

Université de Montréal

Évaluation des niveaux d'éthanolémie résultant de l'exposition à l'éthanol par inhalation : Études chez des volontaires et modélisation toxicocinétique

par

Josée Dumas-Campagna

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en Santé environnementale et santé au travail

Juillet 2013

©Josée Dumas-Campagna, 2013

Université de Montréal

Faculté médecine

Ce mémoire intitulé :

Évaluation des niveaux d'éthanolémie résultant de l'exposition à l'éthanol par inhalation : Études chez des volontaires et modélisation toxicocinétique

présenté par :

Josée Dumas-Campagna

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Ginette Truchon, président-rapporteur

Docteur Sami Haddad, directeur de recherche

Docteur Catherine Jumarie, membre du jury

RÉSUMÉ

Un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) d'exposition par inhalation à l'éthanol a antérieurement été développé en se basant sur des données provenant d'une étude chez des volontaires exposés par inhalation à plus de 5000 ppm. Cependant, une incertitude persiste sur la capacité du modèle PBPK à prédire les niveaux d'éthanolémie pour des expositions à de faibles concentrations. Ces niveaux sont fréquemment rencontrés par une large partie de la population et des travailleurs suite à l'utilisation de produits tels que les vernis et les solutions hydroalcooliques (SHA). Il est ainsi nécessaire de vérifier la validité du modèle existant et de déterminer l'exposition interne à l'éthanol dans de telles conditions. Les objectifs du mémoire sont donc 1) de documenter les niveaux d'éthanolémie résultant de l'exposition par inhalation à de faibles concentrations d'éthanol (i.e., ≤ 1000 ppm) et de valider/raffiner le modèle PBPK existant pour ces concentrations ; et 2) de déterminer les concentrations d'éthanol atmosphérique provenant d'utilisation de SHA et de vernis et de prédire les niveaux d'éthanolémie découlant de leur utilisation. Les données toxicocinétiques récoltées chez des volontaires nous suggèrent qu'il est insuffisant de limiter au foie la clairance métabolique de l'éthanol lors d'exposition à de faibles niveaux d'éthanol, contrairement aux expositions à de plus forts niveaux. De plus, il a clairement été démontré qu'un effort physique léger (50 W) influençait à la hausse (2-3 fois) l'éthanolémie des volontaires exposés à 750 ppm. L'ajout au modèle PBPK d'une clairance métabolique de haute affinité et de faible capacité associée aux tissus richement perfusés a permis de simuler plus adéquatement la cinétique de l'éthanolémie pour des expositions à des concentrations inférieures à 1000 ppm. Des mesures de concentrations d'éthanol dans l'air inhalé générées lors d'utilisation de SHA et de vernis ont permis de simuler des expositions lors de l'utilisation de ces produits. Pour l'utilisation de 1,5 g et 3 g de SHA dans un local peu ventilé, des concentrations sanguines maximales (C_{max}) de 0.383 et 0.366 mg.L^{-1} ont été respectivement simulées. Dans un local bien ventilé, les C_{max} simulées étaient de 0.264 et 0.414 mg.L^{-1} . Selon les simulations, une application de vernis résulterait en une C_{max} respectivement de 0.719 mg.L^{-1} et de 0.729 mg.L^{-1} , chez les hommes et femmes. Les C_{max} sanguines d'éthanol estimées suites aux différentes simulations sont inférieures à la concentration toxique pour les humains (100 mg.L^{-1}). Ainsi, de telles expositions ne semblent

pas être un danger pour la santé. Les résultats de cette étude ont permis de mieux décrire et comprendre les processus d'élimination de l'éthanol à faibles doses et permettront de raffiner l'évaluation du risque associé à l'inhalation chronique de faibles niveaux d'éthanol pour la population, particulièrement chez les travailleurs.

Mot clés : Niveau d'éthanolémie, inhalation, modélisation PBPK, exposition humaine, travailleur, population générale, solution hydro-alcoolique, vernis à base d'éthanol.

ABSTRACT

A physiologically based pharmacokinetic model (PBPK) on inhalation exposure to ethanol has previously been developed based on data from an inhalation study in volunteers exposed to more than 5000 ppm. However, there remains uncertainty about the ability of the PBPK model to predict the blood levels of ethanol (BLE) for exposure to low concentrations. These levels are frequently encountered by a large part of the population and workers by using products such as varnishes and alcoholic solutions (HAS). It is therefore necessary to verify the validity of the existing model and determine the internal exposure to ethanol in such conditions. The objectives of this master's thesis are 1) to document the BLE resulting from inhalation exposure to low concentrations of ethanol (i.e., ≤ 1000 ppm) and validate/refine the existing PBPK model for these concentrations, and 2) to determine the atmospheric concentrations of ethanol following the use of alcoholic solutions (HAS) and varnish as well as to predict the BLE resulting from their use. Toxicokinetic data collected from volunteers suggest that it is insufficient to limit metabolic clearance of ethanol to the liver during exposures to low levels of ethanol, unlike exposures to stronger levels. In addition, it was clearly demonstrated that light exercise (50W) increased (2-3 fold) the BLE in volunteers exposed to 750 ppm. An addition to the PBPK model of a metabolic clearance of high affinity and low capacity associated with richly perfused tissue was performed to simulate more accurately the toxicokinetic data from low and high ethanol exposure levels. Measurements of ethanol concentrations in inhaled air generated during the use of HAS and varnishes were used to simulate the exposure during the use of these products. The simulation for HAS, for 1.5 g and 3 g, gave a maximum blood concentration (C_{max}) of 0.383 and 0.366 mg.L^{-1} respectively in a poorly ventilated room. In a well-ventilated room, the simulated C_{max} for 1.5 g and 3 g of HAS were 0.264 and 0.414 mg.L^{-1} , respectively. The simulation results from the use of ethanol-based varnish yielded a C_{max} for men and women of 0.719 and 0.729 mg.L^{-1} respectively. The blood C_{max} of ethanol previously listed for the various simulations are well below the toxic dose for humans (50 mg.L^{-1}). Thus, such exposures do not seem to be a health hazard. The results of this study helped to better describe and understand the elimination of ethanol at low doses and refine the evaluation process associated with chronic inhalation of low levels of ethanol to the population risk, particularly in workers.

Key words: Blood levels of ethanol, inhalation, PBPK modeling, human exposure, occupational and general population, hydro-alcoholic solution, ethanol-based varnish.

Tables des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Tables des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Abréviations.....	xvi
Remerciement.....	xx
Chapitre 1. Introduction générale.....	1
1.1. L'éthanol : origine, structure et utilisation.....	2
1.2. L'exposition à l'éthanol et les valeurs limites associées.....	4
1.3. La toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme, excrétion).....	6
1.4. Les effets toxiques et les mécanismes de toxicité	12
1.5. La modélisation toxicocinétique à base physiologique (PBPK)	19
1.6. Problématique et objectifs.....	25
1.6.1. Objectif principal.....	25
1.6.2. Objectif spécifiques.....	26
Chapitre 2. Évaluation des niveaux d'éthanolémie résultant de l'exposition à l'éthanol par inhalation : Études chez des volontaires et modélisation toxicocinétique.....	27
2.1. Contribution à l'article.....	28
2.2. Ethanol toxicokinetics resulting from inhalation exposure in human volunteers and toxicokinetic modeling.....	29

2.2.1. Summary.....	30
2.2.2. Introduction.....	31
2.2.3. Materials and methods.....	33
2.2.3.1. Subjects-volunteers.....	33
2.2.3.2. Chemicals.....	34
2.2.3.3. Exposure chamber.....	34
2.2.3.4. Blood and exhaled air samples.....	35
2.2.3.5. Measurement of ethanol in the blood.....	36
2.2.3.6. Calculation of the rate of the total extraction of ethanol.....	37
2.2.3.7. Statistical analysis.....	38
2.2.3.8. Validation of the physiologically based pharmacokinetic model (PBPK).....	38
2.2.4. Results.....	40
2.2.4.1. Blood level of ethanol (BLE).....	40
2.2.4.2. Ethanol in the alveolar air.....	40
2.2.4.3. Impact of physical activity (aerobic)	41
2.2.4.4. Modeling.....	41
2.2.5. Discussion.....	43
2.2.6. Conclusion.....	50
2.2.7. Acknowledgements	51
2.2.8. Declaration of interest.....	51
2.2.9. Bibliography.....	52
2.2.10. Tables et Figures.....	54

Chapitre 3. Prédications des niveaux d'éthanolémie résultant de l'utilisation professionnelle de solutions hydro-alcooliques et de vernis à base d'éthanol.....	67
3.1. Contribution à l'article.....	68
3.2. Predictions of ethanol blood levels resulting from occupational use of hydro-alcoholic solutions and ethanol-based varnishes.....	69
3.2.1. Summary.....	71
3.2.2. Introduction.....	72
3.2.3. Material and methods.....	73
3.2.3.1. Hydro-alcoholic solutions (HAS)	73
3.2.3.2. Ethanol-based varnish.....	74
3.2.3.3. Statistical analysis.....	74
3.2.3.4. Modeling and simulations of exposure to hydro-alcoholic solution and varnish containing ethanol.....	75
3.2.4. Results.....	76
3.2.4.1. Hydro-alcoholic solutions	76
3.2.4.2. Ethanol-based varnish	78
3.2.4.3. Modeling of exposure to hydro-alcoholic solutions and ethanol-based varnish.....	78
3.2.5. Discussion.....	80
3.2.6. Conclusion.....	88
3.2.7. Acknowledgements	89
3.2.8. Declaration of interest.....	89
3.2.9. Bibliography.....	90
3.2.10. Tables et Figures.....	92
3.2.11. Appendix.....	107

Chapitre 4. Discussion générale.....	113
Chapitre 5. Conclusion générale.....	120
Bibliographie.....	123
Annexe.....	126

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques de l'éthanol	3
Tableau II : Classification des alcools déshydrogénases (tiré de INSERM 2001)	11
Tableau III : Les différents symptômes observés en fonction de la concentration et du temps d'exposition	17
Tableau IV : Définition des symboles du modèle PBPK de l'éthanol schématisé dans la figure 2.....	22
Tableau V : Paramètres du modèle PBPK de l'éthanol.....	23

CHAPITRE 2

Table 1: PBPK model parameters for ethanol.....	55
Table 2: The average blood levels of ethanol values obtained in men for different exposure scenarios.....	56
Table 3: The average blood levels of ethanol values obtained in women for different exposure scenarios.....	57
Table 4: Values of the total extraction ratio of ethanol obtained from men and women during a 4 h exposure to different exposure concentrations.....	58
Table 5: Comparison between the blood levels of ethanol measured in volunteers and predicted blood ethanol by the PBPK model for different scenarios after four hours of exposure to 1000 ppm	59

CHAPITRE 3

Table I: Average concentrations at each 30 sec during a three minutes exposure to ethanol vapours from the utilisation of HAS in different scenario and which are used to make the simulation with the PPBK model.....	93
Table II: Average concentrations at each five minutes during a one hour exposure to ethanol vapours from the utilisation of ethanol-based varnish in different scenario and which are used to make the simulation with the PPBK model.....	94
Table III: Maximum blood concentration of ethanol (mg.L^{-1}) obtained after the simulation of the PBPK model for exposure to HAS based on various scenarios.....	95
Table IV: Area under the curve obtained after the simulation of the PBPK model for exposure to HAS based on various scenarios.....	96

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1 : Métabolisme hépatique de l'éthanol.....	9
Figure 2 : Structure compartimentale du modèle PBPK pour l'éthanol (symboles décrits au tableau IV).....	21

CHAPITRE 2

Figure 1: Conceptual representation of the human PBPK model for ethanol based on the original model from Schlouch et Tardif (1999).	60
Figure 2: Blood kinetics of ethanol in blood in women and men (mean \pm standard deviation) volunteers during 4-hr exposure to different concentrations of ethanol vapor	61
Figure 3: Exhaled air concentrations of ethanol measured in women at different time points during a 4 h exposure to concentrations of ethanol vapor of 125 ppm , 250 ppm , 450 ppm, 750 ppm , and 1000 ppm	62
Figure 4: Exhaled air concentrations of ethanol measured in men at different time points during a 4 h exposure to concentrations of ethanol vapor of 125 ppm, 250 ppm, 450 ppm, 750 ppm, and 1000 ppm.....	63
Figure 5: Comparison of blood ethanol concentrations during resting state and while performing physical activity (50W \times 12 minutes per hour) after 1, 3 and 4 h exposure to 750 ppm in female volunteers.	64

Figure 6: Comparison of blood ethanol concentrations during resting state and while performing physical activity (50W × 12 minutes per hour) after 1, 3 and 4 h exposure to 750 ppm in male volunteers.....65

Figure 7: Comparison between A) predicted blood concentrations by the original PBPK model and the measured values (symbols) in men (70kg) B) predicted blood concentrations by the modified PBPK model that considers extra-hepatic metabolism and the measured values (symbols) in men (70kg).....66

Figure 8: Comparison between A) predicted blood concentrations by the original PBPK model and the measured values (symbols) in women (55kg) **B)** predicted blood concentrations by the modified PBPK model that considers extra-hepatic metabolism and the measured values (symbols) in women (55kg).....67

CHAPITRE 3

Figure 1: Experimental setup for studying the ambient levels of ethanol associated with the use of HAS.....97

Figure 2: Experimental setup for studying the ambient levels of ethanol associated with the use of ethanol-based varnish.....98

Figure 3: Maximum ambient concentrations measured during hand disinfection with 1.5 g of Purell or 3 g of Purell (throughout three minutes) with five volunteers in the inhalation chamber with a change of air (samples 30 cm above the hands)(n=5).....99

Figure 4: Area under the curve of ambient concentrations corresponding to the use for three minutes of 1.5 g of Purell or 3 g of Purell for the five volunteers (disinfection in the inhalation chamber with a change of air) * p-value < 0.005.....100

Figure 5: Maximum ambient concentrations measured during hand disinfection with 1.5 g of Purell or 3 g of Purell (throughout three minutes) with five volunteers in the office without air change (samples 30 cm above the hands) (n=5).....101

Figure 6: Area under the curve of ambient concentrations corresponding to the use for three minutes of 1.5 g of Purell or 3 g of Purell for the five volunteers (disinfection in the office without air change).....102

Figure 7: Maximal concentration (\pm standard deviation) obtained after the application of 125 ml of varnish on a surface of 1m² in the inhalation chamber at 20 cm, 40 cm distance from the center of the wooden and in the room.....103

Figure 8: Area under the curve of ambient concentrations versus time following the application of 125 ml of varnish on a surface of 1m² in the inhalation chamber: measurements were made at 20 cm, 40 cm distance from the center of the board and in the room for one hour.....104

Figure 9: PBPK model simulation for a man (70kg) exposed to the use of SHA for three minutes repeated every 10 minutes until the occurrence of 42 frictions in a day of 8 hours divided by one-hour break without any exposure (21 frictions in the morning and 21 frictions in the afternoon) in the office with different amounts of hydro-alcoholic solution 1.5g and 3g.....105

Figure 10: PBPK model simulation for a man (70kg) exposed to the use of SHA for three minutes repeated every 10 minutes until the occurrence of 42 frictions in a day of 8 hours divided by one-hour break without any exposure (21 frictions in the morning and 21 frictions in the afternoon) in the inhalation chamber with different amounts of hydro-alcoholic solution 1.5g and 3g.....106

Figure 11: Simulation for the prediction of BLE by the PBPK model for the ethanol-based varnish for men and women with the following scenario: five minutes to 40 cm of the board followed by 55 minutes exposed to the concentration in the inhalation chamber and 23 hours without exposure.....107

Abréviations

Les abréviations ci-dessous sont citées dans le texte.

ACSLX : *Advance Continuous Simulation Language eXtrem*

ADH : alcool déshydrogénase

ALDH : aldéhyde déshydrogénase

ANSES : Agence national de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AUC : Aire sous la courbe

BD: *Becton, Dickinson and Company*

BLE : Niveau d'éthanolémie (*blood levels of ethanol*)

BW: Poids corporel

CA : Concentration artérielle

CALV : Concentration alvéolaire

CAS : Numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données de *Chemical Abstracts Service*

CEXP: Concentration dans l'air expiré

CEXPO: Concentration d'exposition

CI: Concentration inhalée

CH : molécule de carbone et d'hydrogène

Cmax : Concentration maximale

CSST : Commission de la santé et de la sécurité du travail

CV: Concentration dans le sang veineux

CVBR: Concentration dans le cerveau

CVL: Concentration dans le foie

CVF: Concentration dans les tissus adipeux

CVP: Concentration dans les tissus pauvrement perfusés

CVR: Concentration dans les tissus richement perfusés

CYP: Cytochrome P450

CYP2E1: Cytochrome P450 2E1

CYP3A4: Cytochrome P450 3A4

DIVS : Danger immédiat pour la vie ou la santé

E : Ratio total d'extraction hépatique

FA: Fraction absorbée

FID : *flame ionization detector*

H₂O : molécule d'eau

HAS : Hydro-alcoholic solutions

HNC : *Health Council of the Netherlands*

HPLC : *High-performance liquid chromatography*; Chromatographie en phase liquide à haute performance

GA: calibre de cathéter

GC : Chromatographe à phase gazeuse

GRE : Groupe de travail Éthanol

IARC : *International agency for research on cancer* ; Centre international de recherche sur le

cancer

INRS : Institut national de la recherche scientifique

Inserm : Institut national de la santé et de la recherche médicale

K_m : Constante de Michaelis-Menten (constante métabolique)

K_{m1} : Constante d'affinité pour le foie

K_{m2} : Constante d'affinité pour les tissus richement perfusés

MEOS : Système microsomal d'oxydation de l'éthanol

NAD : Nicotinamide-adénine dinucléotide

NADH : Forme réduite de NAD

OH : Hydroxyde

PB: Coefficient de partage Sang : Air

PBPK : *Physiologically based pharmacokinetic* ; pharmacocinétique à base physiologique

PBRa: Coefficient de partage Cerveau : Air

PFa: Coefficient de partage Tissus adipeux: Air

PLa: Coefficient de partage Foie : Air

PPa: Coefficient de partage Tissus pauvrement perfusés : Air

PRa : Coefficient de partage Tissus richement perfusés : Air

QALV, QALVc: Débit alvéolaire

QC, QCc: Débit sanguin

QBR, QBRc: Fraction du débit cardiaque allant au cerveau

QF, QFc: Fraction du débit cardiaque allant aux tissus adipeux

QL, QLc: Fraction du débit cardiaque allant au foie

QP, QPc: Fraction du débit cardiaque allant aux tissus pauvrement perfusés

QR, QRc: Fraction du débit cardiaque allant aux tissus richement perfusés

RSST : Règlement sur la santé et la sécurité du travail

SHA : Solution hydro-alcoolique

SNC : Système nerveux central

VBRc: Fraction du volume corporel du cerveau

VECD : Valeur d'exposition de courte durée

VEMP : Valeur d'exposition moyenne pondérée

VFc: Fraction du volume corporel du tissu adipeux

VLc: Fraction du volume corporel du foie

Vmax : Vitesse maximale du métabolisme

VMAX1c: Vitesse du métabolisme pour le foie

VMAX2c: Vitesse du métabolisme pour les tissus richement perfusés

VPc: Fraction du volume corporel des tissus pauvrement perfusés

VRc: Fraction du volume corporel des tissus richement perfusés

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier le docteur Sami Haddad pour avoir été un directeur attentif, patient, compréhensif et ayant une joie de vivre contagieuse. Je veux aussi le remercier de m'avoir encadrée, soutenue et précieusement conseillée tout au long de mes deux merveilleuses années de maîtrise. Je remercie aussi le docteur Robert Tardif pour sa grande collaboration, sa disponibilité sans égale, sa gentillesse et pour avoir été mon parrain lors de ma maîtrise. Je tiens à remercier la docteure Michèle Bouchard pour sa précieuse aide lors de mon séminaire, en plus d'avoir été ma marraine pour ma maîtrise.

Je remercie également l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) pour avoir subventionné ce projet.

J'aimerais aussi remercier Ginette Charest-Tardif pour son aide indispensable lors des manipulations en laboratoire et pour la modélisation PBPK. C'est une personne d'une grande richesse, patiente, dynamique et toujours de bonne humeur. Merci mille fois.

Un merci à tous les membres du département et particulièrement Jonathan pour son aide. Je lève mon verre aux étudiants du département pour tous les bons moments passés ensemble à rire, à être plus sérieux ainsi qu'à nos nombreuses discussions: Marjory, Mylène, Alexandra, Roberto, Cyril, Axelle, Igor, Denis, Stéphanie, Richard et Sarah. Merci aussi à mes deux grands amis Vincent et Cynthia pour votre soutien incommensurable.

Pour terminer, je remercie ma famille. Merci à mes parents, Madeleine et Serge, ma sœur Myriam, mon amour Rémi, mes grands-parents, mes oncles et tantes et mes cousins et cousines pour m'avoir soutenue et écoutée parler du même sujet pendant deux années, oui ma maîtrise est terminée. Merci à tous.

Chapitre 1. Introduction générale

1.1. L'éthanol : structure et utilisation

L'éthanol ou alcool éthylique ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) est produit par la fermentation de sucre naturel provenant soit de betteraves, de céréales (blé et orge), de fruits ou de la canne à sucre. La technique de fermentation pour produire du vin ou encore de la bière remonte à 3 000 av. J.-C (ANSES, 2010a). Cet alcool tant apprécié des hommes dans les boissons alcoolisées est un liquide incolore, volatil et inflammable en plus d'être miscible à l'eau. Son odeur a un seuil de détection olfactive de 49 ppm (CSST, 2000). Il est combinable aux alcools, à l'éther éthylique et à plusieurs solvants organiques. Il est probablement un des solvants auquel l'humain a été le plus exposé à l'exception de l'eau (Bruckner and Warren, 2001, Vaubourdolle, 2007). Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont décrites dans le tableau I. Son utilisation en milieu industriel est répandue dans les industries fabriquant de la peinture, du vernis, de l'encre, des matières plastiques, de l'adhésif, des explosifs, des parfums, des cosmétiques, des produits pharmaceutiques, etc (ANSES, 2010a, CSST, 2000, ANSES, 2010b). L'alcool éthylique est aussi la première matière pour la production de nombreux composés tels que : l'acide acétique, l'acétate d'éthyle, l'acrylate d'éthyle, les éthers de glycol, etc. Ce solvant se retrouve aussi dans l'essence à des pourcentages pouvant varier entre 5 et 95% dépendamment des pays. L'éthanol est aussi utilisé comme désinfectant et comme biocide en plus de se retrouver comme composant des boissons alcoolisées (Bonnard et al., 2011). Pour terminer, l'alcool éthylique peut aussi être utilisé comme substance de remplacement pour divers solvants tels que le chloroforme, l'acétone, l'acétaldéhyde, l'heptane, le toluène, l'éthylène glycol et l'isopropanol (CSST, 2000).

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques de l'éthanol.

Caractéristiques	Éthanol
CAS	64-17-5
Formule chimique	CH ₃ -CH ₂ -OH
Synonyme	Alcool éthylique
Apparence	liquide incolore, volatil ayant une odeur plutôt agréable
Masse molaire	46.07g
Densité (D ²⁰ ₄)	0.789 g/ml à 20°C
Point de fusion	-114,1 °C
Point d'ébullition à pression atmosphérique	78.5 °C
Densité de vapeur (air=1)	1.59
Tension de vapeur	44,00 mm de Hg ou 5.85 kPa à 20°C et 53.3 kPa à 63.5°C
Coefficient de partage octanol/eau : log Pow	-0.31
Coefficient de partage (eau/huile)	2,09
Taux d'évaporation (éther =1)	7,00

(CSST, 2000, Bonnard et al., 2011)

1.2. L'exposition à l'éthanol et les valeurs limite associées

Les situations dans lesquelles il est possible d'être exposé à l'éthanol dans la vie quotidienne sont à la fois multiples et diverses. La plus connue est sans aucun doute l'exposition à l'éthanol par ingestion de façon abusive et/ou intempestive, qui est une des premières causes de décès et d'accidents de travail parmi la population (Bruckner and Warren, 2001). Néanmoins, l'exposition à l'éthanol involontaire peut elle aussi apporter des effets néfastes sur la santé des travailleurs ou de la population. Bien que les données toxicologiques ou épidémiologiques de l'exposition à l'éthanol par ingestion soient très abondantes, cela n'est pas le cas pour les expositions par inhalation (Reddy et al., 2005).

L'exposition à l'éthanol par les voies respiratoires touche plusieurs secteurs professionnels tels que le milieu agricole (vinification et distillation), industriel (solvants) et de soins (utilisation de solution hydro-alcoolique [SHA]) (ANSES, 2010b). Les concentrations d'éthanol retrouvées dans l'air de l'environnement de travail sont généralement de 6 à 20 fois en dessous de la valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP). La valeur de cette norme est de 1000ppm au Québec (1880 mg.m⁻³), en France (1950 mg.m⁻³) et aux États-Unis (1880 mg.m⁻³) (Québec, 2013, Bonnard et al., 2011) . La VEMP est définie par le RSST comme étant « La concentration moyenne, pondérée pour une période de 8 heures par jour, en fonction d'une semaine de 40 heures, d'une substance chimique (sous forme de gaz, poussières, fumées, vapeurs ou brouillards) présente dans l'air au niveau de la zone respiratoire du travailleur.¹»

¹ CSST. 2000. *Le lexique* [Online]. Québec : Commission de la santé et de sécurité du travail. Disponible : <http://www.reptox.csst.qc.ca/Lexique-A.htm> [Accès 04 juin 2013].

Cependant, aucun des secteurs professionnels présentés auparavant n'est à l'abri d'un dépassement des normes. Les dépassements des normes ont lieu surtout dans le secteur des distillations industrielles et de la vinification. Les niveaux d'éthanolémie suivant l'inhalation d'éthanol dans le cadre professionnel sont la plus part du temps inférieurs au seuil fixé par le code de la route. Effectivement la loi en vigueur au Québec, quant à l'alcoolémie, est de 80 mg d'éthanol /100 ml (800 mg.L^{-1}) de sang pour pouvoir conduire un véhicule (SAAQ, 2013).

Au niveau de la population générale, l'exposition se fait par les voies respiratoires à l'éthanol puisqu'il est présent dans divers produits de consommation tels l'essence à moteur, les SHA, les désinfectants, les peintures, les encres et vernis, les cosmétiques et parfums, les solvants ... (ANSES, 2011). Les SHA et les cosmétiques sont les produits d'utilisation courante qui exposent la population générale aux plus fortes concentrations d'éthanol dans l'air. Les valeurs maximales d'exposition estimées sont de 758 mg.m^{-3} (402 ppm) pour les SHA et de 230 mg.m^{-3} (122 ppm) pour les cosmétiques (ANSES, 2010a). Cependant, l'activité qui causerait la plus forte exposition est l'application de vernis à tampon (vernis à base d'éthanol) parmi les scénarios envisagés par l'ANSES (ANSES, 2010a). En effet, les concentrations modélisées pourraient atteindre une valeur maximale allant de 1450 à 2500 mg.m^{-3} (770 à 1327 ppm) ce qui entrainerait une éthanolémie variant entre 5 à 9 mg.L^{-1} (ANSES, 2010a). Ces concentrations d'éthanol dans le sang sont inférieures à celles associées aux premiers effets toxiques aigus connus de l'éthanol (entre 100 et 200 mg.L^{-1}) qui sont des effets neurotoxiques. L'exposition par la peau n'est pas prise en compte puisque l'absorption d'éthanol par cette voie est très faible étant donné sa grande capacité à s'évaporer (ANSES, 2010b). Ainsi, les gens peuvent être potentiellement exposés par les voies orales et

respiratoires.

De ce fait, plusieurs valeurs réglementaires ont été déterminées telles la VEMP précédemment présentée pour limiter l'exposition des travailleurs et de la population. La valeur de DIVS (danger immédiat pour la vie ou la santé) est de 3 300 ppm (CSST, 2000). Celle-ci est «la concentration maximale d'un produit présent dans un milieu et duquel un individu peut s'échapper dans un délai de 30 minutes, sans présenter de symptômes pouvant l'empêcher de fuir et sans produire des effets irréversibles sur sa santé.²». Cependant, la DIVS dans le cas de l'éthanol est surtout reliée à un danger d'explosibilité plutôt qu'à un danger pour la santé. (CSST, 2000). En France, la valeur d'exposition de courte durée (VECD) pour l'alcool éthylique est de 5 000 ppm pour un temps d'exposition de 15 minutes (Bonnard et al., 2011).

1.3. La toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme, excrétion)

Absorption :

L'éthanol est très bien absorbé lors de l'inhalation et de l'ingestion. Cependant, l'absorption percutanée est très faible (environ 1 %) (Bonnard et al., 2011, ANSES, 2010b, Kirsehner et al., 2009). La fraction moyenne d'éthanol absorbé par inhalation est d'environ 60% à 80% dépendamment des articles consultés dans la littérature (Lester and Greenberg, 1951, Tardif et al., 2004, Bonnard et al., 2011).

² CSST. 2000. *Le lexique* [Online]. Québec: Commission de la santé et de sécurité du travail Disponible: <http://www.reptox.csst.qc.ca/Lexique-A.htm> [Accès 04 juin 2013].

L'absorption de l'éthanol par inhalation suit le modèle classique des gaz solubles dans l'eau. En effet, il se dissout dans le mucus, puis il diffuse selon le gradient de concentration du système bronchique vers la circulation sanguine lors de l'inspiration et vice versa lors de l'expiration. Les facteurs influençant son absorption dans les poumons sont la concentration dans l'air inspiré, la fréquence respiratoire et la clairance pulmonaire (ANSES, 2010b).

Distribution :

La distribution de l'éthanol dans l'organisme est très rapide puisqu'il se distribue dans l'eau sans se lier aux protéines plasmatiques (INSERM, 2001). Sa distribution est très rapide dans les organes fortement vascularisés (cerveau, poumons, foie) (CSST, 2000, INSERM, 2001). À l'inverse, la distribution de l'éthanol dans les tissus pauvrement perfusés, tels les os, est donc beaucoup plus lente. Par exemple, l'atteinte de l'équilibre des concentrations d'éthanol dans les os peut prendre plusieurs heures (INSERM, 2001, Pohorecky and Brick, 1988).

