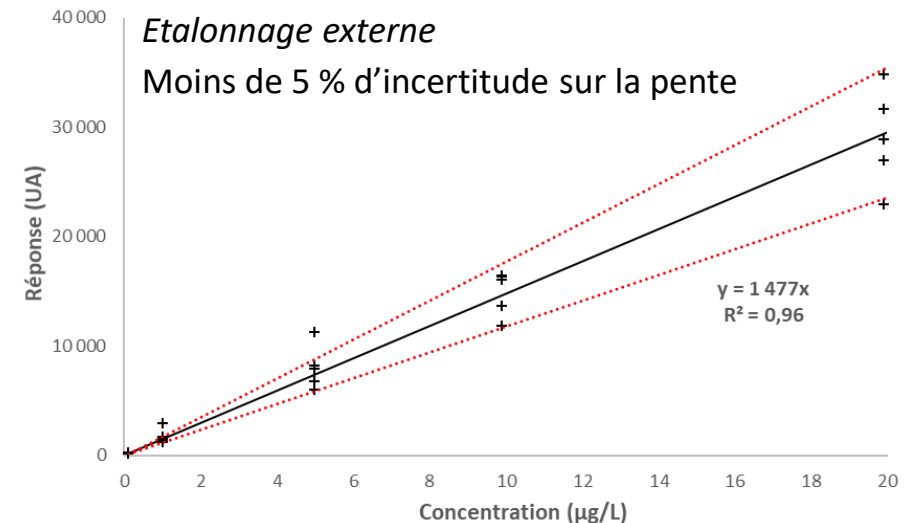
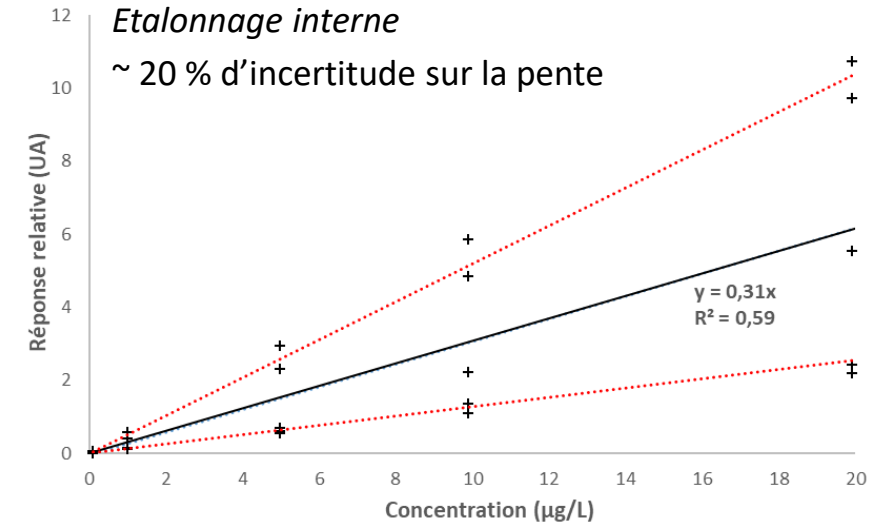
Cas du **norgestrel**, du **mégestrol acétate** et de l'**androstènedione**

❖ Mise en évidence d'un problème lors de l'étalonnage

- Cas du norgestrel (étalon interne : noréthistérone-d6)
 - Forte dispersion des points
 - Mauvaise corrélation ($r^2 = 0,59$)
 - Comparaison avec l'étalonnage externe :
Moins de dispersion et bonne corrélation ($r^2 = 0,96$)

$$\frac{\text{Réponse norgestrel}}{\text{Réponse étalon interne (NTR - d6)}} \longrightarrow \overset{=}{\underset{\uparrow \text{ ou } \downarrow}{\quad}}$$

→ Etalon interne attribué non adapté



Méthode non validée

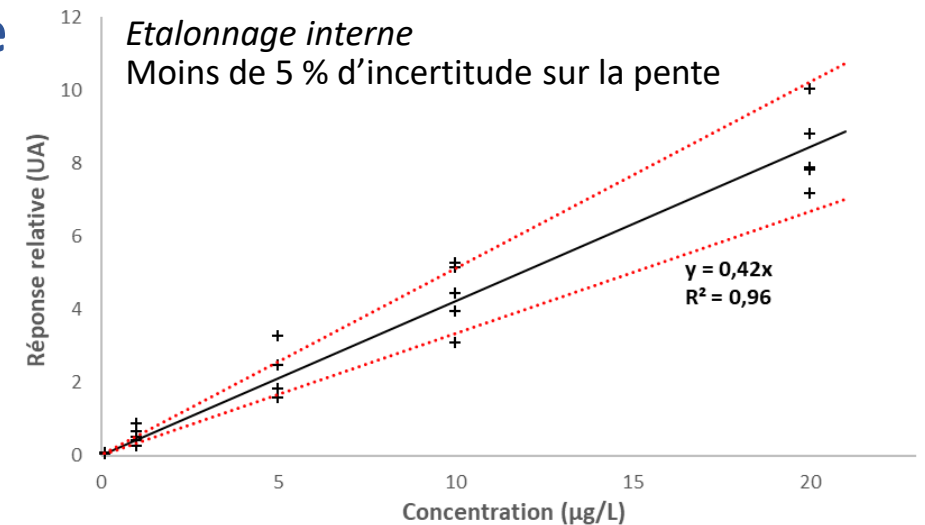
Pour les **3 autres hormones** :

