

Université de Montréal

MODÈLE PHARMACOCINÉTIQUE À BASE PHYSIOLOGIQUE (PBPK)
POUR LES COMPOSÉS HAUTEMENT LIPOPHILES

par

Claude Emond

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Santé Publique,
option Toxicologie de l'environnement

Septembre 2001

© Claude Emond 2001



WA
5
U58
2001
v. 006

U

WA
5
U58
2001
v. 006

U

Université de Montréal
Facultés des études supérieures

Cette thèse intitulée :

MODÈLE PHARMACOCINÉTIQUE À BASE PHYSIOLOGIQUE (PBPK)
POUR LES COMPOSÉS HAUTEMENT LIPOPHILES

présentée par :

Claude Emond

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Joseph Zayed, Président-rapporteur

Docteur Kannan Krishnan, Directeur de recherche

Docteur Robert Tardif, Examineur interne

Docteur Pierre Ayotte, Examineur externe

Docteur Louis Cartilier, Représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le :

Sommaire

Les composés organiques hautement lipophiles (COHL) font partie des polluants organiques persistants (POP) (p.ex. TCDD, BPC, pesticides organochlorés). Ces composés ont une liposolubilité très élevée, ce qui indique qu'ils ont tendance à se distribuer dans les fractions lipidiques des tissus (e.g. tissu adipeux, membrane cellulaire). Les modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK) conventionnels utilisent le tissu entier lors de sa description i.e. les lipides, les protéines et l'eau forment un tout homogène. Il n'existe actuellement aucun outil qui permet de prédire la distribution de ces composés dans la fraction lipidique des divers compartiments de l'organisme pour des expositions chroniques. Jusqu'à maintenant, aucun modèle PBPK n'a été proposé, pour l'évaluation du risque, en utilisant seulement la fraction lipidique des compartiments pour l'établissement de biomarqueurs d'exposition. Les composés visés sont considérés comme persistants dans les tissus biologiques mais la prédictibilité de la charge tissulaire est difficile pour une application en évaluation du risque toxicologique à cause de la diversité des scénarios d'expositions. Les objectifs de cette recherche sont de développer et de valider deux approches originales, un modèle PBPK et un algorithme, permettant d'établir des niveaux acceptables de biomarqueurs d'exposition pour les COHL. Le modèle proposé comporte 5 compartiments (tissu adipeux, tissus richement perfusés, tissus faiblement perfusés, foie et sang, décrits sur la base de leurs lipides neutres. En réalité, la présence dans les tissus de phospholipides nécessite le calcul d'une équivalence de lipide neutre (NLE). Pour des COHL, trois paramètres influencent la distribution soient, le taux d'absorption (K_a), le coefficient de partage tissu:sang ($P_t : b$) et le coefficient d'extraction hépatique (E). Le K_a a été fixé à 0.2 hr^{-1} selon des données de la littérature. Le coefficient de partage n'est pas requis car, le modèle est basé sur une équivalence de lipide neutre décrivant une solubilité identique entre le compartiment tissulaire et le sang. Le coefficient d'extraction est le seul facteur qui varie suivant le COHL simulé et n'a jamais été déterminé pour ces types de composés à partir de données expérimentales. Ce modèle a été validé à partir de données portant sur des composés organiques volatils hautement lipophiles (i.e. α -pinène, d-limonène, 1,2,4-triméthyl benzène et le n-hexane) obtenues chez le rat

et/ou l'humain. La validité de cette nouvelle approche a aussi été démontrée avec 29 composés COHL dont 15 BPCs : 2,4,4'-trichlorobiphényle (PCB-28), 2,4,6-trichlorobiphényle (PCB-32), 2,2',4,4',5-pentachlorobiphényle (PCB-99), 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphényle (PCB-101), 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphényle (PCB-105), 2,3',4,4',5-pentachlorobiphényle (PCB-118), 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphényle (PCB-128), 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphényle (PCB-138), 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle (PCB-153), 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphényle (PCB-156), 2,2',3,3',4,4',5'-heptachlorobiphényle (PCB-170), 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphényle (PCB-180), 2,2',3,4,4',5,6-heptachlorobiphényle (PCB-183), 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphényle (PCB-187), heptachlorobiphényle; 2,2',3,3',4,5,6,6'-octachlorobiphényle (PCB-199), ainsi que 14 pesticides : hexachlorobenzène (HCB), α -hexachlorocyclohexane, β -hexachlorocyclohexane, γ -hexachlorocyclohexane, oxychlordane, cis-chlordane, trans-chlordane, cis-nonachlore, trans-nonachlore, dieldrine, dichlorodiphenyldichloroéthylène (DDE), dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), mirex et toxaphène. La présente étude a déterminé que la distribution du coefficient d'extraction hépatique variait entre 0 et 0.1 pour les pesticides organochlorés et les BPC. Ceci représente la première initiative utilisant le modèle PBPK pour définir la concentration de référence de biomarqueurs d'exposition. Un algorithme basé sur les NLE a aussi été développé pour déterminer la concentration sanguine des substances lors d'expositions sub-chronique et chronique. L'algorithme a été validé en comparant la concentration simulée par le modèle PBPK avec la concentration calculée par l'algorithme et utilisée pour déterminer la concentration sanguine correspondant au niveaux d'exposition du NOAEL (dose d'exposition où on ne retrouve pas d'effet délétère) pour divers POPs (i.e. dieldrine, DDT, mirex, hexachlorobenzène). Ce projet permet, pour la première fois de développer des outils mécanistiques (modèle PBPK et algorithme) pour simuler la concentration de biomarqueurs d'exposition chez le rat et l'humain exposés au COHL et qui sont basés sur le contenu lipidique des tissus tout en négligeant l'utilisation des coefficients de partage tissu:sang.

Abstract

Highly lipophilic organic substances (HLOCs) are concentrated almost uniquely in the neutral lipid fraction of tissues and blood. As suggested by their high n-octanol:water partition coefficient (>10000), their solubility in water fraction of tissues and blood is negligible. However, the conventional physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models assume that HLOCs are distributed uniformly in the various tissue constituents such as proteins, lipids and water. The primary objective of this research project was to develop and validate a PBPK modeling approach for simulating the tissue and blood concentrations of HLOCs based on the consideration of their solubility in neutral lipid component of tissues and blood. A secondary objective was to develop and validate an algorithm for relating exposure dose to the blood concentrations of HLOCs, based on their liposolubility and elimination characteristics. The PBPK model developed in this study contained five compartments (blood, fat, richly perfused tissues, slowly perfused tissues and hepatic tissue) that were described in terms of their content of neutral lipid equivalent (NLE) fraction. The physiological parameters and oral absorption constant (0.2 hr^{-1}) for the PBPK model were obtained from the literature whereas the hepatic extraction coefficient (E) for the various HLOCs were estimated in the present study following *in vivo* exposures. The tissue:blood partition coefficients were not required because the PBPK model described all compartments on the basis of their content of NLE. The NLE-based PBPK model was validated with rat and human data on the inhalation pharmacokinetics of volatile HLOCs such as α -pinene, d-limonene, 1,2,4-trimethyl benzene and n-hexane. This modeling approach was also validated for non-volatile HLOCs in mixtures (i.e., 2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB-28), 2,4,6-trichlorobiphenyl (PCB-32), 2,2',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-99), 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl

(PCB-101), 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB-105), 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-118); 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl (PCB-128), 2,2',3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-138), 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB-153), 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156), 2,2',3,3',4,4',5-heptachlorobiphenyl (PCB-170), 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB-180), 2,2',3,4,4',5,6-heptachlorobiphenyl (PCB-183), 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (PCB-187), 2,2',3,3',4,5,6,6'-octachlorobiphenyl (PCB-199), and fourteen organochlorine pesticides [hexachlorobenzene (HCB), α -hexachlorocyclohexane, β -hexachlorocyclohexane, γ -hexachlorocyclohexane, oxychlordan, *cis*-Chlordane, *trans*-chlordan, *cis*-nanochlor, *trans*-nanochlor, dieldrin, dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), Mirex and toxaphene) administered to rats at different doses and scenarios. The hepatic extraction coefficients estimated in this study ranged from 0 to 0.1 for PCBs and organochlorine pesticides in mixture. This study, for the first time, applied PBPK models to establish the reference biomarker concentrations (e.g., blood concentrations). An algorithm for determining the blood concentrations of HLOCs during chronic and sub-chronic exposures was also developed. This algorithm, based on the consideration of hepatic clearance and solubility in body NLEs of HLOCs, was validated by comparing the calculated blood concentrations with the simulations of PBPK models, for repeated exposures of rats to NOAELs (no observable adverse effect levels) of some persistent organic pollutants (i.e., dieldrin, DDT, Mirex and hexachlorobenzene). This project for the first time has developed mechanistic pharmacokinetic tools (i.e., a PBPK model and an algorithm), that do not require the knowledge of tissue:blood partition coefficients, for simulating tissue and blood concentrations of HLOCs on the basis of the consideration of their solubility in NLEs.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	I
IDENTIFICATION DU JURY	II
SOMMAIRE	III
INDEX DES TABLEAUX	XI
INDEX DES FIGURES	XVII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	XXII
REMERCIEMENT	XXVI
[CHAPITRE 1] INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.0 Les composés organiques hautement lipophiles (COHL)	2
1.1)- Caractéristiques des principaux composés hautement lipophiles	3
1.2)- Présence des COHL dans l'environnement	8
1.2.1)- Charge des COHL dans le milieu	9
1.2.1.1)- Eau, sol, air	9
1.2.1.2)- Tissus animaux.....	10
1.2.1.2.1)- Composés hautement lipophiles dans le lait maternel	12
1.2.1.2.2)- Barrière placentaire	14
2.0 Pharmacocinétique des composés hautement lipophiles	
2.1)- Absorption	15
2.2)- Distribution	16
2.3)- Métabolisme	16
2.3.1)- Induction enzymatique	18
2.3.2)- Biotransformation	20

2.4)- Excrétion	21
3.0)- Principaux effets des COHL sur la santé	23
4.0)- La modélisation PBPK comme outil pour étudier la distribution et la persistance des composés organochlorés hautement lipophiles	27
4.1)- Historique des modèles PBPK	28
4.2)- Description des processus de modélisation.....	28
4.2.1)- Représentation du modèle	33
4.2.1.1)- Représentation conceptuelle	33
4.2.1.2)- Représentation fonctionnelle	37
4.2.1.2.1)- Voie d'exposition (Absorption)	42
4.2.1.2.1.1)- Exposition par voie intraveineuse.....	43
4.2.1.2.1.2)- Exposition par voie gastro-intestinale	43
4.2.1.2.1.3)- Exposition par voie pulmonaire	44
4.2.1.2.2)- Compartiments tissulaires	45
4.2.1.2.3)- Métabolisme	50
4.2.2)- Estimation des paramètres	52
4.2.2.1)- Paramètres physiologiques	52
4.2.2.2)- Paramètres physico-chimiques	53
4.2.2.3)- Paramètres biochimiques	54
4.2.3)- Simulation	55
4.2.4)- Validation	56
4.2.5)- Raffinement	57
5.0)- Analyse des modèles PBPK publiés sur les composés hautement lipophiles	57
6.0)- Problématique et proposition d'un nouveau modèle	64
7.0)- Objectifs de la thèse	73
7.1)- Objectif général	73
7.2)- Objectifs spécifiques	74
8.0)- Organisation de la thèse	75

[CHAPITRE 2]

Article 1 A physiological pharmacokinetic model based on tissue lipid content for simulating inhalation pharmacokinetics of highly lipophilic volatile organic chemicals.	78
Abstract	80
Introduction	81
Methods	83
Results	92
Discussion	93
References	96

[CHAPITRE 3]

Article 2 Physiologically-based modeling of the accumulation in plasma and tissue lipids of a mixture of PCB congeners in female Sprague-Dawley rats.	108
Abstract	110
Introduction	111
Materials and Methods.....	114
Results	121
Discussion	123
References	128

[CHAPITRE 4]

Article 3 Development of reference biomarker concentrations for several organochlorine contaminants using physiologically-based pharmacokinetic models	145
Abstract	147
Introduction	148
Materials and Methods	151
Results	158
Discussion	160
References	162

[CHAPITRE 5]

Article 4 A pharmacokinetic algorithm for predicting the blood concentration of persistent organic pollutants in exposed biota	177
Abstract	179
Introduction	181
Methodology and Results	183
Discussion	189
References	193

[CHAPITRE 6] Discussion générale	206
---	------------

[CHAPITRE 7] Bibliographie	217
---	------------

Index des tableaux

Chapitre 1. Introduction générale

Tableau 1.1.T2.	5
Structure et numérotation IUPAC des congénères de BPC	
Tableau 1.1.T1	6
Structure et numérotation IUPAC des congénères de BPC (suite)	
Tableau 4.2.1.2.T1	38
Exemple de regroupement d'organes ou de tissus dans un contexte de modélisation.	
Tableau 5.0.T1:.....	59
Liste des principaux modèles PBPK publiés pour les composés hautement lipophiles	
Tableau 5.0.T1	60
Liste des principaux modèles PBPK publiés pour les composés hautement lipophiles (suite)	
Tableau 6.0.T1	67
Composition tissulaire en lipides et en eau chez le rat	
Tableau 6.0.T2:	68
Composition tissulaire en lipides et en eau chez l'humain	
Tableau 6.0.T3	70
Fractions en eau et en lipide neutre équivalent calculées pour différents compartiments tissulaires chez le rat et l'humain.	

Tableau 6.0.T4	73
----------------------	----

Distribution de la charge de BPC dans l'organisme
à l'état d'équilibre chez le rat*

Chapitre 2. Article 1

Tableau 1:	100
------------------	-----

Lipid contents of rat and human tissues

Tableau 2:	101
------------------	-----

Physiological and biochemical parameters of rat PBPK
model for n-hexane

Tableau 3:	102
------------------	-----

Parameters of human PBPK model for HLVOCs^a

Chapitre 3. Article 2

Tableau 1:.....	137
-----------------	-----

Lipid contents of rat tissues and blood ^a

Tableau 2 :	138
-------------------	-----

Physiological parameters of rat PBPK model

Tableau 3:	139
------------------	-----

Comparison of PBPK model simulation (SIM) obtained by fitting to
experimental data (Exp; mean \pm SEM) on liver lipid concentrations
($\mu\text{g/ml}$) of PCBs (congeners 118,138,153,170,180 and 187) determined
on days 41 and 90 in rats administered 5, 50 or 500 $\mu\text{g/kg}$ of each
congener according to four protocols.

Tableau 4: 140

Elimination rate constants (K_f ; h^{-1}) obtained by fitting PBPK model simulations to experimental data on hepatic concentrations found on days 41 and 90 following exposure of rats to PCB mixtures by various protocols.

Tableau 5: 141

Comparison of PBPK model predictions (Mod) with experimental data (Exp; mean \pm SEM) on plasma lipid concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of PCBs (congeners 118,138,153,170,180 and 187) determined on days 41 and 90 in rats administered 5, 50 or 500 $\mu\text{g/kg}$ of each congener according to four protocols.

Tableau 6: 142

Comparison of PBPK model predictions (Mod) with experimental data (Exp; mean \pm SEM) on adipose tissue concentrations ($\mu\text{g/ml}$ lipid) of PCBs (congeners 118,138,153,170,180 and 187) determined on days 41 and 90 in rats administered 5, 50 or 500 $\mu\text{g/kg}$ of each congener according to four protocols.

Chapitre 4. Article 3

Tableau 1:	171
Lipid contents of rat tissues and blood ^a	
Tableau 2 :	172
Physiological parameters of the rat PBPK model	
Tableau3:	173
Inuit dietary intake of organochlorine pesticides and polychloro biphenyls (PCBs) ¹	
Tableau 4:	174
Dose levels ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) of organochlorine substances administered as mixtures by gavage to rats during 28 days.	
Tableau 5:	175
Comparison of experimental data (Exp; ng/ml) with PBPK model simulations (Sim.) of blood concentrations of several organochlorine substances in rats exposed to different mixtures.	

Tableau 6:	176
Comparison of experimental data (Exp; ng/ml) with PBPK model simulations (Sim.) of hepatic concentrations of several organochlorine substances in rats exposed to different mixtures.	
Tableau 7:	177
Comparison of experimental data (Exp; ng/ml) with PBPK model simulations (Sim.) of fat concentrations of several organochlorine substances in rats exposed to different mixtures.	
Tableau 8:	178
Hepatic extraction coefficients (E) of organochlorine substances estimated by optimization of PBPK model simulations to blood concentration obtained in rats administered three different mixture during 28 days.	
Tableau 9:	179
Hepatic extraction coefficients (E) of organochlorine substances estimated by hepatic optimization of PBPK model simulations to blood concentration obtained in rats administered three different mixture during 28 days. ^a	
Tableau10 :	180
Blood concentrations corresponding to the chronic NOAELs of several organochlorine substances ^a	

Chapitre 5. Article 4

Tableau 1	199
Volume fraction of tissues and neutral lipids in tissues of rats ^a	
Tableau 2	200
Numerical values of parameters used for the calculation of maximal blood concentration of persistent organic pollutants (POPs) in the rat.	
Tableau 3	201
Relationship between calculated blood concentration (C _{blood_cal}) and blood concentration obtained via simulation (C _{blood_sim}) ^a	

Index des figures

Chapitre 1. Introduction générale

Figure 1.1.F1	7
Représentation générique d'une molécule de BPC, composé d'un squelette biphenyle et d'atomes de chlore.	
Figure 1.1.F2.....	7
Structure d'un composé de la famille des PCDD	
Figure 4.2.F1 :	32
Étapes requises dans le développement d'un modèle PBPK. (Adapté de: Krishnan et Andersen, 2001)	
Figure 4.2.1.1.F1:	36
Représentation conceptuelle d'un modèle PBPK	
Figure 4.2.1.2.F1	39
Exemple d'un modèle à deux compartiments.	
Figure 4.2.1.2.F2:	40
Représentation schématique des sous-compartiments d'un tissu.	

Figure 4.2.1.2.2.F1:	46
----------------------------	----

Compartiment tissulaire où l'entrée des
xénobiotiques est limitée par la perfusion des tissus

Figure 4.2.1.2.2.F2	48
---------------------------	----

Compartiment tissulaire où l'entrée des xénobiotiques
est limitée par la diffusion à travers la membrane cellulaire.

Figure 6.0.F1	71
---------------------	----

Relation entre la circulation sanguine et les organes
périphériques pour un modèle à trois compartiments.

Chapitre 2. Article 1

Figure 1	105
----------------	-----

Conceptual representation of the PBPK model for HLVOCs used in
the present study.

Figure 2.	106
----------------	-----

Venous blood concentration of n-hexane in rats exposed to 100,
200, and 800 ppm for 4 hr.

Figure 3	107
----------------	-----

Venous blood concentrations in humans exposed for 2 hr to 40 ppm (A) or 80 ppm (B) of α -pinene. The experimental data (mean \pm SD) are represented by symbols whereas the solid line is model simulation.

Figure 4 108

Venous blood concentrations in humans exposed for 2 hr to 40 ppm (A) or 80 ppm (B) of d-limonene. The experimental data (mean \pm SD) are represented by symbols whereas the solid line is model simulation.

Figure 5 109

Venous blood concentrations in humans exposed for 2 hr to 2 ppm or 25 ppm (B) of 1,2,4-trimethylbenzene (TMB). The experimental data (mean \pm SD) are represented by symbols whereas the solid line is model simulation.

Chapitre 3. Article 2

Figure.1142

Conceptual representation of the PBPK model used in the present study.

Figure 2 143

PBPK model simulations of the plasma concentration ($\mu\text{g/g}$ lipid) of PCB-118 in rats receiving (A) 50 $\mu\text{g/kg/day}$, (B) 50 $\mu\text{g/kg/week}$, (C) 50 $\mu\text{g/kg/day}$ for 13 days followed by no-treatment, (D) 50 $\mu\text{g/kg}$ on days 1, 7, 8, 11, 21,

36, 46, 49, 50, 55, 67, 70 and 85 of the experiment. The dosing pattern for each of the protocol is indicated with vertical lines on X axis.

Figure 3 149

PBPK model simulations of the plasma concentration of PCB-118 in terms of $\mu\text{g/g}$ of total lipid (A) or $\mu\text{g/g}$ neutral lipid equivalents (B) in rats receiving $50 \mu\text{g/kg/d}$.

Chapitre 4. Article 3

Figure.1 175

Conceptual representation of the PBPK model used in the present study.

Chapitre 5. Article 4

Figure 1 203

Blood concentration (Clb) of PCB-170 following daily dosing of rats with $5 \mu\text{g/kg}$. The calculated Clb values are plotted as a series of symbols (diamonds $E=0$; squares $E = 0.0017$). Experimental data (\blacktriangle) are from Emond et al. (2001) for days 41 and 90.

Figure 2 204

Comparison between exposure dose corresponding to NOAEL (mg/kg/d) and calculated blood concentration ($\mu\text{g/L}$ NLE) in rats at the end of a lifetime exposure.

Figure 3 205

Relationship between blood concentration (C_{lb} , ($\mu\text{g/L}$ lipid NLE)) calculated using the algorithm developed in this study and the simulations of PBPK models.

LISTE DES SIGNES ET ABRÉVIATIONS

16 α OH1	16 α -hydroxyoestrone
2-OH1	2-hydroxyoestrone
Alt	Quantité de xénobiotique dans les compartiments tissulaires (mg)
At	Quantité de xénobiotique dans la matrice cellulaire du tissu (mg)
A _t	Quantité de xénobiotique dans le tissu t (mg)
Atb	Quantité de xénobiotique dans le sang du tissu (mg)
Atb ₀	Quantité de xénobiotique dans le sang du tissu (mg) au temps zéro
BCF	Facteur de bioconcentration
BPC	Biphényle polychloré
BW	Poids corporel
C	Concentration (mg/L)
C ₁ , C ₂	Concentration de xénobiotique de part et d'autre de la membrane (mg/L)
C _A	Concentration dans le compartiment A (mg/L)
Ca	Concentration artérielle (mg/L)
C _{body}	Concentration moyenne de l'individu entier (mg/L)
C _B	Concentration dans le compartiment B (mg/L)
C _b	Concentration de xénobiotique dans le sang veineux quittant le tissu (mg/L)
C _{body}	Concentration de xénobiotique dans l'organisme (mg/L)
C _{inh}	Concentration de xénobiotique dans l'air inhalé (mg/L)
Cl _a	Concentration de xénobiotique dans le sang artériel (mg/L NLE)
Cl _b	Concentration de xénobiotique quittant le compartiment hépatique
Cl _l	Concentration de xénobiotique dans foie (mg/L NLE)
Cl _t	Concentration dans le compartiment tissulaire (mg/ L NLE)
Cl _{tl}	Concentration dans le compartiment tissulaire exprimé en lipide totaux
COHL	Composé organique hautement lipophile
C _t	Concentration dans le compartiment tissulaire (mg/L NLE)
C _v	Concentration de xénobiotique dans le sang veineux (mg/L)
C _{vt}	Concentration de xénobiotique sortant du tissu (mg/L)
CYP	Cytochrome P-450
D	Coefficient de diffusion d'un sous-compartiment à l'autre

D_a	Dose de xénobiotique administrée oralement (mg)
DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
dA_a/dt	Taux d'absorption du xénobiotique (mg/h)
dA_{met}/dt	Taux de xénobiotique métabolisé dans le foie (mg/h)
dAt/dt	Taux de variation de la quantité de xénobiotique dans la matrice cellulaire (mg/L)
$dAtb/dt$	Taux de variation de la quantité de xénobiotique dans le sang du tissu (mg/h)
E	Coefficient d'extraction hépatique
F	Fraction de la dose absorbée
Frac_Li_lip	Fraction de lipide neutre équivalent dans le compartiment hépatique
Frac_t_lip	Fraction de lipide neutre équivalent dans les compartiments tissulaire
FT3	Hormone triiodothyronine libre
FV_{F_NLE}	Fraction de volume en équivalence de lipide neutre dans le tissu adipeux
FV_{L_NLE}	Fraction de volume en équivalence de lipide neutre dans le foie
FV_{R_NLE}	Fraction de volume en équivalence de lipide neutre dans le tissus richement perfusés
FV_{S_NLE}	Fraction de volume en équivalence de lipide neutre dans le tissus faiblement perfusés
FV_{F_NLE}	Sommation des fractions de volume en équivalence de lipide neutre
HCB	Hexachlorobenzène
HCH	Hexachlorocyclohexane
HLS	Substance hautement lipophile
HLVOC	Composé volatil hautement lipophile
Input	Quantité de HLS qui entre dans l'organisme
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemist
K_a	Constante d'absorption gastro-intestinale (h^{-1})
K_f	Taux d'élimination de 1 ^{er} ordre (h^{-1})
K_m	Constante d'affinité de Michaëlis-Menten (mg/L)
K_{ow}	Coefficient de partage n-octanol:eau
K_s	Constante métabolique de second ordre ($L\ mg^{-1}\ h^{-1}$)

LN	Équivalence de lipide neutre
LNE	Neutral lipid equivalent
NLE	Équivalence de lipide neutre
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level (mg/kg/d)
OC	Organochloré
PA	Coefficient de perméabilité
PA _t	Taux de perméabilité de la membrane du tissu (L/h)
Pb	Coefficient de partage sang:air
Pb :a	Coefficient de partage tissu:sang
PBPK	Modèle pharmacocinétique à base physiologique
PC	Partition coefficient
PCB	Biphényle polychloré
PCDD	Polychloro dibenzo-p-dioxine
Po:w	Coefficient de partage octanol:eau
POPs	Polluants organiques persistants
P _{pb_lip} :a	Coefficient de partage lipide :air
Pt:b	Coefficient de partage tissu:sang
Qc	Débit cardiaque (L/h)
Qcc	Débit cardiaque (L/h/kg)
Qcl	Débit cardiaque en terme de lipide neutre équivalent (L NLE/h)
Qf	Taux de perfusion du tissu adipeux (L NLE/h)
Q _l	Taux de perfusion du foie (L/h)
Qll	Débit sanguin dans le tissu hépatique (L NLE/h)
Qlt	Débit sanguin dans le compartiment tissulaire (L NLE/h)
Qp	Taux de ventilation alvéolaire (L/h)
Qpp	Ventilation alvéolaire (L/h/kg)
Qr	Taux de perfusion du compartiment richement perfusé (L NLE/h)
Qs	Taux de perfusion du compartiment faiblement perfusé (L NLE/h)
Qt	Débit sanguin dans le compartiment tissulaire (L NLE/h)
Q _{tt} _{distribution}	Quantité de substance dans l'organisme (ug)
Q _{tt} _{metabolism}	Quantité de substance quittant l'organisme (ug)
RAM	Taux de produit métabolisé (mg/h)

S	Surface de la membrane à traverser
TC	Cholesterol total
TFP	Tissus richement perfusés
TRP	Tissus faiblement perfusés
TG	Triglycérides
TCDD	Tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TIME_C	Temps de résidence
TSH	Thyroid stimulating hormone
V	Volume (L)
V _{body}	Volume de distribution (L)
V _{distribution}	Volume of distribution (L)
V _{IB}	Volume du compartiment sanguin (L NLE)
V _{IF}	Volume compartiment adipeux (L NLE)
V _{IL}	Volume du compartiment hépatique (L NLE)
V _{IR}	Volume du compartiment richement perfusé (L NLE)
V _{IS}	Volume du compartiment faiblement perfusé (L NLE)
V _{It}	Volume du compartiment tissulaire (L NLE)
V _{max}	Vitesse maximale (mg/h)
V _{nIt}	Volume du compartiment en équivalent de lipide neutre (L NLE)
V _t	Volume du tissu t (L)
V _{tIt}	Volume du compartiment en lipides totaux (L lipide totaux)
α	Épaisseur de la membrane (cm)

Remerciements

Je tiens à remercier le professeur Kannan Krishnan pour m'avoir donné la chance de travailler à ses côtés. J'ai beaucoup appris auprès de lui. Sa rigueur et son intégrité font de lui un professeur respecté. Merci Kannan.

Merci aux membres du jury pour leur disponibilité durant l'évaluation de ma thèse. Un sincère remerciement au docteur Zayed qui m'a ouvert l'esprit sur la possibilité d'entrer au doctorat et qui m'a encouragé tout au long de celui-ci par ces mots justes et sa belle philosophie de vie.

Je ne voudrais pas passer sous silence la grande latitude que m'ont donnée les docteurs Pierre Dubé et Gilles Beauchamp de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont pour leur support durant la poursuite de ce doctorat.

Je voudrais aussi remercier Michael Pelekis pour son encouragement, ses conseils et nos agréables discussions sur la modélisation physiologique. Merci à toi Marie-Odile Fouchecourt pour ton amitié qui m'est très chère et pour ton support durant mon doctorat.

Merci à tous les membres du labo, Martin Béliveau, Ganesharam Balagopal pour leurs aides et conseils; à un ex-membre du labo Christine Blanchette pour sa joie de vivre. Je voudrais aussi remercier Pierrette Gagnon, pour les nombreux services et petites attentions qu'elle a eues à mon égard. Sa grande disponibilité m'a vraiment facilité la vie au laboratoire.

Plus particulièrement, je voudrais témoigner tout mon amour à mon épouse Chantal, qui m'a soutenue durant mon rêve vers la connaissance. Je pense très sincèrement que ce n'est pas le doctorat d'une seule personne mais celui d'une famille unie et solidaire : Chantal, Jean-Sébastien (13 ans), Anthonie (9 ans) et Laurence (7 ans), je vous aime tous très fort.

La connaissance couchée dans les pages d'un livre est une chose quelquefois difficile à apprivoiser. Même en y passant une vie, on ne fait que l'effleurer, mais combien il est plaisant d'en faire une amie.

Un passionné des livres

Chapitre I
Introduction Générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.0 Les composés organiques hautement lipophiles

Les composés organiques hautement lipophiles (COHL) regroupent des substances très diverses que l'on retrouve dans l'environnement et dans les milieux industriels. Leurs origines sont principalement anthropiques, mais certains COHL sont d'origine naturelle (e.g. limonène, pinène).

La classification d'un COHL implique souvent la connaissance de son coefficient de partage octanol:eau (K_{ow}). Ce coefficient de partage est un déterminant prépondérant dans la capacité des composés à s'accumuler dans les organismes vivants. En effet, une relation linéaire entre la valeur du $\log K_{ow}$ et le facteur de bioconcentration (BCF, correspondant au ratio de la concentration dans le biota sur la concentration dans l'eau) a déjà été démontrée par plusieurs auteurs pour un $\log K_{ow}$ compris entre 1,46 et 6,0 (Hawker et coll. 1986; Gabric et coll., 1990; Bertelsen et coll., 1998). Plus récemment, Haddad et coll. (2000) ont suggéré que les composés hautement lipophiles se caractérisent par une valeur de $\log K_{ow}$ plus grande que 4.

Plusieurs COHL font partie d'un sous-groupe de contaminants environnementaux que l'on associe à l'acronyme POPs, qui signifie "Persistent Organic Pollutants" et qui pourrait se traduire par « polluants organiques persistants » suivant le même acronyme. L'usage de cet acronyme remonte au début des années '90. Les POPs sont des composés chimiques

que l'on trouve purs ou en mélanges. Ces composés sont dits persistants car ils sont assez résistants à la dégradation chimique, biologique et photolytique. Les biphényles polychlorés (BPC), les biphényles polybromés (BPB), les pesticides organochlorés (OC), certains composés organiques volatils et les dioxines font partie des POPs les plus connus. Alors que les BPC, BPB et OC sont des composés produits synthétisés pour des usages précis, les dioxines sont des contaminants produits involontairement lors de processus industriels ou lors de la combustion de composés chlorés (par exemple, BPC) dans des conditions non contrôlées.

1.1 Caractéristiques des principaux composés hautement lipophiles

La famille des BPC regroupe 209 congénères, qui sont tous composés d'une structure biphényle substituée par un nombre variable d'atomes de chlore. Les congénères se différencient par la position des atomes de chlore sur le squelette biphényle. Chaque congénère est décrit par la position de ses atomes de chlore (figure 1.1.F1), mais par soucis de simplification, des numéros ont été attribués à chacun d'eux par l'International Union of Pure and Applied Chemist (IUPAC) (Tableau 1.1.T1). Parmi les 209 congénères, un certain nombre sont dits coplanaires, car non substitués en position ortho. Cette particularité confère à ces BPC des propriétés de toxicité (10 à 20 fois moins toxique que le 2,3,7,8,-TCDD) se rapprochant de celles des molécules de dioxines, qui sont également planes (Carrier, 1991).

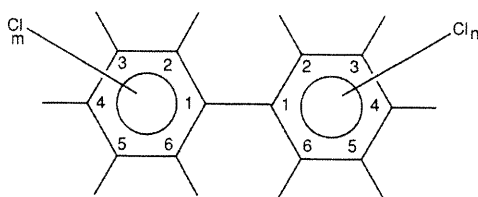


Figure 1.1.F1 Représentation générique d'une molécule de BPC, composée d'un squelette biphényle et d'atomes de chlore.

Le log Kow des BPC est compris entre 4.61 et 8.27 (Howard *et coll.*, 1997). La liposolubilité des BPC tend à augmenter proportionnellement avec le nombre d'atomes de chlore (compris entre 1 et 10) attachés au squelette biphényle. Ainsi plus le nombre d'atomes de chlore augmente, plus la molécule est liposoluble et a tendance à être stable, voire peu dégradable et/ou peu métabolisable.

Tableau 1.1.T1. Structure et numérotation IUPAC des congénères de BPC

No.	Structure	No.	Structure	No.	Structure
Monochlorobiphenyls					
1	2	47	2,2',4,4'	96	2,2',3,6,6'
2	3	48	2,2',4,5	97	2,2',3',4,5
3	4	49	2,2',4,5'	98	2,2',3',4,6
Dichlorobiphenyls					
4	2,2'	50	2,2',4,6	99	2,2',4,4',5
5	2,3	51	2,2',4,6'	100	2,2',4,4',6
6	2,3'	52	2,2',5,5'	101	2,2',4,5,5'
7	2,4	53	2,2',5,6'	102	2,2',4,5,6'
8	2,4'	54	2,2',6,6'	103	2,2',4,5',6
9	2,5	55	2,3,3',4	104	2,2',4,6,6'
10	2,6	56	2,3,3',4'	105	2,3,3',4,4'
11	3,3'	57	2,3,3',5	106	2,3,3',4,5
12	3',4	58	2,3,3',5'	107	2,3,3',4',5
13	3,4'	59	2,3,3',6	108	2,3,3',4,5'
15	4,4'	60	2,3,4,4'	109	2,3,3',4,6
Trichlorobiphenyls					
16	2,2',3	61	2,3,4,5	110	2,3,3',4',6
17	2,2',4	62	2,3,4,6	111	2,3,3',5,5'
18	2,2',5	63	2,3,4',5	112	2,3,3',5,6
19	2,2',6	64	2,3,4',6	113	2,3,3',5',6
20	2,3,3'	65	2,3,5,6	114	2,3,4,4',5
21	2,3,4	66	2,3',4,4'	115	2,3,4,4',6
22	2,3,4'	67	2,3',4,5	116	2,3,4,5,6
23	2,3,5	68	2,3',4,5'	117	2,3,4',5,6
24	2,3,6	69	2,3',4,6	118	2,3',4,4',5
25	2,3',4	70	2,3',4',5	119	2,3',4,4',6
26	2,3',5	71	2,3',4',6	120	2,3',4,5,5'
27	2,3',6	72	2,3',5,5'	121	2,3',4,5',6
28	2,4,4'	73	2,3',5',6	122	2,3,3',4,5
29	2,4,5	74	2,4,4',5	123	2',3,4,4',5
30	2,4,6	75	2,4,4',6	124	2',3,4,5,5'
31	2,4',5	76	2',3,4,5	125	2',3,4,5,6'
32	2,4',6	77	3,3',4,4'	126	3,3',4,4',5
33	2',3,4	78	3,3',4,5	127	3,3',4,5,5'
34	2',3,5	79	3,3',4,5'	Hexachlorobiphenyls	
35	3,3',4	80	3,3',5,5'	128	2,2',3,3',4,4'
36	3,3',5	81	3,4,4',5	129	2,2',3,3',4,5
37	3,4,4'	Pentachlorobiphenyls		130	2,2',3,3',4,5'
38	3,4,5'	82	2,2',3,3',4	131	2,2',3,3',4,6
39	3,4',5	83	2,2',3,3',5	132	2,2',3,3',4,6'
Tetrachlorobiphenyls					
40	2,2',3,3'	84	2,2',3,3',6	133	2,2',3,3',5,5'
41	2,2',3,4	85	2,2',3,4,4'	134	2,2',3,3',5,6
42	2,2',3,4'	86	2,2',3,4,5	135	2,2',3,3',5,6'
43	2,2',3,5	87	2,2',3,4,5'	136	2,2',3,3',6,6'
44	2,2',3,5'	88	2,2',3,4,6	137	2,2',3,4,4',5
45	2,2',3,6	89	2,2',3,4,6'	138	2,2',3,4,4',5'
46	2,2',3,6	90	2,2',3,4',5	139	2,2',3,4,4',6
		91	2,2',3,4',6	140	2,2',3,4,4',6'
		92	2,2',3,5,5'	141	2,2',3,4,5,5'
		93	2,2',3,5,6	142	2,2',3,4,5,6
		94	2,2',3,5,6'	143	2,2',3,4,5,6'
		95	2,2',3,5',6	144	2,2',3,4,5',6

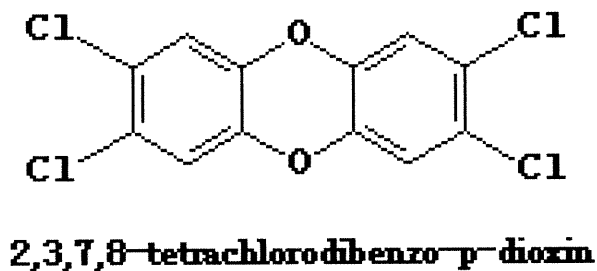
Référence (IPCS, 1993)

Tableau 1.1.T1 (suite)

No.	Structure	No.	Structure
Hexachlorobiphenyls		177	2,2',3,3',4',5,6
145	2,2',3,4,6,6'	178	2,2',3,3',5,5',6
146	2,2',3,4',5,5'	179	2,2',3,3',5,6,6'
147	2,2',3,4',5,6	180	2,2',3,4,4',5,5'
148	2,2',3,4',5,6'	181	2,2',3,4,4',5,6
149	2,2',3,4',5',6	182	2,2',3,4,4',5,6'
150	2,2',3,4',6,6'	183	2,2',3,4,4',5',6
151	2,2',3,5,5',6	184	2,2',3,4,4',6,6'
152	2,2',3,5,6,6'	185	2,2',3,4,5,5',6
153	2,2',4,4',5,5'	186	2,2',3,4,5,6,6'
154	2,2',4,4',5,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
155	2,2',4,4',6,6'	188	2,2',3,4',5,6,6'
156	2,3,3',4,4',5	189	2,3,3',4,4',5,5'
157	2,3,3',4,4',5'	190	2,3,3',4,4',5,6
158	2,3,3',4,4',6	191	2,3,3',4,4',5',6
159	2,3,3',4,5,5'	192	2,3,3',4,5,5',6
160	2,3,3',4,5,6	193	2,3,3',4',5,5',6
161	2,3,3',4,5',6	Octachlorobiphenyls	
162	2,3,3',4',5,5'	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
163	2,3,3',4',5,6	195	2,2',3,3',4,4',5,6
164	2,3,3',4',5',6	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
165	2,3,3',5,5',6	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
166	2,3,4,4',5,6	198	2,2',3,3',4,5,5',6
167	2,3',4,4',5,5'	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
168	2,3',4,4',5',6	200	2,2',3,3',4,5',6,6'
Hexachlorobiphenyls		201	2,2',3,3',4,5,5',6'
169	3,3',4,4',5,5'	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
Heptachlorobiphenyls		203	2,2',3,4,4',5,5',6
170	2,2',3,3',4,4',5	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
171	2,2',3,3',4,4',6	205	2,3,3',4,4',5,5',6
172	2,2',3,3',4,5,5'	Nonachlorobiphenyls	
173	2,2',3,3',4,5,6	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
174	2,2',3,3',4,5,6'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
175	2,2',3,3',4,5',6	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
176	2,2',3,3',4,6,6'	Decachlorobiphenyls	
		209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'

Référence (IPCS, 1993)

Les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD) sont constituées de deux noyaux benzéniques reliés par des atomes d'oxygènes (voir exemple de structure Figure 1.1.F2). Le nombre d'atomes de chlore peut varier entre 1 et 8. Le log Kow des PCDD varie entre 4.75 et 8.20 (Howard et Meylan, 1997). Le congénère le plus connu et le plus toxique des dioxines est la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (2,3,7,8-TCDD), mais ce n'est pas pour autant le congénère le plus répandu dans l'environnement.



1.1.F2 Structure d'un composé de la famille des PCDD

Les pesticides organochlorés sont presque tous considérés comme des polluants organiques persistants. Ils regroupent une grande variété de structures :

- 1)- Cyclodiènes: e.g. aldrine, dieldrine, heptachlore, isodrine, endosulfane, chlordane
- 2)- Composés aromatiques halogénés : e.g. DDT, métoxychlore, chlorbenzylate, chlorphénézine,

3)- Cycloparafines: e.g. hexachlorocyclohexane, lindane

4)- Terpènes chlorés: e.g. polychloropinène, polychlorocamphène

D'autres composés entrant dans la catégorie des COHL, ne font pas partie de grandes classes de composés. Ils sont la plupart du temps d'origine industrielle. On retrouve notamment dans cette catégorie le n-hexane, l'anthracène, le diphenyl éther, le pinène, le carène ou le triméthyl benzène. Certains sont également retrouvés dans la nature.

L'analyse qui va suivre fera référence seulement aux BPC et aux pesticides organochlorés, pour des raisons strictement organisationnelles. Cependant, l'application méthodologique pour des composés volatils se fera sur des composés industriels et d'origine naturelle.