Métabolisme :

Le métabolisme de l'éthanol suit une cinétique d'ordre zéro pour des concentrations sanguines allant de 20 à 300 mg.dl⁻¹. Ainsi le taux d'élimination dans le foie est constant et indépendant de l'éthanolémie sauf pour les très petites ou très hautes concentrations sanguines. En effet, pour ce qui est des concentrations sanguines inférieures à 20 mg.dl⁻¹ ou supérieures à 300 mg.dl⁻¹, des cinétiques de premier ordre ont été observées chez l'humain (Ducluzeau and Meyran, 1999, Carter and Bernstein, 2005). Le taux maximum de biotransformation pour un adulte est de 100-125 mg.kg⁻¹ du poids corporel par heure (Andersson and Victorin, 1996) (c.-

à-d., décrit par une constante d'ordre zéro de 150 à 200 $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Uemura et al., 2005). Si la concentration sanguine d'une personne est de 1200 mg.L^{-1} alors le temps requis par l'organisme pour diminuer la concentration sanguine à une valeur négligeable (valeur endogène 0,1 à 0,3 mg.L^{-1}) est de 6 à 8 heures, rappelons que la limite légale pour conduire au Québec est de 800 mg.L^{-1} (Bruckner and Warren, 2001, SAAQ, 2013, Al-Awadhi et al., 2004).

Plus précisément, le métabolisme de l'éthanol chez l'être humain se fait principalement dans les hépatocytes à 80% et à 20% dans d'autres organes que le foie (Andersson and Victorin, 1996, INSERM, 2001). Cette biotransformation s'effectue grâce à deux oxydations se succédant. La première oxydation transforme l'éthanol en acétaldéhyde et la deuxième transforme ce métabolite en acétate. La première transformation peut être effectuée par trois voies enzymatiques toutes situées dans différents compartiments et par une voie radicalaire (figure 1).

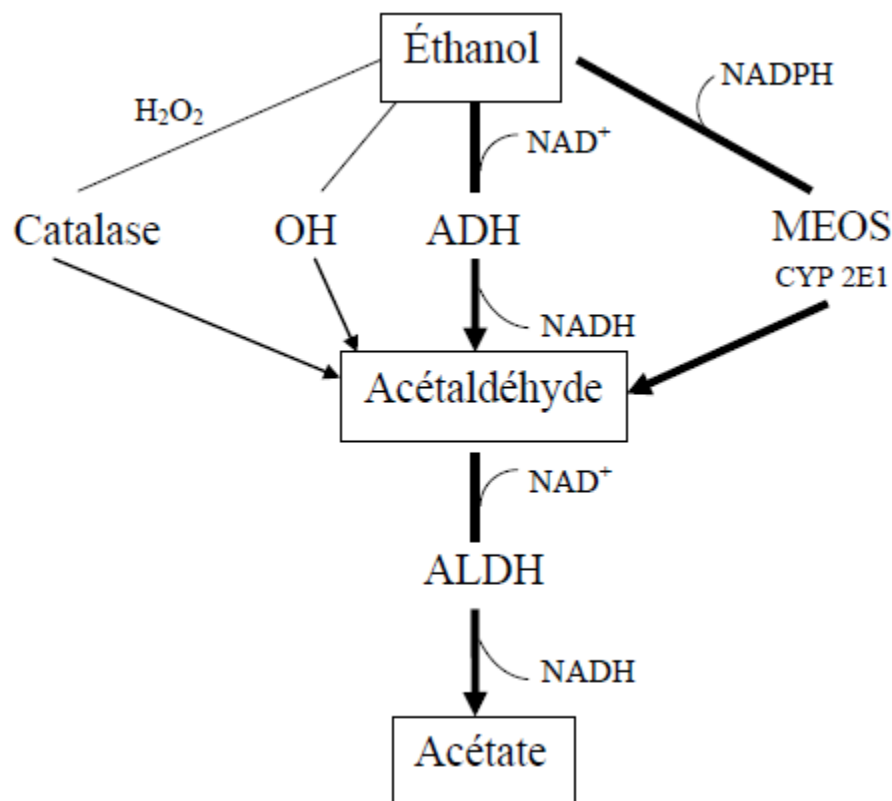


Figure 1 : Métabolisme hépatique de l'éthanol (INSERM, 2001)

La première voie enzymatique, la plus prépondérante, est celle de l'alcool déshydrogénase (ADH). Cette enzyme, qui est retrouvée en grande concentration dans le cytosol des hépatocytes, va produire à l'aide de son coenzyme nicotinamide-adenine dinucléotide (NAD^+) de l'acétaldéhyde et du NADH (forme réduite de NAD) (INSERM, 2001, Pohorecky and Brick, 1988). La deuxième voie est celle du système d'oxydation microsomal de l'éthanol (MEOS) qui est circonscrite dans le réticulum endoplasmique. Celle-ci consiste en la transformation de l'éthanol en acétaldéhyde par l'intermédiaire d'un cytochrome P450 (CYP2E1) à l'aide de ces cofacteurs le NADP^+H^+ et l'oxygène. D'autres cytochromes, tels le CYP1A2 et le CYP3A4, contribuent aussi à l'élimination de l'éthanol mais dans une moindre

mesure. Le système MEOS contribue à environ 10 % de l'élimination de l'éthanol dans l'organisme. De plus, contrairement à la voie avec l'ADH, la voie du CYP2E1 est inductible par l'éthanol (Crabb and Liangpunsakul, 2007, INSERM, 2001). La dernière voie est celle des catalases. Celle-ci utilise le peroxyde d'hydrogène présent dans les peroxysomes des hépatocytes pour effectuer l'oxydation. Par contre, il y a très peu de peroxyde d'hydrogène disponible pour soutenir la réaction dans les hépatocytes, c'est pourquoi cette voie est considérée comme auxiliaire (INSERM, 2001, Bruckner and Warren, 2001, Pohorecky and Brick, 1988). L'éthanol peut aussi être biotransformé en acétaldéhyde par la voie radicalaire. Celle-ci consiste en la réaction de l'éthanol avec des radicaux hydroxyles produits au cours du métabolisme de l'éthanol (Bruckner and Warren, 2001). La deuxième oxydation, quant à elle, consiste en la transformation de l'acétaldéhyde en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui se retrouve à 90% dans le foie et à 10% dans les reins (Bonnard et al., 2011, CSST, 2000). Cette enzyme se retrouve dans le cytosol et dans les mitochondries. Pour terminer, l'acétate produit est majoritairement libéré dans la circulation sanguine et oxydé en dioxyde de carbone et en eau dans les tissus extra hépatiques (INSERM, 2001, Bruckner and Warren, 2001).

L'ADH est une protéine dimérique qui appartient à une famille polygénique. Chez l'homme, il y a sept gènes soit ADH1 à ADH7 qui codent pour des isoformes composées de dimères variables de 3 sous-unités (INSERM, 2001). De plus, chaque type d'ADH se retrouve majoritairement dans différents organes de l'organisme et ont une affinité pour l'éthanol (K_m) et une vitesse maximale de réaction variant d'un type de sous unité à un autre (Tableau II). Par exemple, l'ADH2 sous unité B1 est présent dans les poumons et a un K_m de $0,002 \text{ g.L}^{-1}$ et

un V_{max} de $9 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol d'enzyme}^{-1}$. Le CYP2E1 est retrouvé aussi dans les poumons mais en très petite quantité soit environ 10 à 100 fois moins que dans les hépatocytes.

Tableau II : Classification des alcools déshydrogénases (tiré de INSERM 2001)

Classe	Gène	Allèle	Sous-unité	K_m [mM (g/L)]	V_{max} ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mol}$ d'enzyme^{-1})	Localisation Tissulaire
I	ADH1	ADH1	α	4,4 (0,2)	23	Foie
	ADH2	ADH2*1	β_1	0,05 (0,002)	9	Foie, poumon
		ADH2*2	β_2	0,94 (0,04)	340	
		ADH2*3	β_3	34,0 (1,56)	320	
	ADH3	ADH3*1	γ_1	1,0 (0,05)	88	Foie, estomac
		ADH3*2	γ_2	0,63 (0,029)	35	
II	ADH4	ADH4	π	34,0 (1,56)	20	Foie
III	ADH5	ADH5	X	>1 000 (46,0)		Tous tissus + cerveau
IV	ADH7	ADH7	σ, μ	37,0 (1,7)	1 510	Œsophage, estomac
V	ADH6	ADH6	?	?	?	Foie (ARNm)

Les constantes cinétiques sont données pour des dimères, K_m (constante de Michaelis) représente la concentration d'éthanol nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale, V_{max} représente la vitesse maximale de l'activité enzymatique et est exprimée en moles de substrat métabolisées par minute et par mole d'enzyme. Les enzymes travaillent à leur vitesse maximale pour des concentrations d'environ 10 à 20 K_m .

L'étape limitante du métabolisme de l'éthanol est l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde alors que la biotransformation de l'acétaldéhyde en acétate est très rapide. En effet, l'ALDH a un faible K_m et une V_{max} très élevée. Ainsi, sauf dans le cas de consommateurs chroniques d'alcool, la concentration d'acétaldéhyde n'est jamais trop élevée dans les tissus (Andersson and Victorin, 1996).

Excrétion :

Il est intéressant de mentionner qu'une partie de l'éthanol absorbée n'est pas métabolisée. En effet, cette partie est éliminée sous forme inchangée soit dans l'air expiré ou dans l'urine dans

une proportion allant de 2 à 5% de l'éthanol absorbé lorsque celui-ci est ingéré (Bonnard et al., 2011).

Il est possible d'utiliser la partie non métabolisée relâchée dans l'air expiré pour déterminer si un conducteur a dépassé la limite légale pour conduire, ceci est appelé l'alcootest. Cela est effectivement possible, puisque le pourcentage d'alcool dans l'haleine exhalée contient la même quantité d'alcool contenue dans le sang. En effet, la quantité d'alcool dans 2 100 ml d'air expiré est exactement équivalente à la quantité d'alcool dans 1 ml de sang (Cassie, 2013). Par conséquent, il est possible d'obtenir une mesure précise du taux d'alcool dans le sang suite à une prise d'échantillon d'air expiré.

1.4. Les effets toxiques et les mécanismes de toxicité

Nous introduirons, en premier lieu dans cette section, le type de dommage au niveau cellulaire que peut effectuer l'éthanol en lien avec son métabolisme dans le foie. Par la suite, seront détaillés les effets toxiques et neurotoxiques de l'éthanol suite à une intoxication aiguë, subaiguë, subchronique chez l'animal. Pour terminer cette section, les effets toxiques chez l'humain suite à une intoxication aiguë et chronique seront vus, en plus de l'évaluation de l'IARC (International Agency for Research on Cancer) sur la cancérogénicité de l'éthanol chez l'humain.

Les effets nocifs de l'éthanol sur le foie s'effectuent principalement de trois façons. La première à être énumérée est l'augmentation du rapport nicotinamide-adénine dinucléotide

hydrogène/nicotinamide-adénine dinucléotide (NADH/NAD⁺) étant donné que le NAD⁺ est le coenzyme de l'ADH et l'ALDH. Ceci est la principale conséquence métabolique de l'oxydation de l'éthanol. L'augmentation de ce rapport amène une perturbation du métabolisme des glucides et des lipides. Cette perturbation favorise ainsi l'hypoglycémie et l'accumulation de triglycérides dans le foie (foie gras). Ainsi, la réoxydation du NADH en NAD⁺ est essentielle. Celle-ci s'effectue par l'entremise des mitochondries (INSERM, 2001). La réoxydation dans les mitochondries amène une augmentation de la production des radicaux libres ayant ainsi des effets nocifs sur la santé (Cano et al., 2007).

L'éthanol est aussi nocif pour le foie à cause de son métabolite principal l'acétaldéhyde. Ce métabolite est très toxique dû à sa haute réactivité lui permettant d'effectuer des adduits aux molécules environnantes (protéines, enzymes et glutathion). Les effets de ces réactions indésirables sont la diminution de l'activité enzymatique et de la transformation des protéines en protéines antigéniques amenant ainsi des réactions immunologiques jusqu'à la production de collagène. En plus de former des adduits, l'acétaldéhyde est surtout toxique pour la mitochondrie. En effet, l'acétaldéhyde entraîne la mort cellulaire de celle-ci par l'augmentation de la peroxydation lipidique, et des effets toxiques des radicaux libres et ainsi que par la diminution du glutathion réduit (INSERM, 2001).

La production de radicaux libres suite au métabolisme de l'éthanol peut aussi engendrer des atteintes au foie. Ces radicaux libres entraînent la lipoperoxydation des membranes. La source de leur production peut être liée à l'activité du CYP2E1, l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou encore à l'oxydation de l'acétaldéhyde par la xanthine oxydase (INSERM,

2001). Ainsi, la diminution du NAD^+ , l'acétaldéhyde et des radicaux libres produits lors du métabolisme de l'éthanol peuvent entraîner des effets sur le foie.

Les effets nocifs du métabolisme de l'éthanol peuvent aussi se réaliser théoriquement dans d'autres organes puisqu'il est possible de retrouver les enzymes métabolisant l'éthanol (l'ADH, le CYP2E1 et l'ALDH) ailleurs que dans le foie, tel qu'expliqué dans la section sur le métabolisme de l'éthanol (INSERM, 2001).

Les symptômes observés chez les animaux suite à une exposition aiguë par inhalation, sont les suivants : une irritation légère des muqueuses, une excitation suivie d'une ataxie (coordination musculaire altérée), de la somnolence, de la prostration (épuisement extrême ou impuissance), une narcose, des contractions musculaires, une paralysie générale, la dyspnée (difficulté à respirer) et parfois la mort associée à une insuffisance respiratoire (Andersson and Victorin, 1996).

Une exposition aiguë à l'éthanol par les voies respiratoires semble aussi affecter le système hématologique. En effet, Malik and Wickramasinghe (1986) ont noté chez des souris, suite à une exposition de 24 h à des vapeurs d'éthanol, le développement d'une leucopénie marquée due à une diminution des neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes. Les souris qui ont été exposées à de fortes concentrations d'éthanol dans l'air ($25\text{-}38 \text{ mg.L}^{-1}$ d'air inhalé) pendant 24 heures ont développé une leucopénie, une neutropénie, une lymphopénie, une monocytopenie et une thrombocytopenie.

Pour ce qui est des effets subaiguë et subchroniques chez les animaux, Malik and Wickramasinghe (1986) ont exposé des souris à des concentrations faibles de vapeurs d'éthanol (10-25 mg.L⁻¹ d'air inhalé) pendant 20-43 jours et celles-ci ont développé une thrombocytopénie. Goldin and Wickramasinghe (1987) ont, quant à eux, démontré que des souris continuellement exposées à des vapeurs d'éthanol (19 jours) développent des changements dans les gras du foie (à partir de 2 jours) et des lésions ressemblant grandement à celles associées à une hépatite alcoolique chez l'homme (à partir de 5 jours). Les changements dans les gras du foie ont été en premier localisés dans les hépatocytes péricentraux. Cela fut suivi d'une inflammation avec une augmentation de neutrophiles associés à une nécrose des hépatocytes présent dans la région péricentrale. Ils ont également observé des signes biochimiques de dommages aux cellules du foie, tel l'augmentation significative des niveaux de bilirubine, d'aspartate aminotransférase et d'alcaline phosphatase.

Au niveau de la neurotoxicité, Nelson et al. (1988) ont observé des modifications neurochimiques chez les progénitures de rats exposés à des vapeurs d'éthanol (parents distinctement exposés, exposition sous-chronique). Ils ont observé des changements dans les niveaux de norépinephrine mais seulement chez les ratons dont les pères étaient exposés. Les niveaux de 5-hydroxytryptamine ont été réduits dans le cerveau et les niveaux de met-enképhaline ont augmenté dans toutes les régions du cerveau des ratons dont la mère où le père ont été exposés (Nelson et al., 1988). Andersson and Victorin (1996), quant à eux, ont répertorié que l'inhalation de faibles concentrations d'éthanol lors d'une exposition sous-chronique, chez l'animale, peut avoir un effet sur le système nerveux centrale (SNC). En effet, des perturbations de la phase du sommeil paradoxal chez les rats et une diminution du taux de

renforcement auto-ajusté ont été observées lors d'exposition à des concentrations entre 190 et 746 mg.m⁻³ (sommeil paradoxal) et entre 302 et 748 mg.m⁻³ (renforcement).

Lester and Greenberg (1951) ont constaté, que l'exposition à des concentrations variant entre 5 307 ppm (10 mg.L⁻¹) et 10 614 ppm (20 mg.L⁻¹) pouvait provoquer différents symptômes indésirables chez l'humain comme une irritation au niveau du nez et des yeux et une toux qui était tolérable. Lorsque les concentrations atteignaient 15 921 ppm (30 mg.L⁻¹), la toux pouvait ensuite s'intensifier et un larmoiement continu des yeux pouvait apparaître. Néanmoins, cette situation était considérée comme supportable quoi qu'inconfortable. Cependant à 21 229 ppm (40 mg.L⁻¹), Lester et Greenberg (1951) ont observé que l'atmosphère était suffocante et intolérable. Cela ne permettait pas aux volontaires de rester dans cette atmosphère même pour de courts moments. Lors d'une exposition à 4 700 ppm (9 mg.L⁻¹), Mason and Blackmore (1972) ont observé dans leur étude des symptômes identiques à ceux rapportés par Lester et Greenberg (1951) pour une exposition semblable. Ils ont cependant noté que les sujets présentaient une certaine accoutumance avec le temps. Le rapport de Bonnard et al. (2011) sur l'éthanol corrobore ce fait :

«En cas d'expositions répétées – ou chez les sujets ingérant régulièrement de l'éthanol – un certain degré de tolérance apparaît : pour une même concentration atmosphérique, les symptômes sont moins sévères et le temps nécessaire pour les faire apparaître est plus long.³»

Les différents symptômes observés chez l'humain par Bonnard et al. (2011) suite à une exposition aiguë à l'éthanol pour différentes conditions d'exposition (1 380 ppm à 20 000 ppm) sont présentés dans le tableau III.

³ BONNARD, N., FALCY, M., JARGOT, D. & PASQUIER, E. 2011. Fiche toxicologique: Éthanol. France; Paris: Institut national de recherche et de sécurité.

Tableau III : Les différents symptômes observés en fonction de la concentration et du temps d'exposition.

Concentration d'exposition (ppm)	Temps d'exposition (minutes)	Symptômes
1 380	30	céphalée suivie d'un léger engourdissement
3 340	100	sensation de chaud et froid, irritation nasale, céphalée, engourdissement
5 000	Avant 1 h	irritation immédiate des yeux et des voies aériennes supérieures (toux) (disparaît en 5 et 10 minutes), odeur presque intolérable initialement mais acclimatation rapide, céphalée, tension intraoculaire, sensation de chaleur
	Après 1 h	après 1 heure = engourdissement marqué
9 000	Avant 30 min	symptômes précédemment nommés

	Après 30 min	une fatigue et une somnolence apparaissent
20 000	-	larmoiement permanent, toux irrépressible, suffocation

(Bonnard et al., 2011)

Aux niveaux des effets d'une exposition chronique, il n'a pas été établi qu'une telle exposition par les voies respiratoires cause des effets semblables au foie et au myocarde tel qu'entraîne l'ingestion successive de fortes doses d'éthanol (Bonnard et al., 2011).

L'IARC, en 1998, a conclu qu'il y a des preuves suffisantes de la cancérogénicité des boissons alcoolisées chez l'humain et donc ainsi de l'éthanol (Bruckner and Warren, 2001). En effet, l'incidence accrue des cancers de la bouche, du pharynx, du larynx et de l'œsophage et du foie associés à la consommation d'alcool est suffisamment exhaustive pour établir le lien de causalité. Pour ce qui est du cancer du sein et le cancer colorectal, la relation est considérée comme probable et celle du cancer du poumon est possible (INSERM, 2001). Aucune évidence de l'effet cancérogène de l'éthanol via la voie respiratoire n'a été prouvée, l'absence de données épidémiologiques à ce sujet n'aidant point (Armstrong, 2000, Bonnard et al., 2011). Il est également observé dans la littérature que l'éthanol cause des effets délétères sur le foie, la reproduction, le développement, le système nerveux central et périphérique suite à l'ingestion d'éthanol. Ces effets ne sont cependant pas démontrés suite à une exposition par inhalation d'éthanol chez l'humain (ANSES, 2010b).

1.5. La modélisation toxicocinétique à base physiologique (PBPK)

Deux rapports d'expertise collective portant sur l'évaluation des risques à l'éthanol : le premier concernant l'exposition professionnelle (ANSES, 2010b) et le deuxième la population générale (ANSES, 2011) ont été produits par l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) via son Groupe de travail Éthanol (GRE). Subséquemment, les premiers travaux du GRE ont permis de constater qu'il existait effectivement très peu d'information autant de nature toxicologique qu'épidémiologique portant sur l'exposition à l'éthanol par la voie respiratoire. En particulier, il ne disposait à l'époque que très peu de données concernant les niveaux d'éthanolémie résultant de l'exposition par inhalation et auxquels on pouvait relier des effets toxiques.

En conséquence devant l'absence de données appropriées sur l'éthanolémie, le GRE a décidé de recourir à la modélisation toxicocinétique à base physiologique (mieux connu en anglais sous l'acronyme de modélisation PBPK) qui est une approche de plus en plus utilisée aujourd'hui en analyse de risque (Poulin and Krishnan, 1996). La modélisation PBPK est une approche qui permet, entre autres choses, de décrire le comportement de contaminants, comme l'éthanol, dans l'organisme et de prédire le cas échéant, les niveaux d'un contaminant dans divers compartiments ou fluides de l'organisme comme le sang, et ce, pour divers scénarios d'exposition que l'on peut rencontrer en milieu professionnel ou public (Poulin and Theil, 2002).

Le modèle qui a été utilisé dans les analyses réalisées par le GRE a été développé par Schlouch and Tardif (1999) à partir des travaux de Pastino et al. (1997). Ce modèle a permis de décrire adéquatement les données d'éthanolémie rapportées par Lester and Greenberg (1951), mesurées chez des volontaires exposés à de fortes concentrations (8500 ppm/16 000 mg.m⁻³) durant de courtes périodes (quelques heures) d'exposition en laboratoire. La validation du modèle PBPK a donc été faite essentiellement sur sa capacité à décrire les niveaux d'éthanolémie pour des expositions à des concentrations élevées.

Conception du modèle PBPK

Représentation du modèle :

Le modèle PBPK développé comporte cinq compartiments soit le cerveau, les tissus gras, le foie, les tissus richement perfusés (rein, cœur et etc.) et les tissus pauvrement perfusés (muscles et peau). Quatre-vingt-onze pourcent de la masse totale de l'organisme est représentée par des compartiments tissulaires (par exemple, un tissu irrigué). Le 9 % restant de la masse corporelle (par exemple, les tissus comme les os, les ongles, les cheveux, le cartilage et les dents, etc) n'est pas pris en compte en raison de sa faible influence sur la cinétique de l'éthanol (Schlouch and Tardif, 1999). La figure 2 et le tableau IV représentent conceptuellement le modèle PBPK.

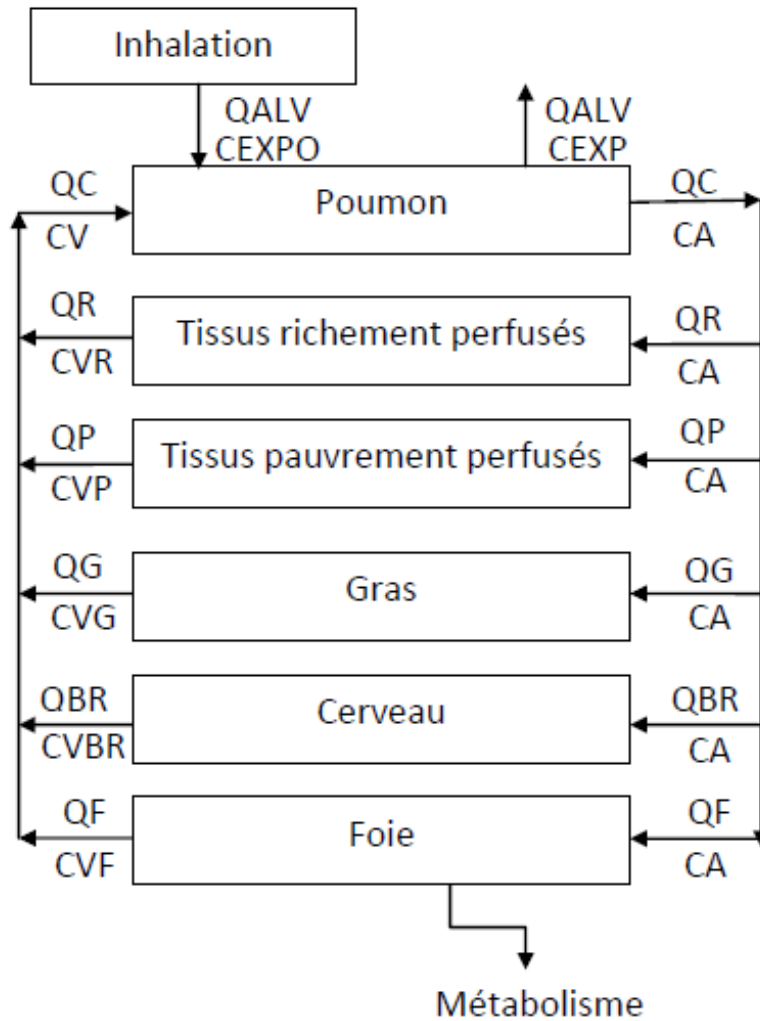


Figure 2 : Structure compartimentale du modèle PBPK pour l'éthanol (symboles décrits au tableau IV)

Tableau IV : Définition des symboles du modèle PBPK de l'éthanol schématisé dans la figure 2

Symbole	Description
CA	Concentration artérielle (mg/L)
CEXP	Concentration dans l'air expiré (mg/L)
CEXPO	Concentration d'exposition (mg/L)
CV	Concentration dans le sang veineux (mg/L)
CVBR	Concentration dans le cerveau (mg/L)
CVF	Concentration dans le foie (mg/L)
CVG	Concentration dans les tissus gras (mg/L)
CVR	Concentration dans les tissus richement perfusés (mg/L)
CVP	Concentration dans les tissus pauvrement perfusés (mg/L)
QALV	Débit alvéolaire (L/h)
QBR	Débit sanguin au cerveau (L/h)
QC	Débit cardiaque (L/h)
QF	Débit sanguin au foie (L/h)
QG	Débit sanguin aux tissus gras (L/h)
QP	Débit sanguin aux tissus pauvrement perfusés (L/h)
QR	Débit sanguin aux tissus richement perfusés (L/h)

Paramètres du modèle :

Le tableau V présente les paramètres utilisés dans le modèle PBPK. Les valeurs de ces paramètres proviennent du rapport professionnel de l'Anses en 2010 (ANSES, 2010b) .

Tableau V : Paramètres du modèle PBPK de l'éthanol^x

Symbole	Paramètres physiologiques	Valeurs
BW	Poids corporel (kg)	70
QCc	Débit cardiaque (l/h/kg) ^0.70	18
QALVc	Débit alvéolaire (l/h/kg) ^0.70	18
FA	Fraction absorbée	0,62
	Fraction du débit cardiaque à chacun des compartiments	
QFc	Gras	0,05
QLc	Foie	0,25
QRc	Richement perfusé	0,39
QPc	Pauvrement perfusés	0,19
QBRc	Cerveau	0,12
	Fraction du volume corporel des compartiments	
VFc	Gras	0,213
VLc	Foie	0,0257
VRc	Richement perfusé	0,0443
VPc	Pauvrement perfusés	0,607
VBRc	Cerveau	0,02
	Paramètres physico-chimiques	
	<i>Coefficients de partage</i>	
PB	Sang : air	2280 ⁺

PFa	Gras : air	226 *
PLa	Foie : air	1730*
PRa	Richement perfusés : air	2030*
PPa	Pauvrement perfusés : air	1710*
PBRa	Cerveau : air	1870*
Paramètres métaboliques		
VMAX1c	Vitesse du métabolisme (Vmax) (mg/h/kg) ^(0.75) pour le foie	359,5
Km1	Constante d'affinité (Km) (mg/L) : Foie	82,1

^xAnses 2010b, +(Dubowski, 1979); *(Kaneko et al., 1994)

Utilité du modèle PBPK :

Le modèle PBPK est composé d'équations algébriques et différentielles qui permettent la simulation en continue de la cinétique de l'éthanol chez l'humain pour des concentrations atmosphériques diverses. En plus de cela, ce modèle rend possible l'élaboration de différents scénarios d'exposition prenant en compte une seule ou plusieurs sources d'exposition. Il permet aussi de répéter dans le temps de façon cyclique une exposition à une source donnée ou encore d'effectuer des chevauchements dans le temps des différentes sources d'exposition. Il est aussi possible avec le modèle d'effectuer des simulations d'une heure ou d'une journée complète de 24h (exposition aiguë) et même des simulations de plusieurs mois (exposition chronique). L'utilisation d'un modèle PBPK permet ainsi de faire des simulations représentant bien la réalité des travailleurs ou encore des gens au cours de leur train de vie quotidien. Cependant, tel que rapporté par l'ANSES (2010b) le modèle a besoin d'être actualisé à l'aide de nouvelles données expérimentales puisqu'il a été validé avec des données humaines datant

des années 50 et dont les concentrations d'exposition étaient au minimum 5 fois plus élevées que la VEMP des travailleurs d'aujourd'hui. Cela laisse un doute quant à la capacité du modèle de bien prédire les niveaux d'éthanolémie pour des expositions à des concentrations plus faibles, soit inférieures à la VEMP.

1.6. Problématique et objectifs.

1.6.1. Objectif principal

Le présent projet s'inscrit dans une démarche conjointe (ANSES-UdeM) qui doit permettre de documenter les expositions à l'éthanol en particulier à des concentrations atmosphériques auxquelles peuvent être soumis les travailleurs ou la population générale dans le cadre d'activités domestiques et professionnelles.