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

Cas du **norgestrel**, du **mégestrol acétate** et de l'**androstènedione**

❖ Mise en évidence d'un problème lors de l'étalonnage

- Cas du norgestrel (étalon interne : noréthistérone-d6)
→ **Etalon interne attribué non adapté**
- Cas de l'androstènedione (étalon interne : testostérone-d5)
 - Dans l'ensemble : dispersion des points et régression correctes ($r^2 = 0,96$)



Méthode non validée

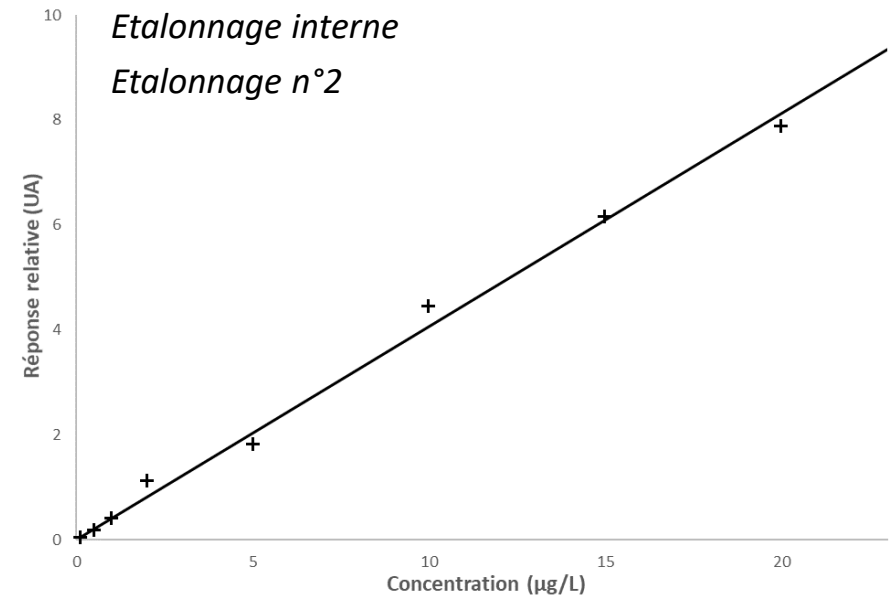
Pour les **3 autres hormones** :

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

Cas du **norgestrel**, du **mégestrol acétate** et de l'**androstènedione**

❖ Mise en évidence d'un problème lors de l'étalonnage

- Cas du norgestrel (étalon interne : noréthistérone-d6)
→ **Etalon interne attribué non adapté**
- Cas de l'androstènedione (étalon interne : testostérone-d5)
 - Dans l'ensemble : dispersion des points et régression correctes ($r^2 = 0,96$)
 - De manière isolée :
 - Certains étalonnages : régressions correctes ($r^2 = 0,99$)



Méthode non validée

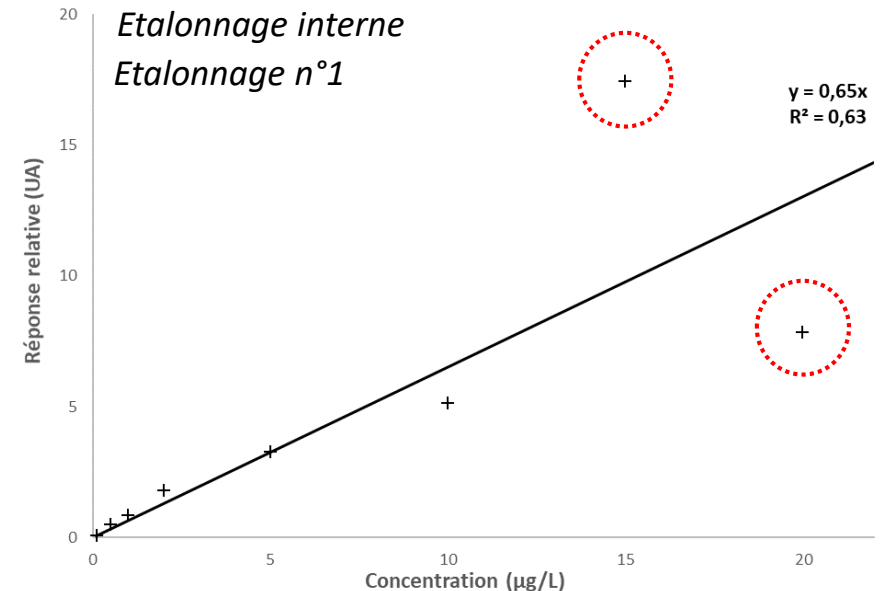
Pour les **3 autres hormones** :

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

Cas du **norgestrel**, du **mégestrol acétate** et de l'**androstènedione**

❖ Mise en évidence d'un problème lors de l'étalonnage

- Cas du norgestrel (étalon interne : noréthistérone-d6)
→ **Etalon interne attribué non adapté**
- Cas de l'androstènedione (étalon interne : testostérone-d5)
 - Dans l'ensemble : dispersion des points et régression correctes ($r^2 = 0,96$)
 - De manière isolée :
 - Certains étalonnages : régressions correctes ($r^2 = 0,99$)
 - Pour d'autres : présence de quelques valeurs douteuses et mauvaise régression ($r^2 = 0,63$)



Méthode non validée

Pour les **3 autres hormones** :