1.2 Présence des COHL dans l'environnement

Bien que les sources de BPC, de pesticides organochlorés et des dioxines ne soient pas disséminées sur l'ensemble de la planète, la persistance de ces composés et leur transport par voie atmosphérique ont conduit à une contamination à l'échelle planétaire. Ainsi, des concentrations non négligeables de ces produits ont été mesurées chez des animaux et des humains vivant dans des contrées éloignées, comme l'Arctique (Muir et coll., 1992). Globalement, ces composés sont donc présents en concentrations variables dans les tissus de la plupart des êtres vivants, incluant les poissons, les mammifères, les oiseaux et les plantes (Muir et coll., 1992; Ali et coll.,

1997; Corsolini et coll., 2000; Muir et coll.,). L'homme est exposé principalement via la chaîne alimentaire. La contamination et la charge corporelle de chacun des individus sera fonction de la structure de la matrice biologique ou inerte dans laquelle les composés lipophiles sont présents.

1.2.1 Charge COHL dans le milieu

1.2.1.1. Eau, sol, air

Les BPC et les pesticides organochlorés sont présents dans l'eau et les sols. Dans l'eau, la concentration des BPC et des pesticides organochlorés est souvent à l'état de trace. Elle dépend de la charge de contaminants apportés par l'eau, mais aussi de la partition des composés avec les sédiments, laquelle est fonction de la lipophilicité de la substance (plus la substance est lipophile, plus elle peut s'adsorber sur les particules). La présence de composés organochlorés dans le milieu aquatique est bien documentée (Tkalin *et coll.*, 2000). Cependant, une meilleure appréciation des teneurs en composés organochlorés passe par le développement des biomarqueurs d'expositions environnementales. Ainsi, Tkalin et coll. (2000) prétendent que les moules sont de bons indicateurs de contamination environnementale par les composés organochlorés (principalement des pesticides : DDT, HCB, DDE).

Dans le sol, la charge peut être importante, mais les composés sont en majorité adsorbés sur les particules, ce qui diminue leur biodisponibilité et ralentit leur lessivage. La charge de ces contaminants dans les sols diminue très lentement car leur dégradation est lente. Toutefois, le lessivage, le

déplacement par ruissellement et l'absorption par les animaux et les plantes contribuent à la diminution de la charge dans les sols.

L'air est aussi un site de stockage et de transport temporaire. Les POPs semi-volatils sont adsorbés sur les particules aéroportées et transportés sur plusieurs kilomètres du lieu d'application ou de déversement. La volatilisation est la principale voie de disparition de l'aldrine, de la dieldrine, et de l'heptachlore présent dans le sol (Jegier, 1969).

1.2.1.2 Tissus animaux

Il est relativement bien démontré dans les études de toxicologie aquatique (Connell *et coll.*, 1988; 1993) qu'il existe une relation entre le coefficient de partage tissus adipeux :sang et le coefficient partage n-octanol :eau (qui peut être associé à la lipophilicité). Ces observations suggèrent la présence d'une relation linéaire entre la présence de lipides et l'accumulation de substances organiques hautement lipophiles. Les résultats obtenus par Haddad et col. (2000) sont clairs et suggèrent que la prédictibilité de la charge corporelle entre le sérum et le tissu adipeux s'explique sur la base du rapport du contenu lipidique de chacun des tissus biologiques.

Étant donné le caractère lipophile des COHL, les tissus lipidiques sont considérés comme des réservoirs de stockage des pesticides organochlorés, des BPC et des dioxines. Pour ces composés qui ont la propriété de s'accumuler et d'être peu éliminés, on parle de biopersistance,

Chez l'humain, la concentration de pesticides organochlorés dans les tissus est bien caractérisée, notamment avec les travaux et les publications de l'organisation mondiale de la santé (Kaloyanova, 1982). Il existe une grande différence dans les concentrations de pesticides dans les tissus adipeux selon le pays d'origine. Il ne semble pas exister de variations causées par le genre chez l'humain. Cependant, de par leur constitution, les femmes ont une masse adipeuse un peu plus élevée que celle des hommes et auront donc tendance à accumuler d'avantage de contaminants hautement lipophiles. De plus, la concentration de pesticides chez l'homme a tendance à augmenter avec l'âge, principalement dans les pays industrialisés. Ceci est en partie causé par la durée d'exposition plus longue à cause de l'espérance de vie, l'augmentation du pourcentage de lipides dans les organes avec l'âge, ainsi que l'augmentation de la proportion de tissus adipeux proprement dit. En 1967, Durham a décrit un certain nombre de facteurs, tels que l'induction enzymatique, la potentialisation causée par la co-administration d'autres produits et la cigarette sont autant de facteurs pouvant affecter le stockage et le métabolisme des pesticides (Durham, 1967). Kaloyanova et coll. (1991) prétendent que c'est l'équilibre entre l'absorption et l'élimination qui maintiendrait la charge corporelle accumulée dans les tissus et qui contribuerait à la persistance des BPC et des pesticides biopersistants (Kaloyanova *et coll.*, 1991). Pour le DDT et la dieldrine, la dose accumulée dans les tissus adipeux humains est proportionnelle à la dose d'exposition (Haynes *et coll.*, 1956). Les auteurs ont établi un algorithme qui permet de déterminer la concentration de ces pesticides dans le tissu adipeux à partir de la dose d'exposition. Cet algorithme est basé sur une relation linéaire issue de

données mesurées chez l'homme et n'a aucune interprétation physiologique selon les auteurs. Des normes d'exposition ont été établies à partir de cet algorithme au Canada et en Angleterre (Kaloyanova et El Batawi, 1991).

1.2.1.2.1 Composés hautement lipophiles dans le lait maternel

Une étude récente publiée par Craan et Haines trace un tableau sur le suivi des POPs dans le lait maternel (Craan et coll., 1998). Les auteurs se sont basés sur 6 études de suivi menées de 1967 à 1992, publiées par des chercheurs de Santé Canada et dans lesquelles on relate la concentration de contaminants dans le lait maternel durant 25 ans en Ontario, au Québec et ailleurs au Canada. Les composés mesurés durant cette période étaient p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT, dieldrine, heptachlore époxyde, oxychlorane, trans-nonachlore, β -hexachlorocyclohexane, hexachlorobenzène et BPC totaux. Cette revue, qui a permis de suivre la teneur de ces pesticides au cours du temps, démontre clairement une diminution des concentrations dans le lait maternel depuis 25 ans. Les graphiques correspondant à chacun des produits sont similaires et démontrent une relation évidente entre la diminution de l'exposition et la diminution de la concentration dans le lait maternel. Toutefois, le bannissement des composés organochlorés dans les années 1970 ne se traduit pas par une diminution rapide dans le lait. Les auteurs expliquent cette faible diminution en partie par le fait que beaucoup d'aliments, de la chaîne alimentaire, sont encore suffisamment contaminés aujourd'hui pour maintenir un niveau d'exposition non négligeable.

En 1993, Dewailly et coll. a comparé les concentrations de BPC et de pesticides OC retrouvées dans le lait maternel chez des populations Inuit (N =107) demeurant dans l'Arctique québécois avec les concentrations mesurées chez les populations d'autres régions (N = 50). L'étude portait sur la détermination de la concentration de 10 congénères de BPC (i.e. IUPAC # 28, 52, 101, 118, 138, 153, 170, 180, 183 et 187) et de 7 pesticides (i.e. DDE, hexachlorobenzène, dieldrine, mirex, heptachlore époxyde, trans-chlordane et endrine). Les concentrations mesurées chez les populations Inuit étaient nettement supérieures à celles mesurées ailleurs au Québec. De plus, les concentrations retrouvées dans le lait maternel étaient comparables aux concentrations et au profil d'exposition des bélugas, pour les BPC, et de l'ours polaire pour les pesticides. Chez les Inuits, la charge corporelle d'organochlorés était 2 à 10 fois supérieure à celle mesurée dans la population Québécoise. Les auteurs concluent que ce haut profil de concentration était attribuable à leur régime alimentaire composé principalement de produits de la chasse (Dewailly et coll., 1993).

Encore ici, la charge corporelle que l'on peut extrapoler à partir de la concentration dans le lait maternel démontre l'effet préoccupant de la situation, d'autant plus que tous les composés traversent la barrière placentaire durant la période de grossesse.

1.2.1.2.2 Barrière placentaire

Waliszewski et coll. (2000) ont étudié la relation entre la présence de pesticides organochlorés dans les graisses et la distribution de ces composés dans le lait

maternel et le cordon ombilical. La revue s'est faite sur 64 patientes se présentant à l'hôpital pour une césarienne entre 1997 et 1998. Quinze pesticides ont été quantifiés (HCB, α,β,γ -HCH, aldrine, heptachlore, heptachlore époxyde, p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, α,β -endosulfane et endosulfane sulfate). Les résultats démontrent une concentration égale de chaque côté de la barrière placentaire lorsque rapportée sur la base de la concentration lipidique. Les auteurs concluent que les pesticides organochlorés traversent la barrière placentaire et se retrouvent en équilibre, dans les tissus adipeux, entre la mère et le fœtus. Toujours selon ces auteurs, l'équilibre serait fonction de la composition lipidique des différents tissus.

Le rapport entre la concentration de l'hexachlorobenzène (HCB) dans le cordon ombilical et la concentration sanguine chez la mère a été étudié par Sala (2001). L'étude portait sur 72 mères de 1997 à 1999 issues d'une population rurale très exposée au HCB. Les résultats montrent une association entre la concentration de HCB chez la mère et la présence de HCB dans le cordon. L'auteur a conclu que le HCB, comme les autres composés OC, peut traverser la barrière placentaire et ainsi contaminer le fœtus (Sala *et coll.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats confirme la priorité de mettre tout en œuvre pour développer des méthodologies nous permettant d'évaluer la teneur des

composés présents dans les tissus humains, plus particulièrement chez les femmes enceintes.

2.0 Pharmacocinétique des composés hautement lipophiles

2.1 Absorption

Les pesticides organochlorés sont absorbés par inhalation, par la voie orale et par absorption cutanée. L'absorption de pesticides par la peau est très variable et dépend de certaines propriétés physico-chimiques. Par exemple, le dieldrine est absorbé très rapidement comparé au DDT. L'absorption par la voie gastro-intestinale est influencée en partie par les fibres et les lipides contenus dans la l'alimentation. Ainsi une alimentation riche en lipides va favoriser l'absorption de ces composés en facilitant les échanges au niveau des parois du duodénum.

Les BPC sont quant à eux principalement absorbés par la voie orale. Le taux d'absorption gastro-intestinal est proche de 100% pour certains BPC (Albro et coll.,1972; Matthews et coll., 1975). L'alimentation constitue un support important pour l'entrée de ces composés dans l'organisme. A cause de la capacité de bioaccumulation des BPC dans les poissons et de leur position dans la chaîne alimentaire, la consommation de poissons contaminés par des composés hautement lipophiles représente un danger pour les populations de pêcheurs notamment lorsque le taux de consommation est élevé.

2.2 Distribution

Les composés organiques hautement lipophiles sont distribués rapidement dans l'organisme. À cause de leur propriété liposoluble, ils auront tendance à se distribuer dans les tissus adipeux. Même si la distribution des composés organiques hautement lipophiles est souvent bien décrite par la liposolubilité, d'autres facteurs tel que les propriétés physico-chimiques du composé impliqué et la compétition sur certains sites de liaison peuvent jouer un rôle non négligeable dans la distribution. Par exemple, Uhi *et coll.* 1986 rapportent que 96% du pentachlorophénol se lie aux protéines plasmatiques, ce qui expliquerait la forte capacité de rétention de ce composé.

L'âge est un facteur important qui influence la charge corporelle. Des changements se produisent notamment dans la composition lipidique des organes, la diminution des taux d'excrétion biliaire et le taux de formation de métabolites (Birnbaum, 1983).

2.3 Métabolisme

Les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP) constituent une grande famille d'enzymes responsables du métabolisme d'un grand nombre de composés exogènes et jouent un rôle important dans le métabolisme de composés endogènes tels que les stéroïdes, les prostaglandines et les acides gras. Plus de 200,000 substances métabolisées par le P450 ont été identifiées. Le cytochrome P450 comporte une hémoprotéine, laquelle se lie à l'oxygène pour être activée. Plus de 200 cytochromes P450 sont aujourd'hui

connus et se répartissent dans de nombreuses familles d'organismes, tels que oiseaux, reptiles, plantes, bactéries, champignons, poissons et mammifères (Lewis, 1996).

Les composés hautement lipophiles peuvent être métabolisés par les cytochromes P450 et peuvent aussi les induire. Par exemple, le CYP1A1 est induit par le récepteur AhR qui est activé par le TCDD (Whitlock, 1999). Les BPC peuvent aussi induire les cytochromes 2A1 et 2A8, qui sont des isoenzymes impliqués dans l'hydroxylation de la testostérone. Le cytochrome CYP2B peut être induit par le DDT, le BPC-153, l'hexachlorocyclohexane, le chlordane et un certain nombre de congénères de BPC (Chang *et coll.*, 1996). Chez le rat, les BPC peuvent induire le CYP3A (Lewis, 1996).

Les BPC sont généralement peu métabolisés. Leur demi-vie d'élimination chez l'humain varie de 1 à 6 ans en moyenne pour les BPC faiblement chlorés (Tanabe *et coll.*, 1981). Les recherches indiquent que les composés les plus chlorés mais aussi ceux qui ne sont pas substitués en position méta-para sont plus résistants au métabolisme et s'accumulent davantage dans les tissus (Carrier, 1991).

Muhlebach *et coll.* (1981), ont exposé des rats au congénère BPC #153 marqué au ^{14}C à des doses de 0,6 et 3,6 mg/kg par voie IV, à dose unique ou à doses répétées une fois par semaine pendant 6 semaines. Après 6 et 40 semaines post-exposition, 75% de la dose se retrouvait dans le réservoir lipidique. L'auteur en a conclu que ce BPC était très peu métabolisé dans des

conditions physiologiques et prétend que 74% de la dose du composé est présente dans les tissus adipeux et est emmagasinée de façon irréversible ceci aux doses administrées par les auteurs. Il a évalué la demi-vie d'excrétion à 100 jours.

En 1986 Uhi et coll. rapportaient une demi-vie de 20 jours pour le pentachlorophénol. Le métabolisme implique des réactions de phase I avec des oxydations conduisant à la formation d'arènes, suivies habituellement par des hydrolyses, l'objectif étant d'augmenter suffisamment l'hydrosolubilité pour permettre une élimination principalement dans l'urine. Pour des composés comme le DDT, le DDE, ou le chlordane, la persistance est comparable à celle des BPC.

2.3.1 Induction enzymatique

Certains BPC tels que les congénères coplanaires sont potentiellement toxiques. La toxicité de ces BPC est due à leur potentiel mimétique du 2,3,7,8-TCDD, c'est à dire qu'ils ont des structures, semblable à la dioxine, qui leur permettent de se lier aux récepteurs AhR tout comme le TCDD. D'autres sont toxiques indirectement en induisant la production des enzymes de type oxydases à fonction mixte (MFO), ce qui conduit à une augmentation de la capacité de bioactivation de certains systèmes enzymatiques et favorise le métabolisme de composés initialement non toxiques (e.g. HAP, œstrogène, BPC) en métabolites cytotoxiques et/ou génotoxiques.

Les BPC ont été classés en quatre groupes par McFarland en fonction de leur spécificité d'induction des cytochromes P450 (McFarland *et coll.*, 1989).

Le groupe (1) comprend les BPC couramment présents dans l'environnement et considérés comme étant les plus toxiques. Le sous-groupe 1A, qui représente les BPC inducteurs du cytochrome P450 1A1 (dits de type 3-méthylcholanthrène), correspond aux BPC coplanaires # 77, 126 et 169. Le sous-groupe 1B contient les BPC # 105, 118, 128, 138, 156 et 170, qui sont considérés comme des inducteurs mixtes (inducteurs de CYP1A et 2B). Le groupe (2) représente les inducteurs du type phénobarbital (comprenant les isoformes CYP2B1 et CYP2B2). Ils sont considérés comme prévalant dans l'environnement, i.e. susceptibles d'être retrouvés dans les tissus biologiques. Les BPC inclus dans cette catégorie sont les BPC # 87, 99, 101, 153, 180, 183 et 195. Le groupe (3), correspond aux BPC non inducteurs et comprend les BPC # 18, 44, 49, 52, 70, 74, 151, 177, 187 et 201. Le groupe (4) est classifié comme des BPC à fonction mixte, mais très peu fréquents dans le biota et les tissus biologiques. Cette classe comprend les BPC # 37, 81, 114, 119, 123, 157, 158, 167, 168 et 189.

De cette classification l'auteur fait ressortir que sur les 209 congénères de BPC, seulement 36 sont problématiques dans le sens qu'ils peuvent être retrouvés dans des tissus biologiques (McFarland et Clarke, 1989). La connaissance de cette liste facilite, entre autres, le développement de mélanges de congénères de BPC pouvant être utilisés comme standard dans des analyses environnementales.

2.3.2 Biotransformation

Les composés organiques hautement lipophiles (COHL) possèdent trois caractéristiques importantes, soit celles d'être persistantes dans l'environnement, de se bioaccumuler dans les tissus biologiques et d'être difficilement éliminés de l'organisme. Le métabolisme des COHL est relativement lent.

Les BPC ayant une structure similaire sont métabolisés de façon semblable. Comme la plupart des composés aromatiques, le métabolisme implique la formation d'un oxyde d'arène. Cet intermédiaire biologique instable peut se lier à une molécule électrophile telle que le glutathion (ce qui permet ensuite son élimination), réagir avec l'ADN (liaison covalente) ou encore être réduit en composé phénolique (Jerina *et coll.*, 1974; Safe, 1989). Une étude *in vivo* sur les congénères BPC #153 et #136 a montré que ces congénères se liaient aux protéines, à l'ADN et à l'ARN du tissu hépatique chez la souris (Morales *et coll.*, 1978). Le réarrangement en composés phénoliques est non-enzymatique et serait causé principalement par l'instabilité de la structure intermédiaire.

Les 209 congénères de BPC ont des structures particulières qui favorisent la formation d'oxydes d'arène puis la formation de groupement hydroxylé. Les règles d'hydroxylation suivent approximativement l'ordre suivant : 1)- L'hydroxylation est favorisée lorsque la position para n'est pas substituée par un groupement chloré (Cl), 2)- Les BPC faiblement chlorés et qui ont un Cl en

position para sont rapidement hydroxylés en para, 3)- La disponibilité de deux atomes de carbones libres consécutifs sur le noyau biphenyle favorise l'oxydation du cycle, 4)- De façon générale, l'accroissement du degré de chloration sur les deux noyaux aromatiques diminue la vitesse du métabolisme et 5)- On retrouve une grande variabilité dans le métabolisme suivant les espèces (Safe, 1989).

La voie oxydative est considérée comme la voie majeure d'élimination pour les BPC (Borlakoglu *et coll.*, 1993a). Les congénères n'ayant pas de groupement chlore en position méta et para sont privilégiés dans le métabolisme oxydatif (Borlakoglu et Wilkins, 1993a; Borlakoglu *et coll.*, 1993b). Les congénères n'ayant pas de groupement chlore en position ortho et méta sont plus persistants que les congénères ayant des groupement chlore en position para seulement (Borlakoglu et Wilkins, 1993b).

Une série d'études faites à la fin des années 1980 par Borlagoglu, ont porté sur le métabolisme des BPC pris individuellement. Ces recherches constituent certainement les travaux les plus complets dans le domaine. Une comparaison sur la persistance ou non des BPC dans la matrice biologique a démontré qu'ils avaient sensiblement le même patron d'exposition (Borlakoglu *et coll.*, 1989). Borlagoglu 1990 suggère que l'incapacité des monooxygénases (cytochrome P-450) à métaboliser certains congénères de BPC pourrait expliquer cette persistance.

2.4 Excrétion

Les BPC et les pesticides organochlorés sont excrétés hors de l'organisme principalement dans les fèces à la suite d'une excrétion biliaire. Cependant, une réabsorption attribuable à la circulation entéro-hépatique est aussi possible. Pour les BPC comportant 1, 2 ou 3 atomes de chlore, l'excrétion urinaire est aussi rencontrée. Toutefois, les composés doivent avoir été hydroxylés et conjugués au préalable pour être suffisamment hydrosolubles.

Un suivi de 25 ans (de 1967 à 1992) sur la population canadienne de la concentration de contaminant dans le lait maternel a été publié par Craan et coll. (1998). On note une nette diminution de la concentration de contaminant organochloré attribuable à la diminution de l'exposition sauf au Québec, où l'on a noté une augmentation en 1982 attribuable, selon les auteurs, à l'amélioration des méthodes d'analyses et à l'abaissement des limites de détection (Craan et Haines, 1998). Cependant, la persistance dans les tissus biologiques caractérisée par la concentration mesurée dans le lait maternel ne suit pas la diminution observée dans l'environnement, ce qui suggère que ces composés ont une élimination lente.

Le transfert placentaire peut être considéré comme une source d'excrétion chez la mère dans la mesure où une réabsorption est impossible. Un exemple original a été proposé par Lucier (1978). Des BPC ont été administrés à des rats femelles gestantes de 19 jours. Selon l'auteur, les BPC seraient hydroxylés puis passeraient la barrière placentaire et se conjugueraient à l'acide glucuronique dans le foie fœtal. Les BPC glucuronidés transférés dans l'intestin par excrétion biliaire fœtale

s'accumuleraient dans cet organe sans être retournés dans le système circulatoire de la mère. Le taux de radioactivité mesuré chez le fœtus était supérieur à celui mesuré chez la mère. Un certain pourcentage pourrait être hydrolysé par la α -glucuronidase, retourné au foie fœtal par réabsorption et conjugué à nouveau.

Les pesticides organochlorés ont un taux d'excrétion variable. Feldman et coll. en 1974 rapportaient des faibles taux d'excrétion faibles, tels que 7,8% d'aldrine en 5 cinq jours, ce qui se compare avec le dieldrine (7,7%) et le lindane (9,3%), pour la même période.

3.0 Principaux effets des COHL sur la santé

Des études d'exposition au 2,3,7,8-TCDD sur le développement ont démontré une démasculinisation et une féminisation du comportement chez le rat mâle (Amin *et coll.*, 2000). Hosie et coll. (2000) ont rapporté une corrélation entre la présence d'organochlorés dans les graisses et la présence d'anomalies dans le développement testiculaire. Une hypothèse a été émise selon laquelle l'exposition prénatale à des composés œstrogéniques exogènes pourrait être responsable de ce type d'anomalie.

Les BPC planaires et coplanaires (aussi appelés "dioxine like") sont bien connus pour leur affinité à se lier au récepteur Ah impliqué dans l'induction enzymatique du cytochrome P450 1A. En se liant à un site sur l'ADN, ces BPC favorisent la transcription de gènes initiant la synthèse de l'enzyme.

Les composés hautement lipophiles tels que les BPC et les pesticides organochlorés ont été bien étudiés dans les années 1990 pour leur caractère œstrogénomimétique. Certaines hypothèses ont été formulées sur le sujet. Les plus probantes sont à l'effet que certains BPC agiraient directement sur les récepteurs œstrogéniques ou androgéniques et seraient en compétition avec des stéroïdes endogènes pour les enzymes impliqués dans leur métabolisme. Les BPC sont métabolisés par les mêmes cytochromes P450 que ceux impliqués dans le métabolisme des stéroïdes. Ainsi, l'interaction avec le métabolisme pourrait soit moduler le taux d'œstrogènes endogènes, soit modifier le ratio de métabolites favorisant la formation de métabolites œstrogénés tels que des catéchols ou encore des quinones (Bradlow *et coll.*, 1995).

La glande thyroïde est impliquée dans le développement des fonctions cérébrales et dans la croissance cellulaire. Une déficience dans le fonctionnement de la thyroïde peut entraîner plusieurs perturbations dans le développement neurologique. Osius *et coll.* (1999) ont fait une étude épidémiologique sur 671 enfants âgés de moins de 10 ans. Les auteurs ont trouvé une association entre l'hormone TSH (hormone thyroïdo-stimuline) mais aucune entre la protéine FT3 (triiodothyronine libre) pour les congénères de BPC # 138, 153, 180, 183, et 187, ce qui laisse présager une influence potentielle dans le développement cérébral de l'enfant (Osius *et coll.*, 1999).

Le système immunitaire est aussi perturbé par la présence de composés organiques hautement lipophiles. Ainsi les pesticides organochlorés (e.g.

DDT) inhibent la synthèse d'anticorps, modifient les réactions immunitaires et diminuent la concentration de protéine α -globuline dans le sang (Kaloyanova et El Batawi, 1991).

Beaucoup de contradictions existent dans la littérature lorsque l'on veut mettre en évidence l'implication des BPC et des pesticides organochlorés comme facteurs importants dans le développement de cancers. En laboratoire plusieurs évidences démontrent le rôle de ces composés dans l'apparition de cancers. Les études animales indiquent que le DDT, l'aldrine, le dieldrine, le chlordane et l'heptachlore sont des cancérrogènes (Kaloyanova et El Batawi, 1991).

Une revue de la littérature a été publiée par Lee Davis (1993) sur l'influence de certains organochlorés, notamment des BPC et des pesticides, agissant comme facteurs de risque dans le cancer du sein. L'auteur a émis l'hypothèse que certaines de ces substances, telles des xénoœstrogènes, pouvaient augmenter le risque de cancer du sein par des mécanismes impliquant des interactions avec des gènes impliqués dans le développement du cancer du sein (Davis et coll., 1993). Son hypothèse était basée sur certaines évidences tirées de la littérature en rapport à des composés organochlorés (pesticides, herbicides et BPC) qui affectaient le métabolisme de l'œstrogène en modifiant le rapport entre les métabolites notamment le ratio 2-OH1 :16 α -OH1 (qui se nomment le 2-hydroxyœstrone et le 16 α -hydroxyœstrone respectivement)

Un revue de la littérature publié par Safe (1998) sur l'interaction des xéno-oestrogènes et l'incidence de ce type de cancer du sein a montré que les causes de développement du cancer était multifactorielles. Il concluait alors que sur la base des connaissances actuelles, rien ne laissait présager que l'exposition aux xéno-oestrogènes serait tributaire ou reliée de façon significative au cancer du sein. En 2000, Safe a présenté une mise à jour de son document de 1998, dans lequel il compare un certain nombre d'études épidémiologiques. Il conclut que les différences entre contrôles et exposées n'étaient pas significatives mais il n'exclut pas la possibilité d'un quelconque effet délétère d'ordre endocrinien causé par des composés environnementaux lorsque que présents à haute dose (Safe, 2000).

Høyer et coll. (2000) ont montré la relation entre le cancer du sein et l'exposition aux organochlorés. Ils analysèrent plusieurs composés organochlorés tous hautement lipophiles chez 195 femmes atteintes de cancer du sein au Danemark. Ils conclurent que seulement la dieldrine était associé au risque de cancer du sein, mais aussi un risque pour la survie des patientes atteintes.

Aronson et coll. (2000) ont comparé les concentrations de BPC et de pesticides mesurées dans les tissus adipeux contenus dans les seins et le risque de cancer du sein. Selon les auteurs, la concentration retrouvée dans les tissus adipeux était beaucoup plus importante que la concentration dans le sérum. Pour des comparaisons physiopathologiques, la dose interne était un meilleur indicateur d'exposition cumulative. Les auteurs ont constaté que les

congénères de BPC #105 et 118 présentait un risque élevé pour les femmes pré-ménopausées, tandis que les congénères #170 et 180 présentait un risque pour les femmes post-ménopausées. Ceci constitue selon l'auteur, la première étude démontrant la relation entre la concentration dans les tissus adipeux mammaires et le risque accru de développer le cancer du sein (Aronson, *et coll.* 2000).

Romieu et coll. (2000), ont étudié la relation entre la concentration d'organochlorés (e.g. DDT, DDE) dans les tissus en considérant l'historique de la lactation, sur l'incidence de cancer du sein chez 260 Mexicaines suivies de 1990 à 1995. Ils concluent que le DDT n'était pas relié au cancer du sein, mais que la présence de p,p'-DDE pouvait augmenter le risque de cancer du sein chez la femme, particulièrement chez les femmes ménopausées.

Ce bref survol des effets toxiques avait pour but de sensibiliser le lecteur à la problématique de l'interaction des composés hautement lipophiles avec le matériel biologique. Étant donné que certains des BPC et des pesticides ont la capacité d'induire ou d'agir dans les processus tels que la cancérogenèse et la modulation hormonale, il devient impératif de développer des outils qui soient simples et qui nous donnent rapidement l'information sur la charge corporelle de ces composés dans l'organisme. Avant d'entrer dans cette problématique, une revue de la modélisation pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) devient essentielle, car la méthodologie proposée dans cette thèse est basée sur ce type de modélisation.

4.0 La modélisation PBPK comme outil pour étudier la distribution et la persistance des composés organochlorés hautement lipophiles

4.1 Historique des modèles PBPK

Le modèle pharmacocinétique à base physiologique (*Physiologically based pharmacokinetic [PBPK] model*) est une description mathématique de processus pharmacocinétique ou toxicocinétique sur la base de notions physiologiques, biochimiques et physico-chimiques. La modélisation PBPK est utilisée lors de l'estimation de la toxicité, afin de réduire les facteurs d'incertitude associés aux approches conventionnelles. La première description de modélisation proprement dite remonte à la publication de Teorell's dans laquelle on peut mettre en évidence les premières équations sur les bilans de masses (Teorell, 1937). Plusieurs auteurs ont permis de faire connaître la modélisation physiologique notamment suite aux travaux Matthews, O'Flaherty, Andersen, Fiserova-Bergerova, Travis, Clewell, Connelly, Krishnan, Fisher, Leung, Yang, Barton qui méritent d'être cités comme les chefs de file de la modélisation (Matthews et coll., 1977; O'Flaherty, 1981; Andersen et coll., 1984; Fiserova-Bergerova et coll., 1984; Travis, 1987; Clewell III et coll., 1987; Conolly et coll., 1988; Krishnan et coll., 1988; Fisher et coll., 1989; Leung et coll., 1990a; Yang et coll., 1995; Barton et coll., 1998). La véritable explosion de la modélisation PBPK s'est fait depuis les 20 dernières années, avec le développement des ordinateurs.

4.2 Description du processus de modélisation

La pharmacocinétique à base physiologique concerne l'étude et la caractérisation des processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME) d'un xénobiotique dans l'organisme en fonction du temps. Il s'agit donc d'un suivi spatio-temporel d'un xénobiotique.

La modélisation PBPK implique le développement d'une série d'équations mathématiques différentielles décrivant les principaux processus ADME d'un xénobiotique ou d'un mélange dans l'organisme. Les équations sont basées sur les interrelations entre la physiologie de l'organisme (débit alvéolaire, débit cardiaque, débits sanguins aux tissus et volumes tissulaires), les caractéristiques physico-chimiques de la substance étudiée (coefficients de partage et coefficients de diffusion) et les taux métaboliques (taux d'élimination, constantes de liaison et métabolisme) impliqués dans l'ADME (Krishnan et coll., 2001). La connaissance de ces paramètres et des mécanismes métaboliques permet aux modèles de prédire le devenir des xénobiotiques dans l'organe cible à partir de la dose d'exposition.

L'utilisation des modèles PBPK en analyse du risque présente plusieurs avantages (Krishnan et Andersen, 2001).

1. Ils sont basés sur des mécanismes biologiques et non sur des relations empiriques. La validation des modèles PBPK consiste à comparer des résultats expérimentaux avec des simulations, ce qui permet de s'assurer que tous les mécanismes ADME ont été pris en compte de façon adéquate.

2. Ces modèles facilitent la détermination de la dose interne laquelle peut être reliée directement aux effets observés, alors que généralement seule la dose externe d'exposition est connue et associée aux effets dans la méthode conventionnelle.
3. À cause des bases pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, le modèle PBPK peut extrapoler la dose interne d'un produit de fortes dose à faibles doses, de l'animal à l'humain, ou encore entre les différentes voies d'exposition.
4. La modélisation PBPK permet la détermination de la dose interne et son extrapolation d'une espèce à l'autre sur la base d'effet similaire dans un même organe cible.

Ces différents avantages contribuent à réduire les facteurs d'incertitude lors de l'évaluation du risque pour la santé humaine.

De plus, la modélisation PBPK est un outil de travail qui permet d'intégrer les données disponibles à la suite d'observations expérimentales tels que le mécanisme de transport, la saturation des processus de biotransformation, la liaison aux protéines et l'interaction du xénobiotique avec des récepteurs biologiques. Lorsque le profil pharmacocinétique généré par le modèle ne correspond pas à celui déterminé expérimentalement, certains processus biologiques doivent être incorporés dans le modèle ou encore, certains paramètres du modèle peuvent être modifiés afin de refléter la réalité expérimentale. L'ajout de descriptions de mécanismes biologiques doit être motivé par la réalité expérimentale et devra permettre de contribuer de façon

significative à l'amélioration du modèle. Ces modifications, pourront générer des hypothèses qui seront ensuite vérifiées expérimentalement.

Le développement d'un modèle PBPK se fait en cinq étapes soit (Figure 1) :

- 1) représentation conceptuelle du modèle,
- 2) estimation des paramètres,
- 3) simulation du modèle,
- 4) validation du modèle et
- 5) raffinement du modèle.

La représentation du modèle comprend sa conceptualisation schématique et le développement mathématique des principaux compartiments de l'organisme, incluant les voies d'exposition et le métabolisme du xénobiotique étudié. L'estimation des paramètres implique l'acquisition des valeurs numériques des déterminants physiologiques, physico-chimiques et biochimiques inclus dans les équations du modèle. La simulation du modèle conduit à la prédiction de l'ADME du xénobiotique pour des scénarios d'exposition définis. La validation du modèle permet de juger de la pertinence du modèle à décrire une réalité expérimentale et fait le lien entre les valeurs expérimentales utilisées lors de l'optimisation, mais elle nécessite aussi la comparaison des prédictions du modèle PBPK avec d'autres données expérimentales pour réfuter, valider ou raffiner la description du modèle.

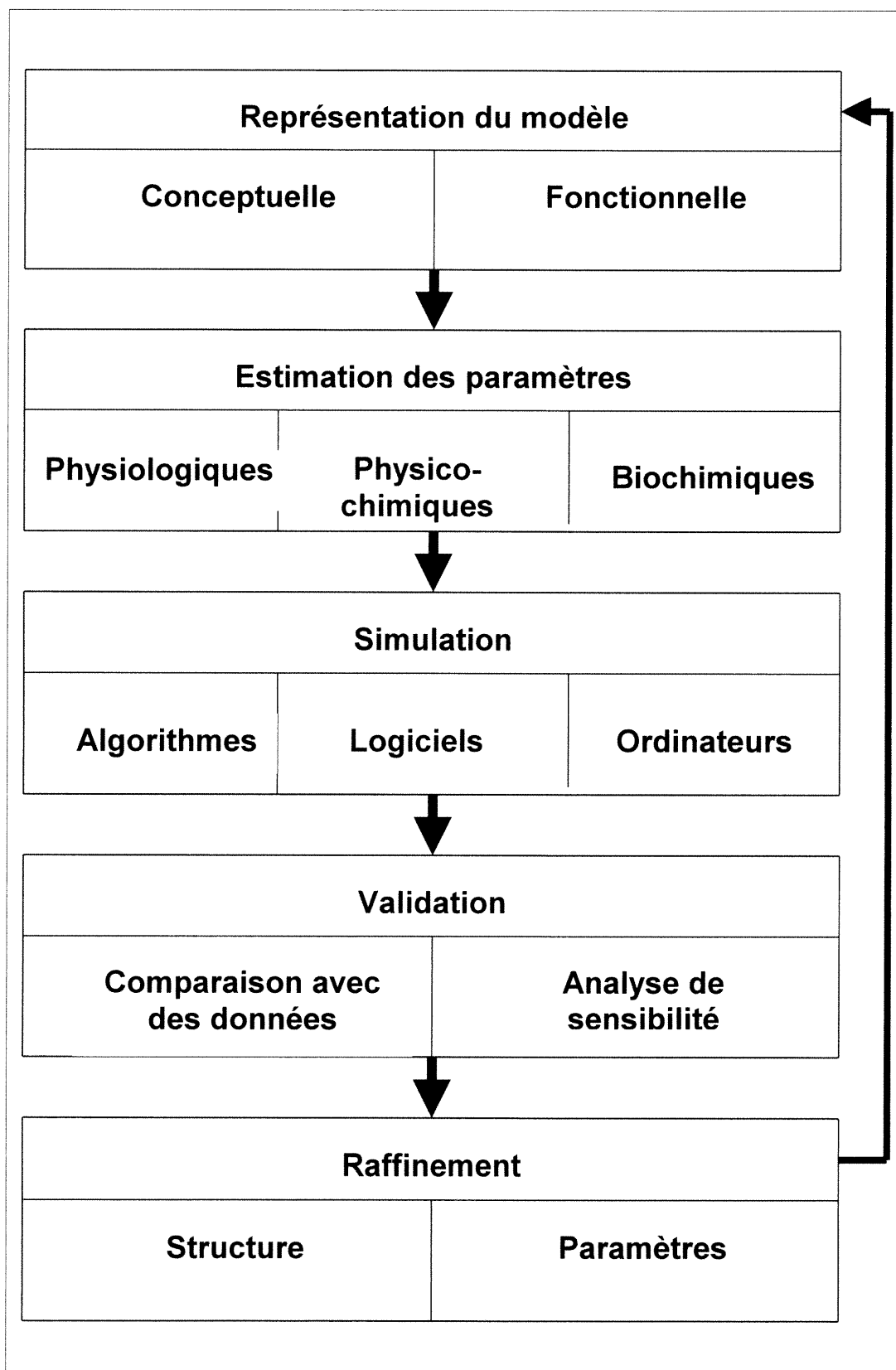


Figure 4.2.F1 : Étapes requises dans le développement d'un modèle PBPK. Adapté de: Krishnan et Andersen, 2001

4.2.1 Représentation du modèle

4.2.1.1 Représentation conceptuelle

La représentation conceptuelle ou schématique consiste à séparer l'organisme en plusieurs compartiments physiologiques identifiés comme étant responsables de la cinétique du xénobiotique étudié (Krishnan et Andersen, 2001) La Figure 4.2.1.1.F1 montre un exemple de la représentation conceptuelle pour une exposition par voie pulmonaire aux composés organiques volatils. Ces compartiments sont interreliés par la circulation systémique et sont caractérisés par des paramètres physiologiques, physico-chimiques et biochimiques. Les principales voies d'absorption et d'élimination du produit sont représentées par des flèches aux compartiments appropriés dans le modèle. Lors de la représentation conceptuelle, il est important de considérer le ou les organes cibles ayant une implication importante dans le processus de distribution, de métabolisme et d'élimination du xénobiotique.

La représentation de l'organisme doit être faite en considérant tout le poids corporel, afin que le bilan de masse du xénobiotique soit maintenu. En d'autres termes, la somme des charges tissulaires (concentration tissulaire $[C_i]$, en mg/L] x volume du tissu $[V_i]$, en L]), des quantités de xénobiotiques excrétées et celles métabolisées et/ou ionisées est égale à la dose administrée (Krishnan et Andersen, 2001). Conséquemment, le débit total de sang dans le modèle doit être égal à la somme des débits sanguins (Q_i , en L/h) distribués à chaque compartiment tissulaire (Krishnan et Andersen,

2001). Étant donné que la perfusion du squelette et de certaines composantes structurelles de l'organisme (e.g. poils, ongles, corne correspondant à environ 9% du poids corporel) est négligeable et que ces éléments ne jouent généralement pas un rôle appréciable dans la disposition des composés organiques, ceux-ci ne sont habituellement pas inclus dans le modèle (Krishnan et Andersen, 2001). Le total des débits sanguins aux tissus est donc réparti dans 91% du poids corporel. Cependant, la contribution du squelette et des poils sont des facteurs importants et exige souvent leur incorporation comme compartiment distinct dans la modélisation des métaux tel que Nickel ou Plomb (Menzel, 1988).

Les critères dans l'élaboration d'un modèle conceptuel sont principalement basés sur l'importance qu'ont certains organes dans la cinétique de distribution du xénobiotique. Ainsi, les tissus contribuant significativement à l'ADME et à la toxicité de la substance sont décrits individuellement et les tissus restants sont regroupés selon leur composition. Les tissus ayant des caractéristiques semblables et un impact individuel minime peuvent être regroupés en un seul compartiment (Krishnan et Andersen, 2001).

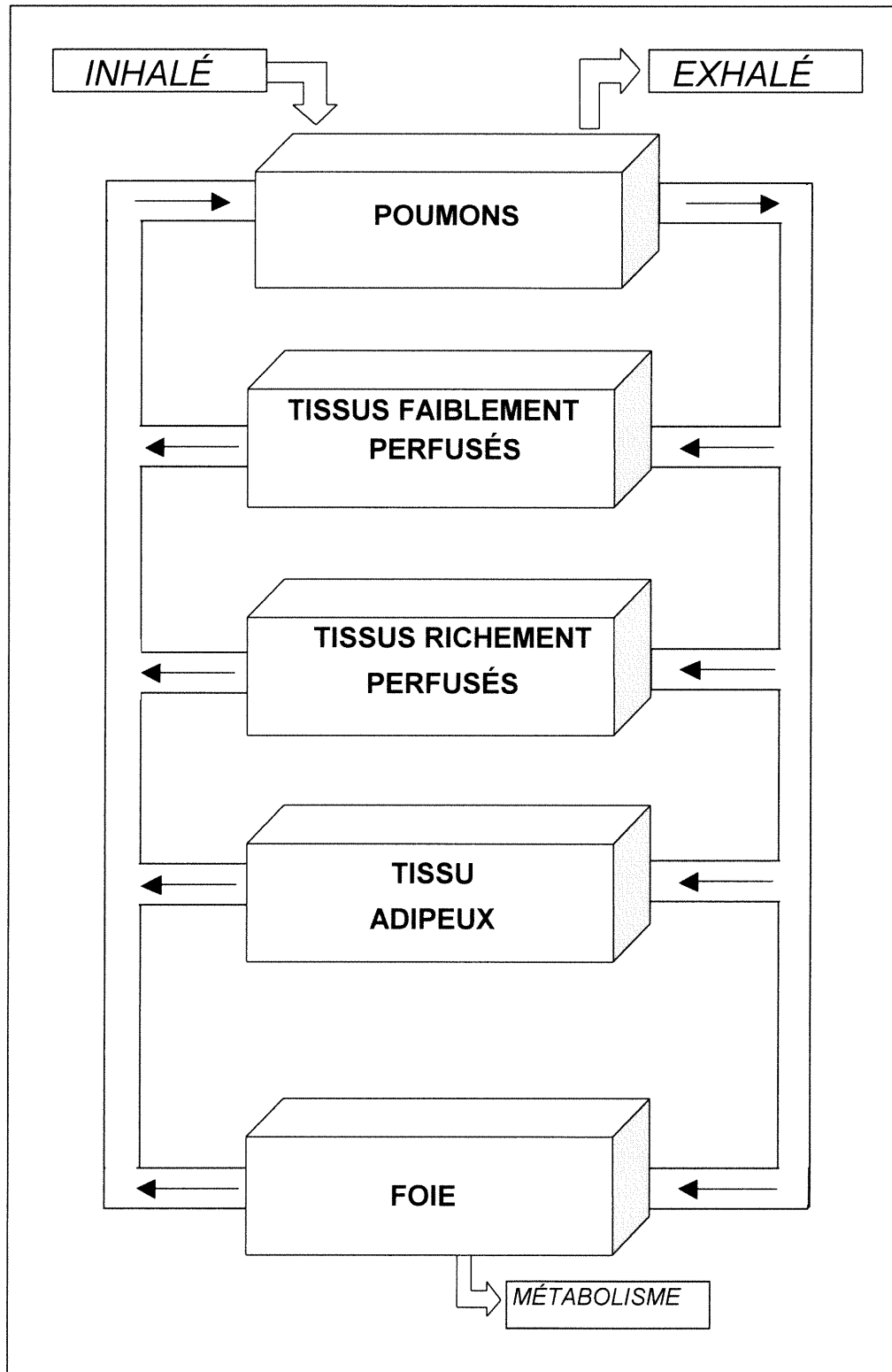


Figure 4.2.1.1.F1: Représentation conceptuelle d'un modèle PBPK pour la voie pulmonaire

4.2.1.2 Représentation fonctionnelle

La représentation fonctionnelle du modèle est l'étape où les processus physiologiques, physico-chimiques et biochimiques impliqués dans l'ADME du xénobiotique sont décrits à l'aide d'équations mathématiques différentielles de type bilan de masse (Krishnan et Andersen, 2001). Le système d'équations différentielles doit considérer l'ensemble des compartiments reliés entre eux via la circulation systémique.