Ce projet a donc pour but général de documenter les niveaux d'éthanolémie résultant de l'exposition à des niveaux relativement faibles d'éthanol par inhalation (i.e., ≤ 1000 ppm). Les niveaux d'éthanolémie seront tels qu'ils devraient permettre de vérifier/valider la capacité du modèle PBPK qui a été utilisé dans le cadre de la Saisine 2007/01 - Évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle pour prédire les niveaux d'éthanolémie (ANSES, 2010b). Les résultats de cette étude faciliteront le raffinement de l'évaluation du risque associé à l'inhalation chronique de faibles niveaux d'éthanol chez la population générale et plus particulièrement chez les travailleurs.

1.6.2. Objectif spécifiques

Plus précisément, ce projet s'articule autour de deux études spécifiques dont les objectifs sont :

Étude 1 :

Objectif 1a. Mesurer les niveaux d'éthanolémie et les concentrations d'éthanol dans l'air exhalé chez un groupe de volontaires au repos (position assise, lecture, travail sur ordinateur) exposés à différentes concentrations d'éthanol durant 4 heures et de vérifier l'impact d'un exercice léger (charge de travail), soit approximativement 50W.

Objectif 1 b. Vérifier et valider le modèle PBPK en comparant les prédictions du modèle avec les données préalablement récoltées chez les volontaires à l'aide d'un logiciel de simulation.

Étude 2 :

Objectif 2a. Mesurer les niveaux ambiants d'éthanol associés à l'usage de solutions hydroalcooliques (SHA) pour la désinfection des mains et des niveaux ambiants d'éthanol résultant de l'utilisation de vernis contenant de l'éthanol.

Objectif 2 b. Utiliser le modèle PPBK validé pour prédire les niveaux d'éthanolémie découlant de l'utilisation de SHA et de vernis lors de simulations représentant, pour les SHA une journée de travail d'une infirmière et, pour le vernis, une exposition lors du vernissage d'une planche de bois de 1m².

**Chapitre 2. Évaluation des niveaux d'éthanolémie résultant de
l'exposition à l'éthanol par inhalation : Études chez des
volontaires et modélisation toxicocinétique.**

2.1. Contribution à l'article

Contribution personnelle :

Ma contribution a été en premier de faire le recrutement des volontaires pour l'étude présentée dans cet article, d'effectuer les séances d'exposition des volontaires, d'analyser l'air dans la chambre d'inhalation, les échantillons sanguins et les échantillons d'air expiré récoltés, en plus d'effectuer la modélisation toxicocinétique à base physiologique. Ma participation, sur l'élaboration de l'article, comprend la recherche bibliographique et la rédaction de l'article.

Contribution de Ginette Charest-Tardif: Sa contribution à l'étude présentée a été d'élaborer la technique analytique pour mesurer l'éthanol dans l'air et dans le sang avec le chromatographe à phase gazeuse. De plus, elle a aussi contribué au bon déroulement des séances d'expositions des volontaires et à l'analyse de l'air dans la chambre d'inhalation et des différents échantillons récoltés. Au niveau de l'article, elle a participé à la correction et à la révision de l'article.

Contribution de Sami Haddad: Sa contribution au niveau du projet de recherche a été la supervision, la gestion, la recherche de financement pour le bon fonctionnement du projet. De plus, monsieur Haddad a été aussi la personne responsable lors des séances d'exposition, en plus de participer à la correction et à la révision de l'article.

Contribution de Robert Tardif: Sa contribution au niveau du projet de recherche a été la supervision, la gestion, la recherche de financement pour le bon fonctionnement du projet. De plus, il a aussi participé à la correction et à la révision de l'article.

2.2. Ethanol toxicokinetics resulting from inhalation exposure in human volunteers and toxicokinetic modeling.

Josée Dumas-Campagna, Robert Tardif, Ginette Charest-Tardif, Sami Haddad

Departement of Environmental and Occupational health, IRSPUM, Université de Montréal,
PO Box 6128, Main station, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Corresponding authors:

Sami Haddad

This is the pre-peer reviewed version of the following article: Ethanol toxicokinetics resulting from inhalation exposure in human volunteers and toxicokinetic modeling, which has been published in final form in the Inhalation Toxicology journal.

2.2.1 Summary

Uncertainty exists regarding the validity of a previously developed physiologically based pharmacokinetic model (PBPK) for inhaled ethanol in humans to predict the blood levels of ethanol (BLE) at low level exposures (<1000 ppm). Thus, the objective of this study is to document the BLE resulting from low levels exposures in order to refine/validate this PBPK model. Human volunteers were exposed to ethanol vapors during 4h at 5 different concentrations (125-1000 ppm), at rest, in an inhalation chamber. Blood and exhaled air were sampled. Also, the impact of light exercise (50W) on the BLE was investigated. There is a linear relationship between the ethanol concentrations in inhaled air and (i) BLE (women: $r^2 = 0.98$ /men: $r^2 = 0.99$), as well as (ii) ethanol concentrations in the exhaled air at end of exposure period (men: $r^2 = 0.99$ /women: $r^2 = 0.99$). Furthermore, the exercise resulted in a net and significant increase of BLE (2-3 folds). Overall, the original model predictions overestimated the BLE for all exposures levels performed in this study. To properly simulate the toxicokinetic data, the model was refined by adding a description of an extrahepatic biotransformation of high affinity and low capacity in the richly perfused tissues compartment. This is based on the observation that total clearance observed at low exposure levels was much greater than liver blood flow. The results of this study will facilitate the refinement of the risk assessment associated with chronic inhalation of low levels of ethanol in the general population and especially among workers.

Keywords: Blood levels of ethanol, inhalation, PBPK modeling, human exposure, occupational and general population

2.2.2. Introduction

Ethanol or ethyl alcohol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) is a colorless liquid, volatile, flammable and miscible with water. It is probably one of the solvents which humans are the most exposed to, with the exception of water (Bruckner and Warren, 2001). Exposures to this agent through the respiratory tract may occur either in the manufacturing of this product, when used in industry, or at home (ANSES, 2013). Indeed, exposure via this route affects several business sectors such as agriculture (vinification and distillation), industrial (solvents) and healthcare (use of hydroalcoholic solutions [HAS]) (ANSES, 2010). Exposure of the general population may be caused to the use of various consumer products containing ethanol such as motor gasoline, HAS, disinfectants, paints, inks and varnishes, cosmetics and perfumes, solvents, etc. (ANSES, 2011). Levels of acute exposure by inhalation in the workplace, measured or estimated, are valued between 50.41 ppm and 159.22 ppm (ANSES, 2010), while those in the general population range from 5 ppm to 402 ppm (ANSES, 2011). Dermal exposure of ethanol is considered to be of no concern since its absorption via this route is very low (ANSES, 2010, Kirsehner et al., 2009).

Risk assessment related to inhalation exposures to ethanol has been carried out, among others, by two expert reports produced by ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) through its "Risk Assessment of ethanol" working Group (GRE). The first report assesses the occupational exposure (ANSES, 2010) while the second assesses the exposure of the general population (ANSES, 2011). The GRE revealed that there was indeed very little information on the risk analysis of this alcohol and limited data pertaining to inhalation exposure.

Consequently, given the absence of adequate data on BLE, the GRE decided to use physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling to predict the BLE under different conditions of exposure by inhalation. These mathematical models describe the mechanical interrelations between pharmacokinetic processes including absorption, distribution, metabolism and elimination based on the physiology of the exposed organism (blood flow, body weight, volume of tissue), the biochemical and physicochemical properties of the compound (Poulin and Theil, 2002). Ultimately the models simulate/predict the kinetics of the contaminant or drug studied in several compartments or body fluids such as blood, and for various exposure scenarios. This approach is increasingly used today for risk analysis to reduce uncertainties associated with different types of extrapolations (e.g., interspecies extrapolation and extrapolation from high doses to low doses) (Krishnan and Andersen, 2001).

The PBPK model that was used in the analysis conducted by the GRE was developed by Schlouch and Tardif (1999), based on an original kinetic modeling study in mice, rats and humans by Pastino et al. (1997). This model adequately described the BLE data reported by Lester and Greenberg (1951). The BLE data in this latter study was obtained from volunteers exposed to high concentrations of ethanol (≥ 8500 ppm) for short periods (a few hours) of controlled exposures. The validation of the PBPK model has therefore been evaluated primarily on its ability to describe the levels of BLE for exposure to high concentrations. Therefore, the question arose as to the ability of the model to predict BLE resulting from exposure to lower levels (e.g., below the permissible limit of 1000 ppm in Canada [1880 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$] called VEMP).

The goals of this study were i) to document the BLE resulting from exposure to relatively low levels of ethanol by inhalation (≤ 1000 ppm) in resting conditions and during a light exercise, and ii) to verify the validity of the previously developed PBPK model (Schlouch and Tardif, 1999) that was validated for high exposures to ethanol. Ultimately this will allow to better assess the BLE resulting from low level ethanol vapour exposure during domestic and professional activities.

2.2.3. Materials and methods

2.2.3.1. Subjects-volunteers

Ten non-smoking adults (five men and five women), aged between 22 and 32 years, with a weight between 62 kg and 75 kg were recruited for this study. Volunteers gave their informed consent to participate in this study, in addition to answering a brief questionnaire about their health. Throughout the study period, the volunteers were instructed not to consume alcohol 48 hours before each of the exposure sessions.

The subjects were exposed to five concentrations of ethanol (125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm and 1000 ppm) in resting conditions during four consecutive hours. Subsequently, they were also exposed to 750 ppm for four hours, while performing an exercise of 50W on an ergonomic bicycle (Life Fitness, World Headquarter, Illinois, USA) (12 min per hour). This bicycle automatically changes the resistance of the pedals depending on the pedaling speed to meet the power of 50W. Blood and exhaled air samples were collected before, during, and

immediately after the end of the exercise period. But only blood sample were collected for the additional exposure.

Thus, the volunteers participated in total in six sessions of exposure. In addition, the sessions of exposure were not in sequential order of concentration. Subjects were continuously monitored during the sessions and the study protocol was approved by the Ethics Committee for Research of Health Sciences (Certificate : No. 11-058-CERSS-P).

2.2.3.2. Chemicals

Ethyl alcohol (anhydrous) (100%) which was used in this study was obtained from Les Alcools de Commerce Inc (Chatham, Canada). The primary standard ethyl alcohol 100% V/V (Sandoz Inc., Boucherville, Canada) was used to prepare the calibration curves for the analysis of blood samples and exhaled air. Isobutanol (2-Methyl-1-propanol) (99% purity) from Sigma-Aldrich was used as internal standard.

2.2.3.3. Exposure chamber

Exposures of volunteers to ethanol vapors were carried out in an 18 m³ inhalation chamber which is located at the inhalation laboratory of the department of environmental and occupational health of the Université de Montréal. The circulation of air in the chamber is provided by a purified air inlet diffused by the ceiling at a rate of 5.34 m³.min⁻¹. To generate ethanol vapors in the atmosphere of the room, liquid ethanol was pumped, using an HPLC pump (Varian 2510), in a round-bottom flask located upstream of the chamber inlet. There, the solvent is volatilized into the stream of pressurized air (Tardif et al., 2004).

Ethanol concentrations in the ambient air of the chamber during the exposures were monitored by two separate and independent systems. The first is a gas chromatograph (GC) Varian CP-3800 with flame ionization detector (FID) coupled with an automatic injection system for volatile compounds including an electric valve and a pneumatic injection loop (1 ml volume). The column used was an HP1 (30 m x 0.53 mm x 1.0 µm film thickness) (Agilent Tech, Canada). A temperature gradient of 40°C to 75°C with an increase of 20°C/min was applied. The final temperature of the ramp (75°C) was maintained for 0.25 min. The temperature of the injection port and detector were set respectively at 110°C and 250°C. The retention time of ethanol was 1.14 minutes. A minimum of 14 samples was performed every hour during the exposure session. The calibration was made using gas standards prepared in Tedlar bags (Integra Environmental, Burlington, Ontario).

The other system used to monitor ethanol vapors was an infrared spectrophotometer (Miran 205B Series SapphIRe). This instrument continuously measured the concentrations of ethanol in the exposure chamber (Tardif et al., 2004).

2.2.3.4. Blood and exhaled air samples

For each subject, a total of six blood samples were collected during each session using a catheter (BD Insyte Autoguard 20 GA) which has been installed by a nurse. The first blood sample was drawn before the beginning of each exposure sessions (time 0), followed by five others collected at 1h, 3h, 4h, 4.5h and 5h after the start of a 4h exposure. The blood was collected in 10 ml tubes (BD Vacutainer tubes with Sodium Fluoride/Potassium Oxalate 100mg/20mg).

Samples of exhaled air were collected in 3 L Tedlar bags. The maximum pulmonary capacity of each subject had previously been measured with a wet test meter. The last liter of air representing the exhaled air was collected for analysis (Tardif et al., 2004). These air samples were measured by GC-FID using the same method for the analysis of ambient air.

2.2.3.5. Measurement of ethanol in the blood

Blood ethanol was measured by gas chromatography (GC) (CP-3800, Varian) with a flame ionization detection (FID) coupled with headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME) injection technique (autosampler Combi-PAL, CTC Analytics). In a 10 ml headspace vial, a solution of 2-methyl-1-propanol (isobutanol) (internal standard) diluted in a saturated solution of sodium chloride was added to 500 μ l of blood samples. The vials were then sealed, pre-incubated and shaken at 40°C for five minutes. Ethanol extraction was then performed using a fiber of 85 μ m Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) exposed for 5 minutes, at 40°C, before desorption into the injection port of the gas chromatograph.

For the blood analysis, the flow of carrier gas (He) in the column [DB WAX, 30 m (L) ; 0.53 mm (ID) ; 1.0 μ m thick film] was kept constant at 6.8 ml.min⁻¹. The column temperature was initially set at 55°C for 4.5 min, followed by an increase of 15°C/min up to 70°C, an another ramp of 25°C/min up to 100°C was performed and temperature was held for 1.5 min. The temperature of the injector and detector were respectively of 300°C and 250°C. The injections were in splitless mode in a liner of reduced diameter. The retention times were 3.06 min for ethanol and 5.88 min for isobutanol (internal standard).

Stock standard solution of ethanol was prepared at a concentration of 7.89 mg.ml⁻¹ in methanol and stored in glass stoppered bottles at 4°C. For each session, intermediate standard solution and working solution were prepared in methanol. The calibration curves (0.1 to 4.73 m.L⁻¹) were prepared by spiking a known amount of working solutions in control blood. The detection limit of this method is 0.019 mg.L⁻¹.

2.2.3.6. Calculation of the rate of the total extraction of ethanol

The formula used to calculate the total extraction (E) was developed from the following equations modified from Pelekis et al. (1997) where metabolism is not assumed to be only restricted to the liver compartment:

$$C_{vss} = C_{ass}(1 - E) \quad (1)$$

$$C_{ass} = \frac{C_i}{1/P_b + E} \quad (2)$$

where:

C_{vss} = venous blood concentration at steady state

C_{ass} = arterial concentration at steady state

E = extraction ratio of ethanol

C_i = concentration inhaled

P_b = blood/air partition coefficient of ethanol

Based on equations 1 and 2, the extraction of ethanol can be calculated with the following formula:

$$E = \frac{C_i - \frac{C_{vss}}{P_b}}{C_i + C_{vss}} \quad (3)$$

2.2.3.7. Statistical analysis

T-tests were performed in this study to determine if there were i) significant differences of BLE between men and women, ii) any gender differences in the ratio between the concentrations in the exhaled air and the exposure concentrations, iii) increases of blood concentrations following the application of a physical exercise and the relationship between BLE at 50W and at rest. The nonparametric Mann-Whitney test was used to determine sure if there was a significant difference between the genders in the percentage of ethanol absorbed by inhalation. These tests were performed using the statistical analysis software SPSS (version 17.0). The level of significance was set at $P < 0.05$.

2.2.3.8. Validation of the physiologically based pharmacokinetic model (PBPK)

The PBPK model developed by Schlouch and Tardif (1999) comprised five compartments namely the brain, fat tissue, liver, richly perfused tissues and poorly perfused tissues. Ninety-one percent of the total body mass is represented by tissue compartments (i.e., irrigated tissues). The remaining 9 % of body mass (i.e., tissues such as bones, nails, hair, cartilage and teeth, etc) is not taken into account because of its weak influence on the kinetics of ethanol (Schlouch and Tardif, 1999). Figure 1 depicts the conceptual representation of the PBPK

model. Parameter values for this model are presented in Table 1 and are taken from the report published by ANSES (2010).

Validation of PBPK model of Schlouch and Tardif (1999) was performed by comparing the model predictions with data obtained from the volunteer exposure part of this study. These predictions were performed by taking into account the exposure conditions of volunteers in the inhalation chamber. PBPK model predictions were performed using the acslX software (AEgis Technologies Group, Inc.).

2.2.4. Results

2.2.4.1. Blood level of ethanol (BLE)

Figure 2 shows the average blood ethanol concentrations measured during each session of exposure in men and women. In all cases, the maximum concentration (steady state) was reached during the first hour of exposure. Also, the results show that there is a linear relationship between the average levels of BLE measured at steady state and the exposure concentrations (women: $r^2= 0.98$ /men: $r^2=0.99$) (Not shown). For example, levels of BLE measured at the end of exposure to 1000 ppm, in men and women, are 3.0 and 2.7 mg.L⁻¹, respectively (difference not significant). One hour after the end of exposure (five hours), levels were back down to relatively low levels to be 0.25 mg.L⁻¹ (men) and 0.14 mg.L⁻¹ (women) (difference not significant). The set of values of BLE (mean \pm standard deviation) is presented in Tables 2 and 3.

Table 4 gives the values of the total extraction ratio (E) of ethanol. These were calculated from BLE data obtained from the subjects. The percentage of E of this alcohol is 60% for the lowest exposure concentration (125 ppm) and this percentage decreases with the increases of the exposure concentrations to reach 40% for exposure to 1000ppm.

2.2.4.2. Ethanol in the alveolar air

Ethanol concentrations measured in the exhaled air are presented in Figures 3 and 4. Just as in the case of blood concentrations, there is also a very good linear relationship between the

average concentrations in exhaled air at steady state and the exposure concentrations ($r^2=0.99$ for men; $r^2= 0.99$ for women) (Not shown). However, the measured values for women are significantly higher than men (approximately 20%) after four hours of exposure to the target concentration of 1000 ppm. Indeed, the average ratios between the concentrations of ethanol in the exhaled air and the exposure concentrations for men and women, are 0.18 ± 0.01 and 0.22 ± 0.01 ($p = 0.03$) respectively. The men were exposed to a slightly higher average concentration of about 6% (1050 ppm) compared to women (992 ppm).

2.2.4.3. Impact of physical activity (aerobic)

Exposure to 750 ppm coupled with a light exercise on a stationary bicycling (50W) during 12 minutes per hour caused a significant increase (of 3 times) in the BLE in all subjects (Figures 5 and 6), and across the sampling period. The increase in ratios was higher in women compared to men. For instance, the level of BLE measured after four hours of exposure increased three-fold in women, $1.63 \pm 0.39 \text{ mg.L}^{-1}$ to $4.81 \pm 1.57 \text{ mg.L}^{-1}$, and twice in men, $2.08 \pm 0.47 \text{ mg.L}^{-1}$ to $4.17 \pm 1.01 \text{ mg.L}^{-1}$. Indeed, the relationship between BLE at 50W and rest is significantly different between men and women for the first hour of exposure (p value = 0.024) and third (p value = 0.019), but not for the fourth hour of exposure (p value = 0.164).

2.2.4.4. Modeling

The BLE measured values (M) in volunteers for various ethanol concentrations are presented in Table 5. The predicted values (P) by the PBPK model, adjusted for the weight of the volunteers [men: 75 kg/ women: 62 kg] were also determined. The values of the PBPK model parameters used in the original risk analysis (ANSES, 2010, ANSES, 2011) are presented in

Table 1. Note that for the original model, the metabolism is limited to liver tissue and is described by a Michaelis-Menten process of low affinity (K_m) and of high capacity (V_{max}). The results show that this model overestimates the measured BLE in volunteers (Ratio P/M > 1) and that the magnitude of this overestimation is inversely correlated with the level of exposure (not shown). That is to say, the ratio decreases when the exposure concentration increases among both women and men. For example, in men, the ratio (P/M) ranges between 2.58 (1000 ppm) and 4.95 (125 ppm), while for women the values range between 2.77 (1000 ppm) and 4.69 (125 ppm). Figures 7 A and 8 A illustrate the difference between the predicted model (Schlouch and Tardif, 1999) and the experimental values obtained during exposure to various concentrations. It was estimated that the levels of exposure, at which the prediction error would be negligible, are approximately 2616 ppm ($4918 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) for women and 2300 ppm ($4350 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) in men (not shown).

To eliminate the error in prediction at low exposure concentrations, adjustments were made to the PBPK model of Schlouch and Tardif (1999). The modification consisted in adding extra-hepatic metabolism of low capacity and high affinity located in the richly perfused tissues (Figure 1). Figures 7 B and 8 B show the improvement of model predictions due to the addition of this extra-hepatic metabolism. In addition, these figures clearly show that the predictions of the modified model are consistent with the kinetics of BLE volunteers for different exposure conditions. The values of V_{max} and K_m (see Table 1) used to describe this process were produced by optimization using simulation software ACSL from BLE data measured in volunteers.

2.2.5. Discussion

The PBPK model of Schlouch and Tardif (1999) describes the BLE in humans for exposures to high concentrations (> 5000 ppm). However, to validate this model at exposure to low concentrations (≤ 1000 ppm), it was necessary to obtain appropriate kinetic data. Hence, this study generated human BLE for exposure concentrations below 1000 ppm under controlled laboratory conditions (Table 2 and 3). The blood concentrations obtained at 1000 ppm in men and women are similar to those previously measured in a another study by our group on five men exposed for six hours at that concentration: 3.00 mg.L^{-1} after three hours, and 4.43 mg.L^{-1} at the end of six hours of exposure (Nadeau et al., 2003).

Furthermore, the measured values of ethanol in exhaled air in this study are also consistent with those found in two of our previous studies. In the first study Nadeau et al. (2003), the average concentration measured after three hours of exposure was and ranged from $241 (\pm 21.5)$ ppm to $249 (\pm 28.4)$ (in five men) compared to $193 (\pm 18.4)$ ppm for men and $223 (\pm 32.23)$ ppm for women in the present study. In the second study of Tardif et al. (2004), the average concentration measured after four hours of exposure to 1000 ppm was $229 (\pm 18.2)$ ppm (three men and two women).

Our results also confirm the results obtained by Nadeau et al. (2003), and by Tardif et al. (2004) that suggested an absorbed fraction of ethanol of about 70 to 80% which is a value higher than it is generally recognized (approximately 62%) and which is reported by Lester and Greenberg (1951). It is important to note however that in their study, these authors had

exposed volunteers to much higher ethanol concentrations which ranged from 5850 ppm to 10265 ppm. This suggests the existence a non-linear process affecting the value of the fraction absorbed by the inhalation route.

Regarding the relationship between ethanol concentrations in exhaled air and exposure concentrations, women have a significantly higher exhaled: inhaled air ratio than do men for the last hour of exposure to the target concentration of 1000 ppm. However, to our knowledge there is no indication of such an observation in the literature. This gender difference led us to postulate that women have a lower blood:air partition coefficient than men as they will absorb 78% of the concentration at which they are exposed versus 82% for men (p-value = 0.28). However, our results are inconsistent with what Jones (1983) reported. Indeed, this author reported that women have a blood:air partition coefficient higher than men due to the fact that the blood:air partition coefficient is highly correlated with the difference in water content in the blood and that there is a systematic difference for the water content between the sexes (men<women) of about 2%.

However, another hypothesis may explain the difference between women and men. This is the effect of respiratory minute volume on the principal of « Wash-In » « Wash-Out » for ethanol. The « Wash-In » « Wash-Out » concept is applied for polar solvents and can be separated in two phases. First, the solvent will be dissolved into the respiratory airways and lung mucus during inhalation, which is « Wash-In » part. The second phase (« Wash-Out ») implies that the polar solvent desorbs during exhalation from the respiratory airway and lung mucus to be exhaled from the lungs. The effect of this phenomenon is that less of the polar solvent will be

absorbed than anticipated based on its blood:air partition coefficient value (Fisher et al., 2000). Indeed, women have theoretically lower respiratory minute volume of approximately 30% compared to men at rest (Nigel and Groeller, 2008). This may be an avenue to investigate or to explain this gender difference in exhaled: inhaled air ratio.

It is well known that the impact of the physical activity can in some cases enhance the absorption of certain solvents (Nadeau et al., 2006, Tardif et al., 2007b, Truchon et al., 2009). This increased absorption is mainly due to certain physiological changes associated with effort such as increased cardiac output and increased pulmonary ventilation. A rise in cardiac output increases the blood's ability to transport the solvent in the body, while a rise in pulmonary ventilation increases the circulation of vapors into the lungs (Löf and Johanson, 1998). Changes in pulmonary ventilation particularly affect the absorption of solvents soluble in blood, while changes in cardiac output modify the absorption of solvents that are less soluble in blood (Löf and Johanson, 1998). Ethanol is very soluble in blood, as it has a high blood:air partition coefficient (i.e., 2280) (Schlouch and Tardif, 1999). Subsequently, it is the pulmonary ventilation which is the limiting factor for the absorption of ethanol (Truchon et al., 2012, Löf and Johanson, 1998). Nevertheless, the increase in pulmonary ventilation due to exercise cannot explain the increase in blood levels (rest vs exercise), because steady-state is already attained before the end of the first hour of exposure. Therefore, the equation 3 indicates that only the partition coefficient or the extraction may cause a variation in blood concentration. However, the blood:air partition coefficient does not change based on exercise since this constant depends solely on the solubility of the molecule in these two phases, hence an increase in ventilation rate or blood circulation has no impact (Stellman, 2000).

The most plausible explanation for the increase in blood level during exercise is therefore a decrease in the extraction of ethanol. This may be explained by a change in the distribution of blood flow to various organs of the body. More precisely, the application of physical exercise causes a decrease in blood flow to the splanchnic organs which include the liver, gastrointestinal tract, spleen and pancreas to be redirected to the muscles. In fact, while lying down (resting), the blood flow going to the splanchnic organs is approximately $1500 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and when a human is severely stressed, the blood circulation in these organs drops by about 80% reaching $300 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Rowell, 1986). This change in the distribution of blood flow thus causes a decrease in the metabolism of ethanol by the diversion of blood flow to splanchnic tissues (i.e., equivalent to liver and richly perfused tissues compartments) towards the muscles (i.e., poorly perfused tissues). It will thus causes an increase in BLE (Rippe, 2011). As shown by the data obtained, the extraction ratio effectively decreased from 40 to 47% for the exposition with exercise. This shows that the general metabolism is decreased with the application of exercise (50W) and probably by the change in the distribution of blood flow from the splanchnic tissues towards the muscles (Rippe, 2011).

This study demonstrated that the application of a 12 min per hour workload of 50 W on a stationary bicycle during the exposure to 750 ppm caused in all subjects a significant increase (i.e., 2-fold in men and 3-fold in women) of BLE measured at the end of the exercise compared to the values measured at rest. The impact of exercise (50W) is similar to that observed for other solvents (toluene, styrene, acetone and trichloroethylene) (Nadeau et al., 2006, Tardif et al., 2007a, Truchon et al., 2009). Additionally, a difference between women

and men for the ratio BLE (50W)/BLE (rest) was observed. A possible explanation for this gender difference could be that women have a metabolism of ethanol lower than men. However, Mumenthaler et al. (1999) have found in their literature review that women eliminate more ethanol per volume of blood per hour than men, thus rendering this hypothesis improbable. We did not find any conclusive information in the literature to explain the difference observed between genders. Finally, the results obtained clearly show that exercise or an increase of the level of workload can, depending on the duration and intensity, result in a significant increase in the internal dose and possibly of the level of risk to health, even for exposures that meet the standards (VEMP).

The simulations indicate that the model that was used in the ethanol risk assessments (ANSES, 2010, ANSES, 2011) overestimates the BLE when the exposure concentration is less than 2616 ppm (4918 mg/m³) in women and 2300 ppm (4350 mg/m³) in men. This original model was validated by only using the only available BLE data from Lester and Greenberg (1951) measured in volunteers exposed to very high ambient concentrations of ethanol (≥ 8500 ppm). This model does not describe accurately the kinetics of ethanol for exposure to lower levels (≤ 1000 ppm). The hypothesis that we propose to justify this gap is the one involving the extrahepatic metabolism of ethanol. Indeed, in the original model, the metabolism of ethanol is limited to the liver (hepatic metabolism), as it is often the case in PBPK modeling, and therefore the metabolism is described using a saturable rate of metabolism with a Vmax and a Km. However, as shown by the data obtained, the elimination of ethanol cannot be restricted to the liver compartment since the extraction ratio is 40 to 60% of cardiac output depending on the exposure concentration (Table 4). Knowing that the blood flow to the liver is equivalent to

25% of the cardiac output, a maximal hepatic elimination (i.e., an hepatic extraction ratio of 1) would obviously yield a total extraction ratio no greater than 25% if metabolism were restricted to the liver. Thus, our results strongly suggest that there is a significant extra-hepatic extraction of ethanol at low exposure concentrations and that this becomes negligible at high exposure levels (as in Lester and Greenberg, 1951). Numerous studies on the metabolism of ethanol have actually shown that several enzymes (alcohol dehydrogenases, cytochrome 2E1, catalase) or isoforms of the same enzyme (e.g., ADH1 to ADH6) are involved in the metabolism of ethanol in humans and that these are present at various levels in thirty body tissues (Crabb and Liangpunsakul, 2007). It is therefore more than likely that, at low exposure concentrations, other tissues become significantly involved in the clearance of ethanol in humans.