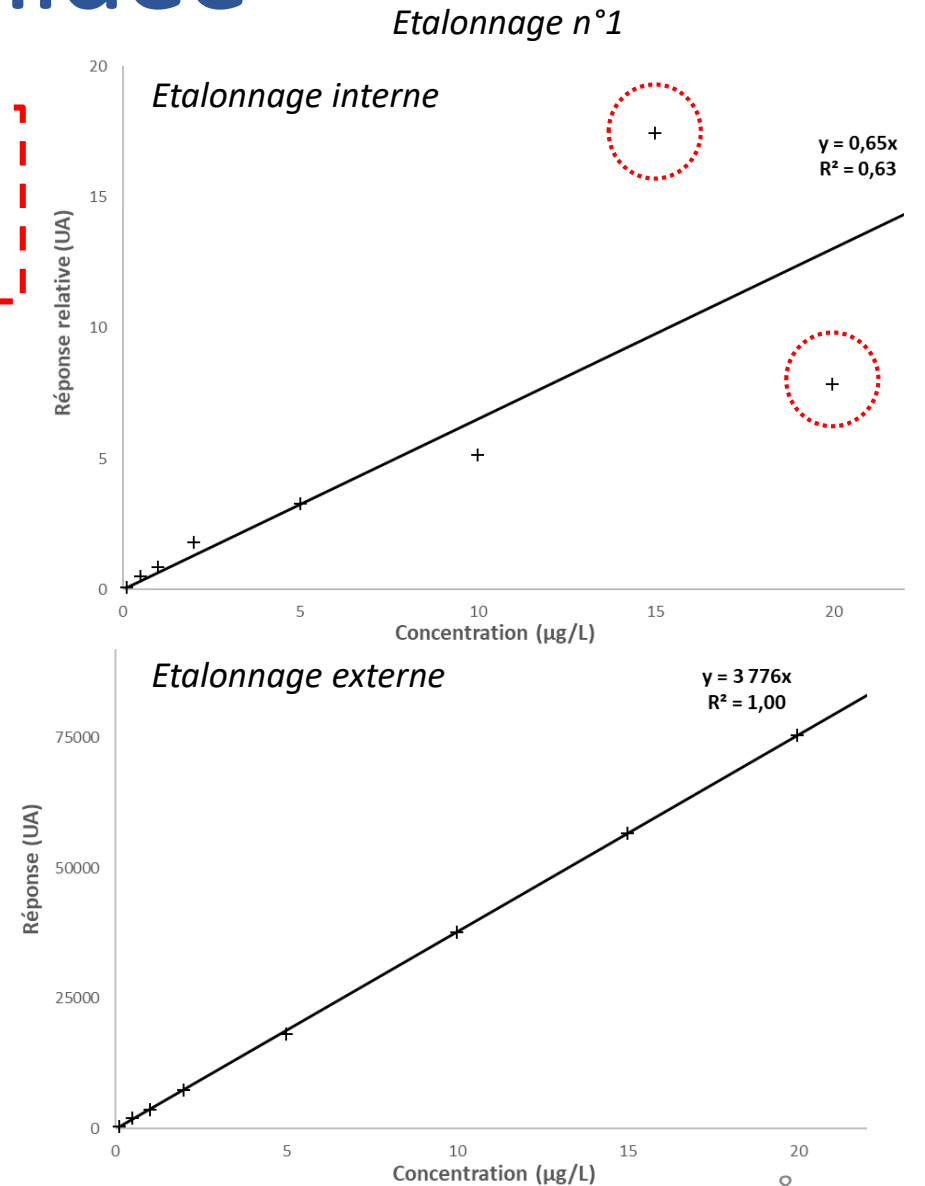
Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

Cas du **norgestrel**, du **mégestrol acétate** et de l'**androstènedione**

❖ Mise en évidence d'un problème lors de l'étalonnage

- Cas du norgestrel (étalon interne : noréthistérone-d6)
→ **Etalon interne attribué non adapté**
- Cas de l'androstènedione (étalon interne : testostérone-d5)
 - Dans l'ensemble : dispersion des points et régression correctes ($r^2 = 0,96$)
 - De manière isolée :
 - Certains étalonnages : régressions correctes ($r^2 = 0,99$)
 - Pour d'autres : présence de quelques valeurs douteuses et mauvaise régression ($r^2 = 0,63$)
 - Comparaison avec l'étalonnage externe : Bonne régression ($r^2 = 1,00$)