L'unité de base des modèles PBPK est le compartiment. Ce compartiment, peut représenter un organe ou un ensemble d'organes ayant des caractéristiques physiologiques et métaboliques semblables. En principe, on peut regrouper en un seul compartiment les tissus qui ont des caractéristiques similaires pour un xénobiotique donné. Le regroupement d'organe est fonction d'une caractéristique de disposition tissulaire que l'on nomme "Time constant" (TIME_C) qui pourrait se traduire par temps de résidence. TIME_C correspond au rapport $(P_t : b * V_t) / Q_t$ (où $P_t : b$, V_t et Q_t correspondent au coefficient de partage tissu :sang, volume du tissu et débit sanguin au tissu, respectivement) et doit être similaire pour chacun des organes regroupés dans le compartiment (Krishnan et Andersen, 2001) . En d'autre termes, lorsque des déterminants critiques de la pharmacocinétique ne varient pas significativement d'un tissu à l'autre, alors les temps de résidence sont semblables et les organes peuvent être regroupés. Les compartiments peuvent être par exemple regroupés comme suit (Tableau 4.2.1.2.T1):

Tableau 4.2.1.2.T1 Exemple de regroupement d'organes ou de tissus dans un contexte de modélisation.

Compartiment	Organes ou tissus dans le compartiment
Foie	Foie
Tissu adipeux	Tissus adipeux
Tissus richement perfusés	Poumons, reins, colon, rate, cerveau, cœur, estomac, duodénum, jéjunum
Tissus faiblement perfusés	muscle, peau, os

Les tissus contenus dans chacun des compartiments peuvent varier suivant les caractéristiques intrinsèques du xénobiotique. À la limite, on pourrait utiliser pour des produits hautement lipophiles un modèle à deux compartiments (tissu adipeux et reste du corps) (Figure 4.2.1.2.F1). Dans ce cas précis, on peut imaginer que le tissu adipeux contiendrait entre 80 et 95% du xénobiotique et que le reste, soit 5-20% de la charge de xénobiotique, serait partagé par les autres tissus. On pourrait alors déterminer une constante métabolique basée sur la disparition de la charge dans le sang veineux ou la moyenne dans le compartiment représentant le reste du corps.

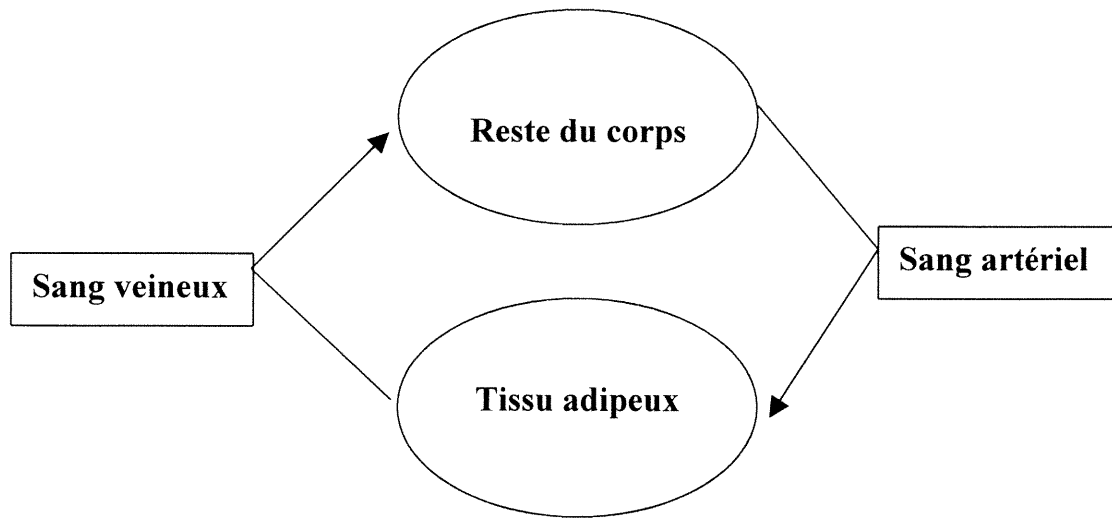


Figure 4.2.1.2.F1 Exemple d'un modèle potentiel à deux compartiments, pour des composés hautement lipophyles.

Chacun des compartiments est constitué de trois sous-compartiments (Figure

4.2.1.2.F2) :

- 1) vaisseaux sanguins par lesquels le compartiment (organe(s)/tissu(s) est perfusé par le sang;
- 2) un espace interstitiel formant une matrice pour les cellules tissulaires et;
- 3) une matrice cellulaire constituée des cellules du tissu/organe.

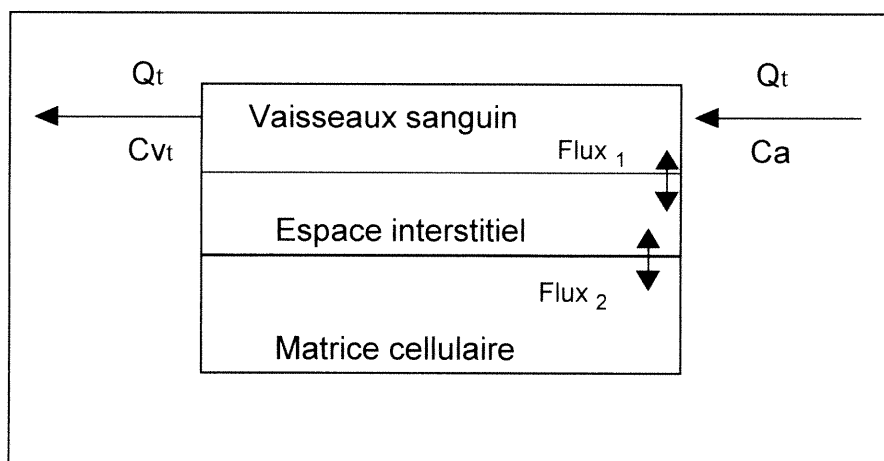


Figure 4.2.1.2.F2: Représentation schématique des sous-compartiments d'un tissu

Le taux d'entrée du xénobiotique dans le sous-compartiment sanguin est le produit du débit sanguin au tissu (Q_t) et de la concentration du xénobiotique dans le sang artériel diffusant dans les tissus (C_a). À l'intérieur du compartiment, la distribution du xénobiotique dépendra de plusieurs facteurs tels que des facteurs intrinsèques au xénobiotique (e.g. dimension de la molécule, structure de la molécule incluant ses groupements fonctionnels, affinité pour le tissu ou des structures dans le tissu). À l'intérieur du compartiment, suivant les facteurs cités précédemment, le xénobiotique traversera les vaisseaux sanguins vers l'espace interstitiel selon une vitesse $Flux_1$ et par la suite traversera le deuxième sous-compartiment à une vitesse $Flux_2$. Habituellement, un des deux flux est faible comparé à l'autre et sera considéré comme le facteur limitant du transfert du sang vers la matrice cellulaire. Ce flux sera seul responsable du taux de transfert du xénobiotique dans la matrice cellulaire.

Certains xénobiotiques peuvent se lier à des composantes de la matrice cellulaire, ce qui signifie qu'à l'intérieur d'un compartiment, il peut y avoir à la fois des xénobiotiques libres et liés. Seule la partie libre peut entrer et quitter le tissu (Lutz *et coll.*, 1980). La concentration de xénobiotique quittant l'espace vasculaire est représenté par C_v .

Le passage du xénobiotique à travers la membrane cellulaire peut se faire par diffusion passive, par diffusion facilitée, par transport actif, ou par une combinaison de ces moyens (Himmelstein *et coll.*, 1979). Le procédé le plus fréquemment utilisé est la diffusion passive, qui est un processus de premier ordre décrit par la loi de Fick selon l'équation suivante (Lutz, *et coll.*, 1980) :

$$Flux = \frac{DSK_s(C_1 - C_2)}{\alpha} = PA \frac{(C_1 - C_2)}{\alpha} \quad (4.2.1.2.E1)$$

- où C_1, C_2 = Concentration de xénobiotique libre de part et d'autre de la membrane
 D = Coefficient de diffusion d'un sous-compartiment à l'autre
 S = Surface de la membrane à traverser
 K_s = Coefficient de partage entre le milieu 1 et le milieu 2
 α = Épaisseur de la membrane
 PA = Coefficient de perméabilité

Les paramètres DSK_s peuvent être simplifiés et regroupés dans la modélisation PBPK sous le paramètre coefficient de perméabilité (PA). Ce paramètre exprime le taux de passage d'un xénobiotique d'un côté à l'autre de la membrane. Le PA correspond au produit de la constante de perméabilité de la membrane cellulaire (DK_s/α) pour le xénobiotique et de la surface totale de la membrane. Parce que la membrane cellulaire a un caractère lipidique, la

valeur de P est généralement considérée comme proportionnelle au coefficient de partage du xénobiotique entre la membrane cellulaire et l'eau. La constante de perméabilité est influencée par différents facteurs, tels que le degré d'ionisation de la substance, la concentration de chaque côté membrane, ainsi que la structure, la fonction et l'épaisseur de la membrane cellulaire (Gillette, 1987; Medinsky et coll., 1996). Pour de petites molécules organiques neutres, le taux de diffusion (D) est proportionnel au poids moléculaire (PM) suivant l'équation : $D = cte/PM^{1/2}$, tel que décrit par Ohki et coll. en 1992.

Comme il a été mentionné précédemment, le sang entre dans un compartiment suivant un certain débit. Le xénobiotique diffuse à travers l'endothélium vasculaire principalement en suivant un gradient de concentration. Deux situations qui auront un impact sur la concentration tissulaire peuvent survenir :

1)- Cas ou $PA < Qt$. Dans cette situation, le sang irrigue plus rapidement l'organe mais le xénobiotique est limité dans le transfert, dans la matrice cellulaire, par la diffusion pour se rendre au tissu. Dans ce cas, on parlera de diffusion limitée, c'est à dire que la diffusion sera le facteur limitant important sur la charge de xénobiotique dans le tissu.

2)- Cas ou $PA > Qt$. Dans ce cas la diffusion du xénobiotique sera de beaucoup supérieure au débit d'irrigation du compartiment. On parlera alors

de distribution selon un processus limité par le débit sanguin (débit dépendant).

Ces deux situations auront un impact important pour des expositions ponctuelles mais peu important dans des expositions chroniques surtout lorsque l'élimination est lente dans l'organe cible et que le modèle est à l'état d'équilibre.

Plusieurs équations sont utilisées pour décrire l'ADME des xénobiotiques dans les modèles PBPK. Une courte description des principaux mécanismes permettra de mieux comprendre comment le modèle PBPK tient compte des phénomènes physiologiques.

4.2.1.2.1 Voies d'exposition (Absorption)

Les voies intraveineuse, orale, par inhalation, cutanée et intra-péritonéale sont les plus souvent utilisées dans les modèles PBPK.

4.2.1.2.1.1 Exposition intraveineuse

L'exposition intraveineuse (IV) est représentée par un processus d'ordre 0 entrant directement dans le sang veineux. Cette voie est très utilisée dans le cas où l'on veut mesurer la distribution d'un xénobiotique dans les différents compartiments sans considérer les facteurs limitant l'absorption.

4.2.1.2.1.2 Exposition par voie orale ou gastro-intestinale

Pour la simulation de l'exposition par voie orale, l'absorption gastro-intestinale est décrite généralement par un processus de premier ordre :

$$\frac{dA_a}{dt} = K_a \times D_a \quad (4.2.1.2.1.2.E1)$$

- où dA_a/dt = Taux d'absorption du xénobiotique (mg/h)
 D_a = Dose de xénobiotique administrée oralement (mg)
 K_a = Constante d'absorption gastro-intestinale (h^{-1})

La constante d'absorption peut être influencée par divers éléments, comme par exemple le taux d'ionisation des xénobiotiques (calculé selon l'équation d'Henderson-Hasselbalch), le temps de transit dans les différentes sections du tube digestif, le passage à travers les parois, la sécrétion biliaire, le taux de dissolution du xénobiotique, le métabolisme intestinal. La description de cette voie d'exposition peut être incorporée à un compartiment représentant le système digestif ou encore directement au compartiment hépatique.

4.2.1.2.1.3 Exposition par voie pulmonaire

Plusieurs composés environnementaux et industriels sont introduits dans l'organisme par cette voie. La quantité inhalée (C_{inh}) sera fonction du débit alvéolaire et dépend du rapport entre la concentration de xénobiotique inhalée et exhalée. La résultante va se traduire en une concentration artérielle de

xénobiotique. Les principaux facteurs limitant sont la dimension des particules, la solubilité des gaz et le débit cardiaque.

L'exposition pulmonaire peut être décrite par la formule suivante :

$$C_a = \frac{Q_p C_{inh} + Q_c C_v}{Q_c + \frac{Q_p}{P_p}} \quad (4.2.1.2.1.3.E1)$$

- où
- Ca = Concentration artérielle (mg/L)
 - C_{inh} = Concentration de xénobiotique dans l'air inhalé (mg/L)
 - C_v = Concentration de xénobiotique dans le sang veineux (mg/L)
 - P_b = Coefficient de partage sang:air
 - Q_c = Débit cardiaque (L/h)
 - Q_p = Taux de ventilation alvéolaire (L/h)

L'équation (4.2.1.2.1.3.E1) n'est valide que lorsqu'il y a un équilibre rapide du xénobiotique entre le sang et l'espace alvéolaire, qu'il n'y a aucune biotransformation significative dans le tissu pulmonaire et que l'accumulation dans les poumons est négligeable.

4.2.1.2.2 Compartiments tissulaires

Chaque compartiment tissulaire est décrit à l'aide de quatre équations qui permettent de connaître la charge de xénobiotique qui y circule :

- 1)- taux de changement de la quantité de xénobiotique;

- 2)- quantité de xénobiotique dans le tissu;
- 3)- concentration de xénobiotique dans le tissu et;
- 4)- concentration de xénobiotique dans le sang veineux quittant le tissu.

Encore une fois, deux situations peuvent se produire :

Si $PA > Qt$

Dans ce contexte nous avons vu dans la section (4.2.1.2) que la charge de xénobiotique dans la matrice cellulaire sera fonction du débit sanguin irriguant l'organe ou le compartiment considéré. La distribution du xénobiotique dans ce compartiment sera considérée comme homogène tel que décrit dans la figure 4.2.1.2.2.F1.

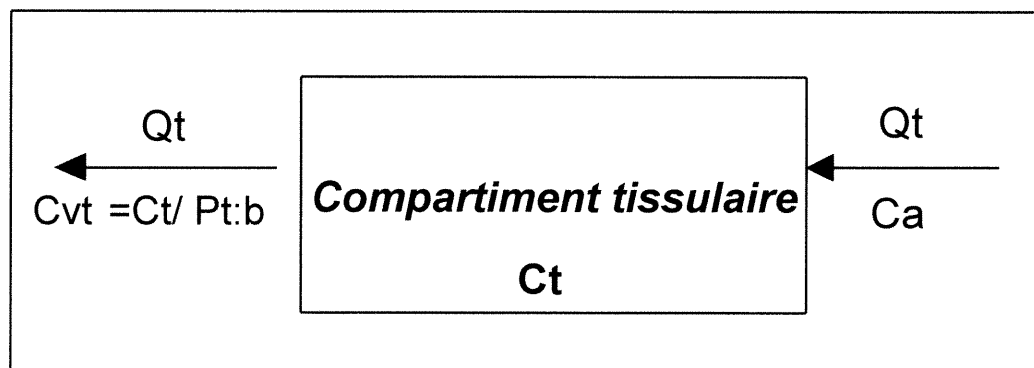


Figure 4.2.1.2.2.F1: Compartiment tissulaire où l'entrée des xénobiotiques est limitée par la perfusion des tissus

1)-Ainsi le taux de changement de la quantité de xénobiotique dans la matrice cellulaire sera exprimé comme suit :

$$\frac{dA_i}{dt} = Q_i * (C_a - C_{v_i}) \quad (4.2.1.2.2.E1)$$

2)- la quantité de xénobiotique dans le tissu,

$$Ab_i = \int_0^{time} dA_i \quad (4.2.1.2.2.E2)$$

3)- la concentration de xénobiotique dans le tissu et

$$C_t = \frac{A_t}{V_t} \quad (4.2.1.2.2.E3)$$

4)- la concentration de xénobiotique dans le sang veineux quittant le tissu.

$$C_{v_i} = \frac{C_i}{Pt : b} \quad (4.2.1.2.2.E4)$$

- où
- A_t = Quantité de xénobiotique dans le tissu t (mg)
 - C_a = Concentration de xénobiotique dans le sang artériel (mg/L)
 - C_t = Concentration de xénobiotique dans le tissu t (mg/L)
 - C_{v_t} = Concentration de xénobiotique dans le sang veineux quittant le tissu i (mg/L)
 - Q_t = Taux de perfusion du tissu t (L/h)
 - dA_t/dt = Taux de variation de la quantité de xénobiotique dans le tissu (mg/h)
 - $Pt:b$ = Coefficient de partage tissu:sang
 - V_t = Volume du tissu t (L)

Si $PA < Q_t$

Dans la deuxième situation où $PA < Q_t$, le facteur limitant sera la perméabilité tissulaire tel que décrit dans la figure 4.2.1.2.2.F.2. Dans ce cas ci, le compartiment tissulaire sera divisé en deux sous-compartiments, c'est à dire le compartiment sang tissulaire (tb) qui irrigue le compartiment et le sous-compartiment matrice cellulaire (t).

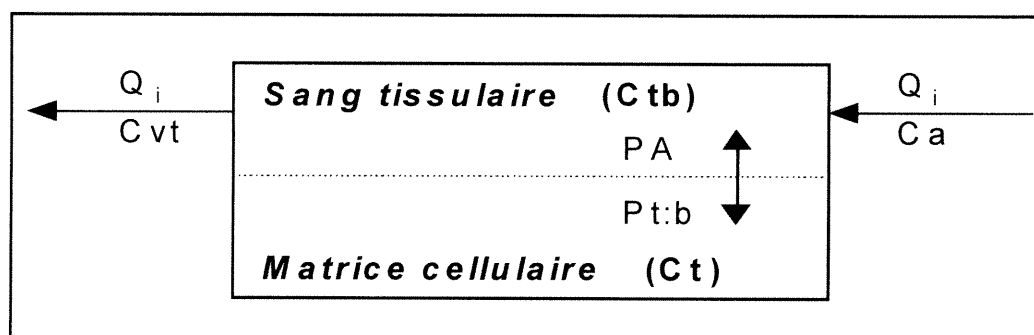


Figure 4.2.1.2.2.F2 Compartiment tissulaire où l'entrée des xénobiotiques est limitée par la diffusion à travers la membrane cellulaire.

1)- Ainsi le taux de changement de la quantité de xénobiotique dans la matrice cellulaire sera exprimé comme suit :

$$\frac{dA_t}{dt} = PA_t \left(C_{vt} - \frac{C_t}{P_t} \right) \quad (4.2.1.2.2.E5)$$

Le taux de changement dans la sous-fraction sang tissulaire sera égal à la somme de la rétention de cette sous fraction plus la charge qui arrive de la sous fraction matrice cellulaire

$$\frac{dA_{tb}}{dt} = Q_t * (C_a - C_{vt}) + PA_t \left(\frac{C_t}{P_t} - C_{vt} \right) \quad (4.2.1.2.2.E6)$$

2)- la quantité de xénobiotique dans les sous fractions matrice cellulaire et sang tissulaire seront respectivement ;

$$Ab_t = \int_0^{time} dA_t \quad (4.2.1.2.2.E7)$$

$$Ab_{tb} = \int_0^{time} dA_{tb} \quad (4.2.1.2.2.E8)$$

3)- la concentration de xénobiotique dans la sous fraction matrice cellulaire :

$$C_t = \frac{A_t}{V_t} \quad (4.2.1.2.2.E9)$$

4)- La concentration de xénobiotique quittant le compartiment sera exprimé comme suit :

$$C_{vt} = \frac{A_{tb}}{V_{tb}} \quad (4.2.1.2.2.E10)$$

- où
- At = Quantité de xénobiotique dans le sang du tissu (mg)
 - Atb₀ = Quantité de xénobiotique dans le sang du tissu (mg) au temps zéro
 - At = Quantité de xénobiotique dans la matrice cellulaire du tissu (mg)
 - At₀ = Quantité de xénobiotique dans la matrice cellulaire du tissu *i* (mg) au temps zéro
 - Cb = Concentration de xénobiotique libre dans le sang veineux quittant le tissu (mg/L)
 - Cvt = Concentration de xénobiotique dans la matrice cellulaire du tissu (mg/L)
 - dAtb/dt = Taux de variation de la quantité de xénobiotique dans le sang du

	tissus (mg/h)
dA_t/dt	= Taux de variation de la quantité de xénobiotique dans la matrice cellulaire du tissu (mg/h)
PA_t	= Taux de perméabilité de la membrane du tissu (L/h)
V_{tb}	= Volume du sang dans le tissu (L)
V_t	= Volume de la matrice cellulaire du tissu (L)

Les descriptions « débit de perfusion d'un organe » et « diffusion limitée » peuvent toutes deux faire partie d'un même modèle PBPK et décrire chacune un organe. Les différents compartiments tissulaires sont interreliés par la circulation systémique. Le sang artériel amène le xénobiotique vers les tissus, tandis que les quantités dans le sang veineux provenant de chaque tissu se regroupent pour former le sang veineux total, ce qui résulte en une concentration veineuse homogène.

La concentration dans le sang veineux est la somme du sang veineux provenant de chaque tissu et est calculée selon l'équation suivante (Ramsey *et coll.*, 1984) :

$$C_v = \frac{\sum_i^n Q_t * C_{vt}}{Q_c} \quad (4.2.1.2.2.E11)$$

où C_{vt} = Concentration de xénobiotique libre dans le sang veineux quittant le tissu i (mg/L)

4.2.1.2.3 Métabolisme

La description de la quantité métabolisée sera différente d'un modèle à l'autre et sera fonction du xénobiotique mais aussi de la capacité d'un organe à métaboliser une substance. Le taux de métabolisme peut être décrit par un processus de premier ordre, de deuxième ordre ou encore par un processus saturable selon les expressions suivantes (Krishnan et Andersen, 2001):

Premier ordre

$$\frac{dA_{met}}{dt} = K_f \times C_{vt} \times V_t \quad (4.2.1.2.3.E1)$$

Deuxième ordre

$$\frac{dA_{met}}{dt} = K_s \times C_{vt} \times V_t \times C_{cf} \quad (4.2.1.2.3.E2)$$

Le taux de xénobiotique métabolisé dans le foie est souvent décrit par un processus saturable. Cette équation est ajoutée à celles décrivant le compartiment du foie :

$$\frac{dA_{met}}{dt} = \frac{V \max * C_{v_l}}{K_m + C_{v_l}} \quad (4.2.1.2.3.E3)$$

où

Kf	=	Constante de premier ordre (h ⁻¹)
Vt	=	Volume tissulaire
Ks	=	Constante métabolique de second ordre (L mg ⁻¹ h ⁻¹)
Ccf	=	Cofacteur dans le tissu

- C_{v_i} = Concentration de xénobiotique libre dans le sang veineux quittant le foie (mg/L)
 dA_{met}/dt = Taux de xénobiotique métabolisé dans le foie (mg/h)
 K_m = Constante d'affinité de Michaelis-Menten (mg/L)
 V_{max} = Vitesse maximale de la réaction enzymatique (mg/h)

Lorsque les valeurs numériques de V_{max} , K_f , et K_m ne sont pas connues, on peut utiliser l'équation suivante qui décrit la formation de métabolite basée sur le concept de clairance hépatique (Cl_h , en L/h) (Pelekis *et coll.*, 1995) :

$$\frac{dA_{\text{met}}}{dt} = Q_l * E * C_a \quad (4.2.1.2.3.E4)$$

- où E = Coefficient d'extraction hépatique, égal à Cl_h/Q_l
 Q_l = Taux de perfusion du foie (L/h)

Ainsi, on suppose une élimination de premier ordre, plutôt qu'une élimination de type Michaelis-Menten pour déterminer les limites minimale et maximale du taux d'élimination. Il faut préciser que cette dernière équation est valable à faible concentration c'est-à-dire lorsque les enzymes impliqués ne sont pas saturés, condition souvent retrouvée lors d'expositions environnementales. (O'Flaherty, 1998).

4.2.2 Estimation des paramètres

Trois types de paramètres sont nécessaires pour élaborer un modèle PBPK : physiologiques, physico-chimiques et biochimiques. Parce que les modèles développés sont des modèles prédictifs, il est préférable d'obtenir la valeur de ces paramètres de façon indépendante.

4.2.2.1 Paramètres physiologiques

Les paramètres physiologiques inclus dans la plupart des modèles PBPK sont le taux de ventilation alvéolaire, le débit cardiaque, le taux de perfusion sanguine de chacun des tissus, ainsi que leur volume (Krishnan et Andersen, 2001). Ces données sont généralement disponibles dans la littérature et ce pour plusieurs espèces animales (e.g. rat, souris, poisson, humain) (Arms *et coll.* 1988; Brown *et coll.*, 1997). Lorsque les données requises ne sont pas disponibles dans la littérature, il est possible de les estimer à l'aide d'équations allométriques validées (Krishnan *et coll.*, 1991).

4.2.2.2 Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques sont principalement représentés par les coefficients de partage tissu:air (Pt:a), sang:air (Pb :a) et tissu:sang (Pt:b) (Krishnan et Andersen, 2001). Les coefficients de partage représentent la distribution d'un produit entre deux phases à l'équilibre. Le degré avec lequel le xénobiotique se partage dans un tissu dépend de la composition du tissu et est indépendant de la concentration du xénobiotique à la condition de non saturation.

Les valeurs numériques des coefficients de partage peuvent être déterminées *in vitro*, *in vivo*, ou à l'aide d'algorithmes empiriques et mécanistes. Pt:a et Pb peuvent être mesurés *in vitro* par la méthode des tubes à l'équilibre, dans le cas des substances organiques volatiles, et par dialyse à l'équilibre ou par ultrafiltration, dans le cas des substances non-volatiles (Krishnan et Andersen,

2001). $Pt:b$ est souvent calculé comme étant le rapport entre $Pt:a$ et P_b , mais il peut également être déterminé *in vivo*, en mesurant le rapport entre les concentrations tissulaires et sanguines à l'état d'équilibre (Krishnan et Andersen, 2001). Toutefois, un des problèmes associés à la détermination *in vivo* des $Pt:b$ est la présence de sang résiduel dans les tissus. Il est possible de corriger cette erreur d'estimation en tenant compte des fractions en sang et matrice cellulaire dans chacun des compartiments tissulaires (Khor *et coll.*, 1991).

Lorsque aucun des coefficients de partage n'est connu, des algorithmes mécanistes et empiriques peuvent servir à produire des estimés préliminaires (van Ommen *et coll.*, 1986; Poulin *et coll.*, 1995b). Puisque les données sur la composition du sang et des tissus sont disponibles dans la littérature, seules les valeurs numériques des coefficients de partage n-octanol:eau sont nécessaires pour déterminer les coefficients de partage de chaque nouveau produit chimique (Poulin et Krishnan, 1995b).

4.2.2.3 Paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques servent à décrire le taux d'absorption, le taux de métabolisme, la liaison aux macromolécules et le taux d'excrétion (Krishnan et Andersen, 2001). Ces paramètres peuvent être estimés à l'aide de méthodes *in vitro* (par exemple fractions post-mitochondriales, microsomes, suspensions cellulaires) ou *in vivo* (comparaison de la pharmacocinétique d'une substance en fonction d'un ou deux facteurs dominants). Les paramètres biochimiques peuvent également être déterminés à l'aide de modèles PBPK, en définissant

tous les paramètres du modèle, sauf celui recherché; la valeur numérique de ce dernier est alors trouvée par itération en ajustant les simulations du modèle avec les données expérimentales. Les méthodes d'estimation des paramètres biochimiques sont nombreuses et dépendent de la nature du paramètre recherché (Krishnan et Andersen, 2001).

Des approches mécanistes n'utilisant pas d'animaux pour prédire les valeurs numériques du coefficient d'extraction hépatique (E), de V_{max} ou de K_m ne sont pas encore disponibles. Toutefois, tel que mentionné à la section 4.2.1.2.3, il est possible de remplacer les valeurs de V_{max} et K_m par E, lorsque celles-ci ne sont pas disponibles. Le coefficient d'extraction hépatique E correspond au ratio entre Cl_h et Q_l , ($E = Cl_h/Q_l$). Lorsqu'un xénobiotique est hautement métabolisé, Cl_h s'approche de la valeur de Q_l . Si le xénobiotique est faiblement métabolisé, alors Cl_h tend vers 0. Ainsi, E peut varier entre 0 (0% d'extraction hépatique) et 1 (100% d'extraction hépatique). Les valeurs générées par le modèle PBPK lorsque $E=0$ ou $E=1$ correspondent donc aux limites supérieure et inférieure des concentrations tissulaires et sanguines possibles, peu importe le xénobiotique testé et l'organisme étudié (Poulin et Krishnan, 1999).

4.2.3 Simulation

La simulation est définie comme étant la résolution, pour chaque intervalle de temps, de l'ensemble des équations de type "bilan de masse" pour les compartiments tissulaires, pour des conditions d'exposition définies. Dans le contexte des modèles PBPK, la simulation réfère à la prédiction des profils

cinétiques dans le sang et les tissus par la résolution des équations différentielles. Le principe général de ces algorithmes utilisés pour solutionner des équations différentielles de premier ordre peut être décrit par l'équation suivante (Davis, 1992) :

Nouvelle valeur = ancienne valeur + (pente x temps d'intégration) (4.2.3.E1)

Les équations du modèle PBPK et les algorithmes peuvent être décrits et résolus en utilisant un langage de programmation (par exemple FORTRAN, BASIC, etc.), un logiciel de simulation (e.g. ACSL[®], ScoP[®], CSSL IV[®], SIMNON[®], ADSIM[®] et STELLA[®]) (Krishnan et Andersen, 2001) ou un tableur (e.g. EXCEL[®]) (Haddad *et coll.*, 1996). Dans les deux premiers cas, le style de représentation informatique du modèle est déterminé par les règles du langage de programmation/simulation utilisé. Les langages et logiciels de simulation sont de nature générale, mais ils peuvent posséder des éléments spéciaux pour modéliser certains types de systèmes. Les simulations de modèles PBPK peuvent être effectuées sur des ordinateurs de type IBM-PC et Macintosh.

4.2.4 Validation

Le modèle pharmacocinétique à base physiologique doit être validé en comparant les simulations avec les données expérimentales afin de confirmer ou de raffiner les valeurs prédictives du modèle. La validation du modèle permet de vérifier si tous les éléments jugés essentiels pour la description de la cinétique d'une substance ont été identifiés et caractérisés correctement

(Krishnan et Andersen, 2001). Lorsque les données simulées à l'aide du modèle concordent avec les données expérimentales, il y a alors un plus grand niveau de confiance lors de l'utilisation du modèle pour l'extrapolation animal-humain dans le processus d'analyse du risque.

L'approche la plus couramment utilisée pour vérifier la justesse du modèle PBPK est la validation par comparaison. Elle consiste en une comparaison visuelle des données simulées et expérimentales en fonction d'une variable commune (par exemple, le temps). Le raisonnement derrière cette approche est que plus les données expérimentales sont proches des données simulées, plus grande est la confiance envers le modèle (Krishnan et Andersen, 2001).

4.2.5 Raffinement

Cette section représente une étape importante dans le sens où elle vise à préciser certains paramètres ou descriptions mathématiques de processus biologique. Elle se manifeste aussi par une analyse de sensibilité qui consiste en une évaluation de l'effet des changements dans la valeur d'un paramètre sur la dose tissulaire estimée par un modèle PBPK (Krishnan et Andersen, 2001). La sensibilité est exprimée à partir de l'impact occasionné par le changement de la valeur d'un paramètre du modèle sur la concentration tissulaire. L'analyse de sensibilité permet ainsi d'identifier les paramètres critiques d'un modèle PBPK (Spear et Bois 1994; Luecke *et coll.* 1997).

5.0 Analyse des modèles PBPK publiés sur les composés hautement lipophiles

Plus de 20 modèles PBPK ont déjà été publiés ces dernières années pour des composés hautement lipophiles (voir Tableaux 5.0.T1 et 5.0.T1 suite). Des BPC, des PCDD, l'hexachlorobenzène et le n-hexane sont autant de produits dont la pharmacocinétique a été décrite et simulée. La majorité des modèles proposés comportent 5 compartiments (i.e. foie, tissus adipeux, tissus richement perfusés, tissus faiblement perfusés et sang). La plupart des modèles sont décrits pour des expositions uniques, principalement par voie intraveineuse.

Certaines variantes existent dans le profil de distribution de ces composés. D'abord, les BPC, le n-hexane et l'hexachlorobenzène sont décrits comme ayant une distribution limitée par le débit de perfusion dans les compartiments. Le PCDD est quant à lui décrit principalement par une distribution par diffusion limitée. Comme nous l'avons vu, une distribution par diffusion limitée reçoit le xénobiotique dans la matrice cellulaire beaucoup plus lentement que lorsque la distribution est limitée par la perfusion du compartiment.

Tableau 5.0.T1 : Liste des principaux modèles PBPK publiés pour les composés hautement lipophiles

Date publi.	Xénobiotique	Espèce	Voie adm et Nb.dose	Nb de compartiment	Référence
1975	BPC-80	rat	IV (1 dose)	5	(Tuey et coll., 1977)
1977	BPC-153	rat	IV (1 dose)	5	(Matthews, Tuey, et Anderson, 1977)
1977	BPC-15, -77, -101 et -153	rat	IV (1 dose)	5	(Anderson et coll., 1977)
1977	BPC-15, 136, -153	rat	IV (1 dose)	5	(Lutz et coll., 1977)
1979	BPC-153	rat	IV (1 dose)	6	(Bungay et coll., 1979)
1980	BPC-153	rat	IV (1 dose)	6	(Tuey et coll., 1980a)
1980	BPC-15, -17, -101, -153	souris	IV (1 dose)	5	(Tuey et coll., 1980b)
1981	Chlordécone	rat	IP (1 dose)	6	(Bungay et coll., 1981)
1984	BPC-15, 136, -153	souris, rat, chien	IV (1 dose)	5	(Lutz et coll., 1984)
1987	BPC136, -153,-15	rat, souris, singe, chien	IV (1 dose)	5	(Lutz et coll., 1987)
1988	2,3,7,8-TCDD	souris	IV (1 dose)	5	(Leung et coll., 1998)
1990	2,3,7,8-TCDD	rat	IV (1 dose)	5	(Leung et coll., 1990b)
1993	Hexachlorobenzène	rat	orale (+++ doses)	13	(Roth et coll., 1993)
1993	TBDD	rat	IV,Orale,Dermal (1 dose)	6	(Kedderis et coll., 1993)

Tableau 5.0.T1 (suite) : Liste des principaux modèles PBPK publiés pour les composés hautement lipophiles

Date publi.	Xénobiotique	Espèce	Voie adm et Nb.dose	Nb de compartiment	Référence
1988	2,3,7,8-TCDD	Humain	orale (++) dose	8	(Cho-Chung et coll., 1981)
1990	2-Iodo-3,7,8-TCDD	souris	IP (1 dose)	6	(Leung et coll., 1990c)
1993	2,3,7,8-TCDD	rat	SC (1 dose)	5	(Andersen et coll., 1993)
1995	2,3,7,8-TCDD	rat	SC (1 dose)	5	(Buckley, 1995)
1997	2,3,7,8-TCDD	rat	orale (1 dose)	8	(Wang et coll., 1997)
1998	2,3,7,8-TCDD	truite	dans l'eau (++) dose	8	(Nichols et coll., 1998)
1998	BPC (tous)	rat	IV (1 dose)	5	(Parham et coll., 1998)
1999	n-hexane	rat, humain	Inhalation (2 heures)	6	(Ali et Tardif., 1999)
1998	1,2,4-triméthyl benzène	humain	Inhalation (2 heures)	5	(Jarnberg et coll., 1996)
1986	hexachlorobenzène	humain / rat	orale (++) dose	9	(Yesair et coll., 1986)

Les paramètres physiologiques, physico-chimiques et biochimiques sont présentés par les auteurs pour chacun des modèles. Les paramètres physiologiques, tels que les débits de perfusion, ont subi une évolution depuis les 30 dernières années. Ainsi en 1977, Matthews a décrit plusieurs modèles de distribution pour le rat, la souris, le chien et l'humain (Matthews et coll, 1977; Tuey et Matthews, 1977; Anderson, et coll., 1977; Lutz et coll., 1977). Certains paramètres décrits ne correspondaient pas à la réalité des débits de perfusions aujourd'hui standardisés. En effet, les publications de ILSI (1994) et de Brown (1997) ont permis d'ajuster et surtout d'uniformiser les paramètres physiologiques. Le débit de perfusion du foie correspond en moyenne entre 18 et 25 % du débit cardiaque (Krishnan et Andersen, 2001). Dans les articles de Matthews des années 1975-77, ce débit était de 65% du débit cardiaque, ce qui avait un impact énorme sur la vitesse d'élimination d'un produit hautement lipophile si l'on se réfère à l'équation (4.2.1.2.3.E4), où le taux d'excrétion est fonction du débit hépatique.

En 1980, le groupe de Matthews modifia la fraction du débit hépatique de 65% à 53% du débit cardiaque, ce qui représentait toujours le double de la valeur maximale utilisée de nos jours. Le groupe de Matthews a décrit, pour les composés hautement lipophiles, la clairance biliaire, l'excrétion fécale et le cycle entérohépatique. Dans un article publié en 1980 par Tuey et Matthews, avec le 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobromobiphenyle (HBB), on retrouve des simulations orales répétées sur une période de 4 jours ou en discontinu sur des cycles de 5 jours. À l'équilibre, plus de 60 % du HBB se retrouve dans le

tissus adipeux après une exposition journalière par voie orale chez l'humain (Tuey et Matthews, 1980a). Des résultats similaires sont rapportés chez la souris (Tuey et Matthews, 1980b). Le principal inconvénient des données expérimentales de Matthews publiées entre les années 1970 et 1980, c'est qu'elles ont été obtenues via l'utilisation du carbone ^{14}C (Tuey et Matthews, 1980a). Ainsi, bien que la modélisation PBPK permette de décrire de façon distincte la pharmacocinétique du produit mère et de ses métabolites, une telle distinction est difficile lorsque le suivi d'un composé se fait par mesure de radioactivité et la distinction entre produits et métabolites n'est pas claire dans les travaux de Matthews. Les auteurs ont toutefois tenté une approche pour discriminer entre les métabolites et le produit mère, mais les résultats ne sont pas très concluants lorsque que l'on tente de simuler seulement les produits mères.

En 1979 et en 1981, Bungay a proposé l'utilisation d'un modèle de distribution à diffusion limitée pour le képone (composés ayant un log Kow 7.41 mais contenant un groupement cétone).

A partir de 1980 plusieurs modèles de distribution du 2,3,7,8 -TCDD ont été décrits (Tableau 4.3.T1 et 4.3.T2), ce qui a permis de développer la description de processus tels que l'induction enzymatique, la distribution par diffusion limitée et la liaison aux protéines dans différents organes. (Leung et coll. 1990b; Leung *et coll.*, 1990c; Kedderis, *et coll.*, 1993; Andersen, *et coll.*, 1993; Wang, *et coll.*, 1997). Le nombre de compartiments inclus dans ces modèles a évolué dans le temps, passant de 5 à 8 compartiments.

Une grande variabilité est retrouvée dans les modèles en rapport avec le coefficient de partage tissu adipeux:sang. Les valeurs prises se situent entre 100 et 1000 suivant les auteurs (Kedderis, *et coll.*, 1993; Wang, *et coll.*, 1997). Cette diversité s'explique par le type de distribution utilisée, le nombre de compartiments et les mécanismes décrits dans le modèle. Ces valeurs étaient souvent obtenues par optimisation. Aujourd'hui, les auteurs décrivent ces paramètres sur des bases mécanistiques ou expérimentales (Krishnan et Andersen, 2001). Dans le cas des expositions uniques, la distribution a principalement lieu dans le tissu hépatique (Andersen et coll. 1993; Carrier *et coll.*, 1995), ce qui est dû essentiellement aux liaisons qui s'établissent entre les composés lipophiles et les protéines dans les tissus hépatiques. Il n'en demeure pas moins que le coefficient de partage entre le tissu adipeux et le sang se situe dans le même ordre de grandeur pour tous les composés hautement lipophiles.