The original model has been modified to include extra-hepatic biotransformation of high affinity and low capacity, that is associated with richly perfused tissues (e.g, lungs, stomach, ...) (Table 1). Such a metabolic process of high affinity/low capacity has generally a relatively large impact on the amount metabolized when circulating levels are low (e.g, as in the present study) and much less when concentrations are high (such as in Lester and Greenberg (1951)) due to a saturation of the process at high concentrations. Figures 7B at 8B clearly indicate that the addition of such an element of extra-hepatic metabolism can adequately describe the kinetics of BLE for exposures to concentrations below 1000 ppm. Furthermore, the simulation of the BLE by the PBPK model differ only by 1.5 % for men and 4% for women, when the simulation are performed for an average individual [men: 70kg/ women: 55kg]. Optimized V_{max} and K_m are given in Table 1 and the K_m is in the same range as the ADH2 enzyme that

is reported to be in the lungs according to INSERM (1999). In conclusion, the addition of such an element of extra-hepatic metabolism associated with the richly perfused tissues allows the PBPK model to better predict the BLE following low and high level exposures to ethanol.

2.2.5. Conclusion

This is the only study, to our knowledge, to document the levels of ethanol in the blood and in exhaled air in volunteers (men and women) for a variety of exposure concentrations ranging from 125 ppm to 1000 ppm under controlled conditions in a laboratory. This study showed that physical activity (workload) even at a moderate level causes a significant increase (two to three times) of BLE and internal dose. By using PBPK modeling we showed that the contribution of an extra-hepatic metabolic pathway is significant at low levels of exposure, and adequately predicted/described the BLE for exposures to concentrations ranging from 125 ppm to 8500 ppm. Finally, the results of this study will not only refine the PBPK model by incorporating exercise into its parameters, but also the assessment of the risk associated with chronic inhalation of low levels of ethanol in the general population and especially among workers.

2.2.7. Acknowledgements

We are grateful to Lyly St-Jean for her nursing care, as well as all the volunteers for their precious contribution. We are grateful to the National Agency for Food Safety, Environment and Work (ANSES) for its funding and support.

2.2.8. Declaration of interest

The authors report no existing potential conflicts of interest.

2.2.9. Bibliography

- ANSES 2010. Évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle. France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail.
- ANSES 2011. Évaluation des risques de l'éthanol pour la population générale. Anses Éditions ed. France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- ANSES. 2013. *Assessing the Risks of Ethanol* [Online]. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Available: <http://www.anses.fr/en/content/assessing-risks-ethanol> [Accessed 30/03/2013 2013].
- BRUCKNER, J. V. & WARREN, D. A. 2001. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLASSEN, C. D. (ed.) *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6 ed. New York: McGraw-Hill, p. 869-916
- CARTER, M. A. & BERNSTEIN, E. 2005. Change in mental status: acute and chronic alcohol intoxication. In: MITCHELL, E. L. & MEDZON, R. (eds.) *Introduction to Emergency Medicine*. Baltimore, USA: Lippincott Williams and Wilkins, p. 268-269
- CRABB, D. & LIANGPUNSAKUL, S. 2007. Acetaldehyde generating enzyme systems: roles of alcohol dehydrogenase, CYP2E1 and catalase, and speculations on the role of other enzymes and processes. *Novartis Found Symp*, 285, 4-16; discussion 16-22, 198-9.
- DUBOWSKI, K. 1979. The blood/breath ratio of ethanol. *Clinical Chemistry*, 25, 1144.
- INSERM 1999. Ethers glycol: Quels risques pour la santé? In: INSERM, L. É. (ed.). Paris: Institut national de la santé et de la recherche médicale.
- JONES, A. 1983. Determination of liquid/air partition coefficients for dilute solutions of ethanol in water, whole blood, and plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 7, 193-197.
- KANEKO, T., WANG, P. Y. & SATO, A. 1994. Partition coefficients of some acetate esters and alcohols in water, blood, olive oil, and rat tissues. *Occup Environ Med*, 51, 68-72.
- KIRSEHNER, M. H., LANG, R. A., BREUER, B., BREUER, M., GRONOVER, C. S., ZWINGERS, T., BÖTTRICH, J. G., ARNDT, A., BRAUER, U., HINTZPETER, M., BURMEISTER, M.-A. & FAUTECK, J.-D. 2009. Transdermal resorption of an ethanol and 2-propanol-containing skin disinfectant. *Langenbecks Arch Surg*, 394, 151-157.
- KRISHNAN, K. & ANDERSEN, M. E. 2001. Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology. In: HAYES, W. (ed.) *Principles and methods of toxicology*. Fourth edition ed. Philadelphia: Taylor and Francis, p. 193-242
- LESTER, D. & GREENBERG, L. 1951. The inhalation of ethyl alcohol by man. I Industrial hygiene and medicolegal aspects. II Individuals treated with tetraethylthiuram disulfide *Quarterly Journal of Studies on Alcohol* 12, 167-178
- LÖF, A. & JOHANSON, G. 1998. Toxicokinetics of organic solvents: a review of modifying factors. *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 571-650.
- MUMENTHALER, M., TAYLOR, J., O'HARA, R. & YESAVAGE, J. 1999. Gender differences in moderate drinking effects. *Alcohol Research & Health*, 23, 55-64.

- NADEAU, V., LAMOUREUX, D., BEUTER, A., CHARBONNEAU, M. & TARDIF, R. 2003. Neuromotor effects of acute ethanol inhalation exposure in humans: a preliminary study. *J Occup Health*, 45, 215-22.
- NADEAU, V., TRUCHON, G., BROCHU, M. & TARDIF, R. 2006. Effect of physical exertion on the biological monitoring of exposure of various solvents following exposure by inhalation in human volunteers: I. Toluene. *J Occup Environ Hyg*, 3, 481-489.
- NIGEL, A. S. T. & GROELLER, H. 2008. *Physiological bases of human performance during work and exercise*, Churchill Livingstone/Elsevier, p. 608
- PASTINO, G., ASGHARIAN, B., ROBERTS, K., MEDINSKY, M. & BOND, J. 1997. A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicology and applied pharmacology* 145, 147–157.
- PELEKIS, M., KREWSKI, D. & KRISHNAN, K. 1997. Physiologically based algebraic expressions for predicting steady-state toxicokinetics of inhaled vapors. *Toxicology Methods*, 7, 205-225.
- POULIN, P. & THEIL, F.-P. 2002. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *Journal of pharmaceutical science* 91, 1358-1370.
- RIPPE, J. 2011. *Encyclopedia of lifestyle medicine and health*, London, Sage Publications, Inc, p. 1296
- ROWELL, L. B. 1986. *Human circulation regulation during physical stress*, New York, Oxford University Press, p 416
- SCHLOUCH, E. & TARDIF, R. 1999. Modélisation toxicocinétique de l'exposition à l'éthanol. Montreal: Université de Montréal.
- STELLMAN, J. M. 2000. *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*, France, Organisation international du Travail, p.4838
- TARDIF, R., CHAREST-TARDIF, G., TRUCHON, G. & BROCHU, M. 2007. Influence de la charge de travail sur les indicateurs biologiques d'exposition de cinq solvants. *Études et recherches / Rapport*. Montreal: IRSST.
- TARDIF, R., LIU, L. & RAIZENNE, M. 2004. Exhaled ethanol and acetaldehyde in human subjects exposed to low levels of ethanol. *Inhalation Toxicology*, 16, 203–207.
- TARDIF, R., NADEAU, V., TRUCHON, G. & BROCHU, M. 2007. Effect of physical exertion on the biological monitoring of exposure to various solvents following exposure by inhalation in human volunteers: II. n-Hexane. *J Occup Environ Hyg*, 4, 502-8; quiz D68-9.
- TRUCHON, G., BROCHU, M. & TARDIF, R. 2009. Effect of physical exertion on the biological monitoring of exposure to various solvents following exposure by inhalation in human volunteers: III. Styrene. *J Occup Environ Hyg*, 6, 460-467.
- TRUCHON, G., TARDIF, R., LAVOUÉ, J., DROLET, D., LÉVESQUE, M. & BOUCHER, J. 2012. Guide de surveillance biologique de l'exposition - Stratégie de prélèvement et interprétation des résultats. *Études et recherches / Guide technique*. 7e édition ed. Montreal: Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.

2.2.10. Tables and figures

Table 1: PBPK model parameters for ethanol

Parameters	Abbreviation	Values
Physiological parameters		
Body weight (kg)	BW	70
Cardiac output (l/h/kg) ^a	QCc	18
Alveolar flow (l/h/kg) ^a	QALVc	18
<i>Fraction of the cardiac output to each of the compartments</i>		
Fat	QFc	0.05
Liver	QLc	0.25
Richly perfused	QRc	0.39
Poorly perfused	QPc	0.19
Brain	QBRc	0.12
<i>Volume fraction of body compartments</i>		
Fat	VFc	0.213
Liver	VLc	0.0257
Richly perfused	VRc	0.0443
Poorly perfused	VPc	0.607
Brain	VBRc	0.02
Physicochemical parameters		
Absorbed fraction	FA	0.62
Partition coefficients		
Blood : air	PB	2280 ⁺
Fat : air	PFa	226 [*]
Liver : air	PLa	1730 [*]
Richly perfused : air	PRa	2030 [*]
Poorly perfused: air	PPa	1710 [*]
Brain : air	PBRa	1870 [*]
Metabolic parameters		
Maximal rate in the liver (mg/h/kg) ^b	VMAX1c	359.5
Affinity constant in the liver (mg/L)	Km1	82.1
Maximal rate in the richly perfused tissues (mg/h/kg) ^b	VMAX2c	12.9
Affinity constant for richly perfused tissues (mg/L)	Km2	0.81

a Values are scaled during simulation by multiplying by $BW^{0.70}$

b Values are scaled during simulation by multiplying by $BW^{0.75}$

+ (Dubowski, 1979); *(Kaneko et al., 1994)

Table 2: The average blood levels of ethanol values obtained in men for different exposure scenarios.

Time (hours)	Average BLE ¹ (mg.L ⁻¹) ²					
	126 ± 3.5 ppm	249 ± 8.9 ppm	497 ± 8.1 ppm	755 ± 26.9 ppm	750 ± 12.8 ppm	1050 ± 27.8 ppm
	(Rest)	(Rest)	(Rest)	(Rest)	(50W)	(Rest)
0	0,036 ±0,007	0.044 ±0.005	0.058 ±0.009	0.066 ±0.015	0.054 ±0.003	0.135 ±0.027
1.0	0.163 ±0.027	0.491 ±0.110	0.846 ±0.214	1.789 ±0.472	3.950 ±0.413	2.802 ±0.730
3.0	0.195 ±0.051	0.458 ±0.077	0.919 ±0.245	1.864 ±0.580	4.293 ±0.938	2.504 ±0.504
4.0	0.184 ±0.034	0.460 ±0.113	1.011 ±0.296	2.076 ±0.473	4.168 ±1.013	2.987 ±0.625
4.5	0.065 ±0.023	0.105 ±0.013	0.202 ±0.094	0.303 ±0.149	N/A	0.574 ±0.248
5.0	0.041 ±0.011	0.069 ±0.028	0.103 ±0.040	0.155 ±0.104	0.197 ±0.124	0.249 ±0.162

¹ BLE: the blood levels of ethanol

²mean ± standard deviation

Table 3: The average blood levels of ethanol values obtained in women for different exposure scenarios.

Time (hours)	Average BLE ¹ (mg.L ⁻¹) ²					
	126 ± 14.2 ppm (Rest)	267 ± 48.8 ppm (Rest)	495 ± 20.2 ppm (Rest)	749 ± 11.8 ppm (Rest)	745 ± 10.8 ppm (50W)	992 ± 17.6 ppm (Rest)
0	0,038 ±0,003	0,082 ±0,041	0,052 ±0,005	0,061 ±0,013	0,025 ±0,019	0,071 ±0,008
1.0	0,167 ±0,042	0,385 ±0,126	0,868 ±0,184	1,434 ±0,377	4,913 ±1,442	2,275 ±0,527
3.0	0,159 ±0,030	0,465 ±0,128	0,997 ±0,141	1,525 ±0,299	4,467 ±0,495	2,333 ±0,875
4.0	0,196 ±0,050	0,469 ±0,115	1,100 ±0,235	1,633 ±0,393	4,808 ±1,573	2,661 ±0,644
4.5	0,061 ±0,024	0,099 ±0,023	0,159 ±0,043	0,229 ±0,106	N/A	0,267 ±0,104
5.0	0,043 ±0,015	0,077 ±0,011	0,113 ±0,032	0,095 ±0,026	0,098 ±0,050	0,141 ±0,034

¹ BLE: the blood levels of ethanol

²mean ± standard deviation

Table 4: Values of the total extraction ratio of ethanol obtained from men and women during a 4 h exposure to different exposure concentrations.

Time (hours)	Total extraction ratio ¹											
	125 ppm		250 ppm		500 ppm		750 ppm		1000 ppm		750 ppm (50W)	
	Men	Women	Men	Women	Men	Women	Men	Women	Men	Women	Men	Women
1	0.593	0.587	0.488	0.566	0.525	0.518	0.443	0.496	0.414	0.451	0.263	0.222
3	0.550	0.599	0.506	0.520	0.504	0.483	0.433	0.480	0.441	0.445	0.247	0.239
4	0.564	0.547	0.504	0.517	0.480	0.459	0.407	0.463	0.398	0.412	0.253	0.226

¹ Estimated using equation 3.

Table 5: Comparison between the blood levels of ethanol measured in volunteers and predicted blood ethanol by the PBPK model for different scenarios after four hours of exposure to 1000 ppm.

Exposure (ppm)	Measured values (M) (mg.L ⁻¹)		Predicted values (P) (mg.L ⁻¹)		Ratio (P/M)	
	Men	Women	Men	Women	Men	Women
125	0.18	0.20	0.91	0.92	4.95	4.96
250	0.46	0.47	1.79	1.95	3.89	4.16
500	1.01	1.10	3.60	3.63	3.56	3.30
750	2.08	1.70	5.51	5.53	2.65	3.26
1000	2.99	2.66	7.71	7.37	2.58	2.77

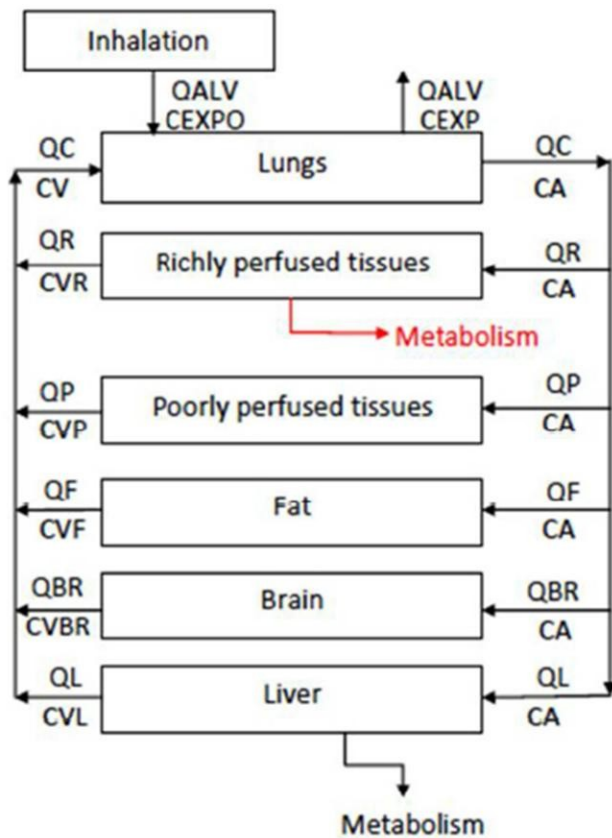


Figure 1. Conceptual representation of the human PBPK model for ethanol based on the original model from Schlouch et Tardif (1999). Metabolism in the richly perfused compartment is an addition from this study. The input into the system comes from the product of inhaled concentration (CI) and alveolar ventilation rate (QALV). The resulting arterial concentration (CA) reaches tissues with their corresponding blood flows: richly perfused tissues (QR), poorly perfused tissues (QP), fat (QF), brain (QBR), liver (QL). The chemical leaves tissues with their corresponding blood flows and venous blood leaving tissues: richly perfused tissues (CVR), poorly perfused tissues (CVP), fat (CVF), brain (CVBR), liver (CVL). The chemical in pooled venous blood (CV) reaches the lungs where a chemical loss occurs via the concentration in exhaled air (CEXP).

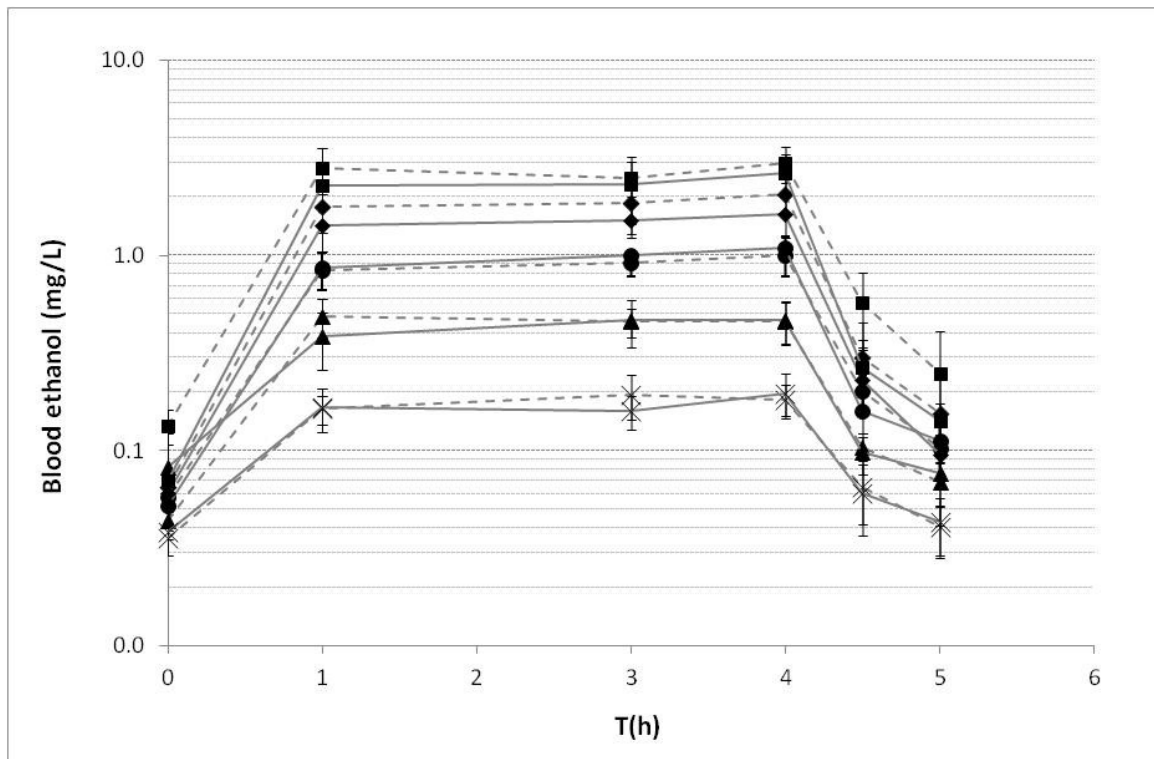


Figure 2. Blood kinetics of ethanol in blood in women (full line) and men (dotted line) (mean \pm standard deviation) volunteers during 4-hr exposure to different concentrations of ethanol vapor (125 ppm: X, 250 ppm: ▲, 450 ppm: ●, 750 ppm: ◆, 1000 ppm: ■).

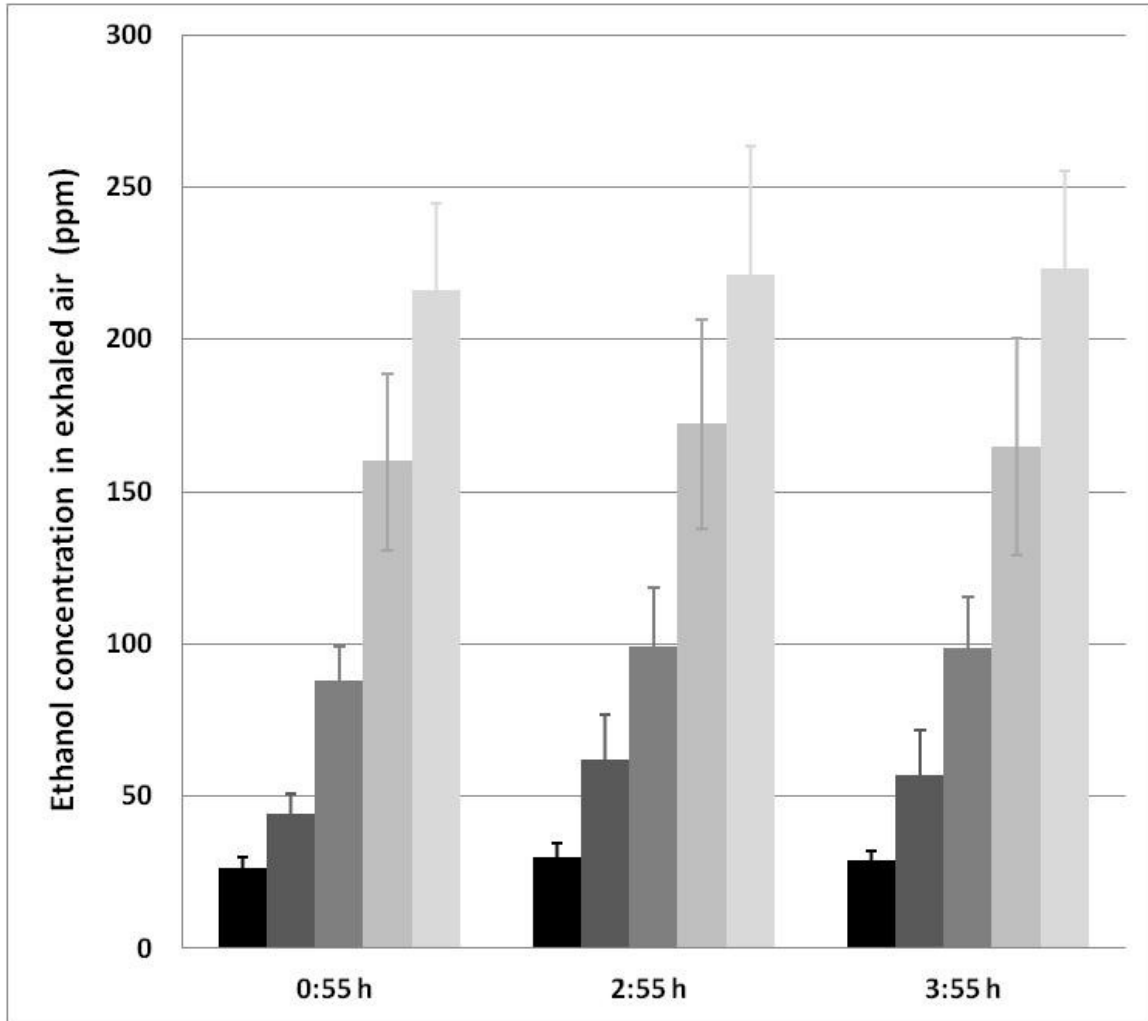


Figure 3. Exhaled air concentrations of ethanol measured in women at different time points during a 4 h exposure to concentrations of ethanol vapor of 125 ppm (black), 250 ppm (dark gray), 450 ppm (gray), 750 ppm (light gray), and 1000 ppm (very light gray).

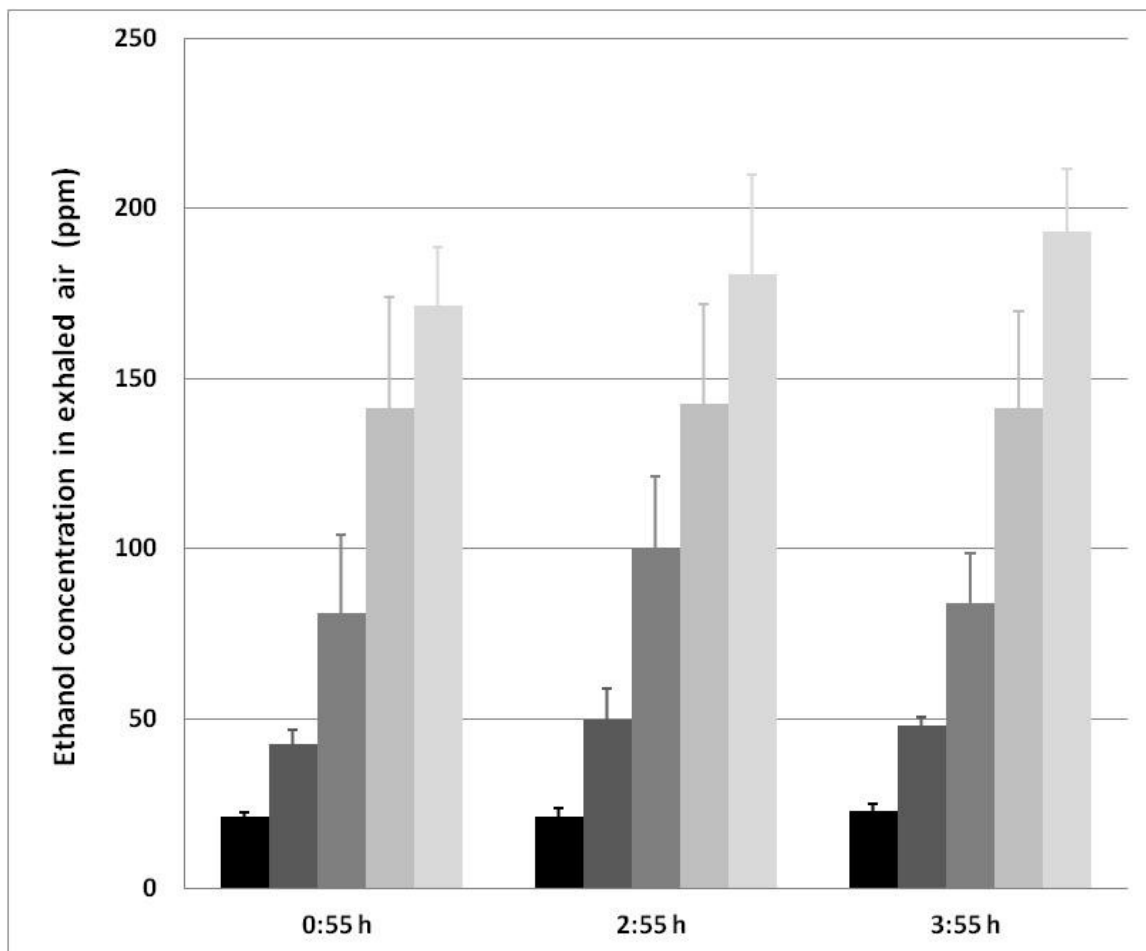


Figure 4. Exhaled air concentrations of ethanol measured in men at different time points during a 4 h exposure to concentrations of ethanol vapor of 125 ppm (black), 250 ppm (dark gray), 450 ppm (gray), 750 ppm (light gray), and 1000 ppm (very light gray).