→ **Etalon interne attribué non adapté**



Méthode non validée

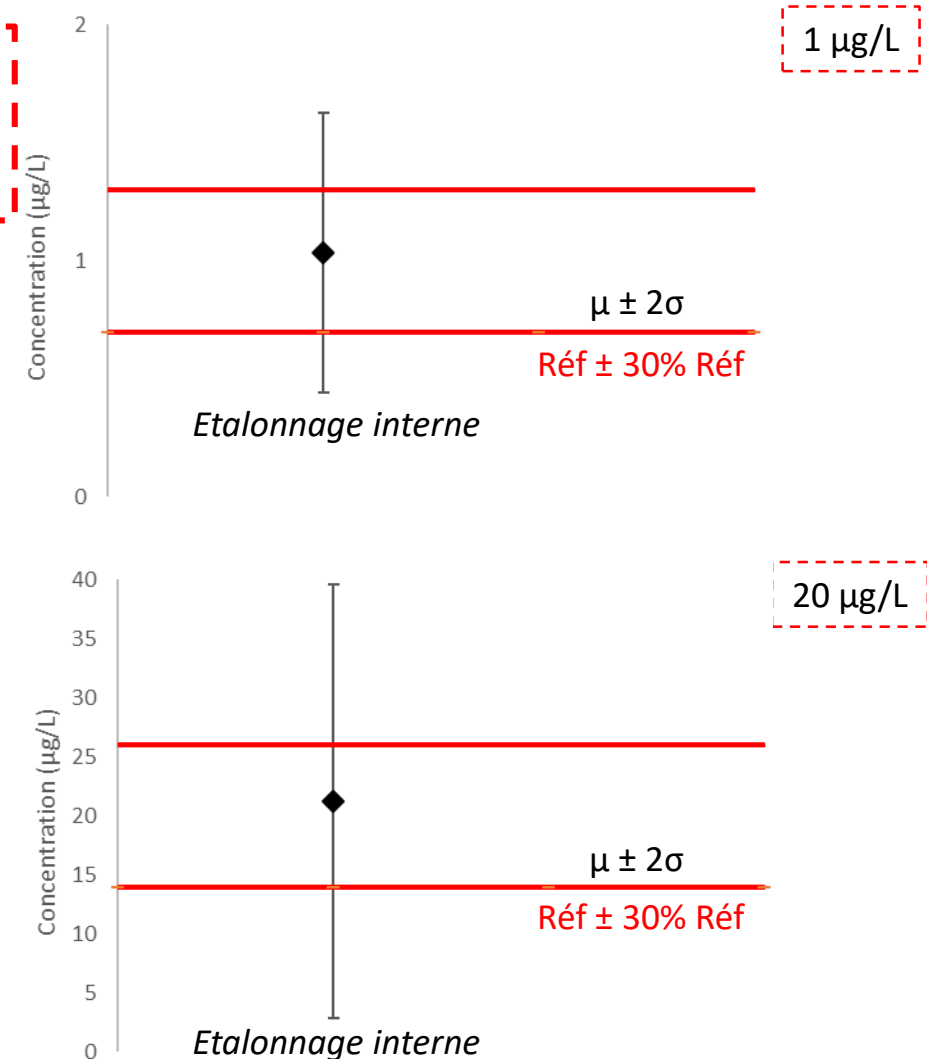
Pour les **3 autres hormones** :

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

Cas du **norgestrel**, du **mégestrol acétate** et de l'**androstènedione**

❖ Conséquence sur l'analyse

- Dégrader la qualité de la régression de la fonction d'étalonnage
- Dégrader l'exactitude de l'analyse
 - Cas de l'androstènedione (étalon interne : testostérone-d5)
 - Exactitude non suffisante pour tous les niveaux de concentration



Méthode non validée

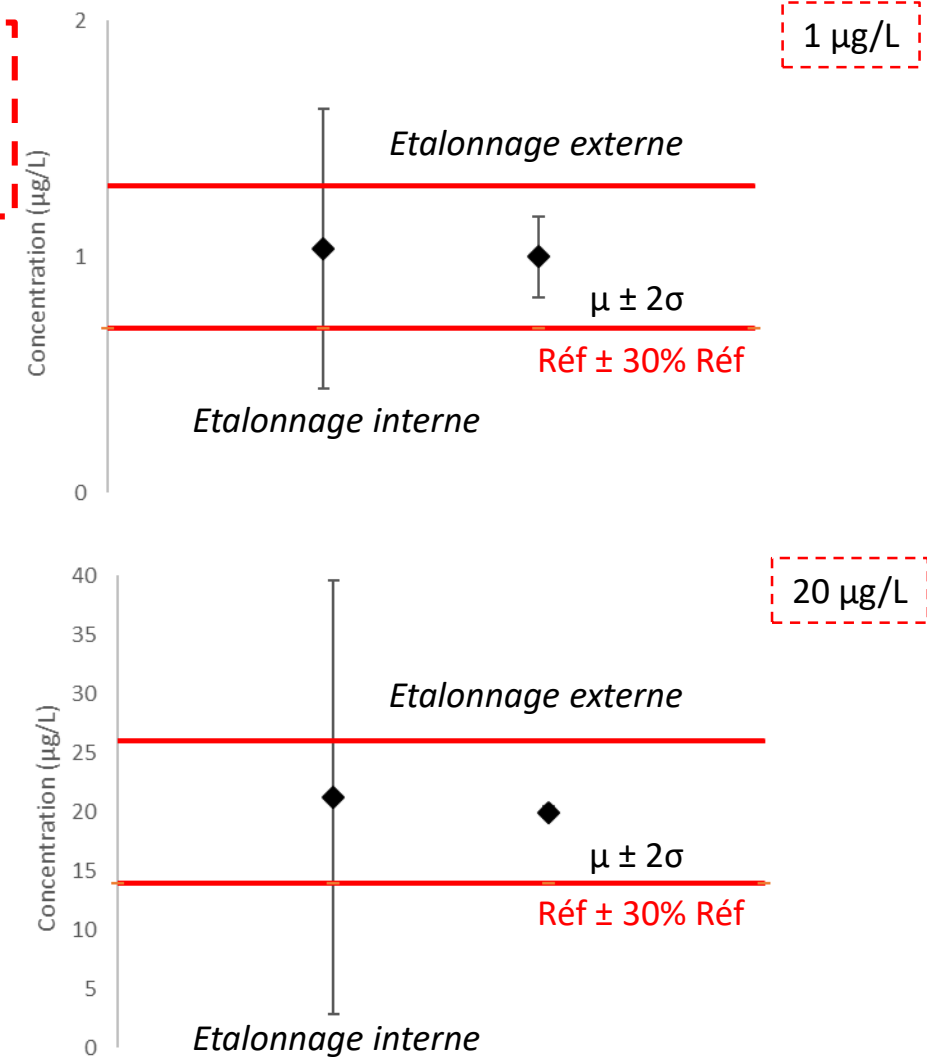
Pour les **3 autres hormones** :