Aucun auteur n'a présenté de modèle multicompartimental où l'on retrouve une simplification du compartiment en ne considérant que la fraction lipidique. Les auteurs s'entendent cependant pour dire que la majorité des xénobiotiques hautement lipophiles se concentrent majoritairement dans le compartiment adipeux lors d'expositions chroniques. Si l'on considère la modélisation PBPK comme une représentation simplifiée de différents mécanismes qui contrôlent la distribution dans le temps d'un xénobiotique, qui a pour objectif d'apporter un support dans la compréhension de la relation entre la concentration dans un organe et la réponse toxique observée (Lutz et

Dedrick, 1987), il serait très intéressant de simplifier les modèles pour composés hautement lipophiles sur la base de la propriété commune de ces composés, à savoir leur lipophilicité élevée. Actuellement, aucun modèle PBPK n'a été conçu sur cette base, c'est-à-dire en considérant la distribution des COHL dans le sous-compartiment lipidique de chaque compartiment.

6.0 Problématique et proposition d'un nouveau modèle

Les composés hautement lipophiles sont des composés persistants dans l'environnement. Ils se composent principalement de BPC, de pesticides organochlorés et de certains composés industriels. Ces substances se concentrent par biomagnification à mesure que l'on monte dans la chaîne alimentaire.

De nombreux travaux sur la bioconcentration en fonction du Kow ont été faits chez les poissons pour définir une relation entre l'organisme (généralement le poisson) et les composés organiques hautement lipophiles (Gabric, et coll., 1990; Connell, et coll., 1993; Geyer et coll. 1997). Les modèles développés jusqu'à maintenant sont surtout des modèles empiriques caractérisés par des relations linéaires entre le log Kow et la bioconcentration. Geyer et coll.(1997) ont démontré une relation entre la persistance du lindane dans les tissus biologiques et la composition lipidique (Geyer, et coll., 1997). Tous ces modèles sont basés sur des échanges globaux entre un organisme vivant et son milieu en l'occurrence l'eau.

Connell et coll. (1993) ont développé un modèle qui définit un coefficient de partage pour estimer la concentration de contaminants hautement lipophiles chez les mammifères. L'approche consistait à définir une équation tenant compte des principaux constituants des tissus soient : les lipides, les protéines et l'eau. En 1996, van der Molen et coll. ont publié un modèle à un compartiment, applicable aux composés hautement lipophiles. Il s'agit en fait d'un modèle à un compartiment dans lequel ils considèrent un intrant et un extrant. Le compartiment central est converti en lipide totaux.

Récemment, Kelly et coll. (2001) démontraient que le coefficient n-octanol:air (Koa) était un meilleur indicateur que le Kow. Ils ont noté, chez le loup, une forte corrélation positive entre Koa et la bioconcentration.

Il est impossible de prédire à l'aide de ce modèle les charges d'un xénobiotique dans les compartiments qui peuvent être impliqués dans une toxicité. Aucun des modèles proposés ne peut ne pas utiliser des coefficients de partage.

Les êtres humains sont donc confrontés aux COHL souvent à des concentrations plus élevées que les concentrations environnementales (Craan et Haines 1998; Osius, Karmaus, et coll., 1999).

Aujourd'hui, deux approches sont utilisées pour estimer le niveau des contaminants des populations. La première approche consiste en la mesure de biomarqueurs d'exposition et du suivi des populations exposées. Des

études animales permettent d'établir quand c'est possible des relations doses réponses. Les niveaux d'exposition sont établis soit à partir d'estimés d'expositions antérieures ou encore à partir d'extrapolation inter-espèce en appliquant des facteurs d'incertitudes. La deuxième approche consiste à développer des modèles pharmacocinétiques à base physiologique en considérant des expositions uniques selon des scénarios uniques.

La grande liposolubilité, le faible taux métabolique et le fait que les mêmes enzymes sont impliqués dans le processus de détoxification des différents composés hautement lipophiles permettent un traitement commun dans l'optique d'additivité. Aucune publication antérieure ne présente cette problématique en incorporant globalement les composés hautement lipophiles dans un modèle unique en négligeant les coefficients de partage tissu:sang.

La composition chimique tissulaire est un paramètre important qui permet *a priori* de prédire la distribution d'une substance dans différents compartiments de l'organisme. Ainsi par exemple, des tissus ayant une composition riche en gras auront tendance à attirer les composés lipophiles et inversement un composé moins lipophile, aura tendance à se distribuer dans un compartiment plus hydrophile. Les tissus sont composés principalement de protéines, de lipides et d'eau, et la proportion de chacun variera en fonction du tissu considéré. Par exemple le tissu adipeux aura une proportion importante de lipides comparativement aux protéines et inversement pour le tissu hépatique. La variabilité dans la composition tissulaire retrouvée entre les différentes espèces est aussi très variable suivant l'âge, le sexe, l'alimentation et les

habitudes de vie. Plusieurs ouvrages de référence et publications présentent la composition chimique pour différents compartiments tel que décrit dans les tableau 6.0.T.1 et 6.0.T.2 (Davis et coll., 1981; Poulin et coll., 1995c; Poulin et coll., 1996 Poulin et Theil 2001; Krishnan et Andersen, 2001).

Tableau 6.0.T1 Composition tissulaire en lipides et en eau chez le rat

Tissu	Composition tissulaire (fraction en poids humide)		
	Eau	Phospholipide	Lipide neutre
Sang			
plasma	0.96	0.00083	0.00147
érythrocyte	0.63	0.00389	0.00116
sang total	0.84	0.00200	0.00130
Adipeux	0.12	0.00214	0.85286
Foie	0.70	0.02520	0.03480
Muscle	0.74	0.01028	0.00872
Cerveau	0.75	0.05320	0.03930

Références: Poulin et Krishnan, 1996; Poulin et Krishnan 1995c;

Poulin et Theil, 2000

Tableau 6.0.T2: Composition tissulaire en lipide et en eau chez l'humain

Tissu	Composition tissulaire (fraction en poids humide)		
	Eau	Phospholipide	Lipide neutre
Plasma	92.0	0.0021	0.0040
érythrocyte	-	-	-
sang total	82.0	0.0024	0.0033
adipeux	15.0	0.0020	0.7980
Foie	72.0	0.0280	0.0390
Muscle	75.0	0.0100	0.0350

Références: (Poulin et Krishnan, 1996)

La fraction lipidique est la pierre angulaire dans ces travaux à cause du caractère particulier des POPs. Les lipides dans les tissus biologiques sont composés principalement de phospholipides et de lipides neutres. Les phospholipides comprennent principalement la phosphatidylcholine, le phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline. Ces molécules sont dites amphiphiles (i.e. elles contiennent un pôle hydrophile et un pôle lipophile). La fraction lipophile est estimée à 30% de la molécule, ce qui revient à dire que 70 % de la molécule de phospholipide ne participe pas à la lipophilicité du tissu. Les lipides neutres, comme leur nom l'indique, sont des lipides ne contenant pas de charge électrique ou de pôle hydrophile. Cette classe se compose principalement des triglycérides, des diglycérides, des monoglycérides de cholestérol et d'autres lipides non-polaires mais en faible

quantité. Les lipides neutres participent activement à la lipophilicité du tissu. En connaissant la fraction lipophile des phospholipides et la fraction en lipide neutre des lipides totaux, il est possible d'estimer la fraction en lipide neutre que l'on nomme aussi équivalence de lipide neutre tel que proposé par Poulin *et coll.*, (1995a). À l'aide de la formule suivante il est donc possible de connaître la fraction de lipide neutre équivalent.

$$LNE = LN + [0.30 \times Phospholipide] \quad (6.0.E1)$$

où

LNE = lipide neutre équivalent

LN = lipide neutre

À l'aide de cette équation et des tableaux 6.0.T1 et 6.0.T2, nous pouvons estimer la fraction de lipide neutre équivalente pour chacun des compartiments (Tableau 6.0.T3).

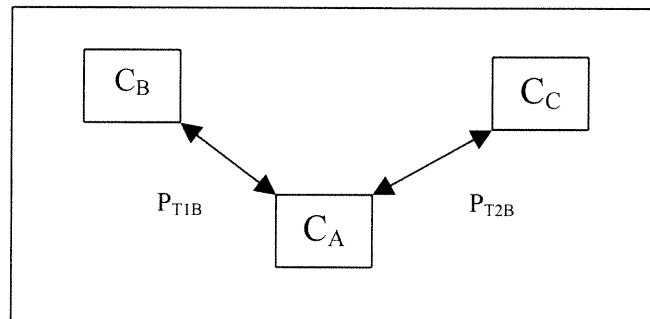
Tableau 6.0.T3 Fractions en eau et en lipide neutre équivalent calculées pour différents compartiments tissulaires chez le rat et l'humain.

	Équivalent eau		Équivalent lipide neutre	
	Rat	Humain	Rat	Humain
sang total	0.8423	0.8217	0.0020	0.004
adipeux	0.1215	0.1514	0.8536	0.7986
Foie	0.7176	0.7400	0.0425	0.0473
Muscle	0.7471	0.7573	0.0117	0.0378

Ref : Krishnan et Andersen, 2001

Comme il a été mentionné dans la section sur les coefficients de partage, ce qui caractérise la distribution entre deux compartiments, c'est le coefficient de partage. Si, par exemple, nous avons deux compartiments interreliés par la circulation systémique (Figure 6.0.F1), un équilibre dynamique va se créer entre les deux compartiments et la circulation systémique. De façon simplifiée, on peut prétendre que l'on va noter un équilibre entre le compartiment à considérer et la circulation systémique. Le rapport de concentration lorsque l'état d'équilibre est atteint correspond au coefficient de partage, soit C_B/C_A ou C_C/C_A . Par exemple un coefficient de partage (C_B/C_A) de 200 correspond simplement à une concentration 200 fois plus élevée dans C_B que dans C_A .

Figure 6.0.F1 Relation entre la circulation sanguine et les organes périphériques pour un modèle à trois compartiments.



La concentration dans un compartiment par rapport à la concentration dans la circulation systémique se calcule de la façon suivante;

$$C_A = \frac{C_B}{P_{T1B}}$$

(6.0.E2)

ou

C_A = Concentration dans le compartiment A
 C_B = Concentration dans le compartiment B
 Pt_{1B} = Coefficient de partage entre C_A et C_B

Lorsque la fraction lipide est calculée en terme d'une fraction lipide équivalente (i.e. que le Pt_{b1} sera égal au Pt_2), on compare la solubilité d'un composé X dans deux compartiments en terme de lipide neutre équivalent. Dans cette situation, le coefficient de partage sera égal à 1. Donc si nous reprenons notre dernier schéma on peut dire que :

$$C_A = C_B = C_C \quad (6.0.E3)$$

Cette affirmation est vraie sur la base de constatations scientifiques où l'on reconnaît que les produits hautement lipophiles se retrouvent dans la portion lipophile de l'organe considérée. Ceci se traduit, chez les mammifères, par une distribution presque exclusivement dans le tissu adipeux (entre 80 et 90%) et dans les sous-fractions lipophiles des compartiments de l'organisme (i.e. les organes). Cette affirmation a été vérifiée par un certain nombre de chercheurs (Carrier, 1991).

Carrier (1991) a calculé la distribution dans les différents tissus (i.e. tissu adipeux; foie; muscles; reins et cerveau) de la charge en BPC pour l'arochlore

1446 et 1016 chez le rat à l'état d'équilibre. Le tableau 6.0.T.4 montre les pourcentages de BPC obtenus dans chacun des compartiments.

Tableau 6.0.T4 Distribution de la charge de BPC dans l'organisme à l'état d'équilibre chez le rat*

Tissus ou organes	% de la charge corporelle en BPC
Corps entier	100
Tissus adipeux	94.3
Foie	1.48
Muscles	3.37
Reins	0.35
Cerveau	0.51

* Adapté de Carrier, 1991

Pour le tissu adipeux, ce pourcentage représente pas moins de 94% de la charge totale (Carrier, 1991). Les autres tissus représentent donc moins de 6% de cette charge totale. Le 94% dans les tissus adipeux est encore plus impressionnant, si on considère que la fraction relative au volume de tissu adipeux par rapport au poids corporel ne représente que 5 à 14%. (Brown *et coll* 1997, Krishnan *et Andersen* 2001). Cette variation de 5 à 14%, est attribuable principalement à la variation en fonction de l'âge et non seulement au poids (Krishnan *et Andersen*, 2001).

En 1985, Di Francesco a étudié l'absorption *in vitro* de composés lipophiles afin de vérifier si le coefficient de partage tissu:sang observé était en relation

avec la constante de liposolubilité ($\log K_{ow}$). Elle a donc comparé des préparations de tissus adipeux avec des adipocytes ainsi qu'à des lipides tels que glycéroltrioleate, glycéroltriheptanoate et lécithine. Les résultats démontrent que la distribution entre la phase aqueuse et la phase lipophile est bien corrélée avec le coefficient de lipophilicité (Di Francesco *et coll.*, 1985).

7.0 Objectifs de la recherche

7.1 Objectif général :

Les objectifs de la thèse étaient de développer et de valider deux approches originales, un modèle PBPK et un algorithme permettant d'établir des niveaux acceptables de concentration pour les COHL.

Cet objectif s'appuie :

- i)- sur l'utilisation de la modélisation pharmacocinétique à base physiologique comme outil d'estimation fiable permettant de prédire la distribution des composés dans l'organisme et;
- ii)- sur le développement d'un algorithme qui estime la concentration maximale rencontrée à la suite d'expositions chroniques dans une perspective d'établissement de doses acceptables pour les COHL.

7.2 Objectifs spécifiques :

- I)- Développer et valider chez le rat et l'humain, un modèle pharmacocinétique à base physiologique qui permet d'estimer la distribution de composés organochlorés persistants, qui soit applicable à des composés volatils ou non

et qui ne nécessite pas la connaissance du coefficient de partage (tissu:sang). (Chapitre 2).

II)- Valider le modèle PBPK développé dans le chapitre 2 avec des données expérimentales obtenues chez le rat exposé à des BPC en mélange suivant différents scénarios d'exposition.

III)- Valider le modèle développé sur la base d'une équivalence de lipide neutre pour plusieurs BPC et pesticides en mélange qui sont considérés comme persistants dans les tissus biologiques afin d'établir des concentrations acceptables lors d'exposition chronique. (Chapitre 4).

IV)- Développer et valider un algorithme qui exprime une relation entre la dose d'exposition et la concentration sanguine de POPs basé sur des considérations pharmacocinétiques. (Chapitre 5).

8.0 Organisation de la thèse

Dans le premier chapitre, nous avons présenté une revue de la littérature dans une perspective dichotomique. L'introduction mettait l'emphase sur la problématique des COHL et de leurs interactions, à la fois avec l'environnement et les organismes vivants. Dans un deuxième temps le chapitre premier a décrit les différentes étapes de la modélisation PBPK dans une perspective d'évaluation du risque. Cette section a insisté sur une revue des modèles publiés pour des substances hautement lipophiles et considérées comme persistantes dans l'environnement. Découlant de ces

premières parties, nous présentons la problématique reliée aux composés hautement lipophiles et les bases scientifiques du modèle. Le chapitre se termine par la présentation des objectifs et une courte description sur l'organisation de la thèse.

Le deuxième chapitre présente le modèle toxicocinétique à base physiologique proposé comme outil d'évaluation quantitative du risque toxicologique *a posteriori*. La diversité des composés implique une validation du modèle pour les composés volatils (Article 1). Dans l'article, on présente une description détaillée des différentes équations utilisées dans le modèle dans une perspective visant à négliger les coefficients de partage. Cet article démontre de plus son application pour des composés organiques volatils hautement lipophiles pour une application chez le rat et l'humain.

Le troisième chapitre présente la méthodologie pour une validation dans une perspective représentative de l'exposition environnementale. L'article 2 implique la validation du modèle pour des mélanges et permet d'exprimer les effets des interactions sur le potentiel de distribution entre les différents composés. Ces expositions à des mélange simulées et validées par comparaison avec des données expérimentales vont permettre le calcul des coefficients d'extractions et la détermination des demi-vies d'élimination. Ce chapitre intègre des notions de dosimétrie dans les organes cibles, des notions de cinétique classique et de physiologie. Les données expérimentales ont été obtenues après l'exposition de rats Sprague-Dawley femelles aux BPC 118, 138, 153, 170, 180 et 187 à des doses de 5, 50 et 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids

corporel administrées par gavage, dans l'huile de maïs, dans un volume de 4 ml/kg et selon 4 scénarios d'exposition.

Le troisième article contenu dans le chapitre 4 est aussi une étude sur les mélanges. Il s'agit d'une étude de 28 jours d'exposition par gavage d'un mélange de 14 BPC et 14 pesticides à des doses de 10X, 100X, et 1000X la dose ingérée par les populations Inuit du nord québécois, selon un article publié par Chan en (1997).

Le chapitre 5, propose un algorithme développé à partir de la cinétique classique sur une base physiologique. Cet algorithme permet de revoir les notions de cinétique classique. Il permet d'estimer des concentrations maximales résultant d'expositions selon des scénarios définis. Cet outil permettra d'estimer *a priori* des concentrations sécuritaires en permettant de définir une réglementation de l'exposition. La validation de cet algorithme se fera avec l'article des mélanges du chapitre 3. Le 4^{ième} article présente une méthodologie originale qui permet de prédire à l'aide d'un algorithme la concentration de biomarqueur. Cette méthodologie, applicable pour des composés organiques hautement lipophiles, devrait permettre une estimation de la concentration maximale retrouvée dans les tissus en fonction de la dose d'exposition et ainsi permettre de définir une relation dose-effet, dans le cadre d'estimation du risque toxicologique pour des composés tels que des BPC et pesticides persistants dans les tissus biologiques.

Dans le chapitre 6, on retrouve une discussion générale sur les implications de cette recherche en évaluation du risque. On abordera les limites d'utilisation du modèle, les contraintes et surtout les hypothèses et les applications. Une comparaison sera faite entre l'algorithme présenté dans le quatrième article et la modélisation PBPK.

Chapitre 2

Article 1

Submitted to: Toxicology Letters

**A PHYSIOLOGICAL PHARMACOKINETIC MODEL BASED ON TISSUE LIPID
CONTENT FOR SIMULATING INHALATION PHARMACOKINETICS OF
HIGHLY LIPOPHILIC VOLATILE ORGANIC CHEMICALS**

Claude Emond and Kannan Krishnan

Groupe de recherche en toxicologie humaine (TOXHUM)
Faculté de médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada.

Abbreviated title: PBPK models for HLVOCs

Keywords: highly lipophilic chemicals; VOCs; PBPK models; lipid solubility

Address for correspondence:

Kannan Krishnan,
Département de santé environnementale et santé au travail,
Faculté de médecine, Université de Montréal,
2375 Chemin de la Côte Ste-Catherine, Bureau 4105
Montréal, Québec, Canada, H3T 1A8.
Tel: (514) 343-6581
Fax: (514) 343-2200
e-mail: kannan.krishnan@umontreal.ca

ABSTRACT

The highly lipophilic volatile organic chemicals (HLVOCs) are distributed almost uniquely in the neutral lipid fraction of tissues and blood. As suggested by their high n-octanol:water partition coefficient (>10000), their solubility in water fraction of tissues and blood is negligible. Hypothetically then the kinetics of HLVOCs can be simulated solely with the consideration of their solubility and distribution in neutral lipid-equivalent (NLE) fractions of the tissues and blood. The objectives of the present study were therefore: (i) to develop a physiological pharmacokinetic model based on NLE content of tissues and blood, and (ii) to apply this model framework for simulating the inhalation pharmacokinetics of HLVOCs (i.e., d-limonene, α -pinene, 1,2,4-trimethylbenzene and n-hexane) in rats and/or humans. The PBPK model developed in this study consisted of tissue compartments that represented only their NLE content. All biological parameters, except alveolar ventilation rate, were expressed on the basis of their NLE content. Tissue:blood partition coefficients were not used since the solubility of HLVOCs in tissue neutral lipids and blood neutral lipids is considered to be the same. The NLE-based physiological pharmacokinetic model developed in this study described adequately the uptake and disposition kinetics of α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene in humans and that of n-hexane in rats. The NLE-based model framework developed in this study represents an original, mechanistic tool for simulating the lipid concentrations and pharmacokinetics of HLVOCs without the use of tissue:blood partition coefficients.

INTRODUCTION

Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling involves simulations of absorption, distribution, metabolism and excretion of chemicals based on tissue solubility characteristics, metabolism rates and physiology of the test species (Krishnan and Krishnan 1991). PBPK models represent the mammalian system as a set of anatomical compartments that include, but not limited to, lung, fat, liver, richly perfused tissues and slowly perfused tissues. In PBPK models, a series of mass balance differential equations are used to predict uptake and disposition of chemicals in the exposed organism. In this context, the kinetics of chemical uptake and disposition in the organism is influenced by several physiological, biochemical, and physicochemical parameters (Krishnan and Andersen, 2001).

The basic physicochemical parameters required for PBPK modeling include tissue:blood partition coefficients and blood:air partition coefficients. Poulin and Krishnan (1995,1996) developed animal-replacement approaches which consist of algorithms for predicting these partition coefficients on the basis of tissue and blood lipid and water contents (Poulin and Krishnan 1995,1996). For very highly lipophilic compounds or super-lipophilic compounds, the tissue:blood partition coefficients obtained with the above algorithms simply equal the ratio of lipid content of tissues and blood. In other words, for highly lipophilic volatile organic chemicals (HLVOCs), the tissue:blood partition coefficients for the various compartments in the model can be set equal to the numerical value that

represents the ratio of the content of lipid in tissues and blood (Haddad *et al.* 2000). More specifically, P_{tb} of HLVOCs equals the tissue to blood ratio of the neutral lipid fraction (Haddad *et al.*, 2000).

The HLVOCs are concentrated solely by the neutral lipid fraction of tissues and blood. The solubility of HLVOCs in polar lipids and water fraction of the various compartments is negligible and is explained by the relatively high n-octanol:water partition coefficients of such chemicals (e.g., $\log P_{o:w} = 4$). Hypothetically then the kinetics of HLVOCs can be simulated solely with the consideration of their solubility and distribution in neutral lipid fractions of tissues and blood. Consequently, if the volumes of the model compartments represented only the neutral lipid fraction of tissues and blood, then there is no necessity to use or estimate a tissue:blood partition coefficient since the (tissue) neutral lipid: (blood) neutral lipid partition coefficient is likely to be unity. Neither the development of PBPK models for HLVOCs based on the sole consideration of neutral lipid solubility nor the development of PBPK models for HLVOCs without the use of tissue:blood partition coefficients has ever been attempted.

The objectives of the present study were therefore: (i) to develop a physiological pharmacokinetic model based on the neutral lipid contents of tissues and blood, and (ii) to apply this model framework for simulating the inhalation pharmacokinetics of HLVOCs (i.e., d-limonene, α -pinene, 1,2,4-trimethylbenzene and n-hexane) in rats and/or humans.

METHODS

(i) Development of a PBPK model based on tissue lipid content for HLVOCs

A. Model Structure

The PBPK model developed in this study for simulating the inhalation pharmacokinetics of HLVOCs in rats and humans consisted of tissue compartments, the volumes of which corresponded to their neutral lipid or more appropriately to their neutral lipid equivalent (NLE) content. NLE refers to the sum total of the tissue content of neutral lipids (i.e., triglycerides, diglycerides, monoglycerides, cholesterol and other non-polar lipids) and a fraction (30%) of the tissue content of phospholipids (i.e., phosphatidylcholine, phosphatidyl, ethanolamine, phosphatidylserine and sphingomyelin) whose solubility characteristics resemble that of neutral lipids (Poulin and Krishnan.1995) (Table 1). The NLE based physiological pharmacokinetic model was basically a four compartmental model (Ramsey and Anderson 1984) (Figure 1) interconnected by systemic circulation. The volumes of these four compartments however corresponded to their NLE content and not to their actual physical volumes as done previously in all PBPK modeling efforts (Krishnan and Andersen 2001).

B. Mathematical Description

(1) Tissue Uptake

In the present study, the rate of change in the amount of chemical in the NLE volume of each tissue compartment (dA_{lt}/dt) was described as follows:

$$\frac{dAlt}{dt} = Qlt(Cla - Clt) \quad (1)$$

$$Cl_t = \frac{Alt}{Vlt} \quad (2)$$

where

Cl_a = Chemical concentration in the NLE fraction of arterial blood (mg/L NLE)

Cl_t = Concentration in tissue NLEs (mg/L NLE), which is the same as the concentration in the NLEs of venous blood leaving the tissue compartment expressed as mg/L NLE

Qlt = Flow of blood NLEs through tissue compartment (L NLE/hr)

Vlt = Volume of tissue compartment (L NLE)

Whereas each of the four compartments was described with the above equations, metabolism was additionally accounted for, in one of the compartments, namely, liver. In conventional PBPK models, the tissue:blood partition coefficients (Pt:b) are used to compute chemical concentration in venous blood leaving tissue compartments (Cvt) from tissue concentrations (Ct) as follows:

$$C_{vt} = \frac{C_t}{Pt : b} \quad (3)$$

The Pt:b in principle reflects the ratio of solubility of chemicals in tissues and blood. Considering that NLEs are the lone important determinants of tissue and blood solubility, the tissue:blood partition coefficients of HLVOCs can be calculated as (Haddad *et al.* 2000):

$$Pt : b = \frac{NLE_t}{NLE_b} \quad (4)$$

Where,

NLE_t = volume fraction of NLE in tissue, and

NLE_b = volume fraction of NLE in blood

If the volumes of the tissue and blood compartments represent only NLEs contained in them (i.e. volume compartment = 100% NLE), as done in the present study, then the Pt:b according to the above equation is unity (i.e., Pt:b = 1). Considering the similarity of the solubility and distribution of HLVOCs in the NLE fractions of tissues and blood, it is evident that the ratio of concentration of chemicals in NLEs of both biological matrices will be the same at equilibrium conditions. So a PBPK model in which the compartment volumes and blood concentrations are based uniquely on NLEs, would not require the use of tissue:blood partition coefficients (or alternatively would use a Pt:b value of 1).

(2) Metabolism

In the rat model for n-hexane, metabolism was described according to Michaelis-Menten kinetics. For the HLVOC model, the maximal velocity (V_{max}) expressed in mg/hr was used as in conventional PBPK models; however, the Michaelis affinity constant (K_m) was expressed in terms of mg substance/L NLE. The resulting equation for calculating the rate of the amount of n-hexane metabolized $\left(\frac{dA_{met}}{dt}\right)$ included in the HLVOC PBPK model was as follows:

$$\frac{dA_{met}}{dt} = \frac{V_{max} * C_{ll}}{K_m + C_{ll}} \quad (5)$$

where

C_{ll} = Chemical concentration in liver NLE, which is identical to the concentration in the NLE of venous blood leaving liver.

In the human models of limonene, 1,2,4-trimethylbenzene and α -pinene, instead of V_{max} and K_m , an extraction coefficient (E) was used for calculating the amount metabolized as shown below:

$$\frac{dA_{met}}{dt} = Q_{ll} * E * C_{la} \quad (6)$$

where

Q_{ll} = Flow of blood NLEs through liver (L NLE/hr).

The above two equations are mathematically equivalent, at low exposure concentrations (Poulin and Krishnan, 1998). Since the exposure concentrations used in the rat studies cover the saturable range, it is essential to use eqn (5), but it is sufficient to use eqn (6) for simulating human exposure to low concentrations of HLVOCs.

(3) Pulmonary uptake

The concentration of HLVOCs in the NLEs of arterial blood following pulmonary uptake was estimated according to Ramsey and Andersen (1984) with two

changes: (i) the cardiac output in the equation was changed to NLE of cardiac output, and (ii) the blood:air partition coefficient was replaced with the lipid:air partition coefficient ($P_{pb_lip:a}$). The input venous and output arterial concentrations relate to chemical concentration in neutral lipids as shown below:

$$Cl_a = \frac{Q_p C_{inh} + Q_{cl} \times Cl_v}{Q_{cl} + \left(\frac{Q_p}{P_{pb_lip:a}} \right)} \quad (7)$$

where

Cl_v = chemical concentration in venous blood expressed as mg/L NLE, and
 Q_{cl} = cardiac output expressed as NLE flow per unit time (i.e., L NLE/hr).

C. Model parameterization

(1) Physiological parameters

The physiological parameters of the conventional rat PBPK model were obtained from Ali and Tardif (1999). Human physiological parameters were from Dankovic and Bailar (1994). The physiological parameters, particularly, cardiac output, tissue blood flow rates and tissue volumes, were then expressed in terms of NLEs (Tables 2-3).

For calculating cardiac output in terms of NLE (Q_{cl}), the QCC used in conventional PBPK model was multiplied by body weight (BW)^{0.74} and additionally with the fraction of NLE in blood (Frac_B_lip) as follows:

$$Q_{cl} = Q_{cc} \times [BW^{0.74}] \times (Frac_B_lip) \quad (8)$$

where Q_{cc} = cardiac output expressed in terms of L blood flow per hr scaled to an animal weighing one kg.

Blood perfusion to each of the four tissue compartments was calculated by multiplying Q_{cl} with the fraction of cardiac output flowing through tissues, which is the same as the one used in the conventional PBPK model (Tables 2-3).

Volumes of compartments in the HLVOG PBPK model corresponded to the volumes of NLEs in the tissues (Tables 2-3). To calculate the NLE volumes of tissues and tissue groups (Vt_lipid), the compartment volumes used in the conventional model (Vt) were multiplied by fractional volume of NLEs ($Frac_t_lip$), as follows,

$$Vt_lipid = [Vt \times Frac_t_lip] \quad (9)$$

(2) Physicochemical parameters

In the PBPK model for HLVOGs, the blood lipid:air partition coefficient ($P_{b_lip:a}$) was calculated by dividing the blood:air PC (P_{b_a}) used in the conventional PBPK model by the lipid content of blood ($Frac_b_lip$) as follows:

$$P_{b_lip:a} = \frac{P_{b_a}}{Frac_b_lip} \quad (10)$$

For the rat model of n-hexane, the blood:air partition coefficient of this chemical was obtained from Ali and Tardif (1999) and the $Pb_{lip:a}$ was calculated as per the above equation. The experimental human blood:air PCs for α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene were obtained from Falk *et al.* (1990b), and Jarnberg *et al.* (1996).

(3) Metabolic constants

For the rat n-hexane model, V_{max} and K_m were required whereas the E value was sufficient for the human model. Whereas the V_{max} (mg/hr) for n-hexane was obtained from Ali and Tardif. (1999), the K_m (mg/L blood) reported by these authors was divided by the NLE content of blood ($Frac_{Li_Lip}$) to derive a Michaelis affinity constant expressed in terms of NLE content (K_m , mg/L lip), as follows:

$$K_{ml}(mg/L_{lip}) = \frac{K_m(mg/L_{blood})}{Frac_{Li_lip}(L_{lip}/L_{blood})} \quad (11)$$

Metabolism of d-limonene, α -pinene and 1,2,4-trimethylbenzene in humans was reported to be rapid and the intrinsic clearance values reflect that it is likely to be blood flow limited (Falk *et al.* 1990a; Falk-Filipsson *et al.* 1993 and Jarnberg *et al.* 1996). Accordingly, metabolism of these three HLVOCs was described with Eqn. (6) in which a hepatic extraction ratio (E) value of 1 was used.

D. Models Simulation and Validation

The algebraic and differential equations describing the kinetics of n-hexane, α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene were written as a program and solved using a commercially available software, namely ACSL® (Advanced Continuous Simulation Language, Aegis corporation., Huntsville, AL).

2. Application of the lipid content based physiological pharmacokinetic model

The first set of experimental data to verify the applicability of the lipid composition-based physiological pharmacokinetic model was obtained from Ali and Tardif (1999). These authors exposed groups of rats to 100, 200 or 800 ppm n-hexane for 4 hr and determined the venous blood concentration of this HLVOC at various intervals following the termination of inhalation exposure.

The second set of experimental data used to illustrate the applicability of the lipid composition-based physiological pharmacokinetic model consisted of human data obtained for three HLVOCs, namely, α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene. Inhalation pharmacokinetic data on α -pinene were taken from Falk *et al.* (1990a). In this study, human volunteers doing light physical exercise (50 W) were exposed to 40 ppm or 80 ppm of α -pinene for 2 hr. Data on d-limonene pharmacokinetics were taken from Falk-Filipsson *et al.* (1993) who exposed eight healthy men to 40 ppm or 80 ppm d-limonene for 2 h during light physical exercise (50 W on a bicycle ergometer). Data on inhalation pharmacokinetics of 1,2,4-trimethylbenzene were obtained from the study of Jarnberg *et al.* (1996) in which healthy volunteers were exposed to 2 ppm or 25

ppm of this chemical for 2 h during light physical exercise (50 W on a bicycle ergometer). For simulating these human studies, the model parameters corresponding to an individual doing light work were used for the first two hours, and then the parameters of a resting human were specified during the no-exposure period (Table 3). The HLVOG model simulation of the chemical concentration in blood NLEs ($\mu\text{mol/L NLE}$) were multiplied with the NLE content of blood (L NLE/L blood) (Table 1), and then compared with the experimental data ($\mu\text{mol/L blood}$).

RESULTS

The HLVOC PBPK model simulations of the kinetics of n-hexane in rats exposed for 4 hr to 100, 200 or 800 ppm are compared with corresponding experimental data in Figure 2. The model simulations were obtained solely with the consideration of the distribution of n-hexane in NLE of the tissue compartments and blood. The HLVOC model used for obtaining these simulations did not require specification of tissue:blood partition coefficients and no adjustment of the original model parameters (Table 2) was attempted to obtain the predictions provided in Figure 2. The model predictions presented in this Figure are comparable to those of the conventional PBPK model published by Ali and Tardif (1999).

The results obtained during the modeling effort of the inhalation pharmacokinetics of three HLVOCs (α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene) in humans are even more striking (Figures 3-5). For these three HLVOCs, the same model framework was used to generate the predictions. It is important to note that the PBPK Model for all three HLVOCs again lacked tissue:blood partition coefficients and used blood perfusion to liver as the sole limiting factor of metabolism. Still, the model successfully reproduced the inhalation pharmacokinetics of α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene in humans at all exposure concentrations investigated in the original experimental studies (Falk *et al* 1990a; Falk-Filipsson *et al.* 1993 and; Jarnberg *et al.* 1996).

DISCUSSION

PBPK models incorporate critical information on animal physiology, physicochemical characteristics and biochemical characteristics for facilitating simulation of the pharmacokinetics of chemicals. The PBPK models frequently used for simulating the kinetics of VOCs comprise of four tissue compartments and require the estimation of 17 parameters (i.e., 4 tissue volumes, 4 tissue blood flow rates, 4 tissue:blood partition coefficients, cardiac output, alveolar ventilation rate, blood:air partition coefficient, maximal velocity for metabolism, and Michaelis affinity constant). In the case of HLVOCs, one basic critical determinant relates to solubility in the neutral lipid component of tissues and blood. The present study has, for the first time, shown that the physiological pharmacokinetic model based on neutral lipid content of tissues and blood, does not require the use or estimation of tissue:blood partition coefficients and still enables adequate simulation of the uptake and disposition of HLVOCs. The model framework developed in this study describes the inhalation pharmacokinetics of α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene in humans and n-hexane in rats.

The conventional PBPK models consist of tissue compartments corresponding to the total volume of all tissue components (i.e., lipids, water, protein) regardless of whether they are critical determinants of the tissue solubility of the substances modeled. The present study, considering the intrinsic liposolubility characteristics of HLVOCs, chose to represent only the volumes of NLEs in each of the tissue compartments and blood. According to the approach

developed in the present study, tissue:blood partition coefficients are not required to simulate internal doses. This PBPK model framework based on neutral lipids showed good reproducibility and a good relation between simulated and experimental data. Results confirm the hypothesis that only the NLEs of tissues is necessary for describing the distribution of HLVOCs. To use this model framework for simulating the kinetics of other HLVOCs, the numerical values of metabolism rate and blood lipid:air partition coefficients are alone needed.

The blood lipid:air partition coefficients may be estimated by measuring the blood:air partition coefficient using whole blood *in vitro* and then dividing it by the NLE content of blood. Alternatively, n-octanol or vegetable oil:air partition coefficient of a chemical may be used, provided blood protein binding is not a significant process. In the present study, previously published *in vitro* Pb:a were divided by the NLE content in rats and humans to obtain the blood lipid:air PCs. The latter PC should, in principle but not necessarily, be identical to the n-octanol:air or vegetable oil:air PC of HLVOCs. This is likely to be true in humans but not rats since human blood does not have lipophilic pockets for binding the HLVOCs (Poulin and Krishnan 1995). For α -pinene, d-limonene and 1,2,4-trimethylbenzene, the blood lipid:air PCs derived from experimental blood:air data are: 3750, 10500 and 14500 (Table 3) whereas the vegetable oil:air PCs for these chemicals are 2900, 5700 and 10200, respectively (Falk *et al.* 1990b , Jarnberg *et al.* 1996). In addition to the use of vegetable oil PCs (or n-octanol:air PCs), lipophilic binding to hemoglobin should be accounted for,

adequately predicting the rat Pb:a of HLVOCs such as n-hexane (Poulin and Krishnan.. 1996b; Beliveau and Krishnan 2000).

In the HLVOC model, differential solubility of chemical in tissues is not accounted for, because all compartments have the same composition (i.e., 100% NLE). Still, the equations of the HLVOC model facilitating chemical distribution in NLEs help maintain the mass balance similar to the one provided by the conventional PBPK model. In fact, the concentration in each tissue NLE fraction obtained in the present study (mg/L NLE), upon multiplication with the NLE content of the corresponding tissue (L NLE/L tissue; Table 1), provides tissue concentration in mg/L that is identical to the simulation obtained using the conventional PBPK model (not shown).

Overall, the model framework developed in this study represents a mechanistically improved tool for simulating the lipid concentrations and pharmacokinetics of HLVOCs. Accordingly, the present study has shown that a PBPK model in which the tissue contents of water, proteins, and phospholipids with water-like solubility characteristics are neglected, could adequately simulate the inhalation pharmacokinetics of HLVOCs in rats (n-hexane) and humans (d-limonene, α -pinene, 1,2,4-trimethylbenzene).

REFERENCES

- Ali, N. and Tardif, R. (1999). Toxicokinetic Modeling of the combined exposure to toluene and n-hexane in rats and human. *Journal of Occupational Medicine* **41**, 95-103.
- Béliveau, M., and Krishnan, K. (2000). Estimation of rat blood:air partition coefficients of volatile organic chemicals using reconstituted mixtures of blood components. *Toxicol.Lett.* **116**, 183-188.
- Dankovic, D. A. and Bailer, A. J. (1994). The impact of exercise and intersubject variability on dose estimates for dichloromethane derived from a physiologically based pharmacokinetic model. *Fundam.Appl.Toxicol.* **22**, 20-25.
- Falk-Filipsson, A., Lof, A., Hagberg, M., Hjelm, E. W., and Wang, Z. (1993). d-limonene exposure to humans by inhalation: uptake, distribution, elimination, and effects on the pulmonary function. *J.Toxicol.Environ.Health* **38**, 77-88.
- Falk, A. A., Hagberg, M. T., Lof, A. E., Wigaeus-Hjelm, E. M., and Wang, Z. P. (1990a). Uptake, distribution and elimination of α -pinene in man after exposure by inhalation. *Scand.J.Work Environ.Health* **16**, 372-378.
- Falk, A., Gullstrand, E., Lof, A., and Wigaeus-Hjelm, E. (1990b). Liquid/air partition coefficients of four terpenes. *Br.J Ind.Med.* **47**, 62-64.

- Haddad, S., Poulin P. and Krishnan, K. (2000). Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue:bloods partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere* **40**, 839-843.
- Jarnberg, J., Johanson, G., and Lof, A. (1996). Toxicokinetics of inhaled trimethylbenzenes in man. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **140**, 281-288.
- Krishnan,K. and Andersen,M.E. (1991). The role of physiological modeling in reducing animal use in toxicology research. In *In vitro Toxicology: Mechanisms and New Technology* pp. 113-133. Mary Ann Liebert, New York.
- Krishnan,K. and Andersen,M.E. (2001). Physiologically based pharmacokinetic modelling in toxicology. In *Principles and methods of toxicology* (A.W.Hayes, Ed.), pp. 193-241. Raven Press, New York.
- Poulin, P. and Krishnan, K. (1995). A Biologically-based algorithm for predicting human tissue: blood partition coefficients of organic chemicals. *human experimental toxicology* **14**, 273-280.
- Poulin, P. and Krishnan, K. (1996). Molecular structure-based prediction of the partition coefficients of organic chemicals for physiological pharmacokinetic models. *Toxicology Methods* **6**, 117-137.
- Poulin, P., and Krishnan, K. (1998). A quantitative structure-toxicokinetic relationship model for highly metabolised Chemicals. *ATLA* **26**, 45-59.

Ramsey, J. C. and Andersen, M. E. (1984). A pharmacokinetically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rat and human. *Toxicology and Applied Pharmacology* **73**, 159-175.