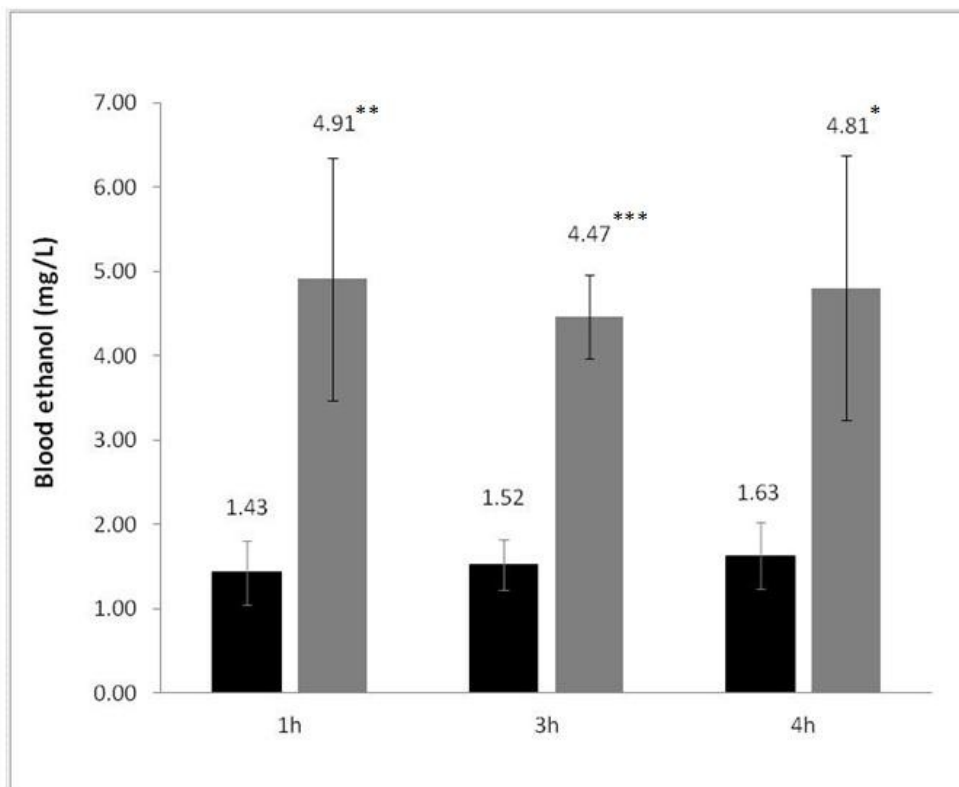


Figure 5. Comparison of blood ethanol concentrations during resting state (black bar) and while performing physical activity (gray bar) (50W × 12 minutes per hour) after 1, 3 and 4 h exposure to 750 ppm in female volunteers. * p-value < 0.005; ** p-value < 0.001;*** p-value < 0.0001

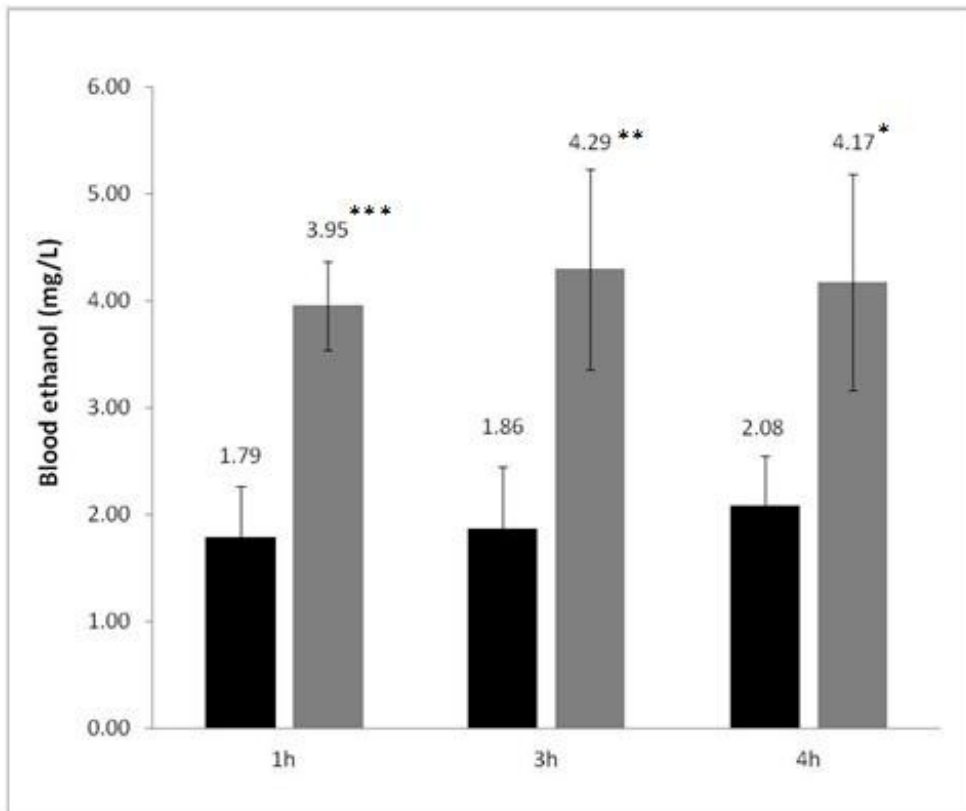


Figure 6. Comparison of blood ethanol concentrations during resting state (black bar) and while performing physical activity (gray bar) (50W × 12 minutes per hour) after 1, 3 and 4 h exposure to 750 ppm in male volunteers. * p-value < 0.005; ** p-value < 0.001;*** p-value < 0.0001

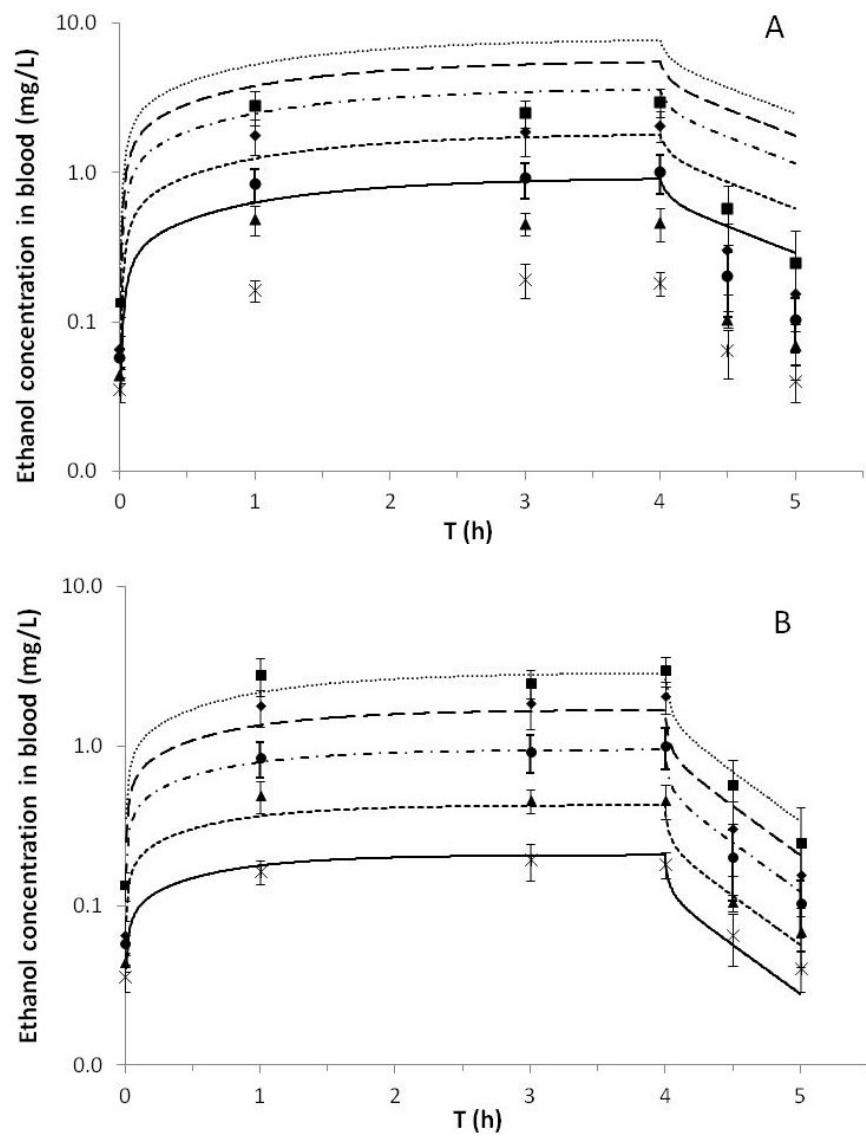


Figure 7. Comparison between A) predicted blood concentrations by the original PBPK model and the measured values (symbols) in men (70kg) B) predicted blood concentrations by the modified PBPK model that considers extra-hepatic metabolism and the measured values (symbols) in men (70kg). The symbols are measured values (125 ppm: X, 250 ppm: ▲, 450 ppm: ●, 750 ppm: ◆, 1000 ppm: ■) and the different lines are the simulation (125 ppm: full line, 250 ppm: ---, 450 ppm: -•-•-, 750 ppm: — — —, 1000 ppm:).

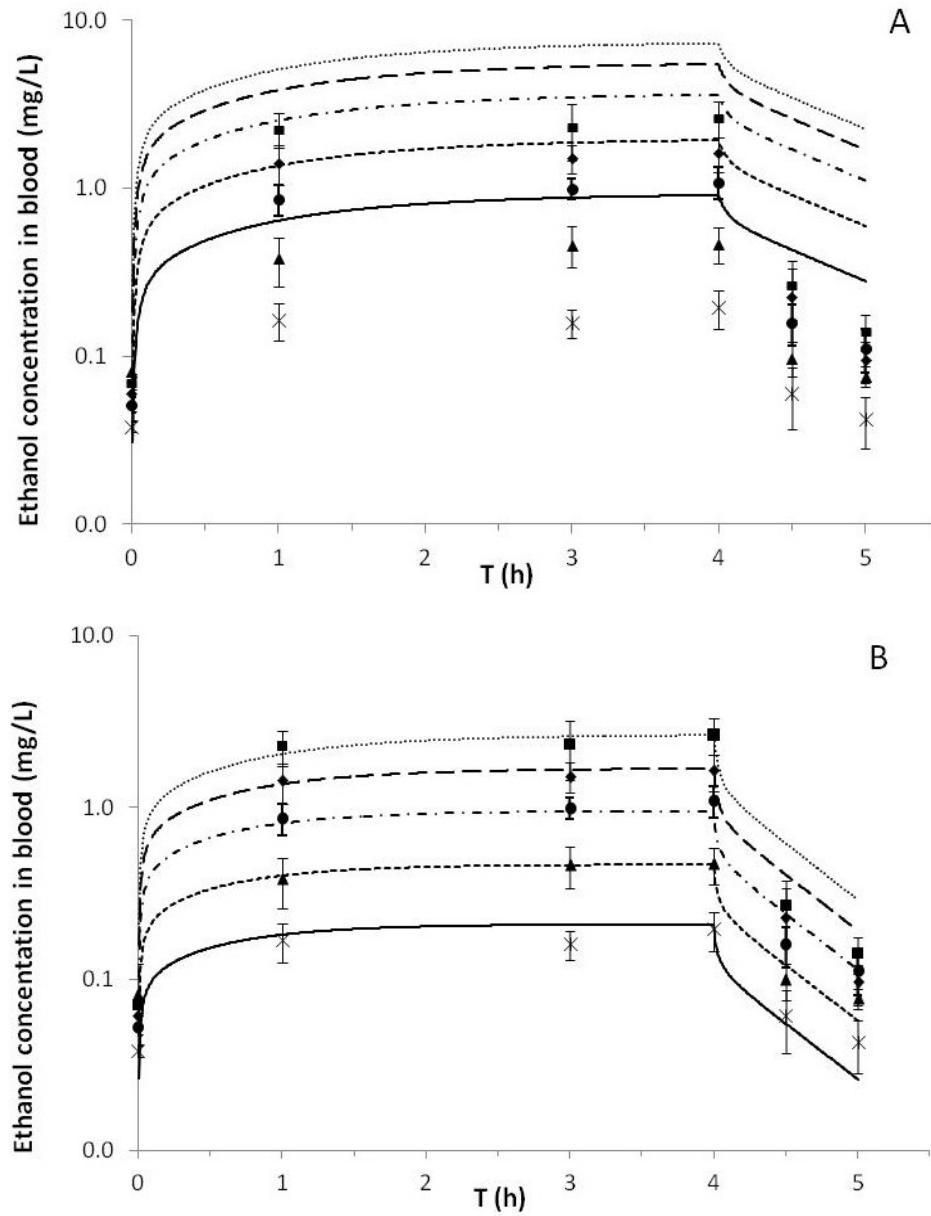


Figure 8. Comparison between A) predicted blood concentrations by the original PBPK model and the measured values (symbols) in women (55kg) B) predicted blood concentrations by the modified PBPK model that considers extra-hepatic metabolism and the measured values (symbols) in women (55kg). The symbols are measured values (125 ppm: \times , 250 ppm: \blacktriangle , 450 ppm: \bullet , 750 ppm: \blacklozenge , 1000 ppm: \blacksquare) and the different lines are the simulation (125 ppm: full line, 250 ppm: ---, 450 ppm: -•-•-, 750 ppm: — — —, 1000 ppm:).

Chapitre 3. Prédiction des niveaux d'éthanolémie résultant de l'utilisation professionnelle de solutions hydro-alcooliques et de vernis à base d'éthanol.

3.1. Contribution à l'article

Contribution personnelle :

Ma contribution a été en premier de faire le recrutement des volontaires pour l'étude présentée dans cet article, d'effectuer avec les volontaires les séances de frictions des mains, d'analyser les vapeurs d'éthanol s'échappant des SHA ou du vernis dans la chambre d'inhalation et dans le bureau et d'effectuer la modélisation toxicocinétique à base physiologique. Ma participation, plus précisément sur l'élaboration de l'article en lui-même, comprend la recherche bibliographique et la rédaction de l'article.

Contribution de Ginette Charest-Tardif: Sa contribution au niveau de l'étude présentée a été de m'aider au bon déroulement des séances de frictions des mains des volontaires et à effectuer la calibration du spectrophotomètre à infra-rouge. De plus, madame Charest-Tardif a, au niveau de l'élaboration de l'article, participé à la correction et à la révision de l'article.

Contribution de Sami Haddad: Sa contribution au niveau du projet de recherche a été la supervision, la gestion, la recherche de financement pour le projet. De plus, monsieur Haddad a participé à la correction et à la révision de l'article.

Contribution de Robert Tardif: Sa contribution au niveau du projet de recherche a été la supervision, la gestion, la recherche de financement pour le projet. De plus, monsieur Tardif a participé à la correction et à la révision de l'article.

3.2. Predictions of ethanol blood levels resulting from occupational use of hydro-alcoholic solutions and ethanol-based varnishes.

Josée Dumas-Campagna, Sami Haddad*, Ginette Charest-Tardif, Robert Tardif*

Department of Environmental and Occupational health, IRSPUM, Université de Montréal, PO Box 6128, Main station, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

*Corresponding authors:

Robert Tardif

Sami Haddad

3.2.1 Summary

The purpose of this study was to determine the ethanol concentration in ambient air following the use of hydro-alcoholic solutions (HAS) and ethanol-based varnishes in order to predict the blood levels of ethanol (BLE) associated with those practices by using a validated PBPK model. The concentrations of ethanol in air at the level of the volunteer's nose after the application of HAS in hands was determined/measured for five volunteers which performed five tests in two environments: 1) in an inhalation chamber (IHC) (air exchange rate ≈ 27 air changes. h^{-1}), and 2) in a closed office (poorly ventilated) and using two different amounts (1.5 and 3 g). In the case of varnish, 125 ml were applied on a wood surface of 1 m^2 in the IHC ($n=4$). The air concentration in the IHC was measured as well as the concentrations at 20 cm and 40 cm from the center of the board during the following 60 minutes. The results obtained with HAS demonstrated i) a large intra and inter-individual variation, ii) a lower maximum concentrations (C_{max}) in the IHC (~ 1250 ppm) than in the office (~ 2352 ppm) and iii) a generally higher AUC for the 3 g than for the 1.5 g. For the varnish, ethanol concentrations could greatly exceed 1000 ppm in a short duration (< 4 min). PBPK modeling of HAS predicted the following blood C_{max} : i) 0,377 and 0,360 mg.L^{-1} in the office, and ii) 0.259 and 0.409 mg.L^{-1} in the IHC for the 1.5 g and 3 g, respectively and AUC for 15 hours 3 g $>$ 1.5 g. As for varnish, the predicted C_{max} for men and women are 0.719 and 0.729 mg.L^{-1} , respectively. The results of this study will facilitate the refinement of risk assessment associated with chronic inhalation of low levels of ethanol in the general population and especially among workers.

Keywords: Inhalation, PBPK modeling, human exposure, occupational and general population, Hydro-alcoholic solution, varnish

3.2.2. Introduction

The advent of the H1N1 flu has caused an increase in the use of hydro-alcoholic solutions (HAS) both among the professionals and the general population to reduce and limit the transmission of the virus following the recommendation of the Ministry of Health and Social Services (Afssaps, 2011, Lowe, 2010, CCTV, 2010). The efficiency of the mode of action of ethanol (denaturation of proteins) depends on the concentration of the latter in the HAS used. For this alcohol, its effectiveness decreases when the concentration of ethanol in the product is less than 70% and it increases when the concentration is greater than 75% (Kramer et al., 2007). Nevertheless, the concentration found in the various HAS, which is classified as effective and safe, is 60% to 95% for use on hands (Katz, 2004, Kramer et al., 2007).

However, ethanol is known to increase the risk of being affected by various chronic diseases when ingested: i) mental, psychiatric and neurological disorders, and ii) cardiovascular, pancreas and liver diseases (Cargiulo, 2007, Bessonneau et al., 2010). In addition, this alcohol is also recognized by the International Agency for Research on Cancer (1988) as a carcinogen of group one when exposed by the oral passageways (Afssaps, 2011, Bessonneau et al., 2010).

Unfortunately, few studies, to our knowledge, have evaluated the exposure to ethanol by dermal or respiratory tract. Since ethanol is a highly volatile substance, it is important to consider the exposure by the inhalation route (Pendlington et al., 2001). As for the dermal route, it was dismissed due to the very low absorption of ethanol by the skin (Kramer et

al., 2007, Beskitt and Sun, 1997, Bessonneau et al., 2010). Knowing the impact of ethanol on health when ingested, it is conceivable that long-term inhalation exposure can result in the same adverse health effects. Furthermore, the presence of ethanol is not limited to HAS. Indeed, this alcohol is also found in many other products used or manufactured in the professional field such as gasoline, disinfectants, paints, inks, varnishes, cosmetics, perfumes, and solvents. These products can also be used or be present at home and thereby expose the general population to ethanol (ANSES, 2010, ANSES, 2011).

Thus the overall aim of this study is to estimate human exposure to ethanol following the use of HAS and ethanol-based varnishes. More specifically, the first objective is to measure the ambient levels of ethanol associated with the use of hydro alcoholic solutions (HAS) for the disinfection of hands as well as from the use of ethanol-based varnishes. The other objective is to predict the blood concentrations of ethanol resulting from exposure to HAS and varnishes. Our purpose is to produce new information on occupational exposure to ethanol from use of HAS and varnishes and hence allowing a better appreciation of the level of health risks of the general population and the workers associated with those practices.

3.2.3. Material and methods

3.2.3.1. Hydroalcoholic solutions (HAS).

The five participants (2 women, 3 men) who volunteered in the study are employees and students of the Department of Environmental Health and Occupational Health of the Université de Montréal.

The measurements of the ambient concentrations of ethanol resulting from HAS were made by infrared spectrophotometer (Miran Serie 205B SapphIRe) which has a tube with a diameter of 1.4 cm. This device has been previously calibrated from standards prepared in Tedlar® bags (373-2243 ppm) according to the manufacturer's specifications to measure ethanol concentrations in ambient air in real-time (up to one measurement/second).

The tests were performed in two environments: 1) in the inhalation chamber of 18 m³ which is located at the inhalation unit of the Department of Environmental and Occupational Health of Université de Montréal with an air change rate of approximately 27 air changes per hour (27 h⁻¹), and 2) in a typical office closed of 32 m³ and without any particular fresh air input. Two quantities of HAS were tested: 1.5 g or 3 g of the commercial product Purell ® with an ethanol content of 70% (v/v). Rubbing hands lasted one minute, after which the volunteers put their arms along their body until the end of the sampling period (3 minutes). Hand temperature was measured before the start of sampling and at the end of the friction with an infrared thermometer (Moutain 8206

Infrared temperature gun). The air samplings were made at a height of 30 cm above the hands of subjects (Figure 1). Between each sample, subjects rinsed their hands with tap water. Each volunteer performed 5 tests spaced at intervals of 15 minutes, and in both environments.

3.2.3.2. Ethanol-based varnish.

A volume of 125 ml of varnish ethanol (100%) was applied to a wooden surface of 1m². The varnish was prepared by dissolving shellac (Les produits Waxine inc., Longueuil, Canada) in ethyl alcohol (anhydrous, 100%) (Commercial Alcohols Inc., Chatham, Canada). Four different applications (n=4) were made in the inhalation chamber described above. The approximate average time required to apply the varnish on the entire surface of the work piece was 3.5 min. The device is described in figure 2. Measurements of ethanol in air were made at 20 cm and 40 cm above the center of the board with the infrared spectrophotometer (Miran Serie 205B SapphIRe.) The choice for the distance between the worker's breathing zone and the varnished board was made arbitrarily. The concentration in the inhalation chamber was taken as another measurement with the same infrared spectrophotometer. The measurements were made throughout a period of 60 minutes.

3.2.3.3. Statistical analysis

The nonparametric Mann-Whitney test was used to determine sure if there was a significant difference between the ethanol concentration in the air following the used of 1.5 g or 3 g of Purell in the inhalation chamber or in the office or between the two

environment. These tests were performed using the statistical analysis software SPSS (version 17.0). The level of significance was set at $P < 0.05$.

3.2.3.4. Modeling and simulations of exposure to hydroalcoholic solution and varnish containing ethanol

The details pertaining to the PBPK model used to predict blood concentrations of ethanol after exposure to ethanol vapors from either HAS or varnish-based ethanol are described in a previous paper (Dumas-Campagna et al., 2013). Briefly, the model consists of five compartments: the brain, the liver, the richly perfused tissues (kidney, heart), the poorly perfused tissues (muscle, skin) and adipose tissues. It takes into account the concentrations of ethanol and blood flow in different compartments, the characteristics of circulatory and respiratory activity, the body weight (men: 70 kg /women: 55 kg) and the partition coefficients blood/air and tissues/air.

The scenario tested for the use of HAS was based on a working day (8 hours) divided into two periods of 3.5 hours interrupted by a break of an hour without exposure (ANSES, 2010). Exposure to ethanol for every friction was three minutes. The first minute of these exposures represent the concentrations of ethanol in the air at the time of rubbing hands with the HAS and the last two represent air concentrations resulting from this friction. Each friction were spaced by 10 min to observe the cumulative blood level of ethanol during a workday (e.g., health professionals) during which a total 42 friction was performed (21 friction in the morning and 21 friction in the afternoon) (ANSES, 2010). The concentrations measured in ambient air following the utilisation of HAS are used to

make the different simulation scenario. In the case of varnish, it was performed by taking into account exposure to ethanol concentrations measured in air at a distance of 40 cm from the center of the board for the first five minutes of exposure. This is followed by an exposure of 55 minutes to the concentrations encountered in the inhalation chamber after the first five minutes of applying the varnish and this is followed by a no exposure period that lasts 23 hours. This scenario was chosen to best represent the concentrations present in the breathing zone of workers during the application of the varnish on the wooden board and after its application. A part of the averages concentrations measured in ambient air following the application of the varnish are used to make the various simulation scenarios. These simulations were performed using the ethanol PBPK model from Dumas Campagna et al (2013) which was transcribed into an MS Excel® spreadsheet (Haddad et al., 1996).

3.2.4. Results

3.2.4.1. Hydro-alcoholic solutions.

Overall, the tests results of evaporation of ethanol during hand disinfection with HAS (Purell® 70%) showed a high variability both intra- and inter-individual. However, these variations appear attenuated in an environment where the airflow is constant and for which the renewal of the air is higher (inhalation chamber) compared to an environment where there is no change of air (office) (Figures, 3, 4, 5 and 6). As we might have expected, the average maximum concentrations were lower in the inhalation chamber but significantly only for the 1.5g (p-value = 0.028). The average maximum concentrations

(Mean \pm SD), for the 1.5 g and 3 g of HAS, are 858 ± 258 ppm and 1134 ± 122 ppm respectively for the inhalation chamber compared to 1467 ± 883 ppm and 1243 ± 594 ppm respectively in the office.

Interestingly, the results show that the average maximum concentrations of each subject associated with the use of 3 grams are not necessarily much higher than those measured for 1.5 g. In contrast, however, for four of the five subjects the area under the curve of ambient concentrations versus time corresponding to the three minutes of exposure to HAS is significantly higher (p-value = 0.009) for the quantity of 3 g but only in the inhalation chamber (Figure 4 and 6). The Figures A1 to A5 are presented in the appendix. These figures show, for each subject, the profile of ambient concentrations resulting from the use of HAS at a quantity of 1.5 g.

In addition, we noted a slight increase in the concentration of ethanol remaining in the office between each test, despite a delay of 15 minutes between each test (results not shown). Hand temperature was measured before and after sanitizing with HAS in order to see if this temperature could explain the observed variability in the measurements. However, the results of these measurements do not allow to draw conclusions in this regard (results not shown).

3.2.4.2. Ethanol-based varnish

The concentrations resulting from the application of 125 ml of ethanol-based varnish are shown in Figures 7 (average maximum concentration \pm SD) and 8 (AUC \pm SD). We note that under the conditions tested, the concentrations of ethanol can greatly exceed the value of 1000 ppm (permissible value for exposures of 8 hours [or time-weighted average (TWA)] (Bessonneau et al., 2010)). However, overtaking is short ($<$ 4 minutes) and the levels decrease rapidly with time (levels below 100 ppm after 20 minutes) (Figure A6 in the Appendix). We also observed a decrease as a function of the distance from application. The averages concentrations measured at 20 cm and 40 cm to the center of the board and the measurement of the concentration in the room corresponding to the first 30 minutes of exposure are 331 ± 15.1 ppm, 318 ± 24.4 ppm and 264 ± 5.5 ppm (value \pm SD) respectively.

3.2.4.3. Modeling of exposure to hydro-alcoholic solutions and ethanol-based varnish

The results of model simulations for men for repeated exposure to hydro-alcoholic solution are presented in Figures 9 and 10. The results for women are very similar to those of men (results not shown). The concentrations measured in ambient air following the utilisation of HAS used to make the different simulation scenario are presented in Table I. The results indicate that after several repeated exposures to HAS, the ethanol does not return to the initial blood levels between each friction of HAS, even during the lunch break (i.e., 1 hr without exposure). In fact, the blood concentrations of ethanol return to initial levels only 5 hours after the end of the working day and therefore the end

of exposure to HAS. Peak blood levels (C_{max}) predicted before and after the one-hour break, for men and women and for the different exposure scenarios (office/inhalation chamber, 1.5g/3g of HAS) are presented in Table III. The C_{max} for the 1.5 g of HAS is higher than for the 3 g but only in the office, in the inhalation chamber the situation is reversed. Finally, the blood predictions of the PBPK model give a higher AUC (15 hours) for the use of 3 g of HAS than for the use of 1.5 g in both environments (about 0.93 times in the office and 1.36 times in the inhalation chamber). Those results are presented in Table IV for women and men.

Figure 11 show the predictions after exposure to vapors of ethanol from ethanol-based varnish. The averages concentrations measured and used for the simulation are presented in Table II, which contained also the average concentrations measured for the different scenarios of exposure following the application of ethanol-based varnish. The predicted C_{max} for men and women are 0.719 mg.L^{-1} and 0.729 mg.L^{-1} , respectively and as was predicted for HAS its takes five hours after the end of the exposure to the ethanol-based varnish for blood concentrations of ethanol to return to initial blood levels.

3.2.5. Discussion

The purpose of this study was to facilitate the evaluation of the health risks for the general population and the workers associated with ethanol exposure by inhalation. Firstly, we measured experimentally the concentrations in ambient air following the use of HAS and the application of a typical ethanol-based varnish. Secondly, we use the latter information to predict by PBPK modeling the blood levels of ethanol resulting from exposure to the ambient concentrations measured.

To begin this study, five volunteers were asked to disinfect of their hands (five times) by using a commercial hydro-alcoholic solution (HAS) (Purell®). The concentrations of ethanol in ambient air resulting from the evaporation of HAS varied considerably depending on i) the amount used, ii) the volunteer, iii) the environment (room size and ventilation), and iv) between each test. The maximum concentrations measured for each subject were highly variable and were higher in the office (closed room) than in the inhalation chamber (highly ventilated) but significantly only for the 1.5 g. However, even if these concentrations are higher than the TWA of 1000 ppm, they are still below the 15 min short-term exposure level (STEL) of 5000 ppm (Bonnard et al., 2011). In addition, the area under the curve (AUC) of ethanol concentrations in air is also higher for the use of 3 g than 1.5 g of HAS but only significantly in the inhalation chamber. The standard deviations for the concentrations and for the AUC of ethanol measured in the office are really high. This shows that there is a great variability that is affecting the concentrations in air. Those results can be explained by the air convection and the behavior of air flow in a room with no ventilation rate. When a solvent or a solution is evaporating in a room

with no ventilation rate, a vapor cloud is than formed. Indeed, the molecules of ethanol are going up in the air because of the energy given by the hands and because non buoyant flow (carrier flow) is present, which will provoke the molecular diffusion of ethanol toward the ceiling of the office (Goodfellow and Tähti, 2001). But, this cloud can easily be perturbed by any flux of air (respiration of the volunteer, air coming under the door, object moved, etc) (Goodfellow and Tähti, 2001) and then deviated from the analysis tube. Indeed, vapors in a non buoyant room are distributed by turbulent and molecular diffusion (Goodfellow and Tähti, 2001). The logical result is that the concentration which will be given by the spectrophotometer shall not represent the highest concentration reached in the air. Another possibility is the convection of the air produce by the heat of the volunteer body which will bring the cloud of vapor to move to the top of the head of the volunteer and not rise vertically to the analysis tube which will analyze a lesser part of the vapor cloud (Goodfellow and Tähti, 2001). Furthermore, in a well ventilated room (with airflows), the vapor cloud will spread evenly in the air significantly faster than distribution due by molecular diffusion (Goodfellow and Tähti, 2001). The result is a more stable reading by the spectrophotometer like demonstrated by the lower variability of the concentrations and AUC of ethanol vapor in the inhalation chamber. In short, this logically means that the internal exposure is more important with the increase of the quantity of HAS but only in a room well ventilated as for a room not ventilated the internal exposure is harder to predicted (Claverie and Hedde, 2008, HCN, 2006). A more detailed study on the air convection and behavior of air flow in the inhalation room may help to understand more this phenomena.

In the report of the "Risk Assessment of ethanol" working Group (GRE) (ANSES, 2010), it is reported that the maximum exposure measured during a test performed by a nurse, in a poorly ventilated room, with 3 ml of a HAS of 80%, during one minute reached 2222 ppm, and an average concentrations of 716 ppm. Their maximum concentration and average concentrations of ethanol in the air during the test are higher than the average maximum concentrations and the average concentrations (1.79 times and 2.75 times respectively) obtained in our tests in the office with 3 g (\approx 3 ml) of HAS. However, it is somewhat difficult to compare these results because the methods differ slightly. First, the distance between the position of the hands making the friction of HAS and the air sampling position during measurement of exposure is likely to be different between the two studies, as in the case of GRE it is simply not specified. So, it is possible that the distance in the study of GRE is smaller thus explaining the greater concentration measured by their team. In addition, the difference in the room ventilation (a highly ventilated room vs a room with no particular supply of fresh air) may have played on the measured concentrations. Another important factor is that in our study only the hands were rubbed whereas the hands and forearms were rubbed for the GRE study increasing the evaporation surface. By increasing the surface of evaporation, the evaporation rate is then increased and by the same fate the ethanol concentration (Triolet and Benoît, 2009) in the air thus explaining the difference between their results and those of this study. The same study also predicted the average maximum concentration of ethanol in air by using a hemispherical exposure model. This model predicted a concentration of ethanol in the air of 1633 ppm for an exposure to 3 ml of HAS (65-85%) for a period of friction with hands of one minute (ANSES, 2011). This maximum concentration of ethanol obtained

by the model of hemispheric exposure differs from 10% and 24% to our average maximum concentrations of ethanol in air obtained for 1.5 g and 3 g of HAS, respectively. The difference between the prediction of the hemispheric model and the data collected in our study is smaller than the inter-individual variability of 10% to 56% observed depending on the exposure scenarios.