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

Cas du **norgestrel**, du **mégestrol acétate** et de l'**androstènedione**

❖ Conséquence sur l'analyse

- Dégrader la qualité de la régression de la fonction d'étalonnage
- Dégrader l'exactitude de l'analyse
 - Cas de l'androstènedione (étalon interne : testostérone-d5)
 - Exactitude non suffisante pour tous les niveaux de concentration
 - Comparaison avec l'étalonnage externe : exactitude correcte



Bilan partiel

Méthode validée selon la norme **NF T90-210**

Pour 10 hormones sur les 13
ciblées dont :

- 6 œstrogènes
- 2 progestatifs
- 1 androgène
- 1 prostaglandine

→ **Vérifier la compatibilité avec un
couplage échantillonneur passif
o-DGT**

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

Pour 3 hormones :

- Norgestrel
- Mégestrol acétate
- Androstènedione

→ **Corriger les problèmes d'étalon
interne rencontrés**

→ **Vérifier la compatibilité avec un
couplage échantillonneur passif
o-DGT**



Mettre en évidence des phénomènes d'effet de matrice

→ Etude complémentaire de la spécificité de la méthode d'analyse



Matrice : extrait de o-DGT



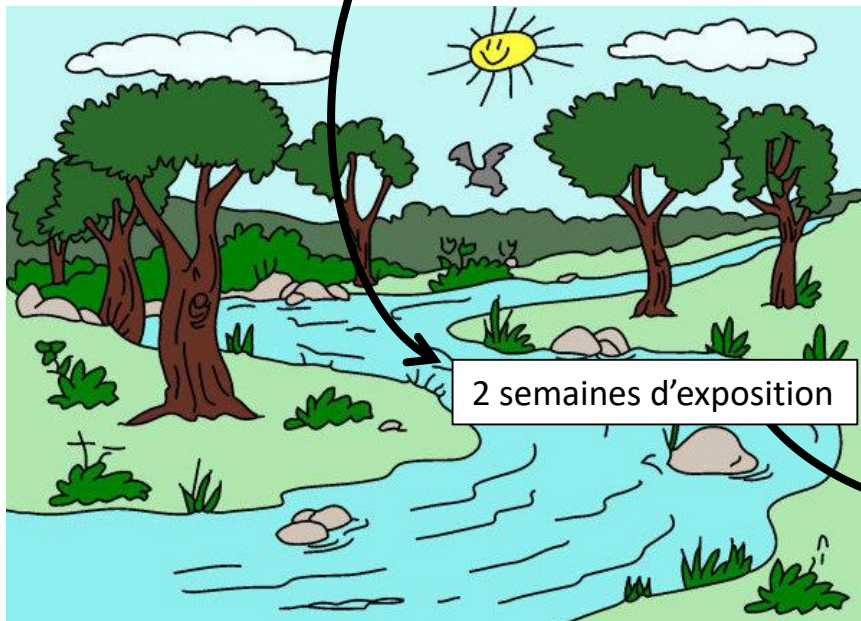
Compatibilité avec la o-DGT

❖ Mise en évidence d'un effet de matrice

- Déroulement de l'exposition



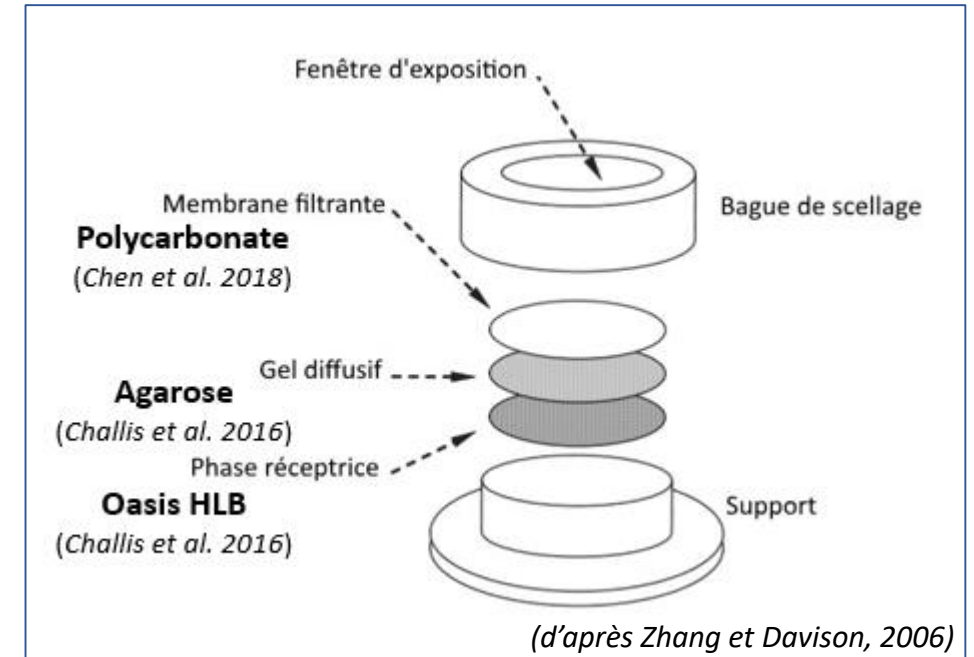
**Cours d'eau de tête de bassin
versant de Nouvelle Aquitaine**



2 semaines d'exposition

Récupération

Traitement en laboratoire



Compatibilité avec la o-DGT

❖ Mise en évidence d'un effet de matrice

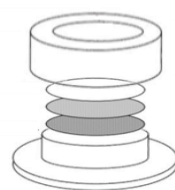
- Déroulement de l'exposition



Têtes de BV de Nouvelle Aquitaine
Exposition : 2 semaines

- Traitement en laboratoire

Etalonnage externe



Démontage

Phase réceptrice
Oasis HLB

Elution : 3 x (3 mL MeOH + 2 min US)
Evaporation, reprise dans 1 mL
(Challis et al. 2016)