Table 1: Lipid contents of rat and human tissues ^a

Tissue	Neutral lipid ^a	Phospholipids ^a	Neutral lipid equivalent ^b
Human			
Blood	0.0033	0.0024	0.0040
Adipose tissue	0.7980	0.0020	0.7986
Liver	0.0390	0.0280	0.0473
Richly perfused tissues	0.0390	0.0280	0.0473
Slowly perfused tissues	0.0350	0.0100	0.0380
Rat			
Blood	0.0013	0.0020	0.0019
Adipose tissue	0.8530	0.0020	0.8536
Liver	0.0350	0.0250	0.0425
Richly perfused tissues	0.0350	0.0250	0.0425
Slowly perfused tissues	0.0090	0.0100	0.0117

^a Data from Poulin and Krishnan (1996)

^b Calculated as the sum total of the volume fraction of neutral lipids and 0.3 times the phospholipid fraction in tissues (Haddad *et al.* 2000)

Table 2: Physiological and biochemical parameters of rat PBPK model for n-hexane

Parameter ^a	Abbreviation	Unit	Values
Alveolar ventilation rate	QPP	L/hr/kg	15
Cardiac output ^b	QCC	L/hr/kg	15
Blood flow to compartments ^b	QC	L _{lipid} /hr	0.0102
Adipose tissue	QF	L _{lipid} /hr	0.00092
Liver	QL	L _{lipid} /hr	0.0025
Richly perfused tissues	QR	L _{lipid} /hr	0.0052
Slowly perfused tissues	QS	L _{lipid} /hr	0.0015
Volume of compartments ^b			
Adipose tissue	VF	L _{lipid}	0.0192
Liver	VL	L _{lipid}	0.00052
Richly perfused tissues	VR	L _{lipid}	0.00053
Slowly perfused tissues	VS	L _{lipid}	0.0021
Maximal velocity of metabolism	VMAX	mg/hr	0.48
Michaelis affinity constant ^b	KM	mg/L _{lipid}	9.40
Blood:air partition coefficient ^b	Pb	L _{lipid} /L _{air}	1205

^a Obtained from Ali and Tardif. (1999)

^b The values obtained from Ali and Tardif (1999) were multiplied by the NLE for each compartment (Table 1)

Table 3: Parameters of human PBPK model for HLVOCs^a

Parameter	Abbreviation	Unit	Values
Alveolar air ventilation ^b	QP	L _{air} /hr	441 (1422)
Cardiac output ^c	Qc	L _{lipid} /hr	1.37 (2.55)
Blood flow to compartments ^c			
Adipose tissue	QF	L _{lipid} /hr	0.038 (0.117)
Liver	QL	L _{lipid} /hr	0.423 (0.413)
Richly perfused tissues	QR	L _{lipid} /hr	0.634 (0.632)
Slowly perfused tissues	QS	L _{lipid} /hr	0.277 (1.388)
Volume of compartments ^c			
Adipose tissue	VF	L _{lipid}	13.938
Liver	VL	L _{lipid}	0.110
Richly perfused tissues	VR	L _{lipid}	0.132
Slowly perfused tissues	VS	L _{lipid}	1.772
Blood:air partition coefficient ^d	QP	L _{air} /hr	1422
d-limonene	Pb	unitless	10500
α -pinene	Pb	unitless	3750
1,2,4-trimethylbenzene	Pb	unitless	14500

^a The values in parentheses correspond to those associated with light exercise (50 watts)

^b Obtained from Dankovic and Bailor (1994)

^c The values obtained from Dankovic and Bailor (1994) were multiplied by the NLE for each compartment (Table 1)

^d Obtained from Falk *et al.* (1990b; d-limonene, α -pinene) and Jarnberg *et al.* (1996; 1,2,4-trimethylbenzene)

Figure legends

Figure 1 Conceptual representation of the PBPK model for HLVOCs used in the present study.

Figure 2. Venous blood concentration of n-hexane in rats exposed to 100, 200, and 800 ppm for 4 hr.

Figure 3 Venous blood concentrations in humans exposed for 2 hr to 40 ppm (A) or 80 ppm (B) of α -pinene. The experimental data (mean \pm SD) are represented by symbols whereas the solid line is model simulation.

Figure 4 Venous blood concentrations in humans exposed for 2 hr to 40 ppm (A) or 80 ppm (B) of d-limonene. The experimental data (mean \pm SD) are represented by symbols whereas the solid line is model simulation.

Figure 5 Venous blood concentrations in humans exposed for 2 hr to 2 ppm (A) or 25 ppm (B) of 1,2,4-trimethylbenzene (TMB). The experimental data (mean \pm SD) are represented by symbols whereas the solid line is model simulation.

Figure 1

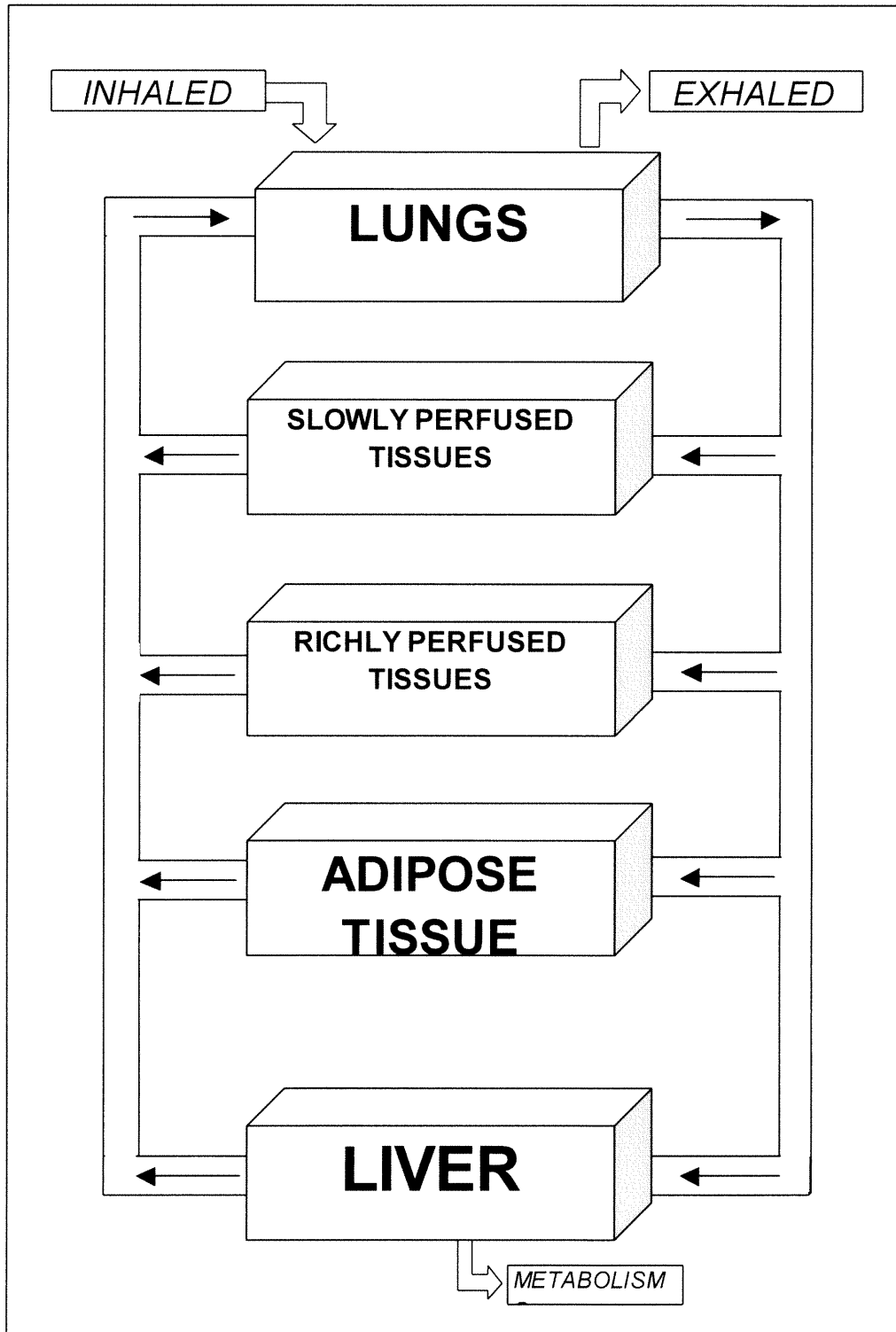


Figure 2.

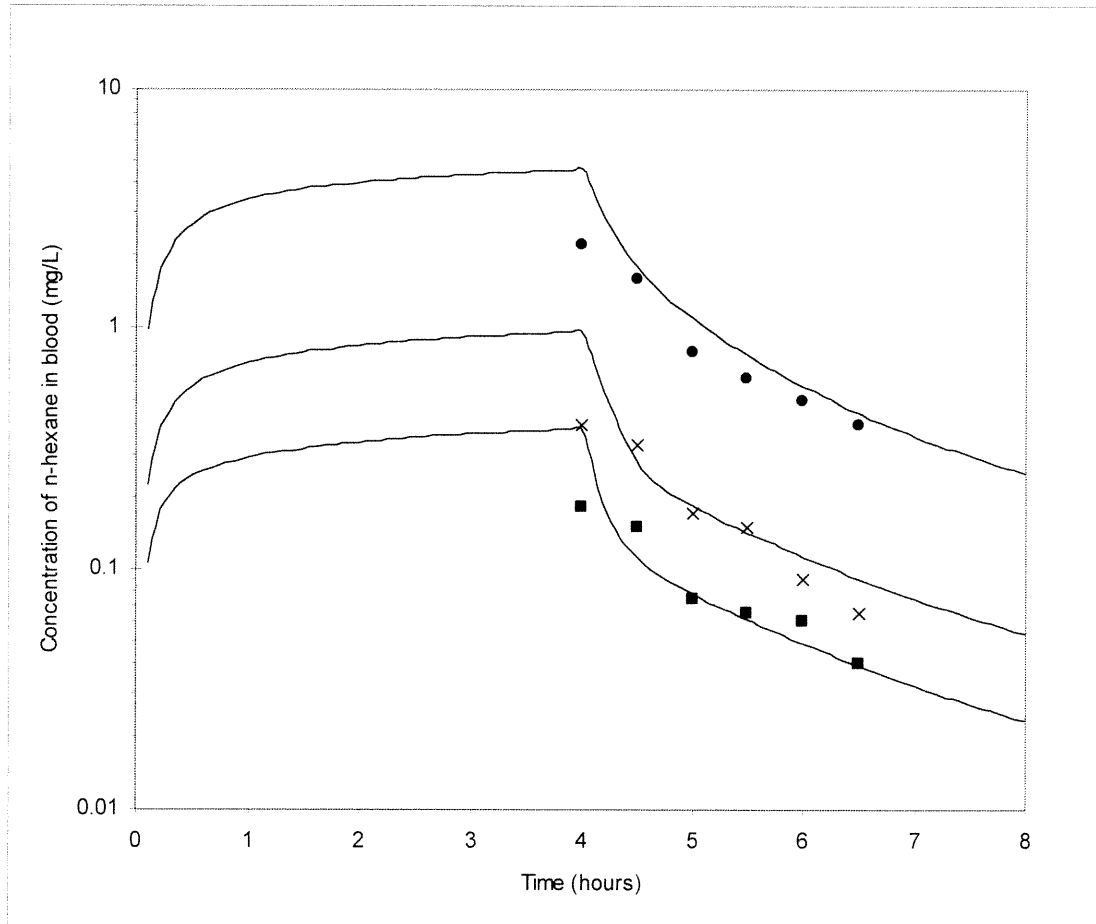
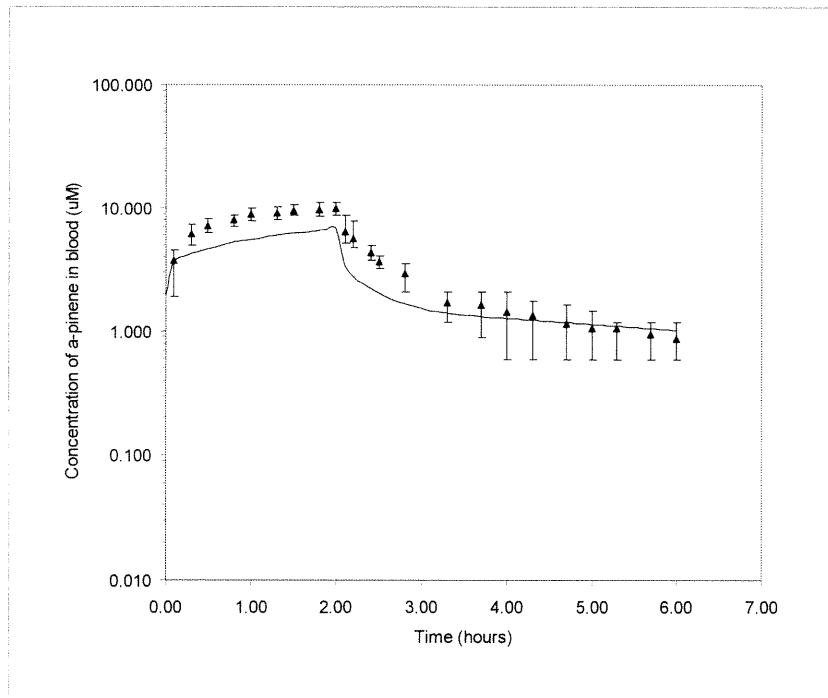


Figure 3

(A)



(B)

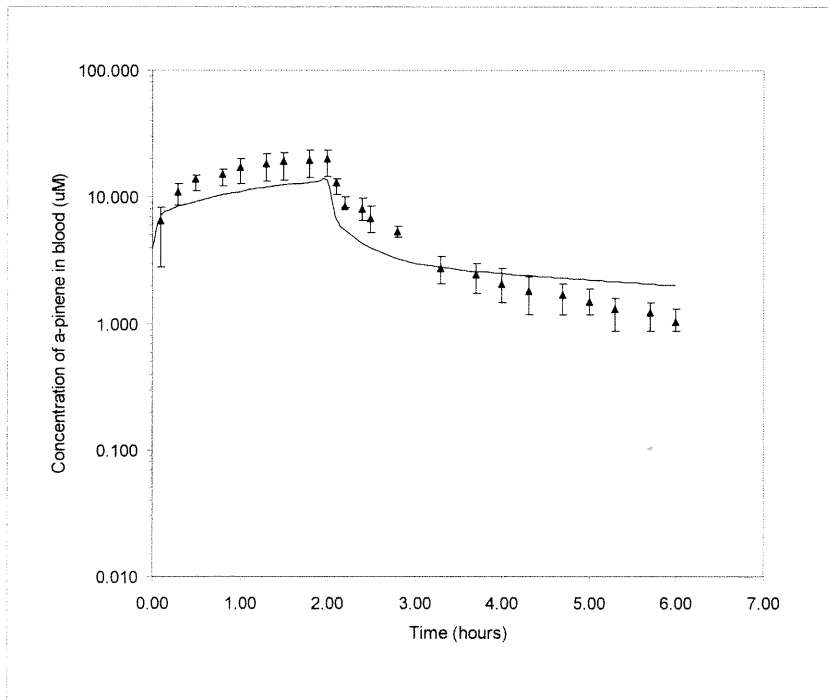
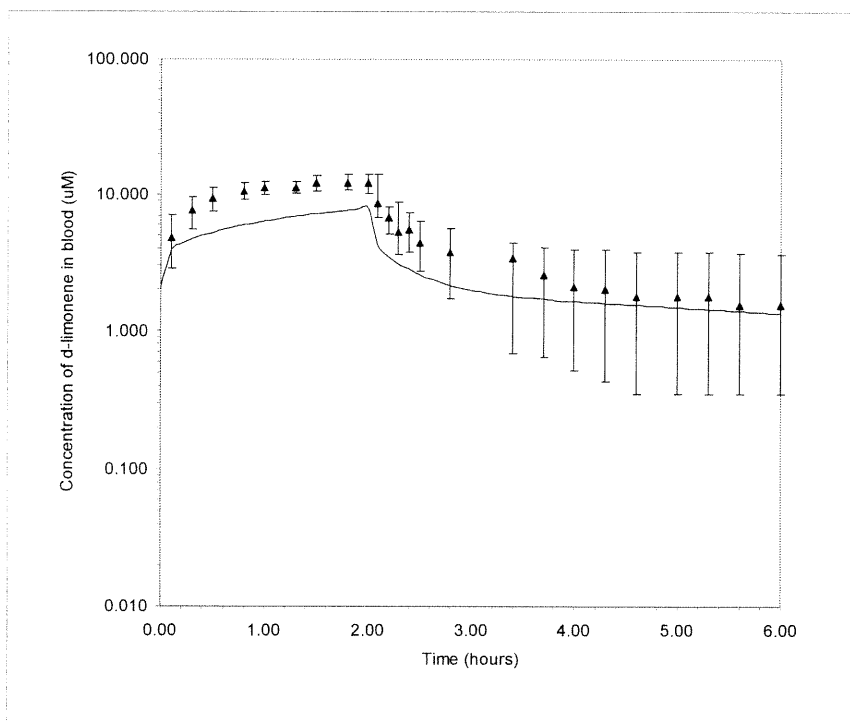


Figure 4

(A)



(B)

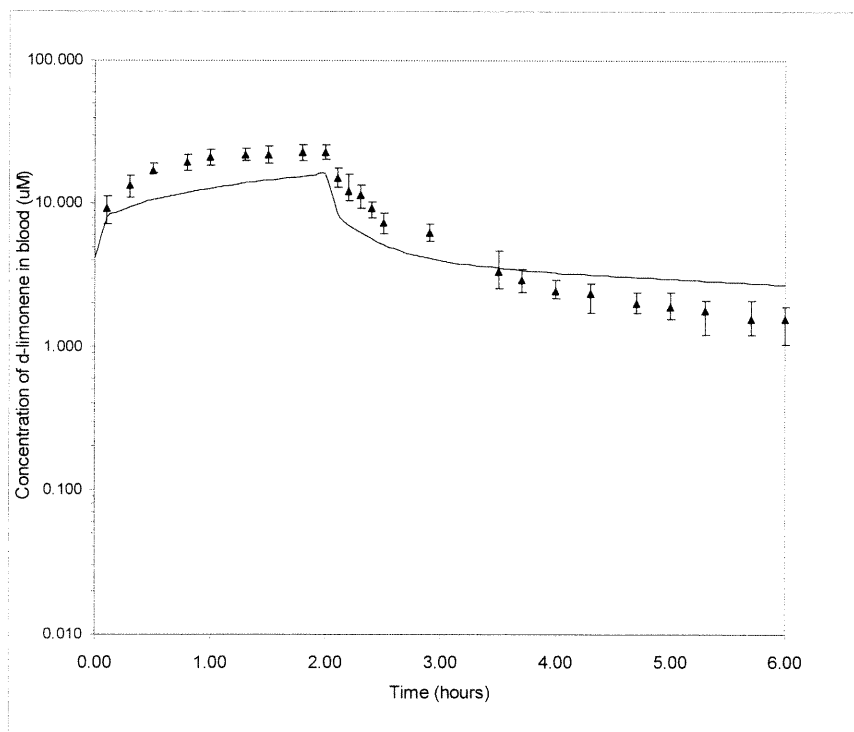
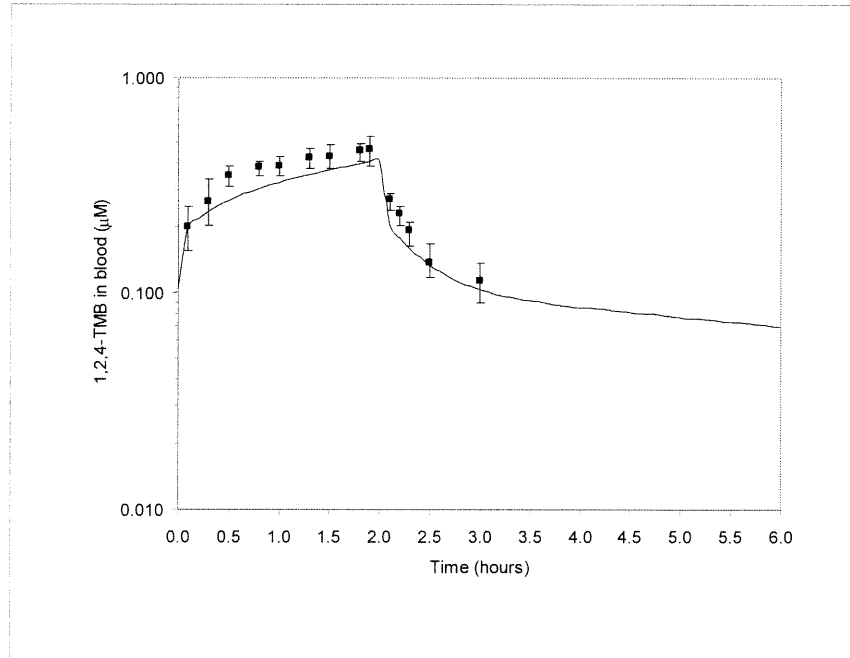
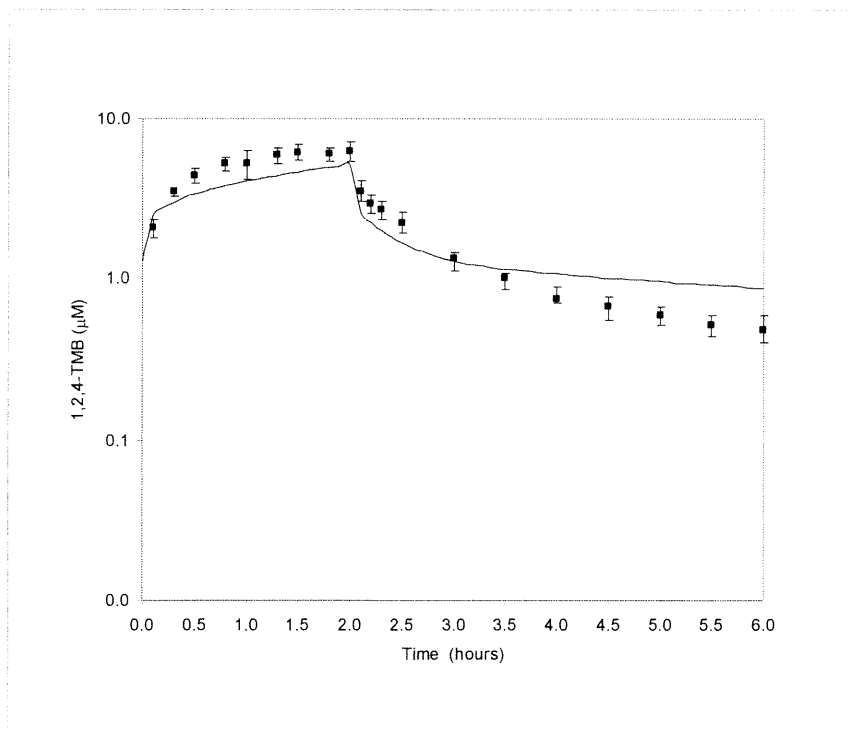


Figure 5

(A)



(B)



Chapitre 3

Article 2

Submitted to: *Archives of toxicology*

Physiologically-based modeling of the accumulation in plasma and tissue lipids of a mixture of PCB congeners in female Sprague-Dawley rats

Claude Emond¹, Michel Charbonneau² and Kannan Krishnan¹

¹Groupe de recherche en toxicologie humaine (TOXHUM)
Faculté de médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

² Centre de recherche en santé humaine
INRS-Institut Armand Frappier
Pointe-Claire, Québec, Canada

Running title: PBPK model for PCBs

Key words: PCBs; PBPK modeling; mixtures; pharmacokinetics

Address for correspondence:

Kannan Krishnan
Département de santé environnementale et santé au travail
Faculté de médecine, Université de Montréal
2375 Chemin de la Côte Ste-Catherine, Bureau 4105
Montréal, Québec, Canada, H3T 1A8.
Tel: (514) 343-6581
Fax: (514) 343-2200
e-mail: kannan.krishnan@umontreal.ca

ABSTRACT

The objectives of the present study were to develop a physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach for simulating the blood and tissue lipid concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) and to validate it with experimental data obtained in rats exposed to an environmentally-relevant PCB mixture by different scenarios. The PBPK model for PCBs developed in the present study was based on the consideration of distribution in neutral lipid fractions of tissues and blood. Therefore the compartment volumes and circulating blood volumes in this model represented only their content of neutral lipid-equivalents (NLEs). The tissue:blood partition coefficients, used in previous PBPK models for PCBs, were not used in this study because the present model is based on the assumption that the solubility is the same in tissue and blood compartments since they all represent only the NLE content (i.e., 100% of the volume of the model compartments correspond to NLEs), and assume that the solubility/retention of PCBs in other tissue components is negligible. The metabolism rate constants (K_f ; hr^{-1}) required for PBPK modeling were derived from the best visual fit of model simulations to experimental data on liver concentrations in rats, determined on days 41 and 90, in rats administered a mixture containing 5, 50 or 500 μg of each congener (118, 138, 153, 170, 180 and 187) per kg body weight according to four protocols [(1) every day dosing, (2) once a week dosing, (3) consecutive dosing for 13 days with no further treatment, and (4) irregular dosing, i.e., on days 1, 7, 8, 11, 21, 36, 46, 49, 50, 55, 67, 70, 85]. Upon incorporation of the K_f value for each PCB congener, the PBPK model simulated adequately the PCB concentrations in plasma and adipose tissue lipids of rats exposed according to the four protocols. The average ratio of simulated/experimental values of the plasma lipid concentrations, computed for each dose-protocol-time combination (e.g., 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, protocol A, 41 days), ranged from 0.75 to 1.62 (mean: $1.16 \pm \text{sd}: 0.26$, $n=24$). For adipose tissue lipids, the average simulated/experimental concentrations for the dose-protocol combination for 90 days was within a factor of 2 (range: 0.83 – 1.92; mean: $1.14 \pm \text{sd}: 0.31$, $n=12$). The present study represents the first attempt of developing a lipid composition based physiological model for non-volatile organic chemicals such as PCBs, and this original modeling framework does not require the use of any partition coefficients for solving the model equations. Further, this PBPK model should be uniquely useful for interpreting blood or plasma concentration data, normally expressed on lipid basis, for highly lipophilic organic chemicals collected during epidemiological and biomonitoring studies of human populations.

INTRODUCTION

Polychlorinated biphenyls (PCBs) include 209 compounds that vary in the number and position of chlorine group in their biphenyl structure. These man-made substances were introduced in the environment as early as 1920 (Guiney *et al.*, 1978). In industrialized countries (e.g. USA, Canada), production of PCBs has been discontinued since 1971 (Brinkman *et al.*, 1980). However, humans and ecological receptors still continue to be exposed to these chemicals because of their persistence and the large accumulated reserves. Whereas the toxicity of PCBs mixtures have been investigated in limited number of studies (Platonow *et al.* 1972; Goldstein *et al.* 1975; Davis *et al.* 1993; Rozman *et al.* 1995; Osius *et al.* 1999; Romieu *et al.* 2000, Rozman *et al.* 2000 and Safe 2000), the pharmacokinetics of PCBs occurring as mixtures in rodents or humans is virtually unknown. High blood PCB levels have been observed in exposed population (e.g., fishermen living in the St Lawrence river basin in Canada) (Kosatsky *et al.* 2000). But a meaningful interpretation of these data, based on an understanding of the pharmacokinetics of PCBs in mixtures, is impossible at this time.

Several physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models have been constructed to simulate the kinetics of one PCB at a time in the exposed animal or human (Anderson *et al.* 1977; Lutz *et al.* 1977; Tuey and Matthews 1980; Lutz and Dedrick 1984). These models simulate the total radioactivity associated with PCB exposure, and consider that the PCBs are uniformly distributed in tissues. The models simulating total radioactivity do not permit the identification of the relative

presence of metabolites and parent chemicals in feces, tissues and blood, and thus are of limited use for risk assessment purposes. The PBPK models simulating the concentrations of PCBs and their metabolites in tissues and blood also assume that these super-lipophilic substances are distributed uniformly within the tissues, i.e., in all tissue components such as lipids, proteins and water (Anderson *et al.* 1977; Lutz *et al.* 1977; Toney and Matthews 1980; Lutz and Dedrick 1984). The n-octanol:water partition coefficients of the PCBs (Howard and Maylar 1997), however, suggest that the presence of PCBs in non-lipid fractions is likely to be negligible, especially if they do not exhibit specific binding properties. Thus, for PBPK modeling, it should be sufficient to account for PCB distribution and accumulation in the lipids of blood and tissues, thus neglecting the volumes of all other tissue components. Lipid content based pharmacokinetic models should be particularly useful for PCBs, since their blood concentrations in exposed population are often reported on lipid basis (i.e., mg/kg lipid) (e.g. Dewailly *et al.* 1993, 1999; Longnecker *et al.* 2000).

A lipid composition based pharmacokinetic model for PCBs is likely to be extremely useful if it is constructed to simulate PCBs in mixture since environmental exposure to individual PCBs is rare. Experimental and modeling studies conducted with PCB mixtures are likely to account for the various phenomena present (e.g., inhibition and induction of metabolism), thus making the resulting data relevant for assessing the consequences of environmental exposures.

The objectives of the present study were to develop a PBPK modeling approach for simulating the blood and tissue lipid concentrations of PCBs and to validate it with

experimental data obtained in rats exposed to an environmentally-relevant PCB mixture by different scenarios.

MATERIALS AND METHODS

Experimental

Chemicals

PCB#118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), PCB#138 (2,2',3',4,4',5-hexachlorobiphenyl), PCB#153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl) and PCB#180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl) were purchased from Radian International inc. (Austin, TX). PCB#170 (2,2',3,3',4,4',5-heptachlorobiphenyl) and PCB#187 (2,2',3,4,5,5',6-heptachlorobiphenyl) were purchased from Chem Service (West Chester, PA).

Animals and Treatments

Female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River breeding laboratories (St-Constant, Quebec, Canada). The animals, weighing between 150 – 175 g, were housed for at least one week prior to use in the experiments. The animals were maintained on a 12 hr light/dark cycle under constant temperature and humidity, were fed with pelleted food (Lab Roden Diet 5001) and were provided water *ad libitum*.

Twelve groups of twelve rats each were administered a mixture containing 5, 50 or 500 µg of each congener per kg body weight by one of the following four protocols: (A) every day dosing, (B) once a week dosing, (C) consecutive dosing for 13 days with no further treatment, and (D) irregular dosing, i.e., on days 1, 7, 8, 11, 21, 36, 46, 49, 50, 55, 67, 70, 85. Half the animals in each group (i.e., 6 rats/group) were

sacrificed on day 41 and the remaining animals were sacrificed on day 90 by CO₂ asphyxiation. Following exsanguination, liver and plasma samples were collected from individual animals on day 41 for quantifying the concentrations of PCBs in parental form. On day 90, samples of adipose tissue were additionally obtained from individual animals and analyzed for the levels of PCB congeners (i.e., 118,138,153,170,180 and 187).

Chemical analysis

Analytical determination of the concentrations of PCBs in plasma, adipose tissue and hepatic tissue was done following the extraction into dichloromethane at Centre de toxicologie du Québec (Québec, Canada). One part of organic solvent was used for lipid analysis and the second part was concentrated by evaporation. PCBs were collected in a fraction collector and cleaned up on Florisil columns and taken to a final volume of 100 µl for analysis using a HP-5890 series II gas chromatograph with dual-capillary columns and dual Ni-63 electron-capture detectors. Peaks were identified by their relative retention times obtained on the two columns, using a computer program developed in-house. Detection limit, based on three times the average standard deviation of noise is 0.02 µg/kg for PCBs in plasma, whereas it was 0.3 µg/kg for PCB congeners in hepatic and adipose tissues. Recovery of PCB extract was estimated to be between 74 to 106 %. The tissue PCB concentrations were then divided by the tissue lipid concentrations, and reported as µg/g lipid.

Lipid analysis

For plasma lipid determination, total and free cholesterol (TC and FC), triglycerides (TG) and phospholipids (PL) are individually measured using enzymatic methods on the Technicon automatic analyser (RA-500) with the following testpaks : Randox for TG and TC; BMC for FC and Wako for PL. Plasma total lipids are calculated using the summation method : [Total lipids : 1.677 (TC-FC) + FC + TG + PL] as recommended by Patterson *et al.* (1991).

Lipid contained in tissues (i.e. liver and adipose tissue) were determined as follows. Tissue (around 1 g) were extracted by Polytron[®] in presence of 100 ml dichloromethane, then 10 ml of the solvent was then deposited in plates pre-incubated without air and heat at 100°C for 60 minutes and evaporated without dust in ventilated space. Knowing the weight of the plate before and after the deposition of the solvent, the percentage of lipid was determined as follows;

$$\% \text{ lipid} = \frac{A-B}{\frac{C \times D}{E}} \times 100 \quad (1)$$

where

A = Weight of plate with lipid (g)

B = Weight of plate alone (g)

C = Weight of tissue used for determination of lipids (g)

D = Volume of solution used for evaporation (ml), and

E = Volume of total dichloromethane used for recovery of lipids (ml)

PBPK Modeling

Model Representation

Different model structures have been proposed in the literature for highly lipophilic substances such as PCBs (Anderson *et al.*, 1977; Lutz *et al.*, 1977; Bungay *et al.*,

1979; Tuey *et al.*, 1980; Lutz *et al.* 1984; Roth *et al.*, 1993). The PBPK model for PCBs used in the present study consisted of five compartments, namely, blood, richly perfused tissues, slowly perfused tissues, liver and adipose tissues (Figure1). All four tissue compartments were connected to the blood compartment via arterial and venous blood flows.

In the present study, the tissue uptake of PCBs was described as a perfusion-limited process (Ramsey and Andersen 1984). Bungay *et al.* (1979) proposed a diffusion-limited tissue uptake model for certain PCBs but there is no indication at the present time that this is necessary.

Lipophilicity characteristics of PCBs congeners (log n-octanol:water partition coefficients for PCBs 118, 138, 153, 170, 180, 187 are 7.12, 7.44, 7.75, 8.27, 8.27, 8.27 respectively (Howard and Meylan 1997)), suggest that their solubility in water and water-like fractions (e.g., certain phospholipids) of tissues and blood is likely to be negligible. Therefore, knowledge of their distribution in neutral lipid fractions alone can be considered sufficient for modeling adequately their pharmacokinetics and accumulation profiles. Accordingly, the compartment volumes in this model only correspond to the neutral lipid-equivalent (NLE) component of the tissues (Table 1). In the present study, the cardiac output, blood flow rates and tissue volumes of conventional PBPK models were multiplied by the NLE content of the corresponding compartments (Table 2). Since this model describes the distribution of PCBs in the NLE fractions of blood and tissues, the partition coefficient describing the ratio of concentration in tissue NLEs and blood NLEs is unity. In other terms, tissue: blood

partition coefficients ($P_{t:b}$), used in previous PCB PBPK models, were not used in this study because the present model describes the solubility to be the same in tissue and blood compartments since they all represent only the NLE content (i.e., 100% of the volumes of the model compartments correspond to NLEs), and assume that the solubility/retention of PCBs in other tissue components is negligible.

Accordingly, the rate of change in the amount of PCBs in the NLE volume of each tissue compartment $\left(\frac{dAlt}{dt}\right)$ was described as follows.

$$\frac{dAlt}{dt} = Q_{lt}(C_{la} - C_{lt}) \quad (2)$$

$$C_{lt} = \frac{Alt}{V_{lt}} \quad (3)$$

$$C_{ltl} = C_{lt} \times \frac{V_{nlt}}{V_{ltl}} \quad (4)$$

where

C_{la} = Chemical concentration in the NLE fraction of arterial blood ($\mu\text{g/ml}$ NLE)

Q_{lt} = Flow of blood NLEs through tissue compartment (ml NLE/hr)

C_{lt} = Chemical concentration in tissue NLEs ($\mu\text{g/ml}$ NLE), which is the same as the concentration in the NLEs of venous blood leaving the tissue compartment expressed as $\mu\text{g/ml}$ NLE

C_{ltl} = Chemical concentration expressed on the basis of total lipids in tissues ($\mu\text{g/ml}$ of total lipid)

V_{lt} = Volume of tissue NLE (ml NLE)

V_{nlt} = Volume of neutral lipid equivalents in tissue (ml NLW), and

V_{ltl} = Volume of total lipids in tissue (L total lipid)

Whereas each of the four compartments was described with the above set of equations, metabolism was additionally accounted for, in one of the compartments, namely, liver as follows.

$$RAM = K_f \times VII \times C_{II} \quad (5)$$

where

RAM = Rate of amount metabolized ($\mu\text{g/hr}$),

K_f = First order metabolic rate constant (h^{-1}),

C_{II} = Chemical concentration in the NLE component of liver ($\mu\text{g/ml NLE}$), and

VII = Volume of neutral lipid equivalents in liver (ml of NLE).

Model parameterization

The physiological parameters of the conventional rat PBPK model (i.e., cardiac output, tissue volumes, tissue blood flow rates) were obtained from Krishnan and Andersen (2001). By multiplying the conventional physiological parameters (e.g., L blood) with the data on NLE content (e.g., L NLE/L blood) (Table 1), they were expressed in terms of NLEs (Table 2). Therefore all compartment volumes corresponded to NLE volumes whereas all blood flows represented the flow of NLEs in blood (Emond and Krishnan, 2001).

Tissue:blood partition coefficients were not used or estimated in the present study, since the equilibrium distribution of PCBs between blood NLEs and tissue NLEs

should be unity. The oral absorption rate constant was set equal to 0.2, based on the previous PBPK modeling studies with similar substances (Leung et al., 1990; Wang et al. 1997). The Kf values, representing the rate of metabolism, for each of the six PCBs were estimated by visual optimization of the fitting of PBPK model simulations to experimental data of their concentrations in liver.

Model Simulation and Validation

The algebraic and differential equations describing the kinetics of PCBs administered simultaneously according to several exposure scenarios were written as a program and solved with a commercially available software, namely ACSL[®] (Advanced Continuous Simulation Language[®], Aegis Huntsville, AL). The PBPK model was used to simulate the kinetics of the six PCB congeners administered according to scenarios A, B, C and D at three dose levels (i.e., 5, 50 and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of body weight). The PBPK model framework used in this study not only simulated the PCB concentration in neutral lipids (Eqn. 3), but also in total lipids (Eqn. 4). For solving Eqn. 4 the ratio of the NLE content to the total lipid content for each tissue was used (Table 1). The PCB PBPK model was validated by comparing *a priori* predictions of their concentrations expressed on lipid basis, in plasma and adipose tissue (i.e., output of eqn 4) to the experimental data for each of the six PCB congeners collected in the rats.

RESULTS

The hepatic concentrations ($\mu\text{g/ml}$ lipid) of each of the six PCB congeners, determined on days 41 and 90 were used as the basis for the determination of the metabolism rate constant (Kf). The Kf value for each congener, for each dose and exposure scenario, was adjusted until an optimal fit between the simulated and experimental data of the liver concentrations on days 41 and 90 was achieved (Table 3). The Kf values derived from the best visual fit of model simulations to both sets of experimental data (i.e., day 41 and day 90) varied from 0.01 to 0.15 hr^{-1} (Table 4). The range of the Kf values for the various congeners increased from the low dose group to the high dose group: 0.01 – 0.02 hr^{-1} (in the four groups receiving 5 $\mu\text{g/kg}$), 0.025 – 0.036 hr^{-1} (in groups receiving 50 $\mu\text{g/kg}$), and 0.032 – 0.078 hr^{-1} (in groups receiving 500 $\mu\text{g/kg}$). The higher end value of Kf, regardless of the dose and exposure protocol (with the exception of the group receiving 50 $\mu\text{g/kg}$ according to protocol D), was associated with PCB-118.

Following the incorporation of the values of Kf from Table 4 in the PBPK model, simulations of the time-course of PCB concentrations in liver, plasma and adipose tissue lipids were obtained for each dose level (5, 50 and 500 $\mu\text{g/kg}$) administered by each of the four exposure protocols (A, B, C, and D). The PBPK model simulations of PCB concentrations in plasma and adipose tissue on days 41 and 90 of the experiment are compared with experimental data in Tables 5 and 6, respectively. The experimental data indicate that PCB concentrations in adipose tissues were comparable or greater than that found in plasma, when expressed on

the basis of total lipids. The lipid concentrations of PCBs, in general, increased linearly when the dose was increased from 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ but such a relationship was not evident with the data obtained in rats receiving 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

The average ratio of simulated/experimental values of the plasma lipid concentrations, computed for each dose-protocol-time combination (e.g., 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, protocol A, 41 days), ranged from 0.75 to 1.62 (mean: $1.16 \pm \text{sd}: 0.26$, $n=24$) (Table 5). For adipose tissue, the average simulated/experimental concentrations on day 90 for the various dose-protocol combinations were within a factor of 2 (range: 0.83 – 1.92; mean: $1.14 \pm \text{sd}: 0.31$, $n=12$) (Table 6). No adjustment of model parameters was attempted to obtain the predictions of PCB lipid concentrations in the adipose tissue and plasma compartments. The model, however, consisted of K_f values previously estimated by fitting to liver lipid concentrations of individual PCBs.

Even though the Tables 5 and 6 present only the simulated data for days 41 and 90 of the experiment, the model could simulate the concentration profiles for other time periods, for which experimental data are not available for comparison purposes. Figure 2 provides examples of such simulations of plasma concentrations for one of the mixture components, namely PCB-118, during the various exposure protocols.

DISCUSSION

Physiologically-based pharmacokinetic models have been developed for individual PCBs but not for PCBs in mixture. Some authors, however, have developed classical pharmacokinetic models for mixtures of PCBs (Carrier 1991; Tanabe 1981). These models could not and have not been used for performing predictions or extrapolations of PCB kinetics from one exposure scenario to another or from high dose to low dose. The present study, for the first time, has developed a PBPK model that provides simulations of the lipid concentrations of PCBs in rats exposed to these chemicals in mixtures. Further, the metabolic rate constants for each of the six congeners in rats administered three different dose levels by four different exposure scenarios have been estimated. The mixture used in the present study represents those PCBs that have frequently been found in combination in human tissues during epidemiological and biomonitoring studies (Safe, 1994; Dewailly *et al.*, 1993; Dewailly *et al.* 1999; Chevrier *et al.*, 2000; 1999; Aroson *et al.*, 2000; Gerstenberger *et al.*, 2000)

PBPK models provide a unique framework for simulating the kinetics of chemicals in mixture (Haddad *et al.* 2000). These models permit the use of a single set of physiological parameters representing the experimental animal, and at the same time facilitate the use of chemical-specific parameters for simulating the kinetics of more than one chemical at a time. In conventional PBPK models, the PCB kinetics was simulated on the basis of accumulation in tissues which were considered as a single homogenous compartment (Anderson *et al.* 1977; Tuey and Matthews 1980; Lutz *et al.* 1984; Lutz and Dedrick 1987). Mechanistically, the non-lipid components are

unlikely to be important especially if they do not contribute to the binding of PCBs. The present study, for the first time, has shown that a model based on the neutral lipid content of tissues alone is sufficient to simulate the accumulation and kinetics of PCBs. The PBPK model developed in this study not only enables the simulation of the kinetics of PCBs without the use of tissue:blood partition coefficients but also facilitates the simulation of lipid concentrations of PCBs. Since biomonitoring studies of PCBs report their concentrations in human blood on total lipid basis, the present model should be useful in directly interpreting such data in terms of body burden and exposure dose.

The concentrations of PCBs in the various tissues and blood, expressed on the basis of total lipids, are not identical (Tables 3, 5 & 6; Figure 3A) because of the difference in their lipid composition (i.e., relative levels of phospholipids and neutral lipids) (Table 1). However, when the PCB concentrations represented on the basis of total lipids are normalized to their neutral lipid content (i.e.,

$\left(\text{Frac}_{.normalized} = \frac{mg}{L_{total_lipids}} \times \frac{L_{total_lip}}{L_{NLE}} \right)$ the numbers are almost identical (Figure 3B).