More recently, Bessonneau and Thomas (2012) have conducted an experimental simulation in laboratory with commercial HAS (Aniosgel 85 NPC) containing 70% of ethanol (v/v). The authors reported that for a friction lasting 30 seconds with 3 ml of HAS, the maximal concentration of ethanol reached in air was as high as 7590 ppm. This value is much higher (about 3.2 times) than ours average maximal concentration reach by one of our volunteer which is 2352.2 ppm. As they had an air change rate of $12 \pm 1 \text{ h}^{-1}$, which is 2.25 times lower than ours ventilation rate, their maximal concentration is not that much higher than ours. Indeed, if we split it by 2.25 their new maximum concentration is 3 373.3. The rest of the difference can easily be explained by the fact that we are comparing two different experimental.

As for the varnish, the maximum ethanol concentrations measured above the surface where the varnish was applied (1 m^2) reached relatively high peak concentrations, as expected. It should be noted that these values remain high given that the tests were done in the inhalation chamber (18 m^3) with a very high turnover rate of air (27 h^{-1}). However after 30 minutes, the concentration was decreased to less than 100 ppm values. But one can

easily imagine that the levels would reach much higher values and for a longer period of time in a poorly ventilated room.

In this regard, the GRE conducted simulations by modeling the exposure to an ethanol based varnish (ANSES, 2011). Two models were compared. The main parameters of the simulations for both models were: volume of varnish (0.5 L), ethanol varnish of 80%, application time (3 hours), volume of the room (50 m³), the varnish surface (2 m²) and the rate of air change (0.25 h⁻¹, 0.5 h⁻¹ and 1 h⁻¹). The predicted values for these conditions are significantly higher than those predicted in our study. For example, at a rate 1 h⁻¹ of air renewal, the IH MOD model predicted a maximum concentration in the room of 1082 ppm and an average concentration during the 3 hours of 771 ppm (ANSES, 2011). The CONSEXPO RIVM model predicted for the same conditions of exposure an average concentration of 755 ppm (ANSES, 2011). In our case, the average concentration measured in the room for 30 min was only 264 ppm. Subsequently, these two models show well in comparison to the results obtained in our study that the ethanol concentrations in the air are much higher in a room when it is much less ventilated (1 h⁻¹ vs 27 h⁻¹).

A working day (8 hours) was simulated with a PBPK model to predict blood concentrations. The simulations produced higher AUC of blood levels for the use of 3 g of HAS than for the use of 1.5 g in both environments. Interestingly however, the maximal concentration of ethanol in blood for the 3 g in the office is slightly lower than the one obtained for the exposure to 1.5 g in the same environment. Although this is

difficult to explain, it is feasible that volatilization was slower for the 3 g of HAS due to the fact that more energy is needed than for a smaller amount. The energy available in the hands is the same for both applications. In addition, the maximal blood concentration and AUC are slightly higher for the 3 g of HAS during the exposure in the inhalation chamber than in the office and despite the fact that the inhalation chamber has much more important ventilation than the office (0 h^{-1} vs 27 h^{-1}). Nevertheless, as write before a more detailed study on the air convection and behavior of air flow in the inhalation room may help to understand more this phenomena. The fact remains that the AUC of blood levels is slightly higher for the exposure to 3 g than 1.5 thus the internal exposure is greater for an exposure to 3 g of HAS as would be expected (Claverie and Hedde, 2008, HCN, 2006).

Recently, the ANSES (2010) conducted a simulation study to predict blood concentrations of ethanol related to the use of HAS in a day of work. A total of 42 hand frictions of HAS (80% v/v) per day comprising two periods [21 frictions each] of 3.5 hours, separated by a break of 1-hour without exposure (with a friction of 94 sec every 10 minutes) were simulated. These simulations gave a maximum concentration of 1.28 mg.L^{-1} , which is approximately 3.1 times higher than the highest maximum concentration predicted by our PBPK model even if the scenario of the ANSES and our are broadly similar. These higher blood levels can be explained by the fact that the concentrations of ethanol in the air used in their simulation were much higher than those of our study by 2.9 times if we compare the average concentrations in air of both simulations. An additional obvious explanation is the difference in the description of ethanol metabolism

used in both studies. The PBPK model of ANSES (2010) takes into account only the hepatic metabolism, which differs to the model used in this study, which includes in addition to the hepatic metabolism, an extra-hepatic metabolism of low capacity and high affinity. The addition of this extra-hepatic metabolism thus helps to metabolize faster the low concentrations of ethanol present in the blood (Dumas-Campagna et al., 2013).

Overall, the predicted blood levels of ethanol associated with the use of HAS and varnish are below the toxic dose for humans which is 100 mg.L^{-1} (ANSES, 2011). The ANSES (2011) also conducted blood concentration simulation for two exposures scenarios with an ethanol-based varnish. These scenarios are for three hours of exposure to ethanol concentration of 1327 ppm or 770 pm. Blood levels predicted by the model were 9.6 mg.L^{-1} and 5.3 mg.L^{-1} , respectively. These results are respectively 13 times and 7 times higher than those predicted in our study, which may be explained by the longer time simulation of the ANSES which is three hours instead of one as in the case of our simulation. Unlike the exposure scenario used in the simulation by ANSES, our simulation did not assume an exposure to a concentration that is constant throughout the exposure time.

Finally, based on the PBPK modeling simulations we conclude that the exposure to ethanol at ambient levels measured after the use of HAS and ethanol-based varnish should not result in blood level that are associated with health adverse-effects. Indeed, in all cases of scenarios tested in this study, the blood levels are below the reported threshold level of human toxicity. However, in the case of ethanol-based varnish, it is

possible that the application of the varnish over a larger area and in a confined space leads to higher exposures levels and health risks.

3.2.6. Conclusion

This study confirms the results reported by other researchers that the use of HAS for sanitizing hands results in a short-term exposure to levels which, while being very variable, remain relatively high and whose magnitude depends mainly on factors such as the amount used and the place of use (room size and ventilation). PBPK modeling indicate that the ethanol blood levels never exceeded 1 mg.L^{-1} either for repeated exposure to HAS and for exposure to ethanol vapors from the application of an ethanol based varnish on a 1 m^2 surface. These concentrations are much lower than the toxic dose for humans (100 mg.L^{-1}) and thus do not appear to present a health hazard. In the end, the results of this study will facilitate the refinement of risk assessment associated with chronic inhalation of low levels of ethanol in the general population and especially among workers.

3.2.7. Acknowledgements

We are grateful to the volunteers for their time. We are grateful to the National Agency for Food Safety, Environment and Work (ANSES) for its funding and support.

3.2.8. Declaration of interest

The authors report no existing potential conflicts of interest.

3.2.9. Bibliography

- AFSSAPS 2011. Rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé relatif à l'innocuité des produits hydro-alcooliques (PHA) à base d'éthanol utilisés pour la désinfection des mains à peau saine par le grand public dans le cadre de l'épidémie de la grippe A (H1N1). France: Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.
- ANSES 2010. Évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle. France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail.
- ANSES 2011. Évaluation des risques de l'éthanol pour la population générale. Anses Éditions ed. France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- BESKITT, J. L. & SUN, J. D. 1997. In vitro skin penetration characteristics of ethanol in the rabbit, mouse, rat and human. *J. Toxicol. Cut. and Ocular Toxicol.*, 16, 61-75.
- BESSONNEAU, V., CLÉMENT, M. & THOMAS, O. 2010. Can intensive use of alcohol-based hand rubs lead to passive alcoholization? *In. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 3038-3050.
- BESSONNEAU, V. & THOMAS, O. 2012. Assessment of exposure to alcohol vapor from alcohol-based hand rubs. *Int J Environ Res Public Health*, 9, 868-79.
- CARGIULO, T. 2007. Understanding the health impact of alcohol dependence. *Am J Health-Syst Pharm*, 64, S5-S11.
- CCTV 2010. Produits hydro-alcooliques destinés à l'usage cutané: étude rétrospective des cas d'intoxications recensés dans les CAPTV en 2009. France: Comité de coordination de toxicovigilance.
- CLAVERIE, I. & HEDDE, H. 2008. *Pharmacologie générale-Toxicologie: Mécanismes fondamentaux*, France, Wolters Kluwer France, p. 100
- DUMAS-CAMPAGNA, J., TARDIF, R., CHARES-TARDIF, G. & HADDAD, S. 2013. Ethanol toxicokinetics resulting from inhalation exposure in human volunteers and toxicokinetic modeling.(submitted)
- GOODFELLOW, H. D. & TÄHTI, E. 2001. *Industrial ventilation design guidebook*, San Diego, Academic Press, p.1519
- HADDAD, S., PELEKIS, M. & KRISHNAN, K. 1996. A methodology for solving physiologically based pharmacokinetic models without the use of simulation softwares. *Toxicology letters*, 85, 113-126.
- HCN 2006. Ethanol (ethyl alcohol); Evaluation of the health effects from occupational exposure. Netherlands: The Hague: Health Council of the Netherlands.
- IARC 1998. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Alcohol drinking: summary of data reported and evaluation. France: International agency for research on cancer.
- KATZ, J. D. 2004. Hand washing and hand disinfection: more than your mother taught you. *Anesthesiology Clin N Am*, 22, 457-471.
- KRAMER, A., BELOW, H., BIEBER, N., KAMPF, G., TOMA, C. D., HUEBNER, N.-O. & ASSADIAN, O. 2007. Quantity of ethanol absorption after excessive hand

- disinfection using three commercially available hand rubs is minimal and below toxic levels for humans. *BMC Infectious Diseases*, 7, 117.
- LOWE, A.-M. 2010. Utilisation des solutions hydro-alcooliques dans les milieux de travail au Québec. Québec: Institut national de santé publique du Québec.
- PENDLINGTON, R. U., WHITTLE, E., ROBINSON, J. A. & HOWES, D. 2001. Fate of ethanol topically applied to skin. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 169-174.
- TRIOLET, J. & BENOÎT, S. 2009. Évaluation de la vitesse d'évaporation et de la concentration d'un composé organique volatil dans l'atmosphère d'un local de travail. 1 ed. Paris: INRS.

3.2.10. Tables and Figures

Table I: Average concentrations at each 30 sec during a three minutes exposure to ethanol vapours from the utilisation of HAS in different scenario and which are used to make the simulation with the PPBK model.

Time (min)	1.5 g Office		3 g Office		1.5 g Inhalation chamber		3 g Inhalation chamber	
	Average (ppm)	SD	Average (ppm)	SD	Average (ppm)	SD	Average (ppm)	SD
0.5	389.2	302.0	227.4	136.4	340.3	173.8	383.3	84.9
1	779.8	303.8	761.8	480.2	460.3	114.9	844.5	90.6
1.5	164.9	195.9	415.9	239.7	115.6	74.1	285.7	76.1
2	49.2	72.6	92.9	55.0	25.4	4.8	51.3	9.9
2.5	28.4	30.7	46.8	22.6	21.2	1.6	40.8	3.1
3	22.5	19.0	32.6	7.6	19.2	1.3	38.8	4.3

Table II: Average concentrations at each five minutes during a one hour exposure to ethanol vapours from the utilisation of ethanol-based varnish in different scenario and which are used to make the simulation with the PPBK model.

Time (min)	20 cm		40 cm		Conc. in room	
	Average (ppm)	SD	Average (ppm)	SD	Average (ppm)	SD
5	917.0	54.4	841.7*	123.8	579.9	13.2
10	637.7	38.6	618.4	34.4	585.5*	15.3
15	278.1	13.6	280.9	11.8	344.1*	8.9
20	136.9	11.9	138.9	7.3	234.2*	7.4
25	79.6	11.1	79.1	5.1	112.5*	6.0
Last 35	34.6	7.2	34.2	3.8	17.5*	3.4

*Concentration used for the simulation of blood concentration with the PBPK model

Table III: Maximum blood concentration of ethanol (mg.L^{-1}) obtained after the simulation of the PBPK model for exposure to HAS based on various scenarios.

		Office		Inhalation chamber	
		1.5 g	3 g	1.5 g	3 g
Women	AM	0.383	0.366	0.264	0.414
	PM	0.381	0.366	0.264	0.414
Men	AM	0.373	0.355	0.256	0.404
	PM	0.371	0.355	0.256	0.404

Table IV: Area under the curve ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained after the simulation of the PBPK model for exposure to HAS based on various scenarios.

	Office		Inhalation chamber	
	1.5 g	3 g	1.5 g	3 g
Women	1.44	1.53	1.18	1.58
Men	1.33	1.43	1.07	1.48

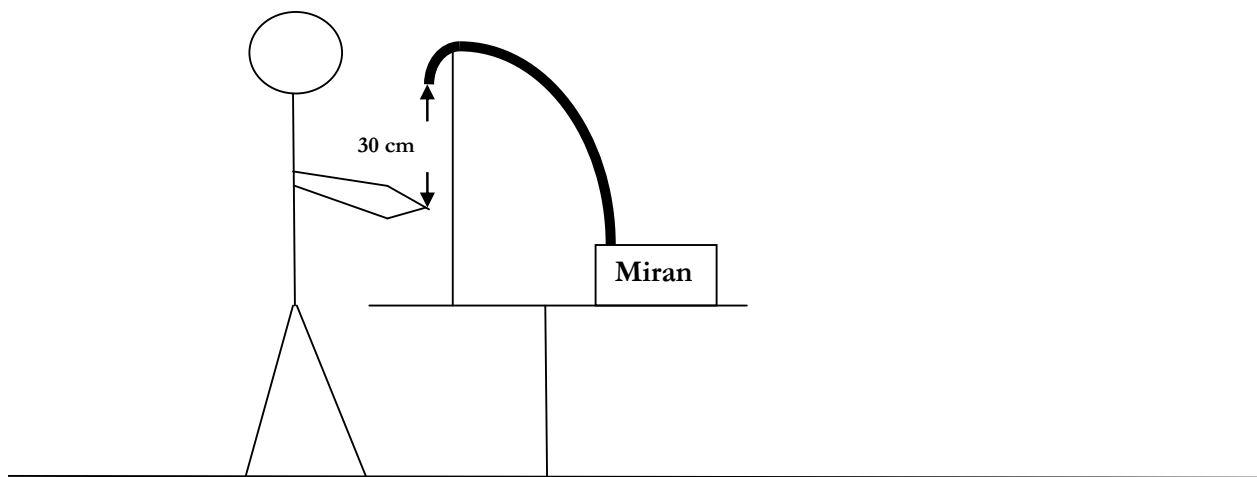


Figure 1. Experimental setup for studying the ambient levels of ethanol associated with the use of HAS.

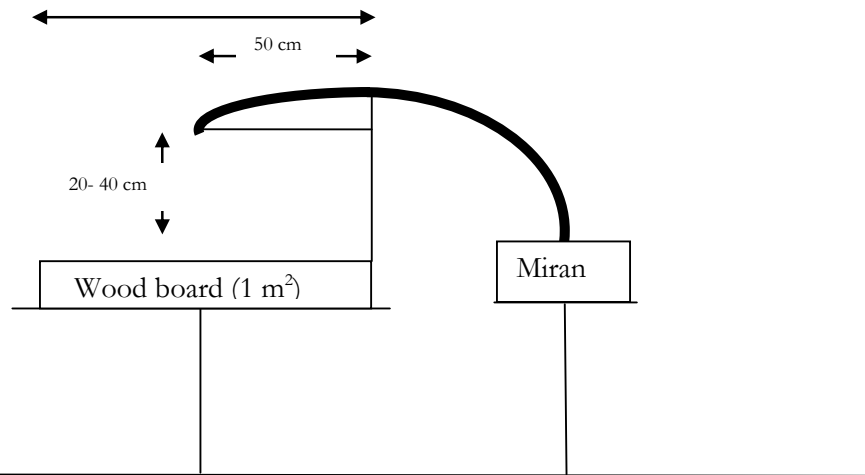


Figure 2. Experimental setup for studying the ambient levels of ethanol associated with the use of ethanol-based varnish.

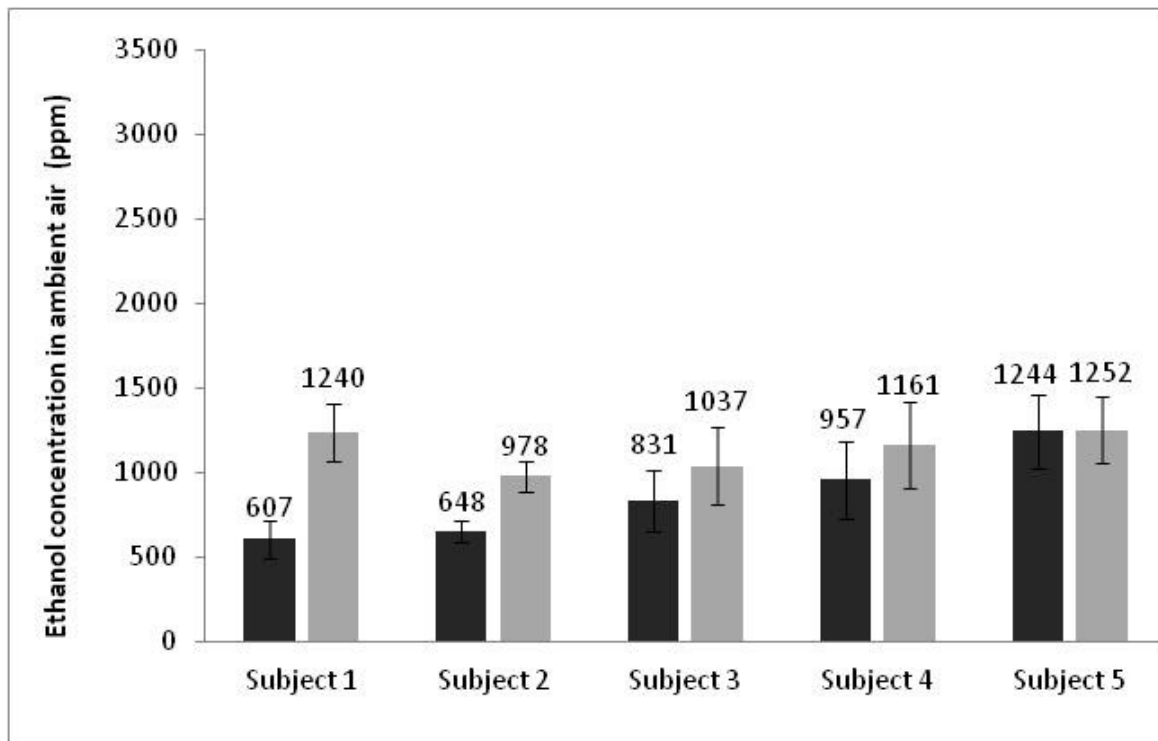


Figure 3. Maximum ambient concentrations measured during hand disinfection with 1.5 g of Purell (black) or 3 g of Purell (grey) (throughout three minutes) with five volunteers in the inhalation chamber with a change of air (samples 30 cm above the hands) (n=5).

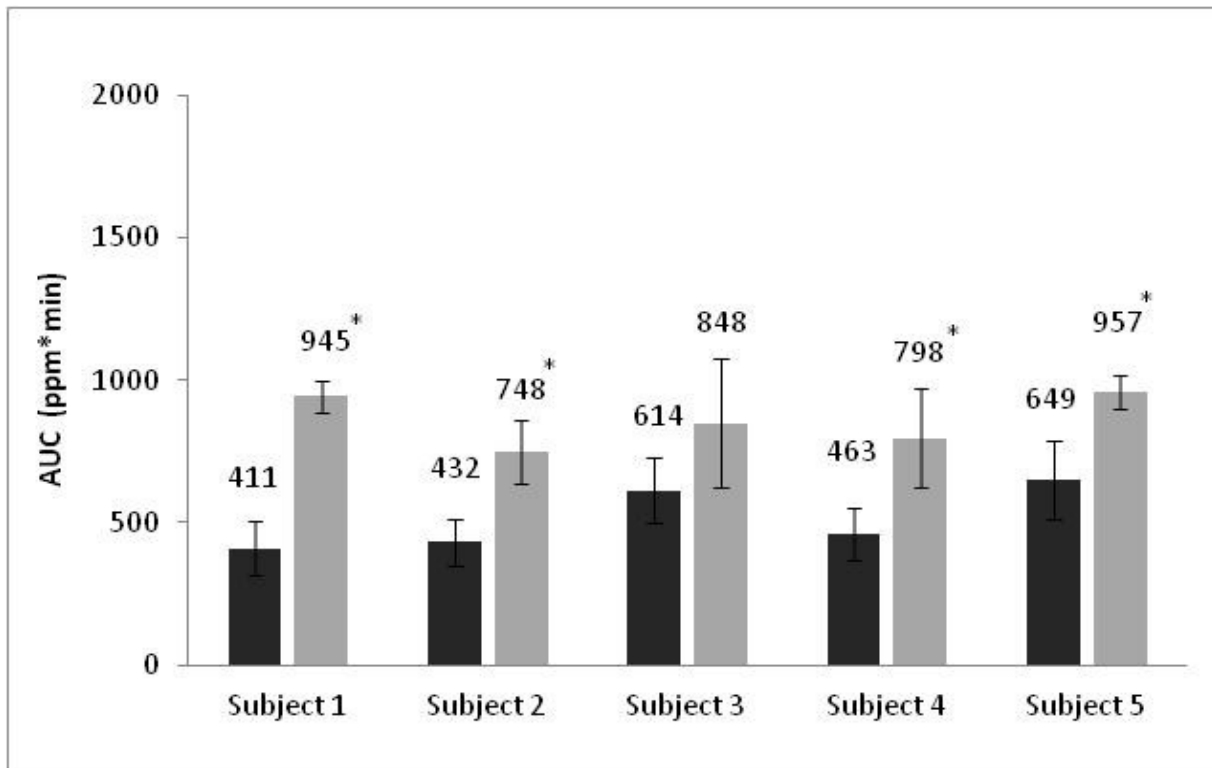


Figure 4. Area under the curve of ambient concentrations corresponding to the use for three minutes of 1.5 g of Purell (black) or 3 g of Purell (grey) for the five volunteers (disinfection in the inhalation chamber with a change of air) * p-value < 0.005.

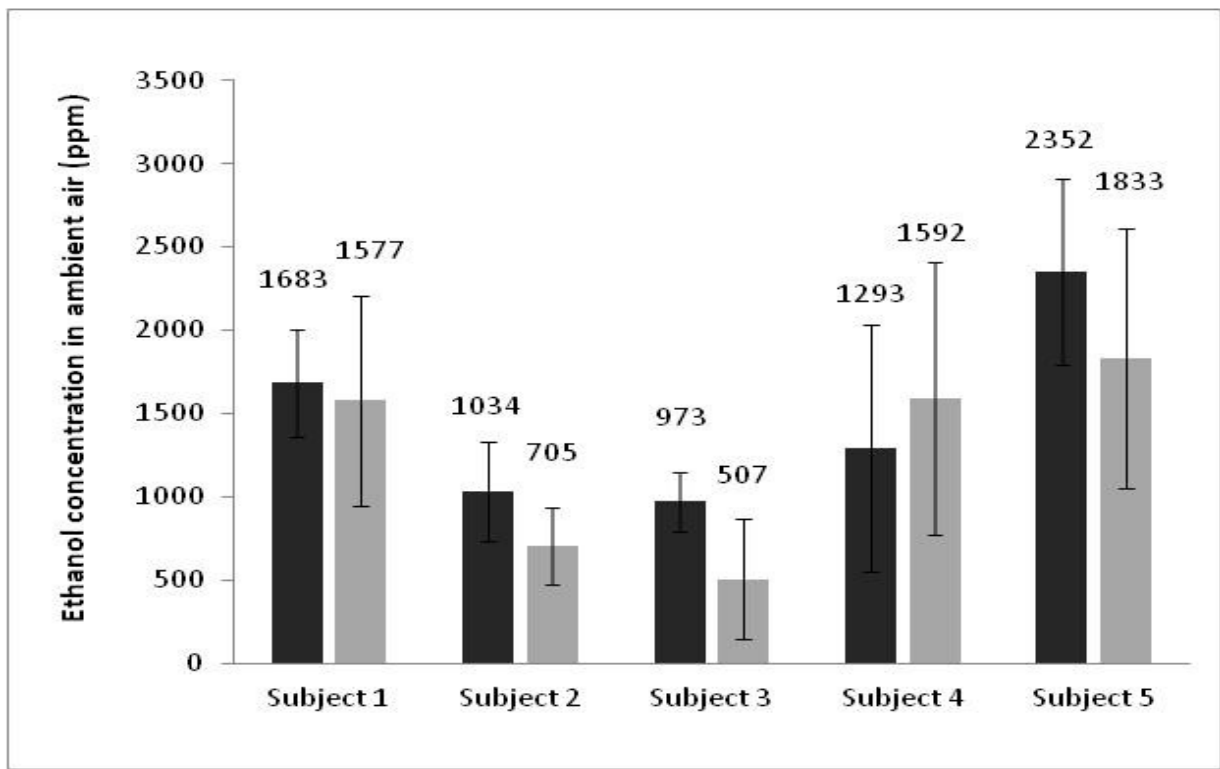


Figure 5. Maximum ambient concentrations measured during hand disinfection with 1.5 g of Purell (black) or 3 g of Purell (grey) (throughout three minutes) with five volunteers in the office without air change (samples 30 cm above the hands) (n=5).

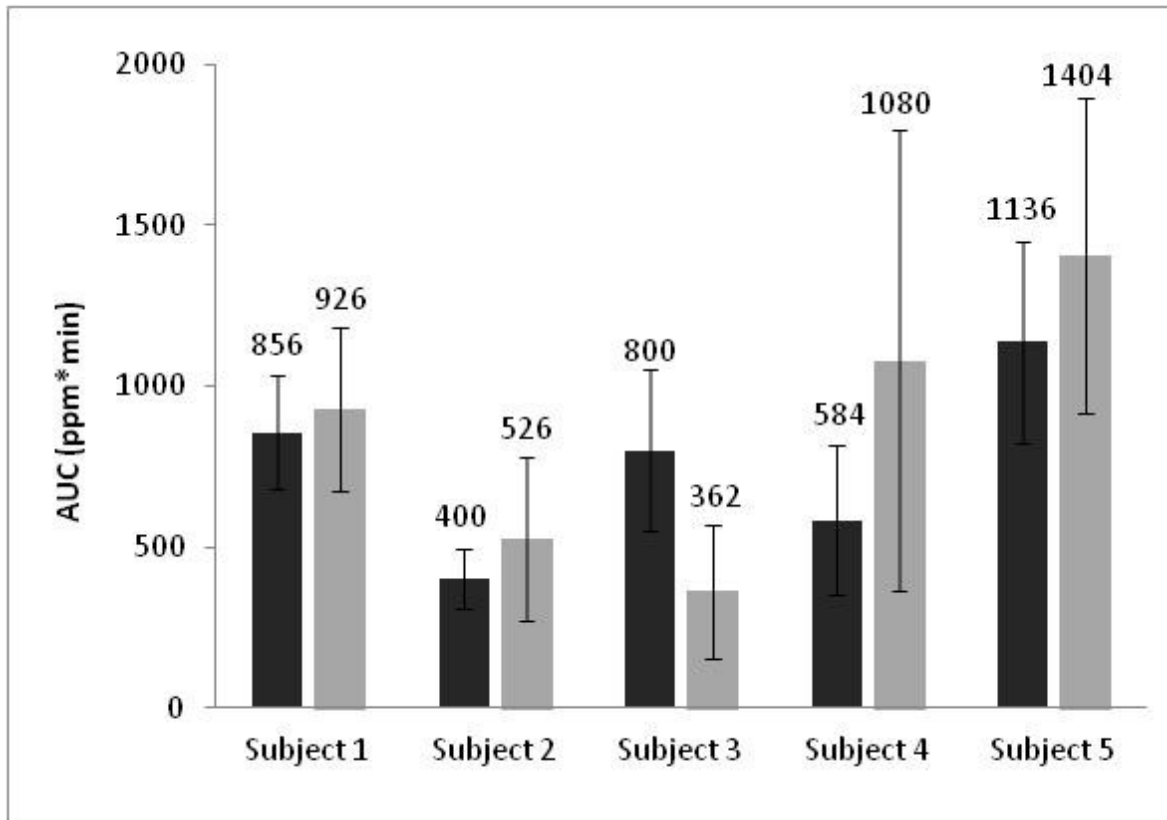


Figure 6. Area under the curve of ambient concentrations corresponding to the use for three minutes of 1.5 g of Purell (black) or 3 g of Purell (grey) for the five volunteers (disinfection in the office without air change).

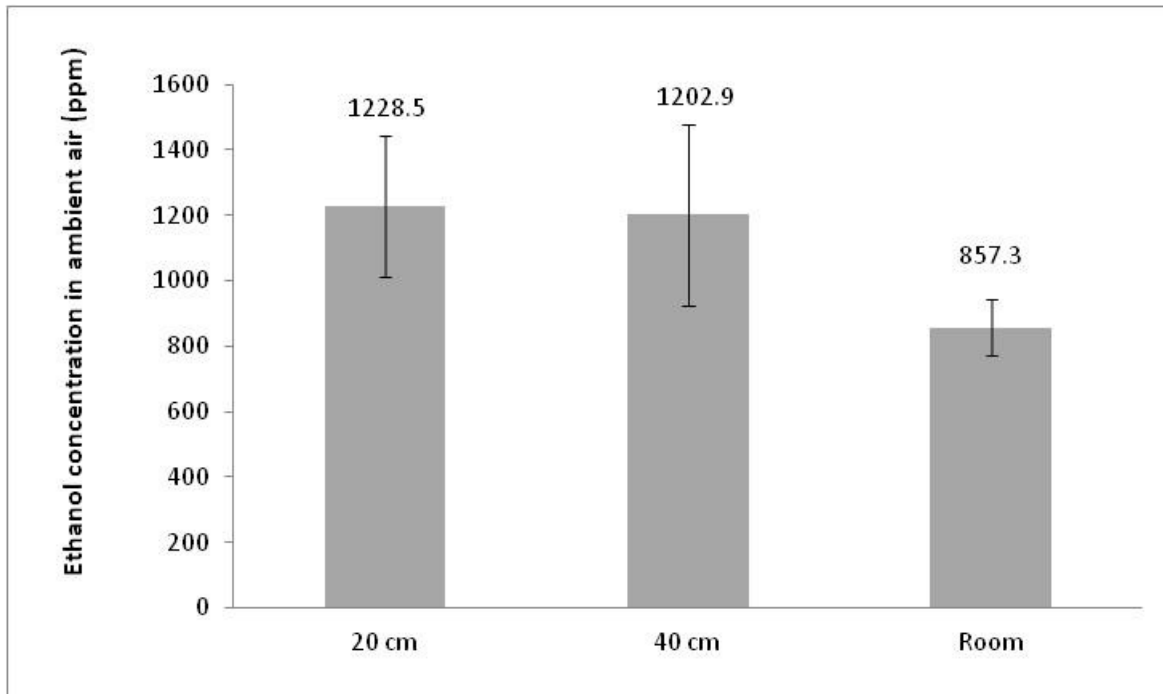


Figure 7. Maximal concentration (\pm standard deviation) obtained after the application of 125 ml of varnish on a surface of 1m^2 in the inhalation chamber at 20 cm, 40 cm distance from the center of the wooden and in the room.