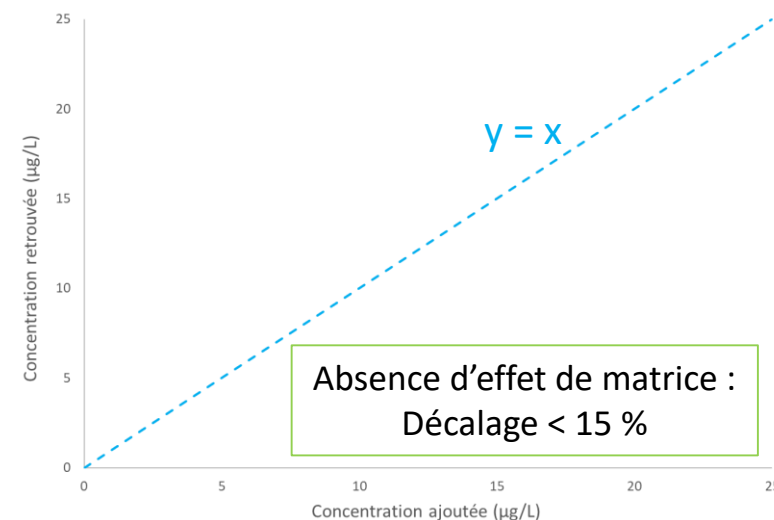


Extraits de o-DGT

Etalonnage interne

Ajouts dosés

Sans ajout



Correction

Déterminer la concentration initiale en hormones de la matrice sans dopage

Compatibilité avec la o-DGT

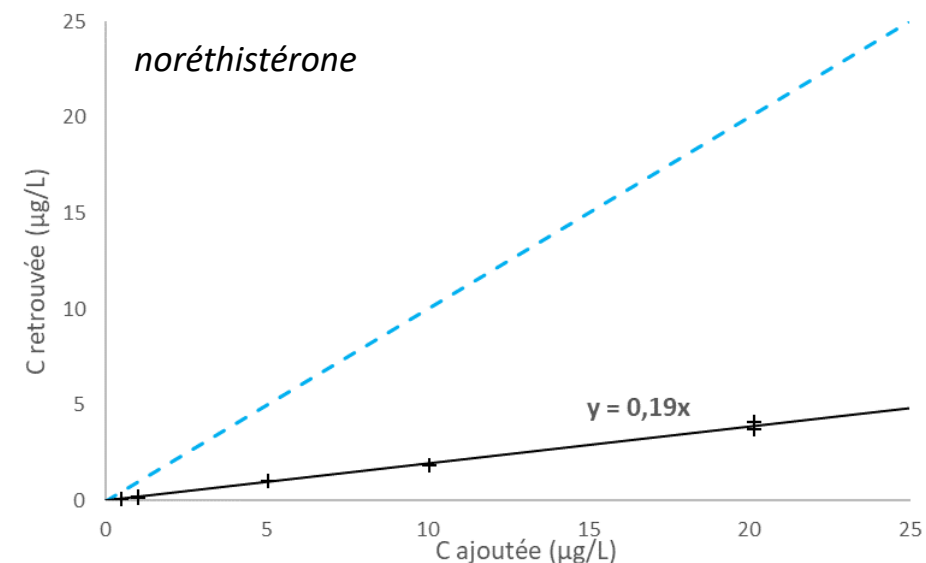
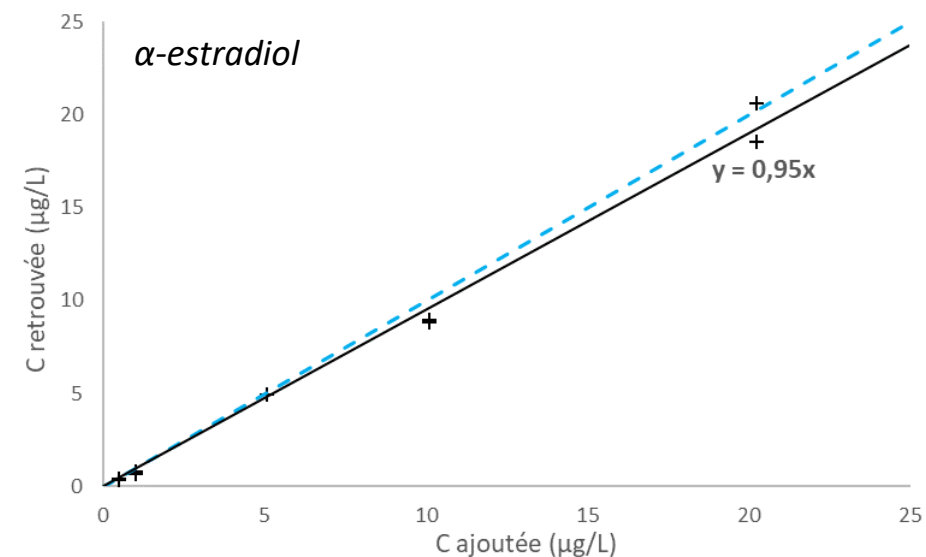
Pour **9/10 hormones** dont la méthode est validée :
Méthode compatible

❖ Absence d'effet de matrice

- Cas de 5 hormones
(*α-estradiol* ; *β-estradiol* ; *éthinyloestradiol* ; *estrone* ; *diéthylstilbestrol*)
- Droite des ajouts obtenue similaire à la droite théorique