With the knowledge of the NLE level in tissues and chemical concentration in NLE of tissues (obtained with the NLE-based pharmacokinetic model), one can calculate the total amount of a chemical in the compartment. This amount can then be divided by the appropriate total tissue volume or total tissue lipid volume, to express the results in terms of mg/L tissue or mg/L total lipids. Apparently, the critical determinant in the model remains to be the NLE, but the volumes of other

components (e.g., phospholipids, proteins) can as well be accounted for, if required, for expressing the model results in other terms (e.g., mg/L tissue volume).

This study has generated metabolism rates for six PCB congeners from mixture exposure studies. These data are relevant and important for PBPK modeling of these PCBs in mixture. Previous reports of PCB metabolism rates for PBPK modeling (Parham *et al.* 1998; Lutz *et al.* 1984) were derived from analysis of radioactivity data, which represented parent chemical and metabolites. The Kf values derived in the present study were only based on fitting of the model simulations to parent chemical concentrations and as such are likely to be more accurate than the previous estimates.

The Kf values estimated in the present study vary from 0.01 to 0.15 hr⁻¹. The use of these values along with the liver blood rate (2.36 ml lipid/hr) and liver lipid volume (0.44 ml) allows the estimation of the hepatic extraction ratios (E) for PCBs

$$E = \left(\frac{(Kf \times VII)}{(Kf \times VII) + Q_{II}} \right)$$
. The E values computed on this basis vary between 0.002 and

0.027 for the various PCBs. The highest value of 0.027 is associated with the lower chlorinated biphenyl investigated in the present study (i.e., PCB-118). E value of 1 would suggest liver blood flow as the limiting factor of metabolism whereas lower E values (<0.3) indicate that the metabolizing enzyme is the limiting factor of hepatic clearance, which in fact is the case for PCBs whose E values are lower than 0.027. Even though the E value is greater for PCB-118 than most other PCBs investigated

in the present study, the E does not vary appreciably among the five other congeners.

The E value is the sole determinant of the toxicokinetic equivalency of structurally similar chemicals. The blood concentration of PCBs resulting from chronic, life-time exposure to the reference dose (RfD) or another dose level on a daily basis is determined primarily by two factors, (1) dose absorbed and (2) hepatic clearance. If the dose absorbed is the same for the six congeners, then the hepatic clearance is the sole determinant responsible for possible difference in internal concentrations of PCBs. Hepatic clearance is determined by liver blood flow rate and the E value. Given that the same individual is exposed to the various congeners, the difference in the blood or tissue lipid concentrations of the congeners will be a consequence of inter-congener differences in E values. The lipid concentrations of all PCBs, following the same exposure dose as done in the present study, will be the same provided the E values for the congeners are identical. The difference in the lipid concentrations of the PCB isomers observed in the present study then is a consequence of the difference in the E value among them. The E value is greater with lower chlorination of PCBs and is anticipated to decrease with increasing chlorination indicative of increasing bio-persistence (Birnbaum, 1985).

In conclusion, the PBPK model developed in the present study simulated adequately the lipid concentrations of PCBs in rats. Even though interactions were not explicitly taken into account, the Kf value used in the model appropriately reflected the metabolism rates in each dose-protocol combination. The simulated lipid

concentrations in liver, plasma and adipose tissues were different for the various isomers, and these differences disappeared once the PCB concentrations were expressed on the basis of neutral lipid content of the tissues and blood. The lipid composition based modeling approach developed in this study should be useful in interpreting blood or plasma lipid concentration data for highly lipophilic organic chemicals collected during epidemiological and biomonitoring studies of human populations.

REFERENCES

- Anderson, M. W., Eling, T. E., Lutz, R. J., Dedrick, R. L., and Matthews, H. B. (1977). The construction of a pharmacokinetic model for the disposition of polychlorinated biphenyls in the rat. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **22**, 765-773.
- Aroson, K. J., Miller, A. B., Woolcott, C. G., Sterns, E. E., McCreedy, D. R., Fish, E. B., Hiraki, G. Y., Lickley, L. A., Holloway, C., Ross, T., Hanna, W. M., SenGupta, S. K., and Weber, J.-P. (2000). Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *central European Journal and Public Health* **9**, 55-63.
- Birnbaum, L. S. (1985). The role of structure in the disposition of halogenated aromatic xenobiotics. *Environ.Health Perspect.* **61**, 11-20.
- Brinkman, U. A., and De Kok, A. (1980). Production, properties and usage. In *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphatalenes, dibenzodioxins and related products* (R. D. Kimbrough, Ed.), pp. 1-40. Elsevier, New york.
- Bungay, P. M., Dedrick, R. L., and Matthews, H. B. (1979). Pharmacokinetics of halogenated hydrocarbons. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **320**, 257-270.
- Carrier, G. (1991). Réponse de l'organisme humain aux BPC, dioxines et furannes et analyse des risques toxiques. Le passeur, Québec.

- Chevrier, J., Dewailly, E., Ayotte, P., Mauriege, P., Despres, J. P., and Tremblay, A. (2000). Body weight loss increases plasma and adipose tissue concentrations of potentially toxic pollutants in obese individuals. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **24**, 1272-1278.
- Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D., and Anton-Culver, H. (1993). Medical Hypothesis: Xenoestrogens As Preventable Causes of Breast Cancer. *Environmental Health Perspectives* **101**, 372-377.
- Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Lalibert, Muir, D. G., and Norstrom, R. J. (1993). Inuit exposure to organochlorine through the aquatic Food Chain in Arctic Quebec. *Environmental Health Perspectives* **101**, 618.
- Dewailly, E., Mulvad, G., Pedersen, H. S., Ayotte, P., Demers, A., Weber, J.-P., and Hansen, J. C. (1999). Concentration of organochlorines in human brain, liver, and adipose tissue autopsy samples from Greenland. *Environmental Health Perspectives* **107**, 823-828.
- Emond, C and Krishnan, K.(2001). A physiological pharmacokinetic model based on tissue lipid content for simulating inhalation pharmacokinetics of highly lipophilic volatile organic chemicals (Submitted)
- Gao, X., Terranova, P. F., and Rozman, K. K. (2000). Effects of polychlorinated dibenzofurans, biphenyls, and their mixture with dibenzo-p-dioxins on ovulation in the gonadotropin-primed immature rat: support for the toxic equivalency concept. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **163** , 115-124.

Gerstenberger, S. L., Dellinger, J. A., and Hansen, L. G. (2000). Concentrations and frequencies of polychlorinated biphenyl congeners in a Native American population that consumes Great Lakes fish. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* **38**, 729-746.

Goldstein J. A., Hickman P., Burse V. W. et Bergman H., 1975. A comparative study of two biphenyl mixtures mixtures (Aroclors 1242 and 1016) containing 42 % chlorine on induction of hepatic porphyria and drug metabolizing enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **32**, p.461-473.

Guiney, P. D., Yang, K. H., Seymour, J. L., and Peterson, R. E. (1978). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the distribution and biliary excretion of polychlorinated biphenyls in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **45**, 403-414.

Haddad, S., Poulin P. and Krishnan, K. (2000). Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue:bloods partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere* **40**, 839-843.

Howard, P. H., and Meylan, W. M. (1997). *Handbook of physical properties of organic chemicals*. CRC Lewis publishers, New York.

Kosatsky T., Shatenstein B., Przybysz R. et Nadon S., 1998. Risk and benefits related to consumption of St. Lawrence river sportfish – final report. *Rapport Saint-Laurent Vision 2000*, 600 p.

- Krishnan, K., and Andersen, M. E. (2001). Physiologically based pharmacokinetic modelling in toxicology. In principles and methods of toxicology (A. W. Hayes, Ed.), pp. 193-241. Raven Press, New York.
- Leung, H. W., Paustenbach, D., Murray, F. J., and Andersen, M. E. (1990). A physiological pharmacokinetic description of the tissue distribution and enzyme-inducing properties of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **103**, 399-410.
- Longnecker, M. P., Gladen, B. C., Patterson, D. G., Jr., and Rogan, W. J. (2000). Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in relation to thyroid hormone levels in neonates. *Epidemiology* **11**, 249-254.
- Lutz, R. J., Dedrick, R. L., Matthews, H. B., and Eling, T. E. (1977). A preliminary pharmacokinetic model for several chlorinated biphenyls in the rat. *Drug Metabolism and Disposition* **5**, 386-396.
- Lutz, R. J., Dedrick, R. L., Tuey, D., Sipes, I. G., Anderson, M. W., and Matthews, H. B. (1984). Comparison of the pharmacokinetics of several polychlorinated biphenyls in mouse, rat, dog, and monkey by means of a physiological pharmacokinetic model. *Drug Metab Dispos.* **12**, 527-535.
- Leung, H. W., Paustenbach, D., Murray, F. J., and Andersen, M. E. (1990). A Physiological Pharmacokinetic description of the Tissue Distribution and Enzyme-Inducing Properties of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **103**, 399-410.

- Osius, N., Karmaus, W., Kruse, H., and Witten, J. (1999). Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in children. *Environ. Health Perspect.* **107**, 843-849
- Parham, F. M., and Portier, C. J. (1998). using structural information to create physiologically based pharmacokinetic models for all biphenyls II Rates of metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* **151**, 110-116.
- Patterson DG Jr, Isaacs SG, Alexander LR, Turner WE, Hampton L, Bernert JT and Needham LL, 1991. Method 6: Determination of specific polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in blood and adipose tissue by isotope dilution – high-resolution mass spectrometry. *IARC Sci. Publ.* 108, pp. 299
- Platonow, N. S., Liptrap, R. M., and Geissinger, H. D. (1972). The distribution and excretion of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) and their effect on urinary gonadal steroid levels in the boar. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **7**, 358-365.
- Poulin, P., and Krishnan, K. (1996). Molecular structure-based prediction of the partition coefficients of organic chemicals for physiological pharmacokinetic models. *Toxicology Methods* **6**, 117-137
- Rozman, K. K., Stahl, B. U., and Kerecsen, L. (1995). Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) and their mixture. *Archives of Toxicology* **69**, 547-551.

- Romieu, I., Hernandez-Avila, M., Lazcano-Ponce, E., Weber, J. P., and Dewailly, E. (2000). Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. *Am.J.Epidemiol.* **152**, 363-370.
- Roth, W. L., Freeman, R. A., and Wilson, A. G. (1993). A physiological based model for gastrointestinal absorption and excretion of chemicals carries by lipids. *Risk Analysis* **13**, 531-543.
- Safe, S. (1994). Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Environmental Impact, Biochemical and Toxic Response, and Implications for Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* **24**, 87-149.
- Safe, S. and Hutzinger, O. (1987). *Polychlorinated biphenyls (PCBs): mammalian and environmental toxicology*. Springer-Verlag, New York.
- Safe, S. H. (2000). Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environ.Health Perspect.* **108**, 487-493.
- Tanabe, S., Nakagawa, Y., and Tatsukawa, R. (1981). Absorption efficiency and biological Half-Life of Individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products. *Agri. Biol. Chem.* **45**, 717-726.
- Tuey, D. B., and Matthews, H. B. (1977). Pharmacokinetics of 3,3',5,5'-tetrachlorobiphenyl in the male rat. *Drug Metab Dispos.* **5**, 444-450.

- Tuey, D. B., and Matthews, H. B. (1980). Distribution and Excretion of 2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl in rats and man: Pharmacokinetic model predictions. *Toxicology Applied Pharmacology* **53**, 420-431.
- Wang, X., Santostefano, M. J., Evans, M. V., and Richardson, V. M. (1997). Determination of parameters responsible for pharmacokinetic behaviour of TCDD in Female Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **147**, 151-168

Table 1: Lipid contents of rat tissues and blood ^a

Tissue	Neutral lipid ^a	Phospholipids ^a	Neutral lipid equivalent (NLE) ^b	<u>NLE</u> Total lipid ^c
Blood	0.0013	0.0020	0.0019	0.750
Adipose tissue	0.8530	0.0020	0.8536	0.998
Liver	0.0350	0.0250	0.0425	0.710
Richly perfused tissues	0.0350	0.0250	0.0425	0.710
Slowly perfused tissues	0.0090	0.0100	0.0117	0.616

^a Data from Poulin and Krishnan (1996)

^b Calculated as the sum total of the volume fraction of neutral lipids and 0.3 times the phospholipid fraction in tissues (Haddad *et al.* 2000)

^c Total lipid = neutral lipid + phospholipids

Table 2 : Physiological parameters of rat PBPK model ^a

Parameter ^b	Abbreviation	Unit	Values
Cardiac output	Qc	ml _{lipid} /hr	9.5
Blood flow to compartments			
Adipose tissue	QF	ml _{lipid} /hr	0.85
Liver	QL	ml _{lipid} /hr	2.36
Richly perfused tissues	QR	ml _{lipid} /hr	4.82
Slowly perfused tissues	QS	ml _{lipid} /hr	1.42
Volumes of compartments			
Blood	VB	ml _{lipid}	0.04
Adipose tissue	VF	ml _{lipid}	15.53
Liver	VL	ml _{lipid}	0.44
Richly perfused tissues	VR	ml _{lipid}	0.55
Slowly perfused tissues	VS	ml _{lipid}	2.04

^a Obtained from Krishnan and Andersen (2001)

^b The values obtained from Krishnan and Andersen (2001) were multiplied by the NLE for each compartment (Table 1)

Table 3: Comparison of PBPK model simulation (SIM) obtained by fitting to experimental data (Exp; mean \pm SEM) on liver lipid concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of PCBs (congeners 118,138,153,170,180 and 187) determined on days 41 and 90 in rats administered 5, 50 or 500 $\mu\text{g/kg}$ of each congener according to four protocols.

Protocol	PCB isomer	Mixture 1 (5 $\mu\text{g/kg}$)			Mixture 2 (50 $\mu\text{g/kg}$)			Mixture 3 (500 $\mu\text{g/kg}$)					
		Exp 41 day	SIM 41 day	Exp 90 day	Exp 41 day	SIM 41 day	Exp 90 day	Exp 41 day	SIM 41 day	Exp 90 day	SIM 90 day		
A	118	1.51 \pm 0.27	1.34	1.91 \pm 0.07	1.98	11.52 \pm 1.59	10.43	14.10 \pm 1.58	12.82	65.45 \pm 23.07	49.59	41.84 \pm 4.46	46.77
	138	1.92 \pm 0.33	1.51	2.33 \pm 0.17	2.42	15.49 \pm 2.70	13.47	20.21 \pm 2.20	19.75	116.77 \pm 35.5	83.02	93.20 \pm 5.58	91.14
	153	1.85 \pm 0.34	1.51	2.33 \pm 0.14	2.42	13.43 \pm 2.28	12.11	16.84 \pm 1.56	16.41	113.41 \pm 31.5	90.65	102.07 \pm 5.26	103.54
	170	2.24 \pm 0.39	1.69	2.37 \pm 0.15	3.04	16.05 \pm 2.73	15.06	21.28 \pm 2.33	24.24	169.30 \pm 40.8	134.73	170.05 \pm 9.55	197.55
	180	1.86 \pm 0.32	1.51	2.27 \pm 0.14	2.42	12.64 \pm 2.35	12.11	16.33 \pm 1.14	16.41	122.45 \pm 34.2	90.65	103.37 \pm 6.83	103.54
B	187	2.15 \pm 0.40	1.51	2.21 \pm 0.13	2.42	14.57 \pm 2.26	13.47	15.59 \pm 1.09	19.75	113.85 \pm 30.9	90.65	94.43 \pm 5.59	103.54
	118	0.22 \pm 0.03	0.23	0.45 \pm 0.08	0.41	1.49 \pm 0.12	1.83	3.38 \pm 0.13	2.69	18.85 \pm 1.15	8.74	6.76 \pm 0.62	9.55
	138	0.23 \pm 0.02	0.23	0.52 \pm 0.12	0.42	1.69 \pm 0.13	1.94	4.07 \pm 0.21	2.99	24.38 \pm 0.87	16.21	16.11 \pm 2.18	22.26
	153	0.23 \pm 0.02	0.21	0.49 \pm 0.12	0.33	1.57 \pm 0.13	1.94	3.44 \pm 0.13	2.99	20.15 \pm 0.84	11.68	14.79 \pm 2.06	13.82
	170	0.22 \pm 0.02	0.23	0.53 \pm 0.12	0.42	1.73 \pm 0.15	2.07	3.88 \pm 0.23	3.33	24.61 \pm 1.54	14.46	15.13 \pm 2.59	18.71
C	180	0.19 \pm 0.02	0.23	0.43 \pm 0.09	0.42	1.29 \pm 0.12	1.62	2.95 \pm 0.13	2.22	17.89 \pm 0.88	11.68	13.11 \pm 1.59	13.82
	187	0.23 \pm 0.02	0.21	0.48 \pm 0.10	0.33	1.53 \pm 0.13	1.83	3.32 \pm 0.11	2.69	19.31 \pm 0.91	11.68	15.54 \pm 1.76	13.82
	118	0.28 \pm 0.02	0.34	0.16 \pm 0.02	0.14	3.03 \pm 0.10	3.04	1.21 \pm 0.14	1.12	15.09 \pm 1.14	20.47	4.85 \pm 0.70	4.41
	138	0.39 \pm 0.03	0.37	0.21 \pm 0.03	0.18	3.91 \pm 0.26	3.72	1.82 \pm 0.19	1.80	35.51 \pm 2.54	33.65	13.73 \pm 1.56	14.24
	153	0.35 \pm 0.03	0.37	0.20 \pm 0.03	0.18	3.09 \pm 0.21	3.36	1.64 \pm 0.17	1.42	29.86 \pm 2.01	30.43	13.09 \pm 1.17	11.23
D	170	0.36 \pm 0.02	0.37	0.21 \pm 0.03	0.18	3.83 \pm 0.28	3.72	1.80 \pm 0.20	1.81	35.59 \pm 2.59	33.65	15.38 \pm 1.55	14.23
	180	0.33 \pm 0.02	0.37	0.19 \pm 0.03	0.18	2.70 \pm 0.18	3.04	1.40 \pm 0.15	1.12	25.56 \pm 1.69	30.43	11.29 \pm 1.10	11.24
	187	0.44 \pm 0.03	0.41	0.25 \pm 0.03	0.23	3.37 \pm 0.24	3.36	1.56 \pm 0.15	1.42	30.05 \pm 1.82	30.43	11.96 \pm 1.22	11.24
	118	0.19 \pm 0.02	0.23	0.48 \pm 0.08	0.41	1.74 \pm 0.20	1.70	1.89 \pm 0.09	2.54	15.51 \pm 1.73	11.43	12.50 \pm 1.15	14.42
	138	0.22 \pm 0.03	0.23	0.44 \pm 0.08	0.41	1.96 \pm 0.27	1.70	2.20 \pm 0.13	2.54	21.67 \pm 3.20	15.82	19.14 \pm 1.80	22.86
	153	0.20 \pm 0.03	0.23	0.38 \pm 0.07	0.41	1.64 \pm 0.22	1.48	2.02 \pm 0.10	2.07	17.49 \pm 2.72	14.78	17.13 \pm 1.63	20.67
	170	0.23 \pm 0.03	0.23	0.46 \pm 0.09	0.41	2.04 \pm 0.27	1.70	2.25 \pm 0.17	2.54	22.38 \pm 3.76	16.97	22.68 \pm 2.18	25.41
	180	0.20 \pm 0.02	0.23	0.38 \pm 0.08	0.41	1.47 \pm 0.16	1.48	1.69 \pm 0.11	2.07	16.44 \pm 2.52	13.83	15.25 \pm 1.83	18.77
187	0.25 \pm 0.04	0.23	0.39 \pm 0.07	0.41	1.61 \pm 0.16	1.58	1.91 \pm 0.10	2.28	16.56 \pm 2.67	13.83	15.69 \pm 1.95	18.77	

Protocol A : One dose per day until sacrifice

Protocol B : One per week until sacrifice

Protocol C : Consecutive dosing for 13 days followed by no-treatment until sacrifice

Protocol D : Irregular dosing (i.e.on days 1, 7, 8, 11, 21, 36, 46, 49, 50, 55, 67, 70 and 85)

Table 4: Elimination rate constants (K_f ; h^{-1}) obtained by fitting PBPK model simulations to experimental data on hepatic concentrations found on days 41 and 90 following exposure of rats to PCB mixtures by various protocols.

Protocol	PCB isomer	Mixture 1 (5 μ g/kg)	Mixture 2 (50 μ g/kg)	Mixture 3 (500 μ g/kg)
A	PCB-118	0.03	0.055	0.15
	PCB-138	0.02	0.03	0.08
	PCB-153	0.02	0.04	0.07
	PCB-170	0.01	0.02	0.03
	PCB-180	0.02	0.04	0.07
B	PCB-187	0.02	0.03	0.07
	PCB-118	0.01	0.03	0.10
	PCB-138	0.01	0.025	0.04
	PCB-153	0.02	0.025	0.07
	PCB-170	0.01	0.02	0.05
C	PCB-180	0.01	0.04	0.07
	PCB-187	0.02	0.03	0.07
	PCB-118	0.025	0.03	0.05
	PCB-138	0.02	0.02	0.025
	PCB-153	0.02	0.025	0.03
D	PCB-170	0.02	0.02	0.025
	PCB-180	0.02	0.03	0.03
	PCB-187	0.01	0.025	0.03
	PCB-118	0.01	0.03	0.06
	PCB-138	0.01	0.03	0.035
	PCB-153	0.01	0.04	0.04
	PCB-170	0.01	0.03	0.03
	PCB-180	0.01	0.04	0.045
	PCB-187	0.01	0.035	0.045

Protocol A : One dose per day until sacrifice

Protocol B : One per week until sacrifice

Protocol C : Consecutive dosing for 13 days followed by no-treatment until sacrifice

Protocol D : Irregular dosing (i.e. on days 1, 7, 8, 11, 21, 36, 46, 49, 50, 55, 67, 70 and 85)

Table 5: Comparison of PBPK model predictions (Mod) with experimental data (Exp; mean \pm SEM) on plasma lipid concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of PCBs (congeners 118,138,153,170,180 and 187) determined on days 41 and 90 in rats administered 5, 50 or 500 $\mu\text{g/kg}$ of each congener according to four protocols.

Protocol	PCB isomer	Mixture 1 (5 $\mu\text{g/kg}$)				Mixture 2 (50 $\mu\text{g/kg}$)				Mixture 3 (500 $\mu\text{g/kg}$)			
		Exp 41 day	Mod 41 day	Exp 90 day	Mod 90 day	Exp 41 day	Mod 41 day	Exp 90 day	Mod 90 day	Exp 41 day	Mod 41 day	Exp 90 day	Mod 90 day
A	118	1.11 \pm 0.07	1.42	2.06 \pm 0.15	2.10	8.70 \pm 0.54	11.70	11.78 \pm 1.13	13.68	48.98 \pm 5.14	53.51	72.38 \pm 3.10	50.69
	138	1.17 \pm 0.09	1.59	2.92 \pm 0.30	2.57	10.31 \pm 0.67	14.29	19.06 \pm 2.00	20.98	84.73 \pm 7.60	88.69	141.7 \pm 6.88	97.61
	153	1.24 \pm 0.09	1.59	3.07 \pm 0.33	2.57	10.10 \pm 0.71	12.87	18.80 \pm 1.72	17.45	94.61 \pm 11.5	96.71	161.7 \pm 7.42	110.70
	170	1.22 \pm 0.08	1.79	2.78 \pm 0.31	3.21	10.85 \pm 0.50	15.95	18.38 \pm 1.91	25.70	107.26 \pm 10.6	142.90	173.8 \pm 5.28	209.77
	180	1.09 \pm 0.07	1.59	2.58 \pm 0.21	2.57	9.06 \pm 0.55	12.87	16.73 \pm 1.38	17.45	92.12 \pm 9.67	96.71	155.8 \pm 5.53	110.70
B	187	1.40 \pm 0.11	1.59	3.23 \pm 0.29	2.57	10.89 \pm 0.77	14.29	18.07 \pm 1.17	20.98	88.75 \pm 7.94	96.71	148.3 \pm 5.55	110.70
	118	0.15 \pm 0.01	0.25	0.23 \pm 0.02	0.44	1.30 \pm 0.06	1.93	2.79 \pm 0.10	2.86	16.20 \pm 0.59	9.36	16.73 \pm 0.82	10.82
	138	0.16 \pm 0.01	0.25	0.27 \pm 0.03	0.44	1.37 \pm 0.08	2.06	3.24 \pm 0.21	3.17	19.61 \pm 0.84	17.24	22.09 \pm 2.48	23.69
	153	0.18 \pm 0.01	0.22	0.29 \pm 0.03	0.35	1.44 \pm 0.09	2.06	3.19 \pm 0.18	3.17	19.37 \pm 0.96	12.47	21.72 \pm 2.60	14.19
	170	0.15 \pm 0.01	0.25	0.24 \pm 0.03	0.44	1.26 \pm 0.08	2.19	2.68 \pm 0.18	3.52	17.27 \pm 1.50	15.40	20.47 \pm 2.14	19.95
C	180	0.14 \pm 0.01	0.25	0.22 \pm 0.03	0.44	1.10 \pm 0.06	1.72	2.32 \pm 0.15	2.37	14.87 \pm 0.81	12.48	16.97 \pm 1.85	14.79
	187	0.19 \pm 0.01	0.22	0.32 \pm 0.04	0.35	1.47 \pm 0.09	1.93	3.20 \pm 0.16	2.86	18.96 \pm 0.89	12.48	19.95 \pm 2.31	14.79
	118	0.22 \pm 0.01	0.36	0.11 \pm 0.01	0.15	2.21 \pm 0.09	3.23	1.13 \pm 0.05	1.19	8.74 \pm 1.35	21.79	5.90 \pm 0.76	4.71
	138	0.28 \pm 0.02	0.39	0.16 \pm 0.02	0.19	2.92 \pm 0.10	3.94	1.89 \pm 0.07	1.91	24.52 \pm 3.76	35.68	18.01 \pm 2.00	15.11
	153	0.30 \pm 0.02	0.39	0.17 \pm 0.02	0.19	3.02 \pm 0.07	3.57	1.98 \pm 0.06	1.51	22.93 \pm 4.11	32.30	19.49 \pm 2.33	11.94
D	170	0.24 \pm 0.03	0.39	0.14 \pm 0.02	0.19	2.67 \pm 0.11	3.94	1.69 \pm 0.08	1.91	21.43 \pm 3.80	35.68	17.14 \pm 2.15	15.11
	180	0.27 \pm 0.01	0.39	0.14 \pm 0.01	0.19	2.34 \pm 0.07	3.23	1.42 \pm 0.05	1.19	18.13 \pm 3.08	32.29	14.78 \pm 1.78	11.94
	187	0.43 \pm 0.02	0.44	0.23 \pm 0.03	0.24	2.97 \pm 0.13	3.57	1.99 \pm 0.10	1.51	21.34 \pm 3.54	32.29	19.06 \pm 2.47	11.94
	118	0.15 \pm 0.02	0.24	0.28 \pm 0.03	0.43	1.35 \pm 0.11	1.80	2.69 \pm 0.16	2.70	9.91 \pm 0.79	12.19	15.54 \pm 0.99	15.41
	138	0.19 \pm 0.03	0.24	0.34 \pm 0.05	0.43	1.50 \pm 0.15	1.80	3.13 \pm 0.27	2.70	13.40 \pm 1.65	16.81	25.11 \pm 2.62	24.31
153	0.20 \pm 0.03	0.24	0.35 \pm 0.05	0.43	1.58 \pm 0.15	1.57	3.17 \pm 0.26	2.20	12.83 \pm 1.52	15.72	25.23 \pm 2.90	22.00	
170	0.19 \pm 0.03	0.24	0.30 \pm 0.04	0.43	1.46 \pm 0.15	1.80	2.73 \pm 0.21	2.70	12.78 \pm 1.70	18.01	24.81 \pm 3.02	26.99	
180	0.17 \pm 0.02	0.24	0.26 \pm 0.04	0.43	1.20 \pm 0.10	1.57	2.38 \pm 0.17	2.20	10.59 \pm 1.36	14.72	20.32 \pm 2.61	20.00	
187	0.27 \pm 0.04	0.24	0.40 \pm 0.05	0.43	1.57 \pm 0.13	1.68	3.06 \pm 0.24	2.43	12.63 \pm 1.65	14.71	22.52 \pm 2.59	20.00	

Protocol A : One dose per day until sacrifice

Protocol B : One per week until sacrifice

Protocol C : Consecutive dosing for 13 days followed by no-treatment until sacrifice

Protocol D : Irregular dosing (i.e. on days 1, 7, 8, 11, 21, 36, 46, 49, 50, 55, 67, 70 and 85)

Table 6: Comparison of PBPK model predictions (Mod) with experimental data (Exp; mean \pm SEM) on adipose tissue concentrations ($\mu\text{g/ml}$ lipid) of PCBs (congeners 118, 138, 153, 170, 180 and 187) determined on days 41 and 90 in rats administered 5, 50 or 500 $\mu\text{g/kg}$ of each congener according to four protocols.

Protocol	PCB Isomer	Mixture 1 (5 $\mu\text{g/kg}$)		Mixture 2 (50 $\mu\text{g/kg}$)		Mixture 3 (500 $\mu\text{g/kg}$)	
		Exp 90 day	Mod 90 day	Exp 90 day	Mod 90 day	Exp 90 day	Mod 90 day
A	118	2.16 \pm 0.17	2.82	18.71 \pm 1.36	18.61	109.23 \pm 7.45	71.54
	138	2.95 \pm 0.21	3.45	23.07 \pm 1.94	28.26	209.43 \pm 16.55	134.12
	153	3.10 \pm 0.23	3.45	23.99 \pm 2.43	23.60	224.05 \pm 19.98	151.51
	170	3.62 \pm 0.27	4.30	23.46 \pm 2.16	34.48	226.42 \pm 20.21	282.56
	180	2.49 \pm 0.18	3.45	19.96 \pm 1.65	23.61	193.13 \pm 17.48	151.51
	187	2.76 \pm 0.21	3.45	18.20 \pm 1.61	28.26	171.08 \pm 14.42	151.51
B	118	0.29 \pm 0.05	0.59	3.43 \pm 0.18	3.86	18.2 \pm 1.25	14.30
	138	0.30 \pm 0.05	0.59	3.74 \pm 0.23	4.26	20.87 \pm 2.78	32.09
	153	0.31 \pm 0.06	0.47	3.92 \pm 0.27	4.26	20.08 \pm 2.80	20.31
	170	0.32 \pm 0.05	0.59	3.59 \pm 0.18	4.74	20.13 \pm 3.01	27.15
	180	0.24 \pm 0.04	0.59	2.97 \pm 0.19	3.21	18.77 \pm 2.85	20.31
	187	0.26 \pm 0.04	0.47	3.09 \pm 0.20	3.86	15.25 \pm 2.18	20.31
C	118	0.18 \pm 0.03	0.20	1.69 \pm 0.06	1.61	8.92 \pm 0.87	6.40
	138	0.24 \pm 0.04	0.26	2.57 \pm 0.11	2.57	22.39 \pm 2.09	20.33
	153	0.26 \pm 0.04	0.26	2.82 \pm 0.13	2.03	25.58 \pm 2.82	16.10
	170	0.26 \pm 0.04	0.26	2.73 \pm 0.14	2.57	28.66 \pm 3.39	20.33
	180	0.23 \pm 0.04	0.26	2.26 \pm 0.10	1.61	23.56 \pm 2.85	16.10
	187	0.29 \pm 0.04	0.32	2.33 \pm 0.11	2.03	21.53 \pm 2.42	16.10
D	118	0.43 \pm 0.06	0.58	3.44 \pm 0.17	3.64	18.97 \pm 1.39	21.06
	138	0.46 \pm 0.08	0.58	3.82 \pm 0.26	3.64	27.02 \pm 2.80	32.86
	153	0.48 \pm 0.08	0.58	4.02 \pm 0.29	2.98	27.96 \pm 3.21	29.80
	170	0.45 \pm 0.08	0.58	3.93 \pm 0.31	3.64	29.59 \pm 3.63	36.40
	180	0.37 \pm 0.06	0.58	2.98 \pm 0.23	2.98	25.86 \pm 3.50	27.15
	187	0.42 \pm 0.07	0.58	3.20 \pm 0.25	3.29	22.67 \pm 2.78	27.15

Protocol A : One dose per day until sacrifice

Protocol B : One per week until sacrifice

Protocol C : Consecutive dosing for 13 days followed by no-treatment until sacrifice

Protocol D : Irregular dosing (i.e. on days 1, 7, 8, 11, 21, 36, 46, 49, 50, 55, 67, 70 and 85)

Figure legends

Figure. 1 Conceptual representation of the PBPK model used in the present study.

Figure 2. PBPK model simulations of the plasma concentration ($\mu\text{g/g}$ lipid) of PCB-118 in rats receiving (A) $50 \mu\text{g/kg/day}$, (B) $50 \mu\text{g/kg/week}$, (C) $50 \mu\text{g/kg/day}$ for 13 days followed by no-treatment, (D) $50 \mu\text{g/kg}$ on days 1, 7, 8, 11, 21, 36, 46, 49, 50, 55, 67, 70 and 85 of the experiment. The dosing pattern for each of the protocol is indicated with vertical lines on X axis.

Figure 3. PBPK model simulations of the plasma concentration of PCB-118 in terms of $\mu\text{g/g}$ of total lipid (A) or $\mu\text{g/g}$ neutral lipid equivalents (B) in rats receiving $50 \mu\text{g/kg/d}$.

Figure 1

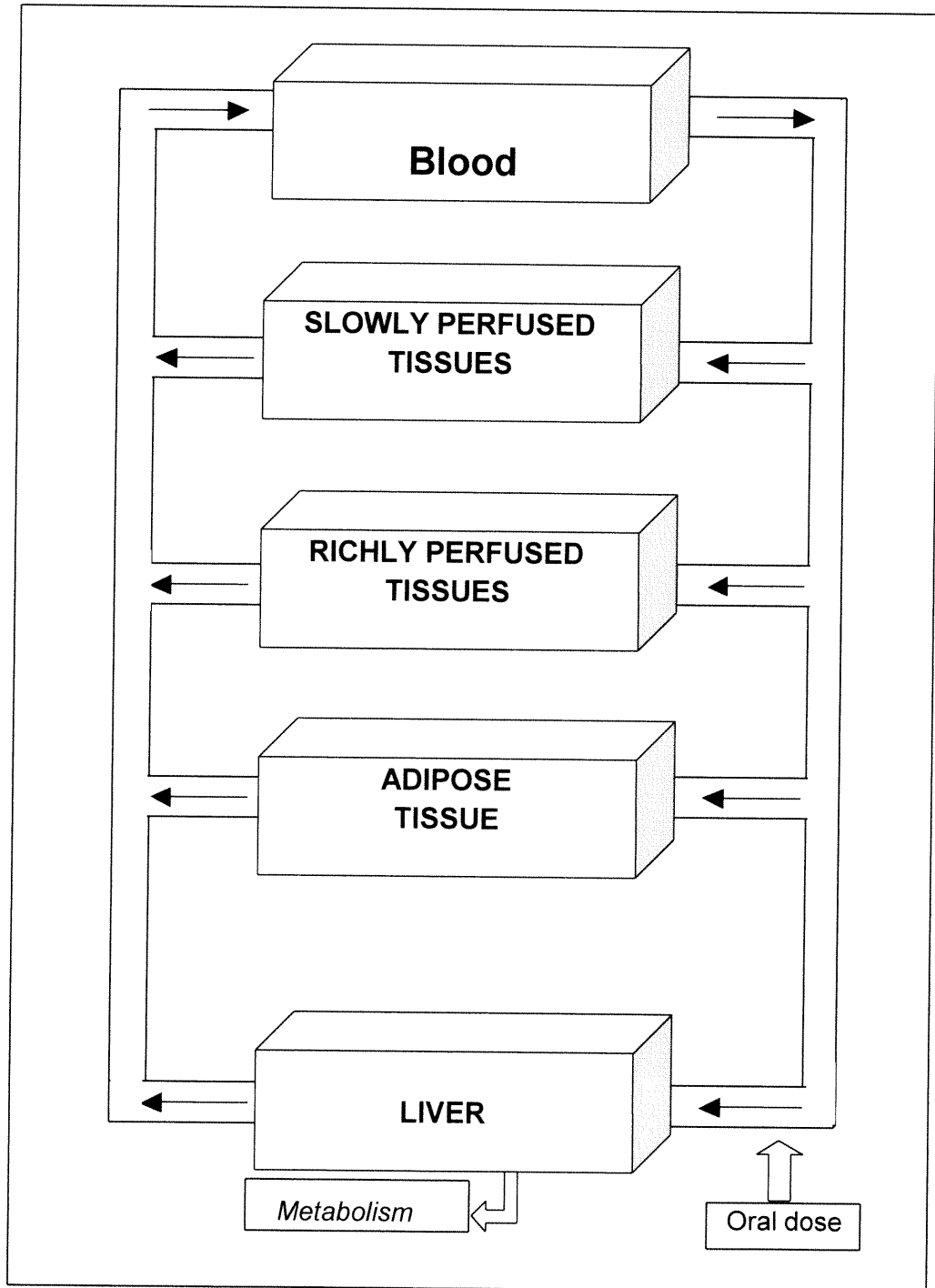


Figure 2

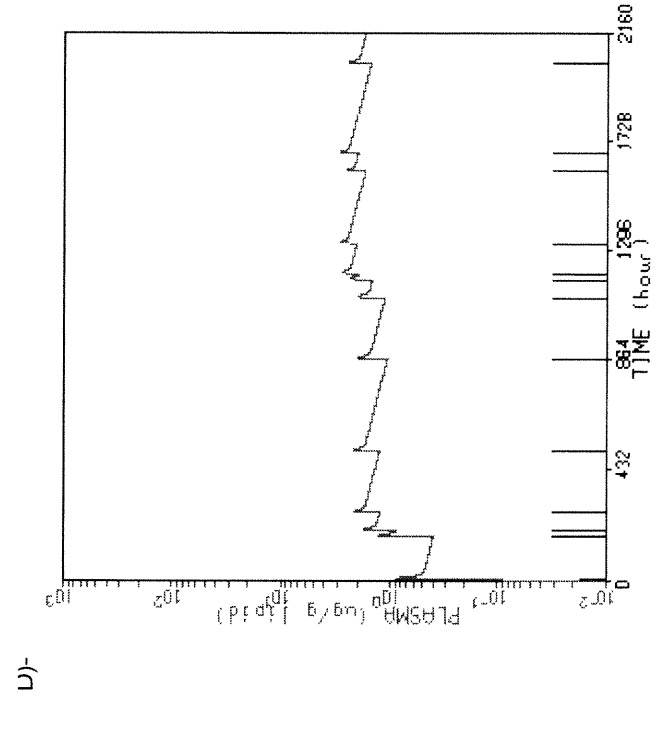
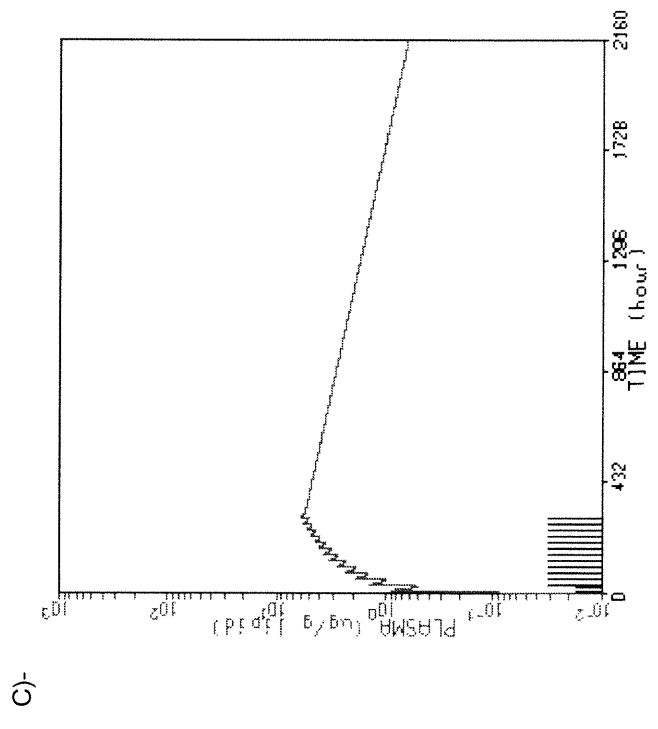
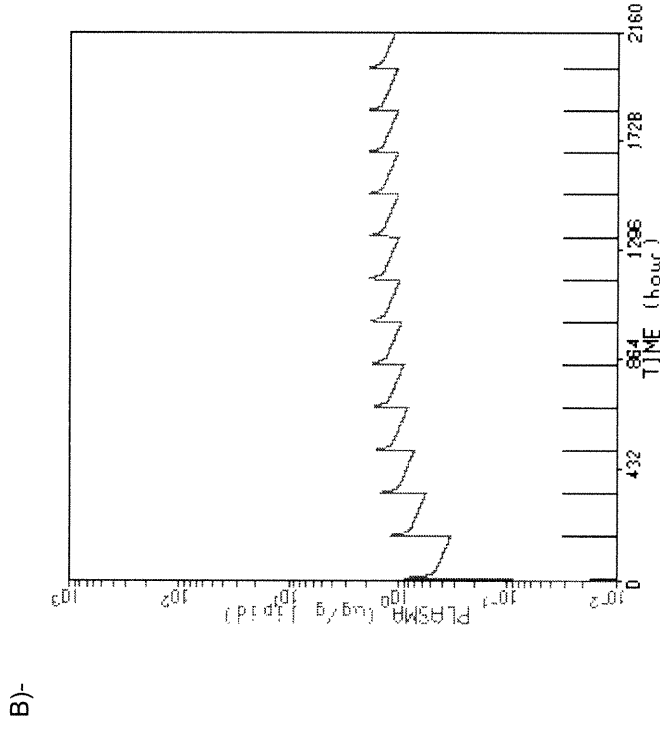
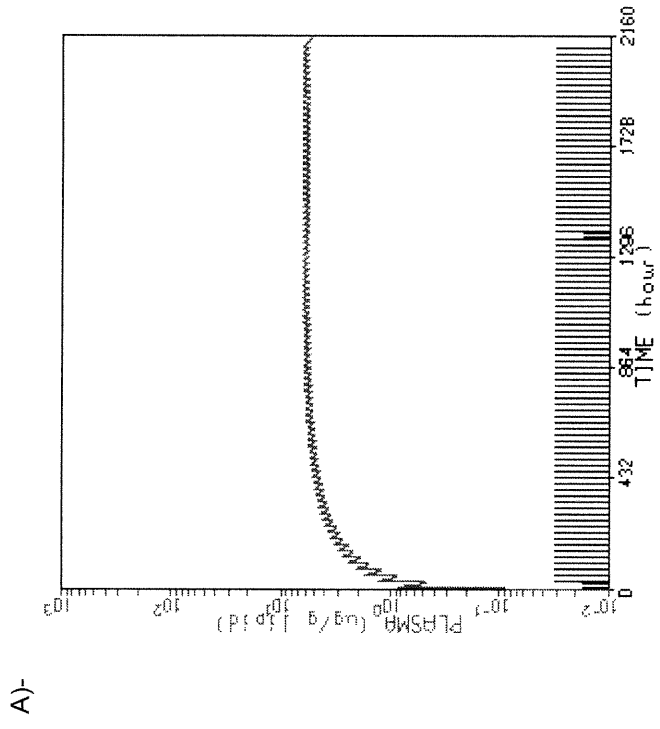
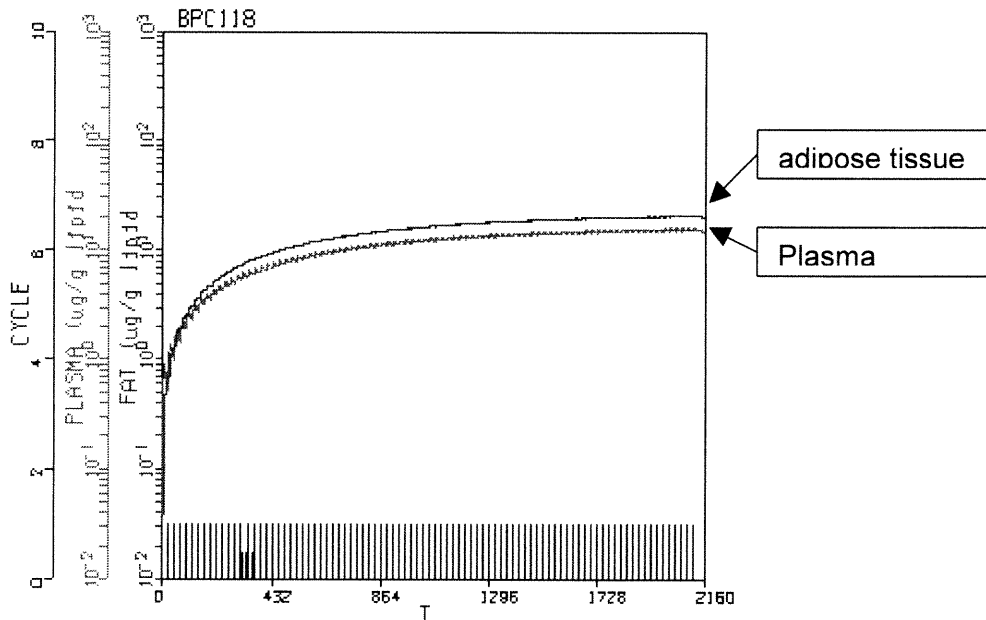
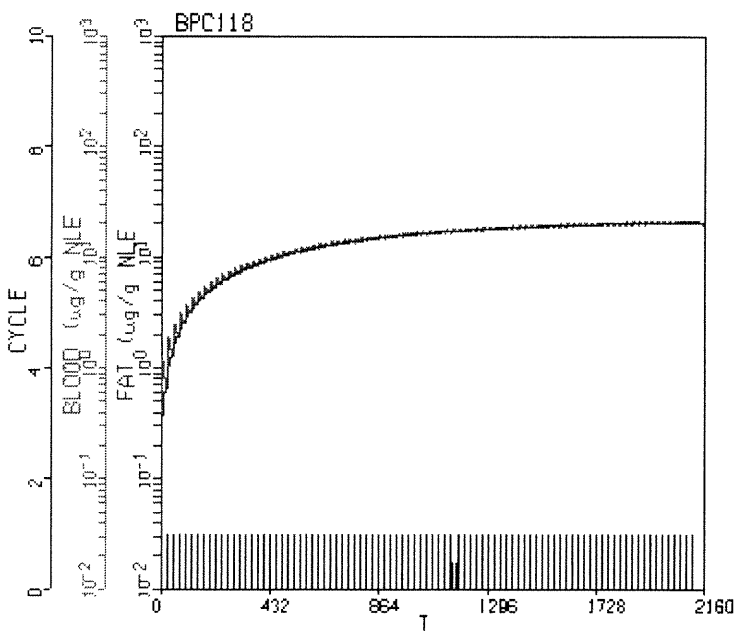