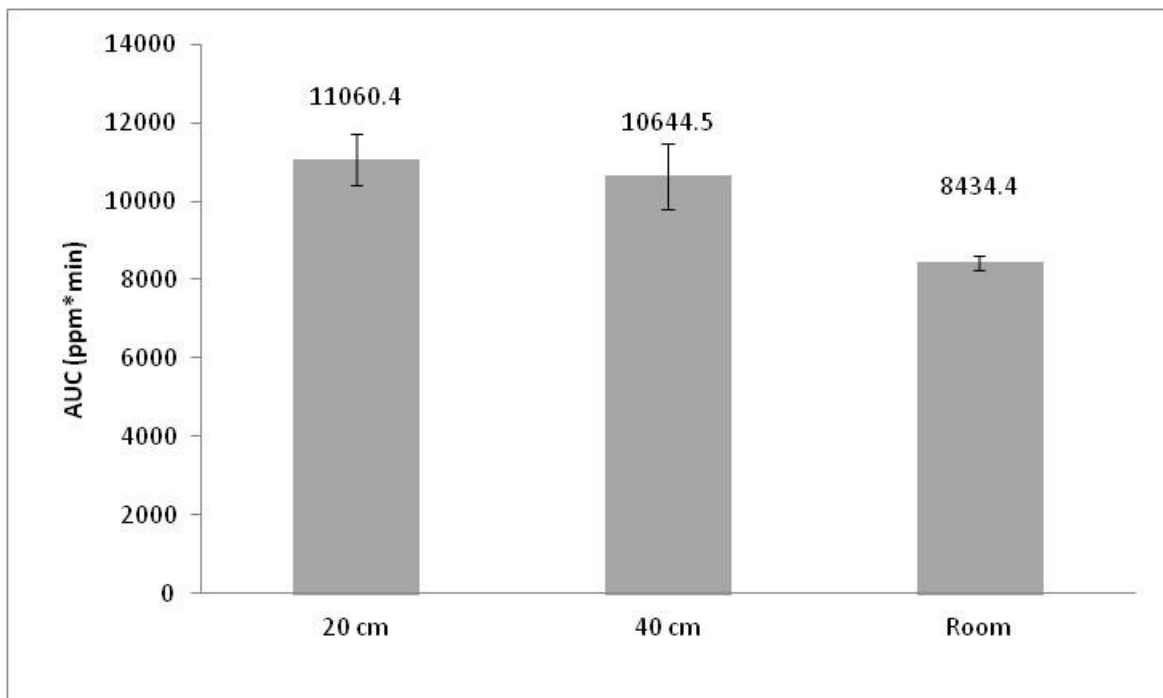


Figure 8. Area under the curve of ambient concentrations versus time following the application of 125 ml of varnish on a surface of 1m² in the inhalation chamber: measurements were made at 20 cm, 40 cm distance from the center of the board and in the room for one hour.

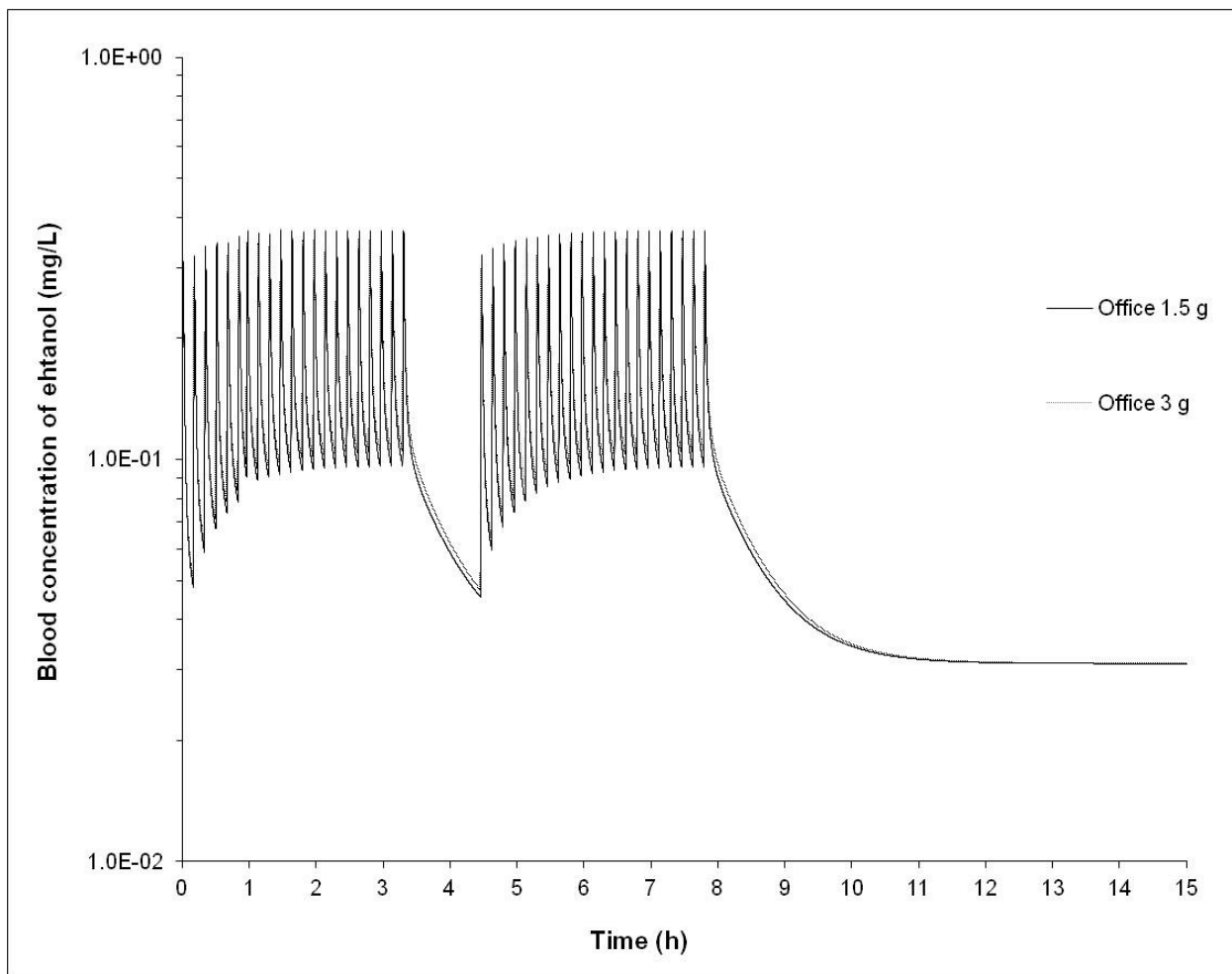


Figure 9. PBPK model simulation for a man (70kg) exposed to the use of SHA for three minutes repeated every 10 minutes until the occurrence of 42 frictions in a day of 8 hours divided by one-hour break without any exposure (21 frictions in the morning and 21 frictions in the afternoon) in the office with different amounts of hydro-alcoholic solution 1.5g and 3g.

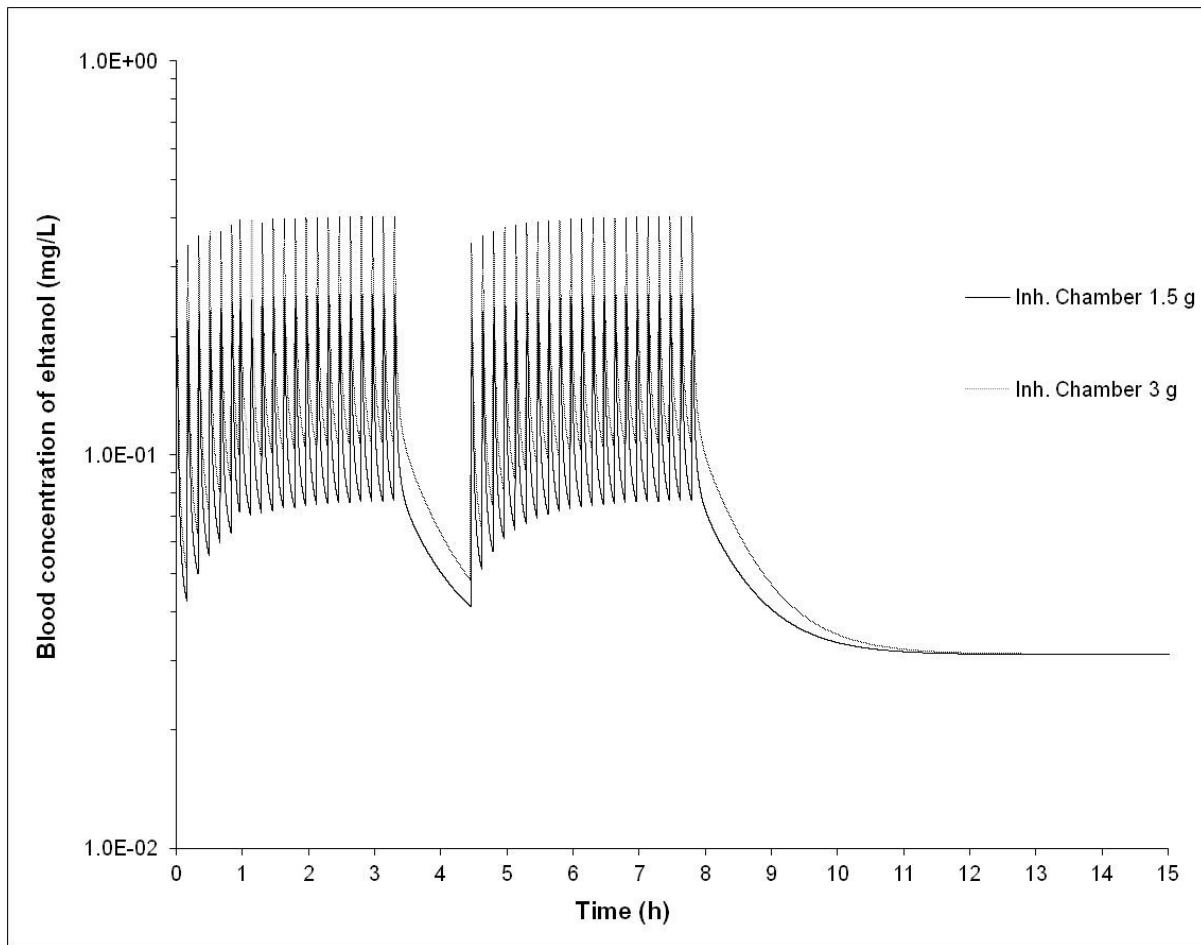


Figure 10. PBPK model simulation for a man (70kg) exposed to the use of SHA for three minutes repeated every 10 minutes until the occurrence of 42 frictions in a day of 8 hours divided by one-hour break without any exposure (21 frictions in the morning and 21 frictions in the afternoon) in the inhalation chamber with different amounts of hydro-alcoholic solution 1.5g and 3g.

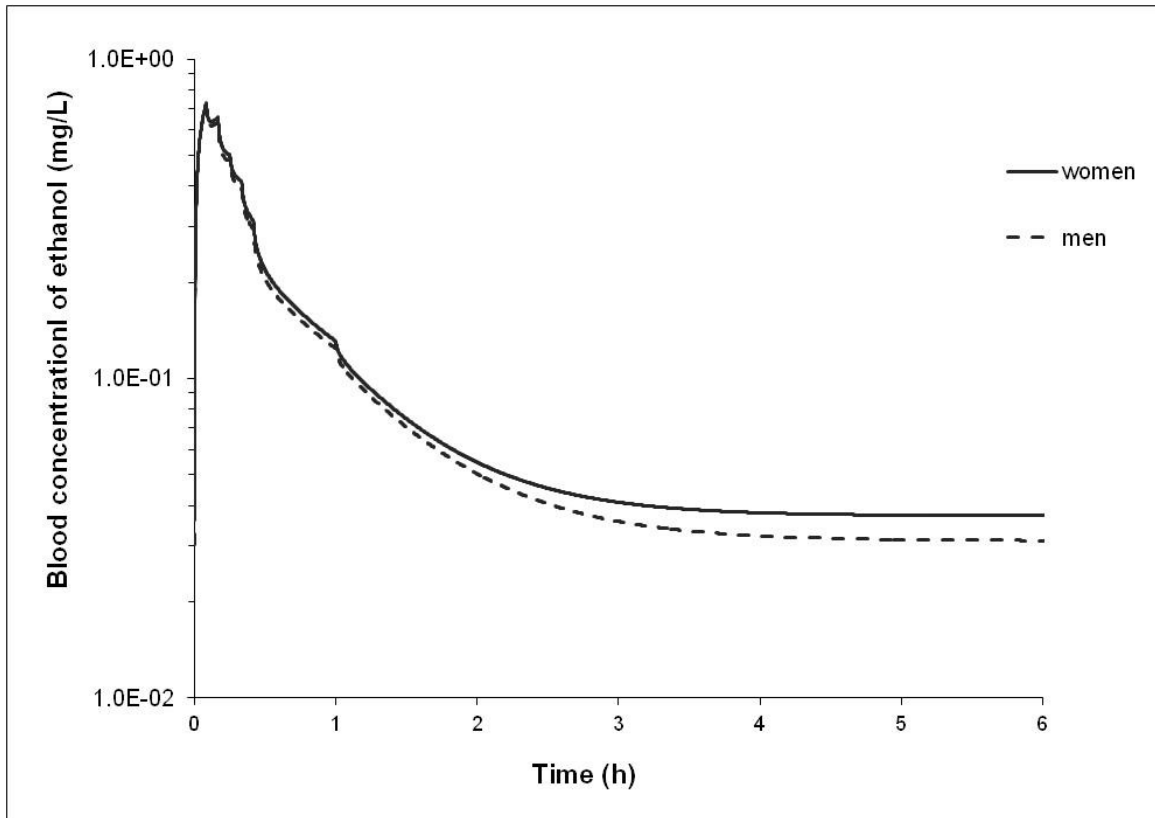


Figure 11. Simulation for the prediction of BLE by the PBPK model for the ethanol-based varnish for men and women with the following scenario: five minutes to 40 cm of the board followed by 55 minutes exposed to the concentration in the inhalation chamber and 23 hours without exposure.

3.2.11. Appendix

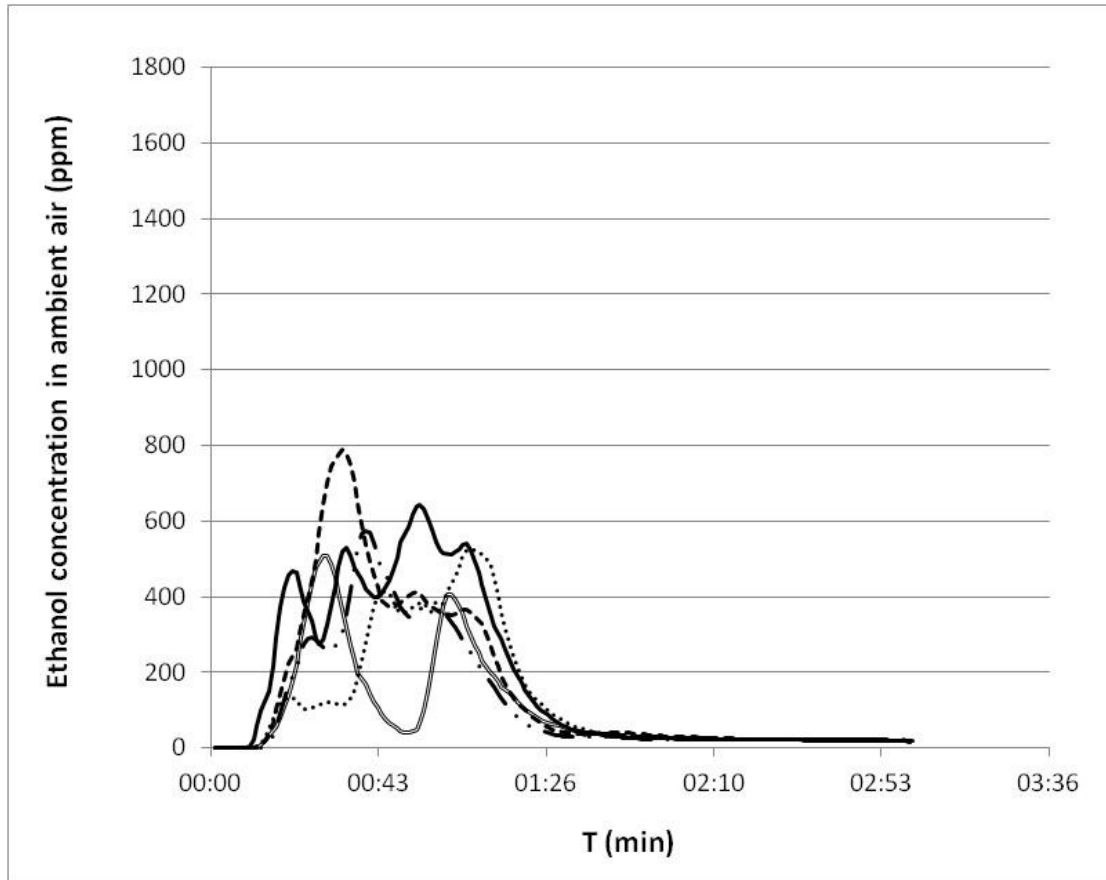


Figure A1: Ambient concentrations during the disinfection of the hands of the subject 1 with 1.5g of HAS in the inhalation chamber. First test (-.-.), second test (---), third test (full line), fourth test (=), and fifth test (...).

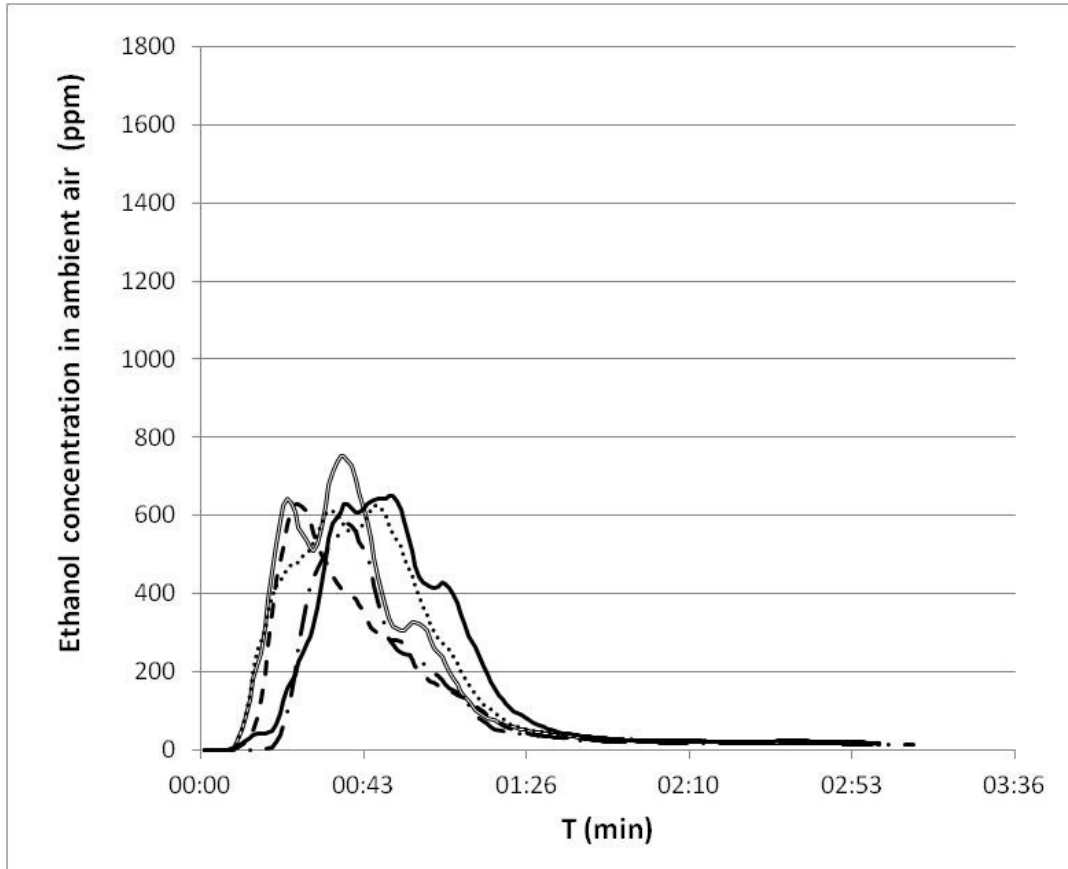


Figure A2: Ambient concentrations during the disinfection of the hands of the subject two with 1.5g of HAS in the inhalation chamber. First test (-.-.-), second test (---), third test (full line), fourth test (=), and fifth test (....).

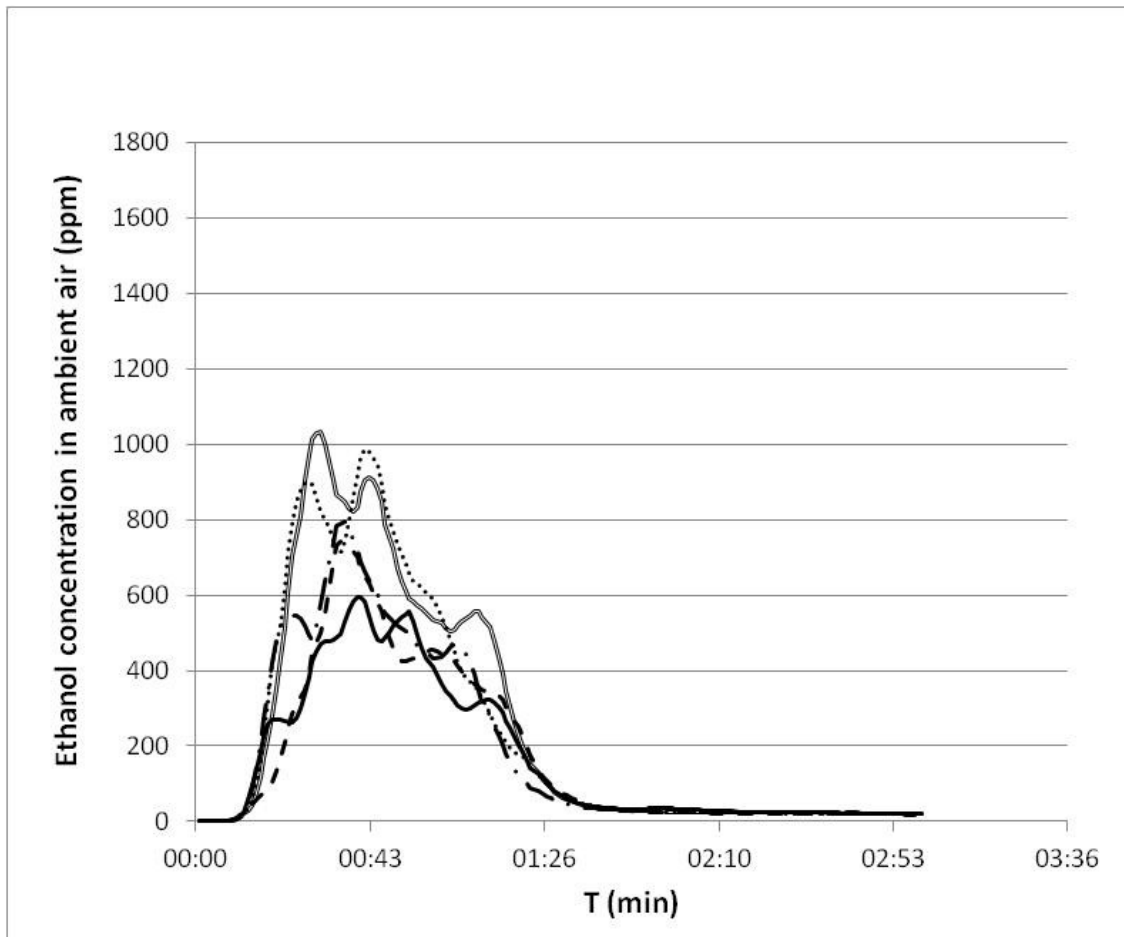


Figure A3: Ambient concentrations during the disinfection of the hands of the subject three with 1.5g of HAS in the inhalation chamber. First test (-.-.), second test (---), third test (full line), fourth test (=), and fifth test (....).

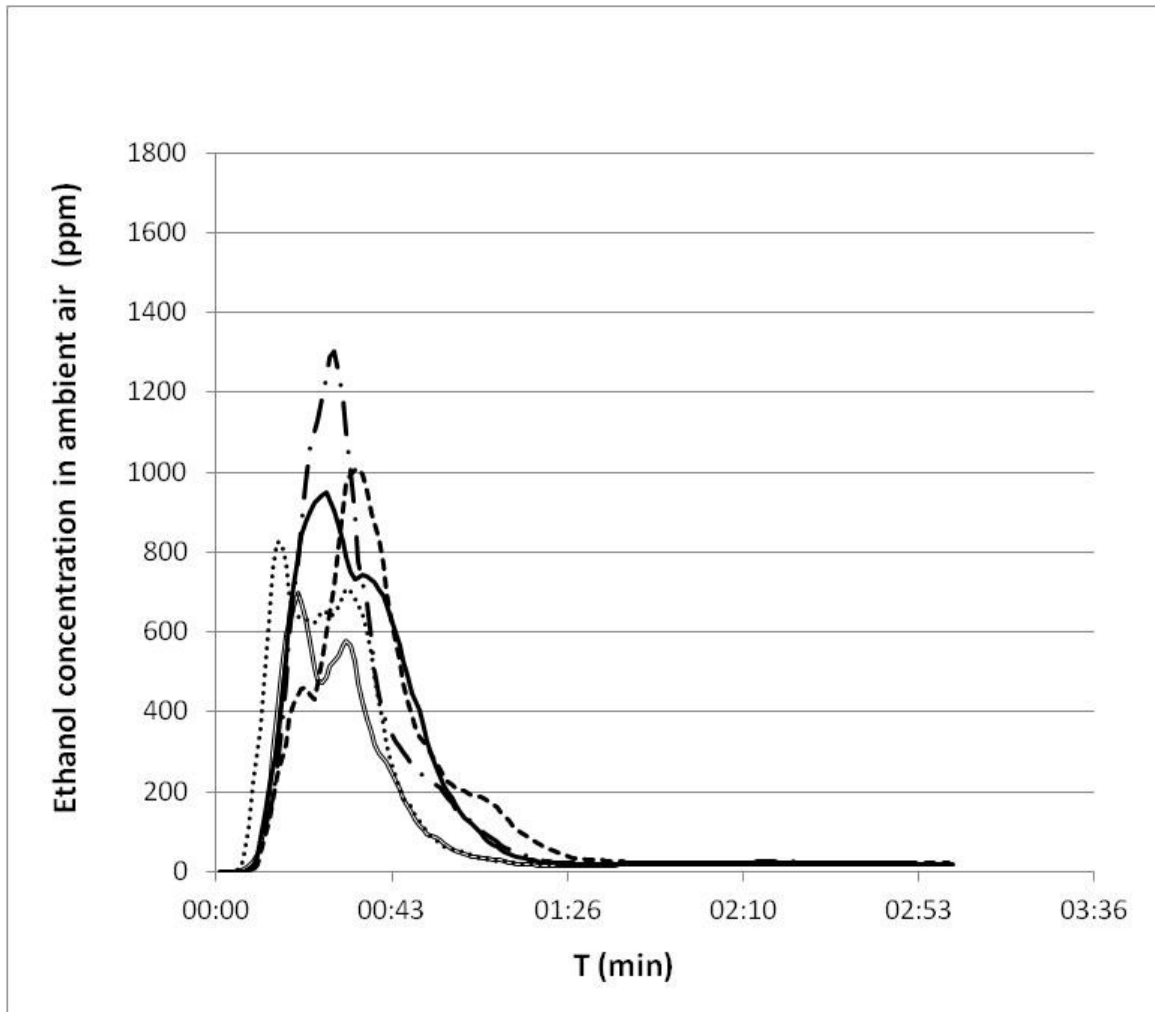


Figure A4: Ambient concentrations during the disinfection of the hands of the subject four with 1.5g of HAS in the inhalation chamber. First test (-.-.), second test (---), third test (full line), fourth test (=), and fifth test (...).