❖ Présence d'un effet de matrice

- Cas de 4 hormones
(*estriol*, *progestérone*, *noréthistérone*, *testostérone*)
- En étalonnage externe : Décalage de pente significatif (> 15 %)
→ **Suppression de signal en présence de matrice**



Compatibilité avec la o-DGT

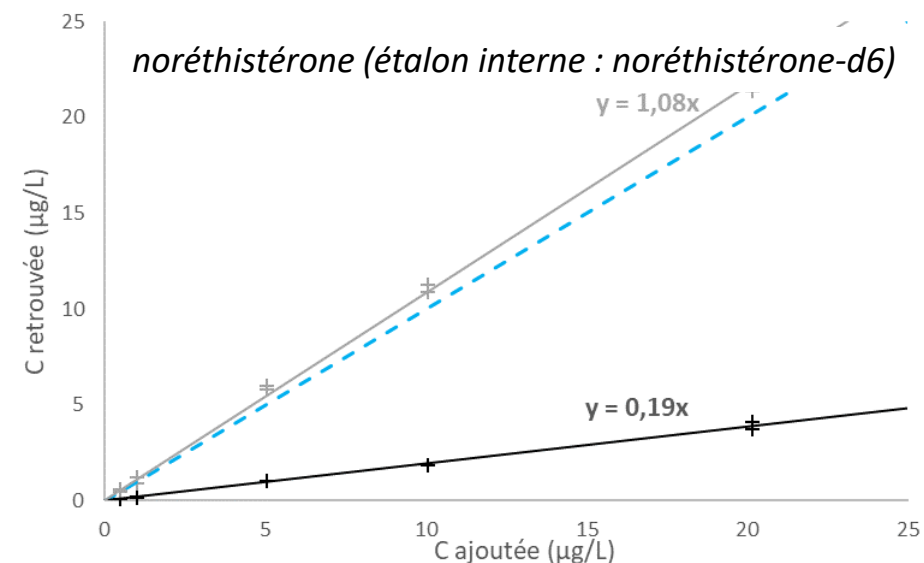
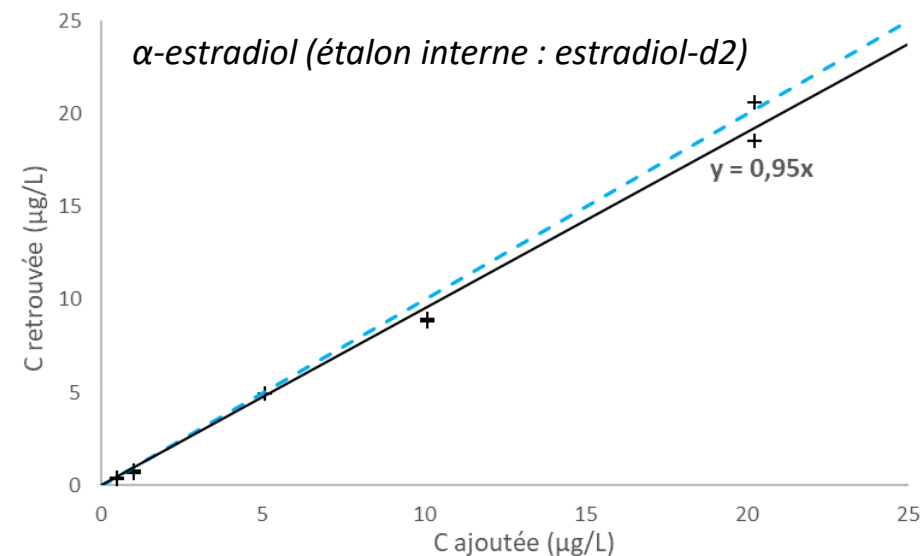
Pour **9/10 hormones** dont la méthode est validée :
Méthode compatible

❖ Absence d'effet de matrice

- Cas de 5 hormones
(α -estradiol ; β -estradiol ; éthinyloestradiol ; estrone ; diéthylstilbestrol)
- Droite des ajouts obtenue similaire à la droite théorique

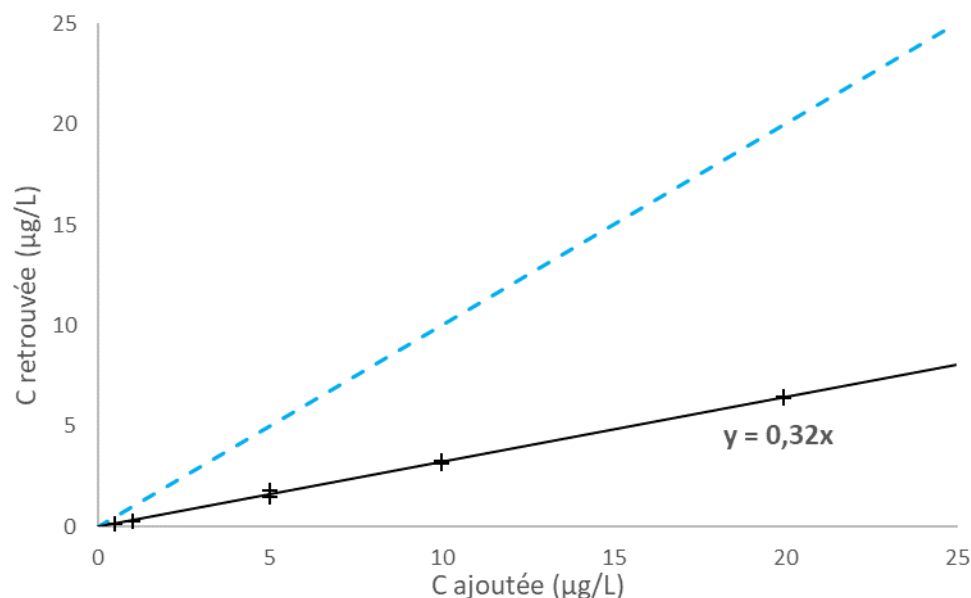
❖ Présence d'un effet de matrice

- Cas de 4 hormones
(estriol, progestérone, noréthistérone, testostérone)
- En étalonnage externe : Décalage de pente significatif ($> 15\%$)
→ **Suppression de signal en présence de matrice**
- En étalonnage interne : Décalage moins important ($< 15\%$)
→ **Effet de matrice corrigée**