Figure 3

A)-



B)-



Chapitre 4

Article 3

SUBMITTED TO: REGULATORY TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY

Development of reference biomarker concentrations for several organochlorine contaminants using physiologically-based pharmacokinetic models

C. Emond¹, L.H.M. Chan², K. Krishnan¹

¹Groupe de recherche en toxicologie humaine (TOXHUM)
Faculté de Médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

²CINE, McGill University,
Ste-Anne de Bellevue, Québec, Canada

Running Title : PBPK modeling of OCs

Keywords : organochlorines; PBPK modeling; biomarkers; pesticides

Address for correspondence:

Kannan Krishnan,
Département de santé environnementale et santé au travail,
Faculté de médecine, Université de Montréal,
2375 Chemin de la Côte Ste-Catherine, Bureau 4105
Montréal, Québec, Canada, H3T 1A8.
Tel: (514) 343-6581
Fax: (514) 343-2200
e-mail: kannan.krishnan@umontreal.ca

Abstract

The objectives of this study were to develop a lipid content based physiological pharmacokinetic model for persistent organic pollutants (POPs) (e.g. pesticides and PCBs) and to establish the biomarker concentrations (e.g., blood concentrations) of these substances in rats exposed to repeated doses of NOAELs using physiological pharmacokinetic models. The methodology consisted of developing a single physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model for simulating the kinetics of 28 POPs. Since these compounds are all highly lipophilic and have high n-octanol:water partition coefficients, only their solubility in the neutral lipid-like components of tissues and blood was considered. The PBPK model was optimized with blood or hepatic concentrations and validated with hepatic or adipose tissue concentrations obtained in rats exposed to three dose levels of a mixture of 28 POPs over a period of 28 days. The simulated/experimental values ranged from 0.73 to 1.29 for adipose tissue and hepatic concentrations. The validated PBPK model for POPs was used to predict the blood concentrations of hexachlorobenzene, DDT, Mirex and dieldrin at the end of lifetime exposure to NOAELs of these substances. The present study represents the first attempt of using PBPK models to establish reference biomarker concentration (e.g., NOAEL-equivalent blood concentration) for risk assessment purposes.

Introduction

Risk assessment should ideally be based on knowledge of the relationship between external and internal doses of chemicals, and their relationship to toxic effects in humans (Ecobichon, 1996). The conventional approach for health risk assessment uses data on environmental concentrations of chemicals and dose-response data collected in humans or animals. Biomarker data (e.g. blood concentrations adduct levels) are increasingly being collected in exposed populations but are not being used for conducting risk assessments due to the lack of approaches permitting their interpretation in terms of health risk (Ayotte *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1997; Dewailly *et al.*, 1999; Sandau *et al.*, 2000; Bjerregaard *et al.*, 2001). One approach would be establishing the biomarker levels associated with the no-observable adverse effect level (NOAEL) established in chronic animal studies (USEPA, 1986). Such an approach is consistent with current default assumption that similar effects will be observed in animals and humans having the same internal doses.

Biomarker data for several organochlorine pesticides have been collected in human studies but they have not been used for making interpretations of health risk. This is, in part, due to the fact that the reference concentrations of biomarkers for organochlorine pesticides have not been developed using pharmacokinetic models. The development of mechanistic pharmacokinetic models, such as the physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models, for these substances is limited principally due to the lack of tissue:blood partition coefficients and metabolism rate constants (Krishnan and Andersen, 2001).

Organochlorine pesticides, alike PCBs, are highly lipophilic substances whose n-octanol:water partition coefficient (K_{ow}) ranges from 1000 to 10000000. These substances are considered to be persistent organic pollutants (POPs) since they are found to a larger extent in lipid fractions of tissues and blood than in water-like components (Bjerregaard *et al.*, 2001). Consideration of the distribution and re-distribution based on sequestration and release from lipid components of tissues is key to the pharmacokinetic modeling of these substances. Recent studies have given rise to a lipid content based physiological pharmacokinetic model applicable to highly lipophilic chemicals and this modeling approach does not require the estimation or knowledge of tissue:blood partition coefficients (Emond and Krishnan, 2001). According to this approach then PBPK models for organochlorine pesticides and other super-lipophilic contaminants can be developed without the knowledge of tissue:blood partition coefficients. However, their rates of metabolism in intact animals need to be known and such data are not available in the published literature. If the metabolic rates are known, then they can be incorporated within PBPK models to develop reference biomarker levels (e.g., blood concentrations) associated with NOAELs in animals or humans.

The objectives of this study were therefore: (i) to develop metabolic rate constants and incorporate them within a lipid content based physiological pharmacokinetic model for several organochlorine substances (pesticides and PCBs), and (ii) to establish the biomarker concentrations (e.g., blood concentrations) of these

substances in rats exposed to repeated doses of NOAELs using the physiological pharmacokinetic models. The model development was based on an experimental study conducted using a mixture of organochlorine pesticides and PCBs, representative of the dietary exposure of Inuit populations in Quebec.

Materials and Methods

(i) PBPK Modeling of POPs

Model Structure

A single physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model was used to simulate the kinetics of all organohalogen compounds. The structure of the model (shown in Figure 1), essentially consisted of five compartments, namely, blood, fat, liver, richly perfused tissues, and slowly perfused tissues. Since these compounds are all highly lipophilic and have high n-octanol:water partition coefficients, only their solubility in the neutral lipid-like components of tissues and blood was considered. Accordingly, the compartments of the PBPK model corresponded only to the neutral like components of each tissue (Emond and Krishnan 2001) (Table 1).

Model Equations

The rate of change in the amount of POPs in the neutral lipid equivalent (NLE) portion of each tissue compartment $\left(\frac{dAlt}{dt}\right)$ was calculated as follows:

$$\frac{dAlt}{dt} = Qlt(Cla - Clt) \quad (1)$$

where

Cl_a = Chemical concentration in the NLE fraction of arterial blood (ng/ml NLE)

Qlt = Flow of blood NLEs through tissue compartment (ml NLE/hr)

C_{lt} = Chemical concentration in tissue NLEs (ng/ml NLE), which is the same as the concentration in the NLEs of venous blood leaving the tissue compartment expressed as ng/ml NLE

The concentration of POPs in the NLE of tissues (C_{lt}) was calculated with knowledge of the amount of chemical in lipid (A_{lt}) and the volume of lipid in the tissue (V_{lt}) as follows:

$$C_{lt} = \frac{A_{lt}}{V_{lt}} \quad (2)$$

Whereas each of the four tissue compartments was described with the above set of equations, metabolism was additionally accounted for in the liver compartment. A hepatic extraction coefficient (E) was used for calculating the amount metabolized as shown below:

$$\frac{dA_{met}}{dt} = Q_{ll} \times E \times C_{la} \quad (3)$$

where

Q_{ll} = Flow of blood NLEs through liver (ml NLE/hr)

Model parameterization

The physiological parameters required for the rat PBPK model were obtained from literature (Krishnan and Andersen 2001). All parameters (i.e., flows and volumes) were then multiplied with their NLE content (Emond and Krishnan 2001) (Table 2).

The conversions of blood flow rates were done by multiplying values of blood flow in

ml/hr by the fraction of NLE found in blood (ml of NLE/ml of blood). Volumes of tissue compartments were multiplied by their respective NLE (Table 1). Tissue:blood partition coefficients, used in conventional PBPK models, were not used in the present study, because the blood concentration and tissue concentration are expressed on the basis of neutral lipid equivalents, and as such their equilibrium ratio is equal to unity. The lipid content-based pharmacokinetic model then required only the estimates of physiological parameters, oral absorption rate constant and metabolism rates for each POP. The absorption rate constant for all POPs was set to 0.2 hr^{-1} , based on previous modeling studies involving similar substances (Leung et al., 1990; Wang et al. 1997).

The hepatic extraction ratios were obtained by optimization of model to fit blood concentration or alternatively hepatic concentration (when the blood concentration was reported to be below the limit of detection) of various POPs determined in rats exposed to mixtures of these substances for a period of 28 days (See Experimental).

Model Validation

The rat PBPK model for the organohalogen substances developed in the present study was validated by comparing the simulations with experimental data on hepatic concentrations and adipose tissue concentrations of parent chemicals following a 28-day exposure (See Experimental).

Since the model simulations were in terms of ng/ml NLE (C_{lt}) and the experimental data were reported in ng/ml tissue (C_t), before making any comparisons, the simulated data were multiplied by the NLE content of tissues (i.e., V_{nlt}/V_t , listed in last column of Table 1) as follows,

$$C_t = C_{lt} \times \frac{V_{nlt}}{V_t} \quad (4)$$

(ii) Determination of reference biomarker concentrations

The PBPK model developed and validated in this present study was then used to simulate the blood concentration profiles in animals orally exposed to NOAELs of hexachlorobenzene (HCB), DDT, Mirex or dieldrin every day for their entire lifetime. The validated PBPK models for these POPs were used without any change to structure, equations or parameter values while conducting these simulation exercises. NOAELs of these POPs were obtained from the Integrated Risk Information System (IRIS) database of the USEPA (<http://www.epa.gov/iris/>). By providing NOAEL of each chemical as the input to the validated PBPK model, the resulting blood concentration (i.e., reference biomarker concentration) was determined at the end of a lifetime exposure.

(iii) Experimental

The experimental study involved the exposure of rats to mixtures of POPs (organochlorine pesticides and PCBs), corresponding to that found in the Inuit diet (Chan et al., 1997). The data presented in Table 3 correspond to the mean daily intake of POPs by the Inuit population in the Arctic North in Quebec. Table 4 presents the daily doses of the organochlorine pesticides and PCBs given to rats by gavage over a period of 28 days. These doses correspond to 10, 100 and 1000 times the estimated daily dose for the Inuit population.

Chemicals

The following PCBs, i.e., 2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB-28), 2,4,6-trichlorobiphenyl (PCB-32), 2,2',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-99), 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (PCB-101), 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB-105), 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-118); 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl (PCB-128), 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB-138) 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB-153), 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156); 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB-180), 2,2',3,4,4',5,6-heptachlorobiphenyl (PCB-183), 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (PCB-187), 2,2',3,3',4,5,6,6'-octachlorobiphenyl (PCB-199), and fourteen organochlorine pesticide [hexachlorobenzene (HCB), α -hexachlorocyclohexane, β -hexachlorocyclohexane, γ -hexachlorocyclohexane, oxychlordane, *cis*-Chlordane, *trans*-chlordane, *cis*-nanochlor, *trans*-nanochlor, dieldrin, dichlorodipenyldichloroethylene (DDE), dichlorodiphenyltrichloroethane

(DDT), Mirex and toxaphene] were used in the present study. All of them were 99% pure and were purchased from Radian International (Austin, TX).

Animals

Female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Canada Inc. (St-Constant, Quebec, Canada). The animals were acclimated for at least one week prior to use and they weighed between 125-150 g at the time of treatment. The animals were maintained on a 12 hr light/dark cycle under constant temperature and humidity and were fed with regular pelleted rat food (from Purina Rodent Chow) and water *ad libitum*.

Exposure

Rats were randomly divided into four groups and were given: corn oil (control), mixture 1 (10x Inuit daily dietary intake), mixture 2 (100x Inuit daily dietary intake) or mixture 3 (1000x Inuit daily dietary intake) (Tables 3 & 4) each day by gavage for a period of 28 days. Each rat received a single daily gavage dose of the chemicals in 0.5 ml corn oil/100 g body weight. Daily information on body weights, food consumption and water consumption were recorded. Twenty-four hr after the last dose, animals were anaesthetized with isoflurane (Janssen, Toronto, Ontario, Canada) and exsanguinated via abdominal aorta. Liver, blood, and adipose tissues of individual animals were collected for determination of the concentration of all mixture constituents.

Analysis

The method of analysis was identical to that described in Muir *et al.* (1990) and Kuhnlein *et al.* (1995). Briefly, biological samples were extracted with n-hexane followed by removal of lipids by gel permeation chromatography. Florisil chromatography was used to separate organochlorine substances (OCs) into nonpolar, semi polar and polar fractions and analyzed by capillary gas chromatography. A Hewlett-Packard 5890 GC equipped with a ^{63}Ni -ECD (Hewlett-Packard, Mississauga, ON) and a fused-silica column (60 m X 0.25 mm i.d.) coated with a cross-linked, bond phase (DB-5.,J and W scientific, from chromatographic specialties inc, Brockville, ON) was used. Low levels of OCs were confirmed by GC-MS analysis with selective ion monitoring. Recoveries of PCBs and organochlorine pesticides from spiked egg samples were > 95%. Detection limits were generally at 1 ng/g. Coefficients of variation of analysis of duplicate samples were less of 5%.

Results

The blood and tissue concentrations of the 28 organochlorine substances given as a mixture, at three different dose levels, to rats over a period of four weeks are reported in Tables 5-7. The blood concentration data in Table 5 were used for optimization and estimation of the hepatic extraction ratios (E) of the various organochlorine pesticides (Table 8), except in cases where the blood concentration was below the limit of detection. In this situation, fitting was done with hepatic concentration data. Due to the frequent non-detects for the PCBs, the dataset on hepatic concentrations was used for estimating the E values of PCBs (Table 9). The E values obtained by visual optimization varied from 0 to 0.11 for organochlorine pesticides and from 0 to 0.45 for PCB congeners. The majority of the extraction ratios for the POPs in this mixture were 0, i.e., no significant hepatic metabolism occurred. For PCB congeners, specifically, the E value increased with dose: 0.001 to 0.12 for low dose mixture, 0 to 0.28 for mid-dose mixture and 0.00082 to 0.45 for high dose mixture. Maximal hepatic extraction ratios for an organochlorine pesticide were obtained for *cis*-nonachlor with the values being 0.042, 0.027 0.068 for the low, medium and high doses.

Following the determination of the hepatic extraction ratios, they were incorporated within PBPK models to generate a time course of tissue and blood concentrations of POPs in rats. Subsequently, the simulated values were compared with the experimental values obtained following mixture administration on day 28. For blood, the average ratios of simulated/experimental values were 0.38, 0.90 and

1.04, respectively, for the low, medium and high dose groups (Table 5); for liver, the average ratios of simulated/experimental concentrations, in the three treated groups, were 0.80, 0.87 and 1.29 (Table 6) whereas the ratios were 0.73, 0.90 and 1.23 for adipose tissue concentrations (Table 7).

The validated PBPK model for POPs was then used to derive the NOAEL-equivalent of the blood concentrations of hexachlorobenzene, DDT, Mirex and dieldrin at the end of lifetime exposure to NOAELs of these substances. The reference blood concentrations for these substances established using the PBPK models varied as a function of the variability in their NOAELs, since the E value was zero for all of them (Table 10).

Discussion

Several human studies have reported the blood concentrations of persistent organic pollutants but have not interpreted these data due to (i) the lack of reference biomarker data and (ii) lack of a pharmacokinetic model to project the exposure dose from biomarker data. The POPs investigated in this study are of enormous concern to the regulatory community and the general population, but no pharmacokinetic models are available to facilitate the back-calculation of exposure dose or the interpretation of the biomarker data. The present study has contributed to the calculation of the hepatic extraction ratio of several organochlorine substances of concern. Further, this study has incorporated such information along with physiological information to simulate the pharmacokinetics in rats of POPs in mixtures. The PBPK model developed in the present study did not require the use of tissue:blood partition coefficients, and successfully simulated the kinetics of POPs solely on the consideration of distribution in neutral lipid fractions of tissues and blood.

The hepatic extraction ratios were estimated following exposure of rats to a mixture of POPs based on their presence in the diet of Inuits (Chan *et al.*, 1997). As such, the estimated numbers are of relevance for use in PBPK models to simulate the kinetics in rats and humans of the POPs occurring as a mixture. The E value was zero in several cases. Sometimes, the theoretical value of E may be very close to zero and not actually be zero. Considering the variability in the experimental data on blood concentrations, it may be that the real value is somewhere close to zero.

The E value of PCBs are greater than that for the organochlorine pesticides, and they are in general greater at higher doses than at lower doses, indicating the possible role of induction of metabolism at such dose levels.

The establishment of biomarker levels that correspond to $NOAEL_{\text{animal}}$ is a scientifically-sound approach that facilitates the appropriate use of biomarker data collected in exposed human populations. Such reference biomarker levels are not routinely established for environmental contaminants. The present study, for the first time, demonstrated the feasibility of establishing such values for organochlorine substances on the basis of their NOAELs, using PBPK models.

Reference

- Ayotte, P., Dewailly, E., Bruneau, S., and Lebel, G. (1997). PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit livings in Nunavick (Artic Quebec). *Chemosphere* **34**, 1459-1468.
- Bjerregaard, P., Dewailly, E., Ayotte, P., Pars, T., Ferron, L., and Mulvad, G. (2001). Exposure of Inuit in Greenland to organochlorine through the marine diet. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **62**, 69-81.
- Chan, H. M., Berty, P. R., Receveur, O., and Kuhnlein, H. V. (1997). Evaluation of the population distribution of dietary contaminant exposure in an Artic population using monte carlo statistics. *Environ.Health. Perspect.* **105**, 316-321.
- Dewailly, E., Mulvad, G., Pedersen, H. S., Ayotte, P., Demers, A., Weber, J.-P., and Hansen, J. C. (1999). Concentration of organochlorines in human brain, liver, and adipose tissue autopsy samples from Greenland. *Environmental Health Perspectives* **107**, 823-828.
- Ecobichon, D. J. (1996). Toxic effects of pesticides. In *Casarett & Doull's Toxicology The science of poisons* (C. D. Klaassen, M. O. Amdur, and J. Doull, Eds.), pp. 643-689. McGraw-Hill, New York.

- Emond, C. and Krishnan, K., (2001), A physiological pharmacokinetic model based on tissue lipid content for simulating inhalation pharmacokinetics of highly lipophilic volatile organic chemicals Submitted to Toxicology Letters
- Haddad, S., Poulin, P. and Krishnan, K. (2000). Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue:bloods partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere* **40**, 839-843.
- Krishnan, K., and Andersen, M. E. (2001). Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology. In principles and methods of toxicology (A. W. Hayes, Ed.), pp. 193-241. Raven Press, New York.
- Leung, H. W., Paustenbach, D., Murray, F. J., and Andersen, M. E. (1990). A physiological pharmacokinetic description of the tissue distribution and enzyme-inducing properties of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Toxicol and Applied Pharmacol* **103**, 399-410.
- Muir, D. C. G., Ford, A., Grift, N. P., Metner, D. A., and Lockhart, L. (1990). Geographic variation of chlorinated hydrocarbons in burbot (*Lota lota*) from remote lakes and river in Canada. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 530-542.
- Poulin, P., and Krishnan, K. (1996). Molecular structure-based prediction of the partition coefficients of organic chemicals for physiological pharmacokinetic models. *Toxicology Methods* **6**, 117-137.

- Ryan, J. J., Dewailly, E., Gilman, A., Lalibert, Ayotte, P., and Rodrigue, J. (1997).
Dioxin-like compounds in fishing people from the lower North Shore of the
St. Lawrence River, Quebec, Canada. *Arch. of Environ. Health* **52**, 309-316.
- Sandau, C. D., Ayotte, P., Dewailly, E., Duffe, J., and Norstrom, R. J. (2000).
Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other
chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit.
Environ. Health. Perspect. **108**, 611-616.
- USEPA. The risk Assessment Guideline of 1986. EPAV600V8-87-045. 1986.
- Wang, X., Santostefano, M. J., Evans, M. V., and Richardson, V. M. (1997).
Determination of parameters responsible for pharmacokinetic behaviour of
TCDD in Female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*
147, 151-168

Table 1: Lipid contents of rat tissues and blood

Tissue	Neutral lipid ^a	Phospholipids ^a	Neutral lipid equivalent (NLE) ^b
Blood	0.0013	0.0020	0.0019
Adipose tissue	0.8530	0.0020	0.8536
Liver	0.0350	0.0250	0.0425
Richly perfused tissues	0.0350	0.0250	0.0425
Slowly perfused tissues	0.0090	0.0100	0.0117

^a Data from Poulin and Krishnan (1996).

^b Calculated as the sum total of the volume fraction of neutral lipids and 0.3 times the phospholipid fraction in tissues (Haddad *et al.*, 2000).

Table 2 : Physiological parameters of the rat PBPK model ^a

Parameter ^b	Abbreviation	Unit	Values
Cardiac output	Qc	ml _{lipid} /hr	9.5
Blood flow to compartments			
Adipose tissue	QF	ml _{lipid} /hr	0.85
Liver	QL	ml _{lipid} /hr	2.36
Richly perfused tissues	QR	ml _{lipid} /hr	4.82
Slowly perfused tissues	QS	ml _{lipid} /hr	1.42
Volumes of compartments			
Blood	VB	ml _{lipid}	0.04
Adipose tissue	VF	ml _{lipid}	15.53
Liver	VL	ml _{lipid}	0.44
Richly perfused tissues	VR	ml _{lipid}	0.55
Slowly perfused tissues	VS	ml _{lipid}	2.04

^a Obtained from Krishnan and Andersen (2001).

^b The values obtained from Krishnan and Andersen (2001) were multiplied by the NLE for each compartment (Table 1).

Table 3: Inuit dietary intake of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls (PCBs)¹

Substances	Inuit dietary intake ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$)
α -hexachlorocyclohexane	0.10
Hexachlorobenzene	0.09
β -Hexachlorocyclohexane	0.01
γ -hexachlorocyclohexane	0.001
Oxychlordane	0.14
trans-Chlordane	0.005
cis-Chlordane	0.01
trans-Nonachlor	0.11
DDE	0.34
Dieldrin	0.09
cis-nonachlor	0.05
DDT	0.09
Mirex	0.005
Toxaphene	1.12
PCB-28	0.01
PCB-32	0.04
PCB-99	0.04
PCB-101	0.06
PCB-105	0.01
PCB-118	0.06
PCB-128	0.005
PCB-138	0.09
PCB-153	0.13
PCB-156	0.004
PCB-180	0.04
PCB-183	0.02
PCB-187	0.02
PCB-199	0.005

¹ PCBs are identified according to the International Union of Pure and Applied Chemists' (IUPAC) nomenclature.

Table 4: Dose levels ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) of organochlorine substances administered as mixtures by gavage to rats during 28 days.

Substances	Mixture 1	Mixture 2	Mixture 3
α -Hexachlorocyclohexane	1.09	10.90	109.00
Hexachlorobenzene	0.94	9.36	93.60
β -Hexachlorocyclohexane	0.10	1.04	10.40
γ -Hexachlorocyclohexane	0.01	0.96	9.60
Oxychlordane	1.44	14.40	144.00
trans-Chlordane	0.05	0.48	4.80
cis-Chlordane	0.13	1.28	12.8
trans-Nonachlor	1.09	10.92	109.20
DDE	3.39	33.9	339.00
Dieldrin	0.92	9.20	92.00
cis-Nonachlor	0.45	4.48	44.80
DDT	0.90	9.04	90.40
Mirex	0.05	0.48	4.80
Toxaphene	11.2	112.4	1124.0
PCB-28	0.12	1.20	12.00
PCB-32	0.40	4.00	40.00
PCB-99	0.44	4.40	44.00
PCB-101	0.61	6.08	60.80
PCB-105	0.10	1.04	10.40
PCB-118	0.60	6.00	60.00
PCB-128	0.05	0.52	5.20
PCB-138	0.89	8.88	88.80
PCB-153	1.28	12.80	128.00
PCB-156	0.04	0.44	4.40
PCB-180	0.38	3.80	38.00
PCB-183	0.17	1.72	17.20
PCB-187	0.16	1.60	16.00
PCB-199	0.05	0.52	5.20

Table 5: Comparison of experimental data (Exp; ng/ml) with PBPK model simulations (Sim.) of blood concentrations of several organochlorine substances in rats exposed to different mixtures.

Mixture constituents	Mixture 1 ^a		Mixture 2 ^a		Mixture 3 ^a	
	Exp ^b	Sim	Exp ^b	Sim	Exp ^b	Sim
α -Hexachlorocyclohexane	ND ^c	0.55	2.4± 1.6	2.40	43.7±10.5	43.70
Hexachlorobenzene	0.7 ± 0.3	0.70	9.3± 1.9	7.00	68.8±16.6	69.70
β -Hexachlorocyclohexane	0.1 ± 0.1	0.08	0.1± 0.0	0.10	0.0±0.0	7.74
γ -hexachlorocyclohexane	0.7 ± 0.2	0.07	0.8± 0.2	0.71	8.5±6.5	7.15
Oxychlordane	5.2 ± 4.8	1.07	18.8± 6.7	10.71	149.9±27	107
trans-Chlordane	0.9 ± 0.3	0.03	ND	0.08	9.8±9.8	3.34
cis-Chlordane	0.2 ± 0.1	0.095	0.2± 0.2	0.20	0.7±0.6	0.70
trans-Nonachlor	1.2 ± 0.8	0.81	10.1± 1.7	8.13	33.0±6.57	33.4
DDE	5.5 ± 2.5	2.52	50.1± 6.9	25.2	264.7±55	252
Dieldrin	2.8 ± 1.6	0.68	8.7± 3.3	6.85	32.9±16.1	68.50
cis-nonachlor	ND	0.07	1.1± 0.7	1.13	4.4±0.7	4.42
DDT	8.4 ± 3.4	0.67	24.3± 3.1	6.73	89.1±18.9	67.30
Mirex	0.1 ± 0.1	0.036	0.6± 0.2	0.36	12.7±2.5	3.57
Toxaphene	ND	7.18	ND	43.1	ND	223
PCB-28	0.1±0.08	0.046	1.1±0.2	0.21	2.1±0.5	1.60
PCB-32	ND	0.02	0.4±0.37	0.062	ND	0.30
PCB-99	0.2 ± 0.12	0.25	4.6±0.82	3.28	28.4±3.02	31.40
PCB-101	ND	0.07	1.7±0.65	0.67	5.2±0.86	3.99
PCB-105	0.1±0.08	0.05	0.6±0.08	0.37	3.4±0.2	3.00
PCB-118	0.3±0.08	0.28	4.2±0.2	2.74	26.1±1.6	24.5
PCB-128	0.1±0.04	0.024	0.4±0.2	0.22	2.1±0.2	1.75
PCB-138	ND	0.54	7.9±0.6	6.41	47.9±4.7	44.80
PCB-153	0.4±0.24	0.60	8.3±0.5	7.56	53.4±5.6	65.37
PCB-156	ND	0.018	ND	0.22	1.6±0.7	2.19
PCB-180	ND	0.24	3.1±0.2	2.20	21.7±1.8	19.3
PCB-183	ND	0.096	0.8±0.24	0.89	6.9±0.5	7.80
PCB-187	ND	0.11	1.3±0.45	0.96	10.3±0.9	8.3
PCB-199	ND	0.006	0.1±0.04	0.03	0.1±0.1	0.17

^a Dose levels of mixture constituents are given in Table 4

^b Experimental data represent mean ± SEM (n = 6)

^c ND =not detected

Table 6: Comparison of experimental data (Exp; ng/ml) with PBPK model simulations (Sim.) of hepatic concentrations of several organochlorine substances in rats exposed to different mixtures.

Mixture constituents	Mixture 1 ^a		Mixture 2 ^a		Mixture 3 ^a	
	Exp ^b	Sim	Exp ^b	Sim	Exp ^b	Sim
α -Hexachlorocyclohexane	12.5 \pm 2	12.30	121.2 \pm 8	54.26	1021 \pm 103	968
Hexachlorobenzene	20.9 \pm 3	15.60	249.5 \pm 40	156	2347.8 \pm 283	1559
β -Hexachlorocyclohexane	ND ^c	1.73	ND	2.10	ND	173
γ -Hexachlorocyclohexane	0.4 \pm 0.1	1.60	2.5 \pm 0.2	16.00	8.7 \pm 2	160
Oxychlordane	39.2 \pm 6	24.00	328.8 \pm 48	240	1399.7 \pm 178	2399
trans-Chlordane	2.3 \pm 0.5	0.75	1.8 \pm 0.2	1.80	1.0 \pm 0.2	75
cis-Chlordane	1.3 \pm 0.3	2.13	1.1 \pm 0.2	4.45	1.9 \pm 0.5	14.25
trans-Nonachlor	11.1 \pm 1.2	18.20	125.5 \pm 18	182	223.4 \pm 64	733
DDE	83.6 \pm 13	56.50	648.0 \pm 100	565	2592.1 \pm 430	5649
Dieldrin	19.3 \pm 6	15.30	64.5 \pm 22	153	166.4 \pm 33	1533
cis-Nonachlor	1.6 \pm 0.2	1.60	15.5 \pm 3	24.5	36.4 \pm 13	92.6
DDT	50.8 \pm 7	15.00	309.3 \pm 40	151	811.4 \pm 63	1506
Mirex	1.6 \pm 0.6	0.80	26.5 \pm 4	8.00	111.3 \pm 11	80
Toxaphene	160 \pm 49	160	950 \pm 130	950	4820 \pm 560	4823
PCB-28	1.0 \pm 0.2	1.00	4.4 \pm 0.2	4.51	34.2 \pm 5	34.00
PCB-32	0.4 \pm 0.3	0.40	1 \pm 0.2	1.00	4.0 \pm 1.1	4.00
PCB-99	5.6 \pm 0.7	5.60	77.8 \pm 14	73.30	702.8 \pm 77	702.8
PCB-101	1.4 \pm 0.1	1.40	14.1 \pm 1	14.10	81.4 \pm 12	81.3
PCB-105	1.0 \pm 0.1	1.10	8 \pm 1	8.00	66.4 \pm 5.1	66.20
PCB-118	6.2 \pm 1	6.20	60.6 \pm 7	60.70	542.5 \pm 39	542.5
PCB-128	0.5 \pm 0.2	0.50	4.9 \pm 1	4.83	38.3 \pm 12	38.5
PCB-138	12.1 \pm 2	12.10	143.9 \pm 33	143.50	994.7 \pm 362	995
PCB-153	13.2 \pm 2	13.20	168.7 \pm 4	168.40	1452.3 \pm 500	1452
PCB-156	0.4 \pm 0.2	0.40	4.9 \pm 1.4	4.90	48.9 \pm 15	48.7
PCB-180	5.4 \pm 1	5.40	48.2 \pm 9	48.20	428.8 \pm 44	428.8
PCB-183	2.1 \pm 0.2	2.13	19.8 \pm 4	19.89	172.8 \pm 17	172.7
PCB-187	2.5 \pm 0.3	2.50	21.3 \pm 4	21.30	184.7 \pm 19	185
PCB-199	0.1 \pm 0	0.12	0.7 \pm 0.2	0.70	3.2 \pm 0.4	3.2

^a Dose levels of mixture constituents are given in Table 4

^b Experimental data represent mean \pm SEM (n = 6)

^c ND =not detected

Table 7: Comparison of experimental data (Exp; ng/ml) with PBPK model simulations (Sim.) of fat concentrations of several organochlorine substances in rats exposed to different mixtures.

Mixture constituents	Mixture 1 ^a		Mixture 2 ^a		Mixture 3 ^a	
	Exp ^b	Sim	Exp ^b	Sim	Exp ^b	Sim
α -Hexachlorocyclohexane	403±109	252	3586±751	1190	27488±4830	20214
Hexachlorobenzene	597±175	312	6745±1983	3123	47800±8618	31233
β -Hexachlorocyclohexane	ND ^c	35	ND	51	ND	3470
γ -Hexachlorocyclohexane	25±16	32	73±20	320	339±59	3203
Oxychlordane	726±229	481	7505±1410	4805	33849±8529	48051
trans-Chlordane	49±15	15	85±53	40.45	46±11	1495
cis-Chlordane	21±4	43	61±34	102	106±25	393
trans-Nonachlor	239±51	364	2731±562	3643	8550±1974	15649
DDE	2303±571	1131	17643±3749	11312	95664±23272	113121
Dieldrin	499±173	307	2216±448	3070	4888±817	30699
cis-Nonachlor	40±8	36.46	422±98	534	1716±351	2272
DDT	728±159	300	4453±1002	3016	20972±3686	30165
Mirex	14±4	160	119±25	160	551±103	1601
Toxaphene	3660±2987	3241	13280±4040	19933	97690±15300	107482
PCB-28	19±6	21	158±38	102	1091±169	796
PCB-32	5±2	11	35±10	45	226.4±31	263
PCB-99	97±29	113	930±248	1468	8830.8±1679	14110
PCB-101	33±7	35	334±59	339	2236.1±320	2157
PCB-105	20±4	22	159±32	171	1262.7±196	1420
PCB-118	124±31	128	1278±269	1257	10256.2±1655	11317
PCB-128	96±87	11	74.7±17	101	546.5±96	816
PCB-138	217±53	245	2024±422	2878	13383.1±2420	20444
PCB-153	236±61	274	2514±538	3424	19945.4±3631	29810
PCB-156	8±3	8	76±17	102	596±102	1000
PCB-180	49±16	110	558±125	982	4878.3±913	8792
PCB-183	18±5	44	191±42	408	1600.2±287	3575
PCB-187	42±13	51	259±56	434	2256.7±404	3793
PCB-199	4±3	3	12±3	19	77.6±11	104

^a Dose levels of mixture constituents are given in Table 4

^b Experimental data represent mean ± SEM (n = 6)

^c ND =not detected

Table 8: Hepatic extraction ratios of organochlorine substances estimated by optimization of PBPK model simulations to blood concentration data obtained in rats administered three different mixture during 28 days.

Mixture Constituents	Mixture 1 ^a	Mixture 2 ^a	Mixture 3 ^a
α -Hexachlorocyclohexane	0.008 ^b	0.03	0.0136
Hexachlorobenzene	0	0	0
β -Hexachlorocyclohexane	0	0.07	0
γ -Hexachlorocyclohexane	0	0	0
Oxychlordane	0	0	0
trans-Chlordane	0	0.0375 ^b	0
cis-Chlordane	0	0.043	0.11
trans-Nonachlor	0	0	0.021
DDE	0	0	0
Dieldrin	0	0	0
cis-Nonachlor	0.042 ^b	0.027	0.068
DDT	0	0	0
Mirex	0	0	0
Toxaphene	0.003 ^b	0.01485 ^b	0.0351 ^b

^a Dose levels of mixture constituents are given in Table 4.

^b Estimated by fitting to hepatic concentrations.

Table 9: Hepatic extraction ratios of organochlorine substances estimated by optimization of PBPK model simulations to hepatic concentration data obtained in rats administered three different mixture during 28 days.^a

Mixture constituents	Mixture 1 ^b	Mixture 2 ^b	Mixture 3 ^b
PCB-28	0.015	0.04	0.052
PCB-32	0.12	0.28	0.45
PCB-99	0.0055	0	0.00082
PCB-101	0.06	0.062	0.096
PCB-105	0.01	0.017	0.0225
PCB-118	0.01	0.0105	0.0132
PCB-128	0.01	0.0125	0.0183
PCB-138	0.004	0.0006	0.0082
PCB-153	0.01	0.0048	0.009
PCB-156	0.013	0.008	0.0085
PCB-180	0.003	0.0055	0.00806
PCB-183	0.006	0.0075	0.0107
PCB-187	0.001	0.0044	0.0075
PCB-199	0.06	0.095	0.165

^a Estimated by fitting to hepatic concentrations.

^b Dose levels of mixture constituents are given in Table 4.

Table 10 : Blood concentrations corresponding to the chronic NOAELs of several organochlorine substances

COMPOUNDS	NOAEL ^a (mg/kg/d)	Blood concentration ^b (µg/L)
Hexachlorobenzene	0.08	1550
Σ DDT	0.05	969
Mirex	0.07	1356
Dieldrin	0.005	97

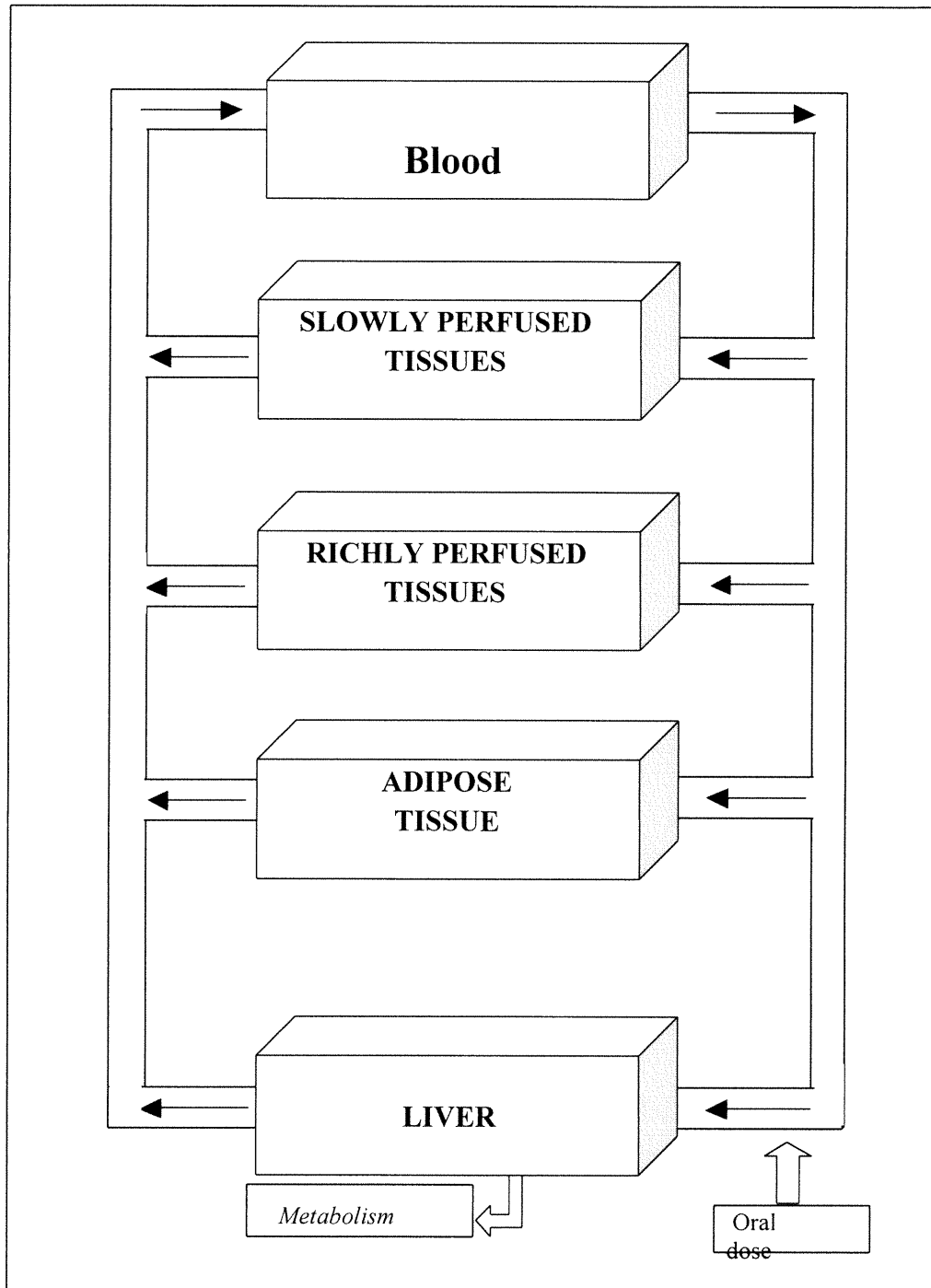
^a The NOAELs were for liver effect and were obtained from EPA's IRIS database

^b Determined at the end of a lifetime exposure to daily dose of NOAEL.