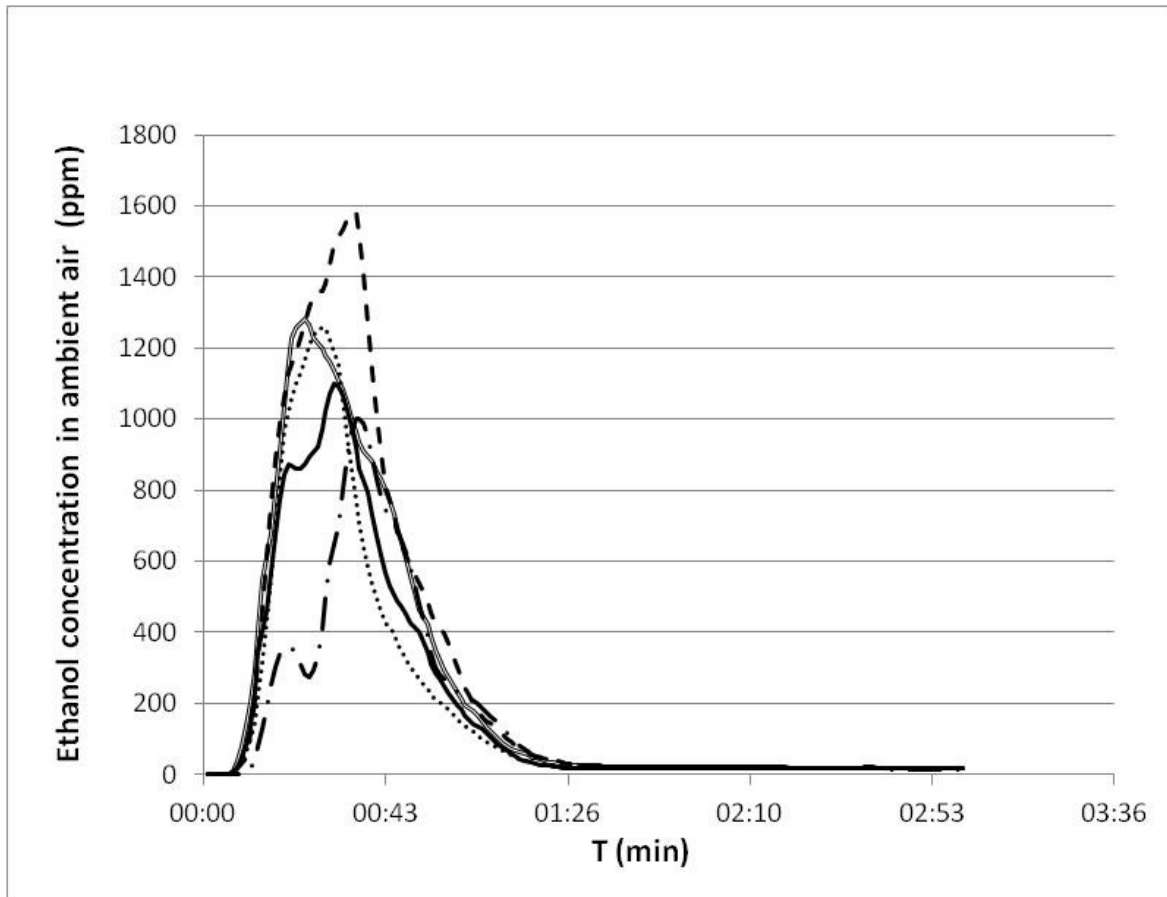


Figure A5: Ambient concentrations during the disinfection of the hands of the subject five with 1.5g of HAS in the inhalation chamber. First test (-.-.-), second test (---), third test (full line), fourth test (=), and fifth test (....).

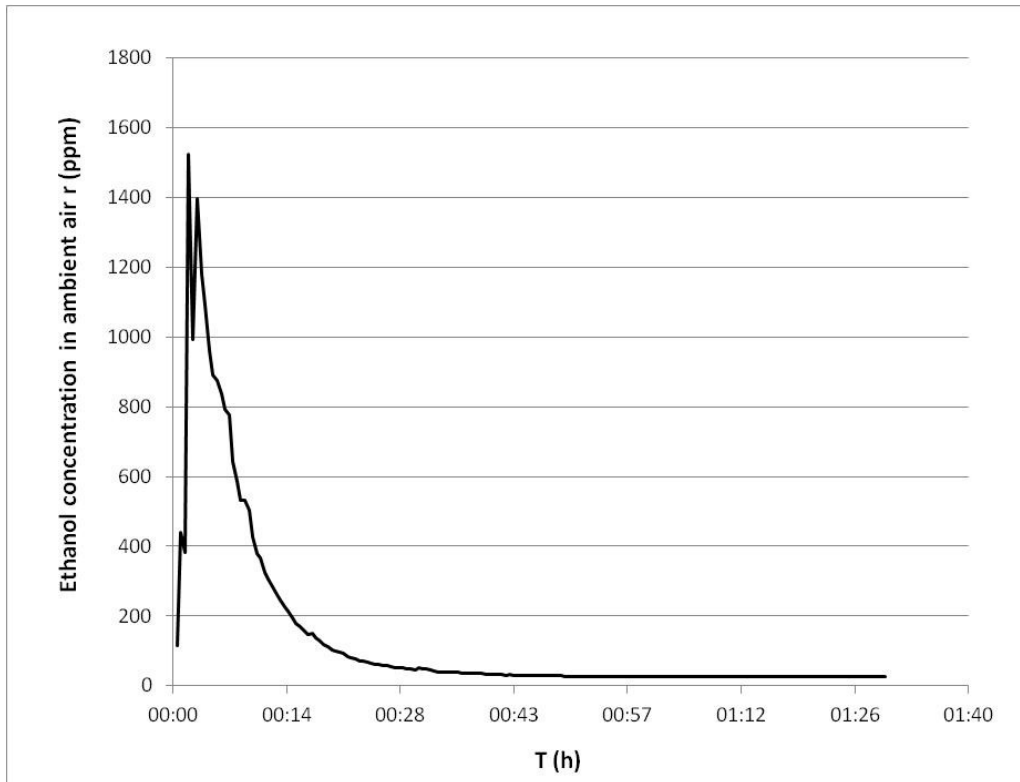


Figure A6: Changes in ethanol concentrations after the application of 125 ml of varnish on a surface of 1m² in the inhalation chamber: the measurements were made at 20 cm from the center of the wooden board.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

La grande diversité d'études réalisées sur l'exposition à l'éthanol par ingestion et sur ces conséquences toxicologiques chez l'humain a permis de classifier l'éthanol comme agent cancérigène de groupe 1 (IARC, 1998). Cependant, cela n'est plus le cas lorsque la voie d'exposition est changée. En effet, les données disponibles, chez l'être humain, pour l'exposition aux vapeurs d'éthanol sont très peu exhaustives. C'est pourquoi l'ANSES a décidé de recourir à la modélisation PBPK pour pouvoir effectuer des analyses de risque sur l'exposition aux vapeurs d'éthanol. Toutefois, le modèle utilisé par l'ANSES a été évalué à l'aide de données humaines suivant une exposition à des concentrations d'éthanol très élevées soit plus de 5000 ppm. Ainsi, une incertitude demeure quant à la validité du modèle pour prédire les concentrations sanguines d'éthanol suivant une exposition à des concentrations de plus faibles niveaux, soit de l'ordre de 1000 ppm et moins. L'intérêt de vérifier la validité de ce modèle pour des concentrations plus faibles vient du fait que ces concentrations représentent celles auxquelles peut être exposée la population dans le cadre d'activités domestiques et professionnelles. Les objectifs de ce projet de recherche ont donc été i) de documenter les niveaux d'éthanolémie suivant des expositions volontaire à de faibles concentrations d'éthanol et suivant l'application d'un exercice de 50W, ii) de valider le modèle PBPK à l'aide de ces données récoltées, iii) de déterminer les concentrations d'éthanol générées dans l'air ambiant suivant l'utilisation d'une solution hydro-alcoolique et de vernis afin de prédire les niveaux d'éthanolémie découlant de l'utilisation de ces produits.

Cette étude a permis, en premier lieu, de générer de nouvelles données cinétiques provenant de l'exposition humaine aux vapeurs d'éthanol. En effet, elle a rendu possible l'établissement des concentrations sanguines d'éthanol chez l'humain suite à des expositions à des concentrations

d'éthanol dans l'air ambiant allant de 125 ppm à 1000 ppm sous des conditions contrôlées en laboratoire. Les concentrations sanguines obtenues suite à l'exposition à 1000 ppm sont similaires à celles retrouvées dans la littérature (Nadeau et al., 2003). Cependant, les concentrations sanguines liées aux expositions plus faibles n'ont pu être comparées puisqu'aucune donnée semblable ne se retrouve dans la littérature à notre connaissance. De plus, ce projet a aussi permis de déterminer les concentrations d'éthanol dans l'air expiré des volontaires suite à ces mêmes expositions. Ces concentrations sont consistantes avec les études antérieures effectuées chez l'humain (Nadeau et al., 2003, Tardif et al., 2004). En outre, notre étude a démontré, en concordance avec d'autres études, que la fraction d'éthanol absorbée variait entre 70% et 80% au lieu de la valeur généralement utilisé de 62% que nous utilisons dans notre modèle (Tardif et al., 2004, Nadeau et al., 2003). Cependant, cette valeur généralement reconnue a été déterminée à l'aide de données venant d'une étude où les volontaires humains ont été exposés à des concentrations très élevées (5000 ppm à 10 000 ppm) (Lester and Greenberg, 1951). Cela pourrait donc indiquer qu'il existerait un processus non linéaire affectant la valeur de la fraction d'éthanol absorbée lors de l'inhalation des vapeurs d'éthanol.

Il a été aussi possible, pendant cette étude, de démontrer l'impact d'un exercice léger (50W) sur les niveaux d'éthanolémie. Il s'est avéré qu'un exercice léger augmentait significativement de 2 à 3 fois les concentrations sanguines en éthanol chez les volontaires. L'impact de cet exercice à 50W dans cette étude concorde avec ce qui est observé dans la littérature pour d'autres solvants (Nadeau et al., 2006, Tardif et al., 2007a, Tardif et al., 2007b, Truchon et al., 2009). Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que l'application d'un exercice ou une augmentation du niveau de travail peut amener à une augmentation de la dose interne par l'intermédiaire d'une

diminution du métabolisme de l'éthanol dû au détournement du flux sanguins des tissus splanchniques vers les muscles. De plus, il est possible que le niveau de risque à la santé augmente même pour des expositions respectant même les valeurs de références telle la VEMP lorsqu'un exercice est effectué ou lorsqu'une augmentation du niveau de travail a lieu.

Cette étude a démontré que le modèle PBPK original surestimait les niveaux d'éthanolémie lorsque les concentrations d'exposition en éthanol sont faibles (1000 ppm et moins). Les résultats du calcul du taux d'extraction total suggèrent fortement que le métabolisme de l'éthanol ne peut pas être qu'hépatique et qu'un métabolisme extra-hépatique de l'éthanol doit être présent chez l'homme. La contribution de celui-ci à la clairance de l'éthanol serait plus importante lors d'expositions à de faibles concentrations d'éthanol et, étant de faible capacité et saturable à de faibles concentrations, ce métabolisme serait plutôt négligeable lors d'expositions à hautes concentrations (>5000 ppm). Cette hypothèse d'une autre ADH métabolisant l'éthanol en dehors du foie est appuyée par la littérature (Crabb and Liangpunsakul, 2007) . Il y a effectivement des sous classes d'ADH présentes dans d'autres organes que le foie chez l'humain permettant de métaboliser l'éthanol (INSERM, 2001). L'isoforme ADH2 sous unité $\beta 1$ semble être celle qui correspondrait le mieux à ce que nous avons estimé avec notre modèle, en terme de valeurs de V_{max} et K_m ainsi qu'en terme de distribution tissulaire. Ainsi, le modèle original a été modifié par l'ajout d'une biotransformation extra-hépatique à haute affinité et faible capacité associée aux tissus richement perfusés. Cette modification a permis au modèle de décrire adéquatement la cinétique des niveaux d'éthanolémie pour des concentrations inférieures à 1000 ppm. La conséquence de ce travail est de finalement permettre au modèle PBPK de bien prédire les niveaux d'éthanolémie lors d'expositions éthanoliques à de faibles ou de forts niveaux.

Cette étude a aussi permis de documenter l'exposition aux vapeurs d'éthanol suivant l'utilisation de solutions hydro-alcooliques et de vernis à base d'éthanol. Complémentairement à cette documentation, cette partie du projet a aussi rendu possible l'utilisation du nouveau modèle PBPK pour prédire les concentrations sanguines suivant l'exposition à ces vapeurs en fonction de deux scénarios d'expositions probables (jour de travail d'une infirmière, vernissage d'une planche de bois).

Au niveau de l'utilisation de SHA, il a été démontré que les concentrations d'éthanol dans l'air ambiant variaient considérablement en fonction de la quantité utilisée, de l'individu qui effectuait la friction des mains et d'un test à l'autre, autant dans une pièce ventilée que dans une pièce non ventilée. De plus, l'AUC des concentrations ambiantes d'éthanol est plus élevée pour l'utilisation de 3 g que de 1,5 g de SHA dans une pièce ventilée. Logiquement, cela implique que l'exposition interne est plus importante avec l'augmentation de la quantité de SHA utilisée lors de la désinfection des mains si la personne se retrouve dans une pièce ventilée. Pour ce qui est de l'application de vernis à base d'éthanol sur une planche de bois (1 m²), il a été démontré qu'au dessus de la surface vernie les concentrations d'éthanol dans l'air ambiant ont atteint des niveaux relativement élevés malgré un changement d'air élevé (27 changement d'air. h⁻¹). Il est donc facile d'imaginer que les concentrations d'éthanol dans l'air ambiant pourraient facilement être plus élevées si ce travail avait été effectué dans une pièce bien moins ventilée tel qu'indiqué par d'autres études (ANSES, 2011).

La prédiction des concentrations sanguines à l'aide du nouveau modèle a donné une AUC des niveaux sanguins plus élevée pour l'utilisation de 3 g que de 1,5 g de SHA pour le scénario de 8 heures de travail avec exposition aux vapeurs de 42 frictions de SHA pendant la journée. Cela confirme que l'exposition interne à l'éthanol augmente en fonction de la quantité utilisée de SHA. La concentration sanguine maximale d'éthanol atteinte lors de ces simulations de 8 heures ne dépasse pas 1 mg.L^{-1} . La simulation de l'exposition d'une heure à l'application de vernis à base d'éthanol a donné, elle aussi, une concentration maximale d'éthanol dans le sang ne dépassant pas 1 mg.L^{-1} . Les concentrations maximales sanguines d'éthanol obtenues pour ces deux scénarios d'exposition aux vapeurs d'éthanol sont bien inférieures à la dose toxique pour les humains (100 mg.L^{-1}) (ANSES, 2011). Ainsi, notre étude démontre que ces types d'exposition ne semblent pas présenter un danger pour la santé. Il reste toutefois à déterminer les niveaux sanguins que pourrait engendrer le vernissage (répété ou d'une grande surface) en chambre confinée avec peu de ventilation.

Ce projet ouvre plusieurs portes pour des études futures ou pour des utilisations concrètes des données produites lors de cette étude. La première perspective future est d'effectuer une étude pour quantifier l'ADH2 β 1 retrouvée dans les poumons permettant ainsi de déterminer le V_{max} de cette enzyme. Cela permettrait de vérifier si les poumons sont bien les organes effectuant principalement le métabolisme extra-hépatique qui, dans cette étude, a été distribués aux tissus richement perfusés par manque d'information dans la littérature. De plus, il serait des plus intéressants de vérifier si les poumons exercent un effet de premier passage sur l'éthanol grâce à cet alcool déshydrogénase. Par la suite, il serait des plus captivants d'incorporer une description mathématique du principe de «Wash-in» et de «Wash-out» au nouveau modèle PBPK pour

prédire les concentrations d'éthanol dans l'air expiré. Une autre avenue serait aussi de raffiner le modèle en incorporant l'exercice dans les paramètres. Cela permettrait de vérifier si l'exposition des travailleurs respecte les normes d'exposition lorsque le niveau de travail augmente. Pour terminer, les résultats de cette étude permettront de raffiner l'évaluation du risque associé avec l'inhalation chronique de faibles niveaux d'éthanol pour la population générale et en particulier chez les travailleurs.

CHAPITRE 5. CONCLUSION

Cette étude est la seule, à notre connaissance, à documenter les niveaux d'éthanol dans le sang et l'air alvéolaire chez des volontaires (femmes et hommes) pour une gamme variée de concentrations d'exposition allant de 125 ppm (235 mg.m⁻³) à 1000 ppm (1880 mg.m⁻³) dans des conditions contrôlées en laboratoire. Nous avons montré que l'activité physique (charge de travail) même à un niveau moyen cause une augmentation significative (2 à 3 fois) de l'éthanolémie reflétant du même coup une diminution du métabolisme de l'éthanol. Les données produites dans cette étude ont permis de modifier la paramétrisation du modèle PBPK original, à savoir l'ajout d'un élément de métabolisme extra-hépatique, dont la contribution est significative à faibles concentrations d'exposition, qui permet de décrire adéquatement l'éthanolémie pour des expositions à des concentrations allant de 125 à 8500 ppm.

De plus, nous confirmons les résultats rapportés par d'autres chercheurs à savoir que l'utilisation de SHA pour la désinfection des mains se traduit par une exposition de courte durée à des niveaux qui tout en étant très variables demeurent relativement élevés et dont l'ampleur dépend principalement des conditions d'utilisation, notamment, la quantité utilisée et le lieu d'utilisation (pièce ventilée ou non). En ce qui concerne l'utilisation de vernis à base d'éthanol, nos résultats vont dans le même sens que ceux rapportés dans le rapport du GRE (ANSES, 2011) et soulignent qu'il s'agit là d'une activité qui peut générer des niveaux d'exposition relativement élevés, durant des périodes relativement longues et qui, en conséquence, devrait être réalisée dans des locaux bien ventilés. Cette étude a aussi permis de prédire les concentrations sanguines d'éthanol lors de la simulation de deux scénarios (SHA et vernis) avec le nouveau modèle PBPK. Ces deux simulations ont démontré que ces types d'exposition n'amenent pas un niveau sanguin d'éthanol qui est dangereux pour la santé humaine.

Pour terminer, les résultats de ce projet suscitent de nouveaux projets sur la quantification des ADH dans les poumons et la vérification de l'effet de premier passage dans les poumons. De plus, des efforts additionnels devront être déployés pour raffiner le nouveau modèle PBPK en incorporant le principe de «Wash-in» et de «Wash-out» et l'exercice dans les paramètres. Les résultats de ce projet auront surtout comme impact de permettre le raffinement de l'évaluation du risque pour une exposition chronique à de faibles niveaux de vapeurs d'éthanol chez la population générale et chez les travailleurs.

BIBLIOGRAPHIE

- AL-AWADHI, A., WASFI, I., REYAMI, F. A. & AL-HATALI, Z. 2004. Autobrewing revisited: endogenous concentrations of blood ethanol in residents of the United Arab Emirates. *Science & justice : journal of the Forensic Science Society*, 44, 149-52.
- ANDERSSON, P. & VICTORIN, K. 1996. Inhalation of ethanol. Literature survey and risk assessment. Stockholm: Institutet för miljömedicin.
- ANSES. 2010a. *Évaluation des risques de l'éthanol* [Online]. France: Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Available: <http://www.afsset.fr/index.php?pageid=2057&parentid=523> [Accessed 15 mars 2013].
- ANSES 2010b. *Évaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle*. France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail.
- ANSES 2011. *Évaluation des risques de l'éthanol pour la population générale*. Anses Éditions ed. France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- ARMSTRONG, S. 2000. Ethanol: Its use in gasoline: expected impacts and comments of expert reviewers. Massachusetts: Cambridge Environmental Inc.
- BONNARD, N., FALCY, M., JARGOT, D. & PASQUIER, E. 2011. Fiche toxicologique: Éthanol. France; Paris: Institut national de recherche et de sécurité.
- BRUCKNER, J. V. & WARREN, D. A. 2001. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLASSEN, C. D. (ed.) *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6 ed. New York: McGraw-Hill, p. 869-916
- CANO, N., BARNOUD, D., SCHNEIDER, S. M., VASSON, M.-P., HASSELMANN, M. & X.LEVERVE 2007. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte: Nourrir l'Homme malade*, France, Springer-Verlag, p. 1189
- CASSIE. 2013. *Andatech» Breathalyser FAQs* [Online]. Andatech. Available: <http://www.andatech.com.au/blog/breathalyser-faqs/> [Accessed 22 september 2013].
- CRABB, D. & LIANGPUNSAKUL, S. 2007. Acetaldehyde generating enzyme systems: roles of alcohol dehydrogenase, CYP2E1 and catalase, and speculations on the role of other enzymes and processes. *Novartis Found Symp*, 285, 4-16; discussion 16-22, 198-9.
- CSST. 2000. *Éthanol* [Online]. Montreal: Commission de la santé et de la sécurité du travail. Available: http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=893&nom=%C9thanol [Accessed 04 juin 2013].
- DUBOWSKI, K. 1979. The blood/breath ratio of ethanol. *Clinical Chemistry*, 25, 1144.
- DUCLUZEAU, R. & MEYRAN, S. 1999. Intoxications par monoalcools: alcools éthyliques, alcools isopropyliques. In: BARRIOT, P. & DANIEL, V. (eds.) *Intoxications aiguës en réanimation*. 2e ed. France: Wolters Kluwer France, p. 114-115
- GOLDIN, R. & WICKRAMASINGHE, S. 1987. Hepatotoxicity of ethanol in mice. *Br J Exp Pathol*, 68, 815-24.
- IARC 1998. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Alcohol drinking: summary of data reported and evaluation. France: International agency for research on cancer.
- INSERM 2001. Alcool: effets sur la santé. Expertise collective. Paris: Institut national de la santé et de la recherche médicale.

- KANEKO, T., WANG, P. Y. & SATO, A. 1994. Partition coefficients of some acetate esters and alcohols in water, blood, olive oil, and rat tissues. *Occup Environ Med*, 51, 68-72.
- KIRSEHNER, M. H., LANG, R. A., BREUER, B., BREUER, M., GRONOVER, C. S., ZWINGERS, T., BÖTTRICH, J. G., ARNDT, A., BRAUER, U., HINTZPETER, M., BURMEISTER, M.-A. & FAUTECK, J.-D. 2009. Transdermal resorption of an ethanol and 2-propanol-containing skin disinfectant. *Langenbecks Arch Surg*, 394, 151-157.
- LESTER, D. & GREENBERG, L. 1951. The inhalation of ethyl alcohol by man. I Industrial hygiene and medicolegal aspects. II Individuals treated with tetraethylthiuram disulfide *Quarterly Journal of Studies on Alcohol* 12, 167-178
- MALIK, F. & WICKRAMASINGHE, S. 1986. Haematological abnormalities in mice continuously exposed to ethanol vapour. *Br. J. exp. Path.*, 67, 831-838.
- MASON, J. K. & BLACKMORE, D. J. 1972. Experimental inhalation of ethanol vapour. *Med Sci Law*, 12, 205-208.
- NADEAU, V., LAMOUREUX, D., BEUTER, A., CHARBONNEAU, M. & TARDIF, R. 2003. Neuromotor effects of acute ethanol inhalation exposure in humans: a preliminary study. *J Occup Health*, 45, 215-22.
- NADEAU, V., TRUCHON, G., BROCHU, M. & TARDIF, R. 2006. Effect of physical exertion on the biological monitoring of exposure of various solvents following exposure by inhalation in human volunteers: I. Toluene. *J Occup Environ Hyg*, 3, 481-489.
- NELSON, B. K., BRIGHTWELL, W. S., MACKENZIE-TAYLOR, D. R., BURG, J. R. & MASSARI, V. J. 1988. Neurochemical, but not behavioral, deviations in the offspring of rats following prenatal or parternal inhalation exposure to ethanol. *Neurotoxicol and teratology*, 10, 15-22.
- PASTINO, G., ASGHARIAN, B., ROBERTS, K., MEDINSKY, M. & BOND, J. 1997. A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicology and applied pharmacology* 145, 147-157.
- POHORECKY, L. A. & BRICK, J. 1988. Pharmacology of ethanol. *Pharmacology and Therapeutics*, 36, 335-427.
- POULIN, P. & KANNAN, K. 1996. Molecular structure-based prediction of the partition coefficients of organic chemicals for physiological pharmacokinetic models. *Toxicology mechanisms and methods*, 6, 117-137.
- POULIN, P. & THEIL, F.-P. 2002. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *Journal of pharmaceutical science* 91, 1358-1370.
- QUÉBEC, G. D. 2013. *Règlement sur la qualité du milieu de travail* [Online]. Available: http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/S_2_1/S2_1R11.HTM [Accessed 04 juin 2013].
- REDDY, M., YANG, R. S., ANDERSEN, M. E. & III, H. J. C. 2005. *Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling: science and application*, New Jersey, John Wiley & Sons, p. 420
- SAAQ. 2013. *Permis de conduire* [Online]. Québec. Available: http://www.saaq.gouv.qc.ca/permis/en_route/alcool/zero_21.php [Accessed 18 mai 2013].
- SCHLOUCH, E. & TARDIF, R. 1999. Modélisation toxicocinétique de l'exposition à l'éthanol. Montreal: Université de Montréal.

- TARDIF, R., CHAREST-TARDIF, G., TRUCHON, G. & BROCHU, M. 2007a. Influence de la charge de travail sur les indicateurs biologiques d'exposition de cinq solvants. *Études et recherches / Rapport*. Montreal: IRSST.
- TARDIF, R., LIU, L. & RAIZENNE, M. 2004. Exhaled ethanol and acetaldehyde in human subjects exposed to low levels of ethanol. *Inhalation Toxicology*, 16, 203–207.
- TARDIF, R., NADEAU, V., TRUCHON, G. & BROCHU, M. 2007b. Effect of physical exertion on the biological monitoring of exposure to various solvents following exposure by inhalation in human volunteers: II. n-Hexane. *J Occup Environ Hyg*, 4, 502-8.
- TRUCHON, G., BROCHU, M. & TARDIF, R. 2009. Effect of physical exertion on the biological monitoring of exposure to various solvents following exposure by inhalation in human volunteers: III. Styrene. *J Occup Environ Hyg*, 6, 460-467.
- VAUBOURDOLLE, M. 2007. *Toxicologie Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques*, France, Wolters Kluwer, p. 1037

ANNEXE

Tableau A1: Concentrations d'éthanol dans l'air alvéolaire (ppm) mesurées chez les femmes (moyenne ± écart-type) pour les différents scénarii d'exposition.

Temps	126 ppm		[AA*/CE]
55min	26,6	3,31	21%
2:55hr	30,1	4,43	24%
3:55hr	29,1	3,00	23%
Temps	267 ppm		AA/CE
55min	44,4	6,5	17%
2:55hr	62,1	14,9	23%
3:55hr	56,8	14,7	21%
Temps	495 ppm		AA/CE
55min	87,7	11,6	18%
2:55hr	99,2	19,3	20%
3:55hr	98,5	16,8	20%
Temps	749 ppm		AA/CE
55min	159,8	28,9	21%
2:55hr	172,1	34,3	23%
3:55hr	164,6	35,6	22%
Temps	992 ppm		AA/CE
55min	216,4	28,1	22%
2:55hr	221,2	42,3	22%
3:55hr	223,2	32,2	22%

*AA= Air Alvéolaire, *CE= Concentration d'exposition

[AA/EE] : % du Rapport entre éthanol alvéolaire et éthanol ambiant

Tableau A2: Concentrations d'éthanol dans l'air alvéolaire (ppm) mesurées chez les hommes (moyenne ± écart-type) pour les différents scénarii d'exposition.

Temps	126 ppm		[AA*/CE]
55min	21,0	1,25	17%
2:55hr	21,0	2,82	17%
3:55hr	22,6	2,33	18%
Temps	249 ppm		AA/CE
55min	42,4	4,1	17%
2:55hr	49,4	9,2	20%
3:55hr	48,1	2,2	19%
Temps	497 ppm		AA/CE
55min	80,8	23,24	16%
2:55hr	100,1	20,94	20%
3:55hr	84,0	14,54	17%
Temps	756 ppm		AA/CE
55min	141,3	32,44	19%
2:55hr	142,5	29,19	19%
3:55hr	141,3	28,47	19%
Temps	1050 ppm		AA/CE
55min	171,4	17,18	16%
2:55hr	180,8	29,31	17%
3:55hr	193,1	18,36	18%

*AA= Air Alvéolaire, *CE= Concentration d'exposition

[AA/EE] : % du Rapport entre éthanol alvéolaire et éthanol ambiant

Comité d'éthique de la recherche des sciences de la santé

CERTIFICAT D'ÉTHIQUE

Le Comité d'éthique de la recherche des sciences de la santé (CÉRSS), selon les procédures en vigueur, en vertu des documents qui lui ont été fournis, a examiné le projet de recherche suivant et conclu qu'il respecte les règles d'éthique énoncées dans la Politique sur la recherche avec des êtres humains de l'Université de Montréal.

Projet	
Titre du projet	Évaluation des niveaux d'éthanolémie résultant de l'exposition à l'éthanol par inhalation: Études chez des volontaires et modélisation toxicocinétique.
Chercheurs requérants	Robert Tardif (18574), Professeur titulaire, Faculté de médecine - Département de santé environnementale et santé au travail. Sami Haddad (N.D.), Professeur agrégé, Faculté de médecine - Département de santé environnementale et santé au travail.

Financement	
Organisme	Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses, France)
Programme	Contrat
Titre de l'octroi si différent	
Numéro d'octroi	
Chercheur principal	
No de compte	

MODALITÉS D'APPLICATION

Tout changement anticipé au protocole de recherche doit être communiqué au CÉRSS qui en évaluera l'impact au chapitre de l'éthique.

Toute interruption prématurée du projet ou tout incident grave doit être immédiatement signalé au CÉRSS.

Selon les règles universitaires en vigueur, un suivi annuel est minimalement exigé pour maintenir la validité de la présente approbation éthique, et ce, jusqu'à la fin du projet. Le questionnaire de suivi est disponible sur la page web du CÉRSS.

Marie-France Daniel, présidente
Comité d'éthique de la recherche des sciences
de la santé (CÉRSS)
Université de Montréal

16 août 2011
Date de délivrance

1er septembre 2012
Date de fin de validité

adresse postale

C.P. 6128, succ. Centre-ville
Montréal QC H3C 3J7

Département de kinésiologie
Cepsum
2100 Boul. Édouard-Montpetit
7^e étage, bur. 7213
Montréal QC H3T 1J4

Téléphone : 514-343-6111 poste 2604
Télécopieur : 514-343-2181
cerss@umontreal.ca