Compatibilité avec la o-DGT

Pour **1 hormone** dont la méthode est validée :
Méthode non compatible



❖ Présence d'un effet de matrice

- Cas du cloprosténol (étalon interne : estrone-d4)
- En étalonnage externe : Décalage de pente significatif (> 15 %)
→ **Suppression de signal en présence de matrice**
- En étalonnage interne : Décalage moins important mais toujours > 15 %
→ **Correction par l'étalon interne non suffisante**

Remarque :

*Effet de matrice présent et non corrigé par les étalons internes pour :
le norgestrel, le mégestrol acétate et l'androstènedione
(méthode d'analyse non validée précédemment)*

Bilan final

Méthode validée selon la norme
NF T90-210

10/13 hormones

6 œstrogènes : *α-estradiol, β-estradiol, éthinyloestradiol, estriol, estrone, diéthylstilbestrol*

2 progestatifs : *progestérone, noréthistérone*

1 androgène : *testostérone*

1 prostaglandine : *cloprosténol*

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

3/13 hormones

2 progestatifs : *norgestrel, mégestrol acétate*

1 androgène : *androstènedione*

Présence d'effet de matrice

3/3 hormones

Présence d'effet de matrice
non corrigé par l'étalon interne

**Méthode compatible avec
l'échantillonnage par o-DGT**

9/10 hormones

Absence d'effet de matrice
ou
effet corrigé par l'étalon interne

**Méthode non compatible avec
l'échantillonnage par o-DGT**

1/10 hormones

Présence d'effet de matrice
non corrigé par l'étalon interne

Solutions ?

Solutions et poursuite du travail

- Tester de nouveaux étalons internes
 - idéalement ces hormones modifiées : carbone 13 ou deutérées
- Valider la méthode d'analyse selon la norme NF T90-210
 - Etude de la fonction d'étalonnage
 - Etude des limites de quantification
 - Etude de l'exactitude
- Vérifier la compatibilité avec l'échantillonnage passif par o-DGT
 - Correction des effets de matrice par les nouveaux étalons internes ?

Méthode non validée selon la norme **NF T90-210**

3/13 hormones

2 progestatifs : *norgestrel*, *mégestrol acétate*

1 androgène : *androstènedione*



Présence d'effet de matrice

3/3 hormones

Présence d'effet de matrice
non corrigé par l'étalon interne

Solutions et poursuite du travail

Méthode validée selon la norme
NF T90-210

10/13 hormones

6 œstrogènes : α -estradiol, β -estradiol,
éthinyloestradiol, estriol, estrone,
diéthylstilbestrol

2 progestatifs : progestérone,
noréthistérone

1 androgène : testostérone

1 prostaglandine : cloprosténol

■ Pour le cloprosténol :

- Pas d'étalon interne de la même famille disponible dans le commerce
- Envisager une autre méthode de correction des effets de matrice
 - Dilution de la matrice
 - Quantification par ajouts dosés

**Méthode non compatible avec
l'échantillonnage par o-DGT**

1/10 hormones

Présence d'effet de matrice
non corrigé par l'étalon interne

Solutions et poursuite du travail

Méthode validée selon la norme
NF T90-210

10/13 hormones

6 œstrogènes : α -estradiol, β -estradiol,
éthinyloestradiol, estriol, estrone,
diéthylstilbestrol

2 progestatifs : progestérone,
noréthistérone

1 androgène : testostérone

1 prostaglandine : cloprosténol

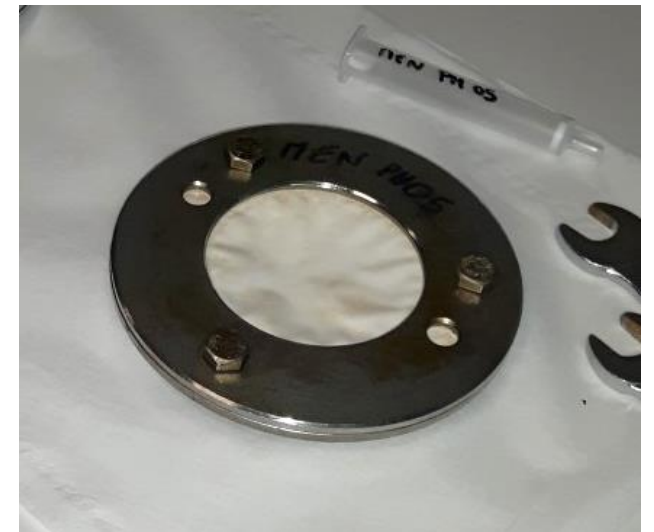
Méthode non validée selon la norme **NF**
T90-210

3/13 hormones

2 progestatifs : norgestrel, mégestrol acétate

1 androgène : androstènedione

Pour l'ensemble des hormones :
Vérifier la compatibilité avec d'autres échantillonneurs
passifs (exemple : POCIS)



Merci de votre attention