Figure legends

Figure. 1 Conceptual representation of the PBPK model used in the present study.

Figure 1



Chapitre 5

Article 4

Submitted to: *Toxicology Methods*

**A PHARMACOKINETIC ALGORITHM FOR PREDICTING THE BLOOD
CONCENTRATION OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS IN EXPOSED
BIOTA**

Claude Emond and Kannan Krishnan

Groupe de recherche en toxicologie humaine (TOXHUM)
Faculté de médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

Abbreviated title: Pharmacokinetic algorithm

Key words: Lipophilic organics; blood concentrations; pharmacokinetics; steady-state; equilibrium distribution model

Address for correspondence:

Kannan Krishnan,
Département de santé environnementale et santé au travail,
Faculté de médecine, Université de Montréal,
2375 Chemin de la Côte Ste-Catherine, Bureau 4105
Montréal, Québec, Canada, H3T 1A8.
Tel: (514) 343-6581,
Fax: (514) 343-2200.
e-mail: kannan.krishnan@umontreal.ca

ABSTRACT

Several complex pharmacokinetic models have been developed for persistent organic pollutants (POPs) but there is no algebraic approach that enables the calculation of blood concentration from exposure data. The objectives of the present study were to develop and validate an algorithm for relating exposure dose to the blood concentrations of POPs, based on pharmacokinetic considerations. The algorithm developed in this study facilitated the calculation of the blood concentrations as the ratio of the absorbed dose to the sum of distribution volume and hepatic clearance. Whereas the distribution volume was set equal to the volume of neural lipid equivalents (NLEs) found in the body, the hepatic clearance was calculated with the knowledge of the rate of blood NLE flow to the liver and the hepatic extraction ratio (E). The validation of the algorithm for predicting the blood concentration (C_b ; $\mu\text{g/L}$ NLE) of POPs from the knowledge of exposure scenario and exposure dose was performed in two steps. First, the calculated C_b for various POPs possessing different E values were compared with the simulations of PBPK models. Then, the validated algorithm was then applied to calculate the biomarker concentration (i.e., blood concentration) that is associated with daily exposure to NOAEL of some organochlorine pesticides (i.e., dieldrin, DDT, Mirex and hexachlorobenzene). A linear relationship between the NOAELs of these substances and the calculated blood concentrations at the end of a life-time exposure was observed. These observations were consistent with those generated using a validated PBPK

model. The simple mechanistic algorithm developed in this study should be useful in screening and prioritizing the POPs based on their accumulation characteristics and for developing reference biomarker data for risk assessment purposes.

INTRODUCTION

Persistent organochlorine substances find their way along the food chain and bioaccumulate principally in the lipidic tissues of exposed individuals. These chemicals have been found to occur in the biological fluids and tissues of various sectors of the human population around the world (Kazen *et al.*, 1974; Dewailly *et al.*, 1993;1999; Feeley *et al.*, 2000; Gerstenberger *et al.*, 2000; Paumgarten *et al.*, 2000; Waliszewski *et al.*, 2000). Their intrinsic characteristics such as the high liposolubility, low volatility and low metabolism rate lead to their persistence in the body. The class of persistent organic pollutants (POPs) includes priority pollutants such as the polychlorinated biphenyls, and pesticides which include 1,1,1-trichloro-2,2'-bis(p-chlorophenyl)ethane [DDT], 1,1-dichloro-2,2'-bis(p-chlorophenyl)ethylene [DDE], cyclodienes (e.g., aldrin, dieldrin, chlordane and endrin) and chlorinated benzenes and cyclohexanes (e.g. hexachlorobenzene [HCB], hexachlorocyclohexane [HCH] (Pohl *et al.*, 2000). These chemicals have found extensive use between mid-1940s and mid-1960s, and are still found in breast milk, plasma and adipose tissues of people because of their persistence in the environment and biomagnification through human food chain.

Several animal studies have shown that reproductive and developmental effects are associated with exposure to POPs (Sauer *et al.*, 1994; Osius *et al.*, 1999). Suggestive evidence of association of POP exposure with endocrine disturbance is also found in the literature (Jansen *et al.*, 1993; Wolff and Toniolo, 1995; Safe, 1998; Osius *et al.*,1999; Aoki, 2001). Several authors have attempted to verify

the causal relationship between breast cancer risk and with exposure to POPs (Aroson *et al.*, 2000; Millikan *et al.*, 2000; Romieu *et al.*, 2000; Stellman *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000). The information on exposure in such studies have either come from the knowledge of the daily activities of individuals, or from measures of the blood concentrations of POPs. The blood concentrations of POPs measured in these recent studies are the result of body reserves of these chemicals related to the past exposure via food chain or other environmental sources.

The association of current blood concentrations of POPs to their past or net exposure can be done using a pharmacokinetic modeling approach. Even though several complex pharmacokinetic models have been developed for the POPs (Leung *et al.*, 1990; Wang *et al.* 1997), there is no algebraic approach or an algorithm that either enables the calculation of blood concentration from exposure data or vice versa.

The objectives of the present study were to develop and validate an algorithm for relating exposure dose to the blood concentrations of POPs, based on pharmacokinetic considerations.

METHODOLOGY AND RESULTS

DEVELOPMENT OF ALGORITHM

Highly lipophilic substances upon administration and absorption (i.e., input), are distributed in various tissues of the body and may be removed from the body by processes of elimination (e.g., urinary excretion, hepatic metabolism, pulmonary exhalation).

If we assume that the body is a homogenous mass, the mass balance equation is as follows:

$$Dose \times F = Q_{tt_{distribution}} + Q_{elimination} \quad (1)$$

Dose	= Exposure dose at the site of absorption
F	= Fraction of dose absorbed
$Q_{tt_{distribution}}$	= Amount of parent chemical in the body, and
$Q_{tt_{elimination}}$	= Amount of parent chemical leaving the body

By default, for new and uncharacterized chemicals, F can be set to 1. Therefore

$$Dose = Q_{tt_{distribution}} + Q_{tt_{elimination}} \quad (2)$$

or

$$Dose = (C_{body} \times V_{body}) + Q_{tt_{elimination}} \quad (3)$$

where

C_{body} = Average concentration in the body, and

V_{body} = Volume of distribution (equal to the volume of soft tissues)

Average concentration in the body is not a useful measure, and it is also difficult to estimate. However, C_{body} and V_{body} can be rewritten as a function of the various non-homogenous compartments, namely fat (F), liver (L), richly perfused tissues (R), slowly perfused tissues (S) and blood (B) as follows:

$$C_{\text{body}}V_{\text{body}} = C_F V_F + C_L V_L + C_R V_R + C_S V_S + C_B V_B \quad (4)$$

where the C terms refer to concentration and the V terms refer to volumes. The subscripts F, L, R, S and B refer to fat, liver, richly perfused tissues, slowly perfused tissues and blood.

Combining Eqn. 2 and Eqn. 4,

$$\text{Dose} = C_F V_F + C_L V_L + C_R V_R + C_S V_S + C_B V_B + Q_{\text{t}} t_{\text{elimination}} \quad (5)$$

For highly lipophilic organic chemicals, the pulmonary and urinary excretion pathways are unlikely to be important. As such, for these chemicals, metabolism in liver is likely to be the most important of the elimination pathways. Accordingly, $Q_{\text{t}} t_{\text{elimination}}$ in Eqn. 5 can be replaced with the amount metabolized ($Q_{\text{t}} t_{\text{elimination}}$) calculated as follows:

$$Q_{\text{t}} t_{\text{elimination}} = Q_l \times E \times C_B \quad (6)$$

where

QI = Rate of blood flow to the liver (L/hr), and
E = Hepatic extraction ratio (unitless)

Combining Eqns. 5 and 6,

$$Dose = C_F V_F + C_L V_L + C_R V_R + C_S V_S + C_B V_B + QI \times E \times C_B \quad (7)$$

Assuming that highly lipophilic substances would concentrate only in tissue neutral lipids, (i) the C terms in Eqn. 7 can be set equal to concentration in neutral lipids, and (ii) the V terms are set equal to the volume of neutral lipid-equivalent (NLE) fractions in tissues (Emond and Krishnan, 2001). That will yield the following equation:

$$Dose = C_{IF} V_{IF} + C_{IL} V_{IL} + C_{IR} V_{IR} + C_{IS} V_{IS} + C_{IB} V_{IB} + QI \times E \times C_{IB} \quad (8)$$

Since (i) the chemical concentrations in neutral lipid fractions of tissues (except the metabolizing tissue, i.e., liver) and blood are likely to be the same, and (ii) the liver concentrations are related to blood concentrations by a factor of (1-E) (Pelekis et al., 1997), the above Eqn. was rearranged as follows:

$$Dose = C_{IB} [V_{IF} + V_{IL} + V_{IR} + V_{IS} + V_{IB}] + QI \times E \times t \quad (9)$$

The V terms in the above equation may require the use of more than one value particularly if one considers time-dependent changes in body weight and tissue volumes. Therefore, V_{IF} , V_{IL} , V_{IR} , V_{IS} and V_{IB} in the above Eqn. were replaced with the following equation that facilitated the calculation of tissue lipid volumes (V_{IT}) as a function of fractional volume of NLE in tissues ($Frac_t_LIP$), fractional volume of tissue (F_V_{tissue}) and body weight (BW) (Table 1):

$$V_{IT} = Frac_t_LIP \times F_V_{tissue} \times BW \quad (10)$$

The above type of eqn. permits the calculation of compartment-specific NLE volumes as a function of changing body weight. Combining Eqns. 9 and 10, and replacing $Frac_t_LIP \times F_V_{tissue} \times BW$ with $FV_{T_NLE} \times BW$, result in the following algorithm:

$$C_{B_LIP} = \frac{Dose}{(FV_{F_NLE} \times BW) + (FV_{I_NLE} \times BW(1-E)) + (FV_{R_NLE} \times BW) + (FV_{S_NLE} \times BW) + (FV_{B_NLE} \times BW) + (Q_{ll} \times Ext)} \quad (11)$$

Eqn. 11 can be used to calculate the blood lipid concentrations of highly lipophilic organic chemicals, provided the lipid contents of tissues, body weight, liver blood flow rate, hepatic extraction ratio and the dose administered are known.

Validation of the algorithm

The validation of the algorithm developed in the present study (i.e., Eqn 11) for predicting the blood concentration (C_b) of POPs ($\mu\text{g/L NLE}$) from the knowledge of exposure duration and dose was performed in two steps. The first one involved the calculation of C_b of POPs for varying E values, and the comparison of such values with the C_b obtained using physiological pharmacokinetic models (Emond *et al.*, 2001a). For performing these calculations, the data on lipid contents of rat tissues and blood were obtained from literature (Table 1), whereas the other parameters were set equal to those of an experimental study involving PCB exposures (Emond *et al.* 2001a) (Table 2). Table 3 presents a comparison of the calculated and simulated values of C_b for POPs of varying E . The simpler pharmacokinetic algorithm provided comparable numbers as the complex, physiological pharmacokinetic model.

The second step in the validation process was to generate the time-course of blood concentration of PCB-170 during 90 days in rats exposed daily to $5 \mu\text{g/kg}$ body weight and compare it to experimental data (Emond *et al.*, 2001a). The comparisons presented in Figure 1 suggest that the blood concentrations determined on days 41 and 90 were essentially within the range of blood concentrations calculated using the algorithm developed in the present study. By using E values of 0 and 0.0017 (Emond *et al.*, 2001a), this envelope of blood concentration for PCB-170 was obtained.

The validated algorithm was then applied to calculate the biomarker concentration (i.e., blood concentration) that is associated with daily exposure to NOAEL of several organochlorine pesticides (dieldrin, DDT, Mirex, and hexachlorobenzene). A linear relationship between the NOAELs of these substances and the calculated blood concentrations at the end of a life-time exposure was observed (Figure 2). The calculated concentrations obtained using Eqn. 11 were comparable to the simulated concentrations obtained using validated PBPK models (Emond *et al.*, 2001b) (Figure 3). These results suggest that the simple algorithm developed in this study is useful for establishing the quantitative relationship between the administered dose and the blood concentration of POPs that are not metabolized to a significant extent.

DISCUSSION

Even though the production and dispersion of persistent organic pollutants (POPs) in the environment has been regulated in a number of industrialized nations, accumulation of these substances in biota is a reality as evidenced by their presence serum, blood and milk (Dewailly, 1991;1993; Craan *et al.* 1998; Ramos *et al.*, 2000; Romieu *et al.*,2000; Saeed *et al.*, 2000). The relationship between the concentrations of these chemicals detected in biological fluids and the exposure dose is not routinely possible because of the lack of appropriate pharmacokinetic models. One simple approach is to relate the biomarker levels (e.g., blood concentration) to exposure dose with knowledge of volume of distribution and clearance parameters. The current study developed such a tool for the first time for POPs and validated it using data on PCB-170 obtained with a complete PBPK model.

The denominator of Eqn. 11 developed in this study reflects the contribution of the volume of distribution as well as the hepatic clearance factors. The hepatic clearance is determined by liver blood flow rate and hepatic extraction ratio. The volume of distribution, in conventional terms, represents the total volume equivalent of blood in which the chemical is distributed. In the present study, the volume of distribution was set equal to the volume of neutral lipid equivalents (NLEs) in the body. Hypothetically, such an approach is acceptable if the distribution of substances in the other tissue components is negligible which is

the case with POPs. The blood concentration (expressed on the basis of NLEs), should then be a function of hepatic clearance and the total volume of NLEs in the body. The relative importance of these parameters depends on the exposure scenario and type of chemicals considered. For example, if the chemical is not metabolized significantly (i.e., $E = 0$) or if the clearance term is much smaller compared to the volume of distribution, then Eqn 11 becomes:

$$C_{B_LIP} = \frac{Dose}{(FV_{total_NLE} \times BW)} \quad (12)$$

On the other hand, if the exposure occurs for a long period, and if the E value is not equal to 0, then the clearance term in the denominator of Eqn. 11 becomes dominant such that,

$$C_{B_LIP} = \frac{Dose}{(Ql \times E \times t)} \quad (13)$$

The hepatic extraction coefficients for various POPs are very low (Ritschel *et al.*, 1998; Emond *et al.*, 2001). The E value ranges between 0 to 0.1 for six PCBs (i.e. 118, 138, 153, 170, 180, 187) (Emond and Krishnan, 2001b). Similar extraction ratios were observed for organochlorine pesticides (data not shown). For these relatively persistent substances then, regardless of their molecular structure and nature, the blood concentrations are likely to follow the numbers

presented in Table 3. If two POPs have the same E values, then they will likely have the same blood concentrations since the lipid volumes in the exposed individual are the same regardless of the chemical. This aspect has been validated by comparing the calculations performed in the present study with the PBPK model simulations for DDT, dieldrin, hexachlorobenzene and Mirex.

Using an E value of 0 in Eqn. 11, one can make projections of the possible blood and tissue concentrations that are likely to be observed following exposure to POPs. These calculations will simply reflect the dilution of the chemical in the neutral lipid pool of the body, which can change as a function of body weight and age. These aspects are also facilitated by Eqn 11 since body weight is an explicit input parameter.

The pharmacokinetic algorithm developed in the present study provides essentially the same results as the complete PBPK model, particularly for longer exposure periods. This is a result of the fact that both the PBPK model and the present algorithm use tissue volumes and blood volumes expressed on the basis of their NLE content, both of them do not use the tissue:blood partition coefficients, and both of them use the same hepatic extraction ratios. The PBPK model, however, additionally, requires the data on tissue blood flow rates to solve the differential equations for generating predictions of blood concentrations of POPs. But, the algorithm developed in the present study, is an algebraic equation that provides the concentration as a function of the dose administered

and the amount of NLE in the body along with the appropriate consideration of hepatic clearance. Such simple approaches are likely to be adequate for calculation of blood concentration associated with chronic exposure to compounds that are not metabolized to a significant extent, which is the case with most POPs.

Overall, the present study developed a simple pharmacokinetic algorithm for relating blood concentrations of POPs to their exposure dose. This algorithm can be used for back-calculating the exposure dose from blood concentrations measured in human studies, or for providing *a priori* predictions of blood concentrations of POPs even before the exposure occurs. Such a mechanistic tool should be useful in screening and prioritizing the POPs based on their accumulation characteristics and for interpreting the available biomarker data for risk assessment purposes.

Reference

- Aoki, Y. (2001). Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters - what we have learned from Yusho disease. *Environ.Res.* **86**, 2-11.
- Aroson, K. J., Miller, A. B., Woolcott, C. G., Sterns, E. E., McCreedy, D. R., Fish, E. B., Hiraki, G. Y., Lickley, L. A., Holloway, C., Ross, T., Hanna, W. M., Sengupta, S. K., and Weber, J.-P. (2000). Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Central European J. and Public Health* **9**, 55-63.
- Craan, A. G., and Haines, D. A. (1998). Twenty-five years of surveillance for contaminants in human breast milk. *Arch.Environ.Contam Toxicol* **35**, 702-710.
- Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Lalibert, Muir, D. G., and Norstrom, R. J. (1993). Inuit exposure to organochlorine through the aquatic Food Chain in Arctic Quebec. *Environ. Health Perspectives* **101**, 618.
- Dewailly, E., Mulvad, G., Pedersen, H. S., Ayotte, P., Demers, A., Weber, J.-P., and Hansen, J. C. (1999). Concentration of organochlorines in human

brain, liver, and adipose tissue autopsy samples from Greenland.

Environ. Health Perspectives **107**, 823-828.

Dewailly, E., Weber, J. P., Gingras, S., and Laliberte, C. (1991). Coplanar PCBs in human milk in the province of Quebec, Canada: are they more toxic than dioxin for breast fed infants? *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **47**, 491-498.

Emond, C., and Krishnan, K., (2001), A physiological pharmacokinetic model based on tissue lipid content for simulating inhalation pharmacokinetics of highly lipophilic volatile organic chemicals. (Submitted)

Emond, C., Charbonneau, M., and Krishnan, K., (2001a), Physiologically-based modeling of the accumulation in plasma and tissue lipids of a mixture of PCB congeners in female Sprague-Dawley rats (Submitted)

Emond, C., Chan L.H.M., and Krishnan, K., (2001b), Development of reference biomarker concentrations for several organochlorine contaminants using physiologically-based pharmacokinetic models (in preparation)

Feeley, M., and Brouwer, A. (2000). Health risks to infants from exposure to PCBs, PCDDs and PCDFs. *Food Addit. Contam.*, **17**, 325-333.

Gerstenberger, S. L., Dellinger, J. A., and Hansen, L. G. (2000). Concentrations and frequencies of polychlorinated biphenyl congeners in a Native

American population that consumes Great Lakes fish. *J. Toxicol. Clin.Toxicol.* **38**, 729-746.

Jansen, H. T., Cooke, P. S., Porcelli, J., Liu, T. C., and Hansen, L. G. (1993). Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: in vitro and in vivo studies. *Reprod.Toxicol.* **7**, 237-248.

Kazen, C., Bloomer, A., Welch, R., Oudbier, A., and Price, H. (1974). Persistence of pesticides on the hands of some occupationally exposed people. *Arch.Environ.Health* **29**, 315-318.

Leung, H. W., Paustenbach, D., Murray, F. J., and Andersen, M. E. (1990). A Physiological Pharmacokinetic description of the Tissue distribution and enzyme-inducing properties of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* **103**, 399-410.

Millikan, R., DeVito, E., Duell, E. J., Tse, C. K., Savitz, D. A., Beach, J., Edmiston, S., Jackson, S., and Newman, B. (2000). Dichlorodiphenyldichloroethene, polychlorinated biphenyls, and breast cancer among African-American and white women in North Carolina. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**, 1233-1240.

Osius, N., Karmaus, W., Kruse, H., and Witten, J. (1999). Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in children. *Environ. Health Perspect.* **107**, 843-849.

- Paumgarten, F. J., Cruz, C. M., Chahoud, I., Palavinskas, R., and Mathar, W. (2000). PCDDs, PCDFs, PCBs, and other organochlorine compounds in human milk from Rio de Janeiro, Brazil. *Environ.Res.* **83**, 293-297.
- Pohl, H. R., and Tylanda, C. A. (2000). Breast-feeding exposure of infants to selected pesticides: a public health viewpoint. *Toxicol. Ind. Health* **16**, 65-77.
- Ramos, L., Hernandez, L. M., and Gonzalez, M. J. (2000). Study of the distribution of the polychlorinated biphenyls in the milk fat globule by supercritical fluid extraction. *Chemosphere* **41**, 881-888.
- Ritschel, W. A., and Kearns, G. L. (1998). *Handbook of basic pharmacokinetics ... including Clinical Applications*. American Pharmaceutical Association.
- Romieu, I., Hernandez-Avila, M., Lazcano-Ponce, E., Weber, J. P., and Dewailly, E. (2000). Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. *Am.J.Epidemiol.* **152**, 363-370.
- Safe, S. H. (1998). Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 121-158.

- Saeed, T., Sawaya, W. N., Ahmad, N., Rajagopal, S., Dashti, B., and al Awadhi, S. (2000). Assessment of the levels of chlorinated pesticides in breast milk in Kuwait. *Food Addit. Contam* **17**, 1013-1018.
- Stellman, S. D., Djordjevic, M. V., Britton, J. A., Muscat, J. E., Citron, M. L., Kemeny, M., Busch, E., and Gong, L. (2000). Breast cancer risk in relation to adipose concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**, 1241-1249.
- Sauer, P. J., Huisman, M., Koopman-Esseboom, C., Morse, D. C., Smits-van Prooije, A. E., van de Berg, K. J., Tuinstra, L. G., van der Paauw, C. G., Boersma, E. R., and Weisglas-Kuperus, N. (1994). Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins on growth and development. *Hum. Exp. Toxicol.* **13**, 900-906
- Waliszewski, S. M., Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., and Siliceo, J. (2000b). Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud Publica Mex.* **42**, 384-390.
- Waliszewski, S. M., Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., Silva, C. S., and Siliceo, J. (2001). Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz, Mexico. *Arch. Environ. Contam Toxicol.* **40**, 432-438.

- Wang, X., Santostefano, M. J., Evans, M. V., and Richardson, V. M. (1997).
Determination of parameters responsible for pharmacokinetic behaviour
of TCDD in Female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. and Applied
Pharmacol.* **147**, 151-168
- Ward, E. M., Schulte, P., Grajewski, B., Andersen, A., Patterson, D. G., Jr.,
Turner, W., Jellum, E., Deddens, J. A., Friedland, J., Roeleveld, N.,
Waters, M., Butler, M. A., DiPietro, E., and Needham, L. L. (2000).
Serum organochlorine levels and breast cancer: a nested case-control
study of Norwegian women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**,
1357-1367.
- Wolff, M. S., and Toniolo, P. G. (1995). Environmental organochlorine exposure
as a potential etiologic factor in breast cancer. *Environ. Health
Perspect.* **103** Suppl 7, 141-145.

Table 1. Volume fraction of tissues and neutral lipids in tissues of rats ^a

Tissue compartment	$F_{V_{\text{tissue}}}$ ^b	Frac_t_LIP ^c	FV_{t_NLE} ^d	$FV_{t_NLE} \times (BW)$ ^e
Blood	0.08	0.0019	0.000152	$1.52 \times 10^{-4} \times (BW)$
Adipose	0.07	0.8536	0.059752	$5.97 \times 10^{-2} \times (BW)$
Richly perfused tissues	0.05	0.0425	0.002125	$2.12 \times 10^{-3} \times (BW)$
Slowly perfused tissues	0.67	0.0117	0.007839	$7.84 \times 10^{-3} \times (BW)$
Liver	0.04	0.0425	0.00170	$1.70 \times 10^{-3} \times (BW)$
			$FV_{\text{total_NLE}}$ ^e	$7.16 \times 10^{-2} \times (BW)$

^a Data were obtained from Krishnan and Andersen (2001)

^b Fraction of volume of tissue compartment (unitless)

^c Fraction of neutral lipid equivalent (L NLE/L tissue)

^d Fraction of volume of tissue compartment in term of neutral lipid equivalents (NLE/kg)

^e Volume of NLE in tissues as a function of body weight (NLE/kg)

Table 2. Numerical values of parameters used for the calculation of maximal blood concentration of persistent organic pollutants (POPs) in the rat.

Parameter	Symbol	Value
Body weight (kg)	Bw	0.225
Number of doses	Nb dose	90
Hepatic flow ($L_{\text{lipid}}/\text{hr}$)	QII	0.00236
Time of sacrifice (hr)	t	2160

Table 3 Relationship between calculated blood concentration (C_{blood_cal}) and simulated blood concentration obtained with PBPK models (C_{blood_sim})^a

E ^b	C _{blood_cal} (μg/L NLE)	C _{blood_sim} (μg/L NLE)
0	6.28	6.22
0.0001	6.23	6.20
0.001	6.21	6.05
0.01	5.60	4.80
0.1	2.71	1.09

^a Exposure scenario involved daily administrations of 50 μg/kg for lifetime of rats.

^b Hepatic extraction ratio

Figure 1 Blood concentration (C_{lb}) of PCB-170 following daily dosing of rats with 5 µg/kg. The calculated C_{lb} values are plotted as a series of symbols (diamonds E=0; squares E = 0.0017). Experimental data (▲) are from Emond et al. (2001) for days 41 and 90.

Figure 2 Comparison between exposure dose corresponding to NOAEL (mg/kg/d) and calculated blood concentration (µg/L NLE) in rats at the end of a lifetime exposure.

Figure 3 Relationship between blood concentration (C_{lb}, µg/L lipid NLE) calculated using the algorithm developed in this study and the simulations of PBPK models.



Figure 1

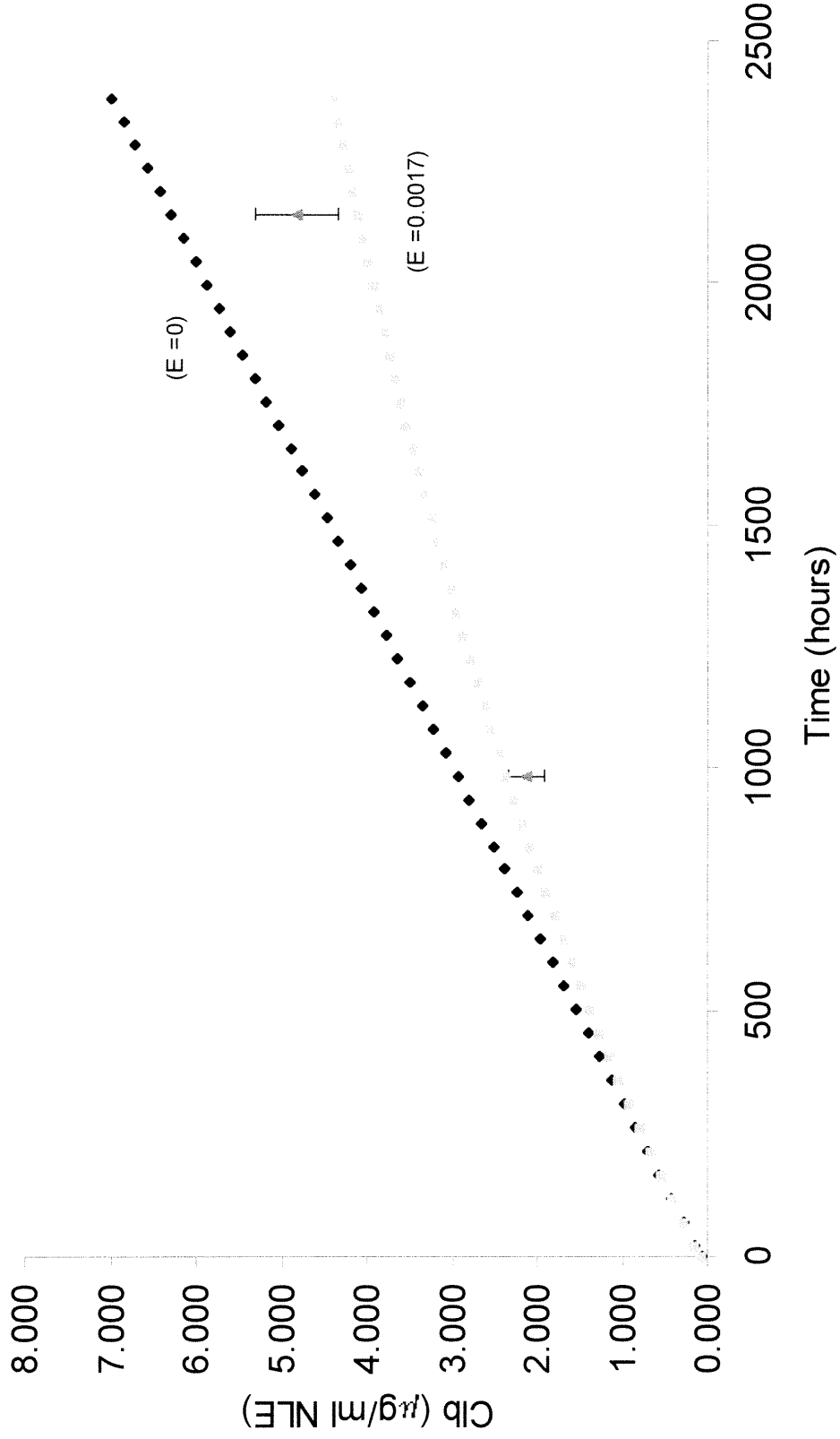


Figure 2

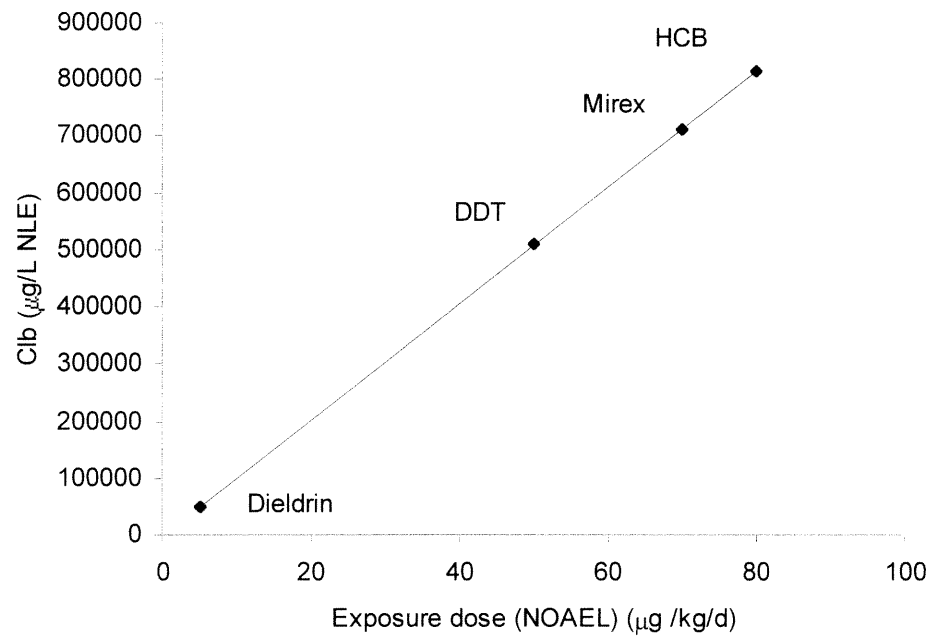
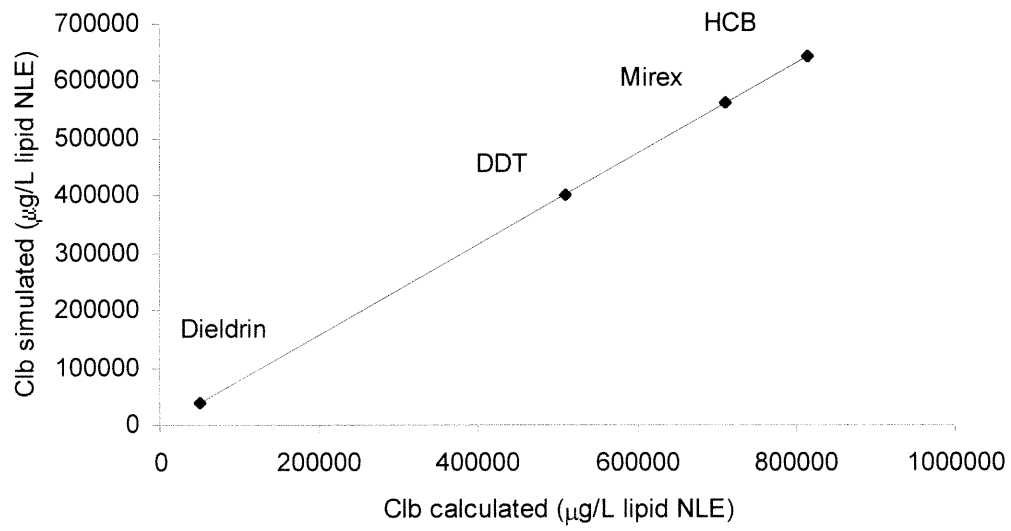


Figure 3



Chapitre 6

Discussion générale

Discussion générale

Durant les années 1970-80, l'industrialisation a permis la dispersion dans l'environnement de grandes quantités de composés que l'on nomme polluants organiques persistants (POPs), tels que des pesticides organochlorés, des BPC, des métaux ainsi que des composés organiques volatiles et non-volatiles. La prise de conscience et l'apparition de problèmes toxicologiques à la fin des années 1970 et le début des années 1980 causé par la pollution a résulté en une diminution substantielle de l'émission de ces substances. Néanmoins, les composés rejetés dans l'environnement se sont accumulés dans les espèces biologiques et les sédiments.

À cause de leur grande stabilité, ces substances sont peu dégradés dans l'environnement par réactions chimiques, physiques ou biologiques. De plus, les composés présents dans les sédiments se retrouvent par l'entremise des invertébrés ou encore des poissons de fond, à remonter la chaîne alimentaire jusqu'aux mammifères et à l'homme. Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, au Canada, les concentrations dans les fluides biologiques ont diminué sur une période de 25 ans. Cependant, il faut préciser que cette diminution a été inférieure à la baisse des quantités introduites dans l'environnement. Deux causes expliquent cette tendance, d'abord certains pays en voie de développement utilisent toujours des produits dont l'utilisation est bannie dans les pays

industrialisés (e.g. DDT) et la charge dans les sédiments et le biota, est encore suffisamment importante pour favoriser une exposition par la chaîne alimentaire.

Un autre point préoccupant est la présence de concentrations importantes de POPs dans les tissus de mammifères et chez l'humain dans des régions où ces produits n'ont jamais été utilisés. Plusieurs études ont démontré que les Inuits et les mammifères du grand Nord québécois ont des teneurs en BPC et en pesticides organochlorés plus importantes que chez les populations plus au sud (Dewailly *et coll.* 1989).

Par conséquent, le développement d'outils permettant de faciliter une évaluation du risque à la santé humaine dû aux composés organiques persistants reste une priorité pour de nombreux chercheurs. L'évaluation du risque pour des composés non-cancérogènes repose sur l'établissement de la NOAEL issue généralement d'expériences animales. La NOAEL est extrapolée de l'animal à l'homme en utilisant des facteurs d'incertitude basés sur les caractéristiques de l'étude et pour dériver par exemple une dose de référence (RfD). La RfD représente un niveau d'exposition pour lequel l'homme peut être exposé durant toute sa vie sans voir apparaître d'effets délétères. Cependant, la relation entre la dose d'exposition et la réponse observée ne permet pas d'établir une relation directe avec l'organe cible. En effet, la détermination de cette relation

nécessite la prise en compte des processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion.

L'établissement de biomarqueurs tels que nous les connaissons se veut davantage une méthode évaluative que prédictive, c'est à dire que la méthode des biomarqueurs, telle qu'elle est utilisée aujourd'hui, ne fait qu'évaluer une concentration dans le fluide biologique des populations dans une courte fenêtre i.e. dans un temps précis. Néanmoins, on peut comparer cette concentration à celles mesurées dans d'autres populations. Mais une telle utilisation d'un indicateur n'a qu'une portée limitée.

Il est aujourd'hui bien établi que le meilleur indicateur de la réponse de toxicité observée est la concentration du produit mère ou du métabolite actif dans le tissu de l'organe cible. Les scientifiques sont aussi d'accord avec l'idée que la concentration présente dans un tissu cible aura un effet similaire chez l'humain et l'animal, sauf dans les cas où il est prouvé que des mécanismes propres à une des deux espèces réduisent ou augmente l'action du toxique *in situ*. Le pour les chercheurs, le développement d'outils de comparaison entre la dose interne et la réponse physiologique reste donc une priorité pour un grand nombre de substances.

L'approche encore la plus utilisée pour établir une relation entre la dose interne et la réponse toxique est basée sur l'expérimentation animale,

laquelle nécessite le sacrifice d'une grande quantité d'animaux de laboratoire. La tendance aujourd'hui est de trouver des méthodes alternatives qui permettent de limiter l'utilisation d'animaux de laboratoire. Les études *in vitro* dans lesquelles sont établies des relations dose/réponse font partie de ces méthodes. Il faut être conscient que ces outils ont une portée limitée, car ils ne tiennent pas compte de l'influence de processus tels que l'absorption et la distribution. Les relations pouvant être établies sont donc limitées.

Un autre outil est disponible aujourd'hui, avec l'arrivée d'ordinateurs personnels de plus en plus performants. Il s'agit de la modélisation toxicocinétique à base physiologique qui consiste en une description mathématique de mécanismes impliqués dans la pharmacocinétique (soit ADME) dans le temps. Cet outil a été privilégié dans cette recherche. La modélisation comme, elle a été décrite dans l'introduction, comporte un certain nombre d'avantages. La modélisation pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) a l'avantage de pouvoir générer des concentrations internes pour différents scénarios d'expositions pour différentes voies d'exposition.

Toutefois, un inconvénient de la modélisation PBPK est qu'elle nécessite la connaissance de nombreux paramètres physiologiques, biochimiques et physicochimiques mesurés expérimentalement ou déterminés par un

algorithme. Par exemple, un modèle simple à 4 compartiments comporte entre 15 et 20 paramètres. Or, la valeur de chacun de ces paramètres est sujette à une certaine incertitude. Développer une méthodologie permettant de limiter le nombre de paramètres limitera donc la présence de facteurs d'incertitudes et augmentera ainsi la qualité des valeurs prédictives du modèle.

Le modèle proposé dans cette recherche élimine les coefficients de partage (tissus:sang) et réduit par le fait même la présence d'incertitudes reliées à ces paramètres. L'application de ce modèle vaut pour des composés volatils et non volatils reconnus comme étant hautement lipophiles. Les modèles antérieurs pour cette classe de composés comportaient des coefficients de partages très variables souvent compris entre 100 et 1000. Ces paramètres étaient obtenus par expérimentation animale, par algorithme ou tout simplement par ajustement du modèle.

Ici, il est proposé d'éliminer ces paramètres physico-chimiques en décrivant chaque compartiment par sa fraction lipidique. La description d'un modèle basée sur des lipides totaux nous oblige toutefois à utiliser un coefficient de partage n-octanol:eau, car les phospholipides contenus dans les compartiments comportent une partie hydrophile. Pour pallier à cette difficulté, ce modèle uniformise les lipides responsables de la distribution

de composés hautement lipophiles en incorporant un concept d'équivalence de lipide que l'on nomme équivalence de lipide neutre (NLE).

La validité de ce nouveau modèle a été démontrée pour des composés volatils tels que le n-hexane, le α -pinène, le 1,2,4 triméthylbenzène et la d-limonène (Emond and Krishnan. 2001).

Les expositions environnementales, impliquent très souvent la présence non pas d'un produit unique, mais d'un mélange de composés à des concentrations variables. Pour répondre à la réalité des expositions environnementales, le modèle a donc été validé avec des données expérimentales obtenues chez les rats exposés à un mélange de BPC (Article II). Les BPC utilisés dans le mélange sont principalement des mono-ortho et di-ortho reconnus pour leur persistance dans le matériel biologique. Il est clair qu'avec les résultats obtenus, les lipides contrôlent la distribution de ces composés qui se distribuent essentiellement dans le lipides.

Une autre validation a été faite avec un mélange de pesticides et de BPC (soit 28 composés) présents dans l'environnement, faisant partie des POPs, et se retrouvant à des concentrations diverses dans les tissus biologiques. Les doses utilisées correspondent à 10X, 100X et 1000X les doses quotidiennes ingérées par les populations Inuits du Nord québécois.

Ces doses d'expositions provenaient d'une étude antérieure (Chan *et al.*, 1997). Les simulations obtenues et validées avec ces composés (voir article III) démontrent encore une fois l'importance des lipides de l'organisme dans la distribution des composés hautement lipophiles.

Il faut cependant être réaliste, même si la toxicité d'un grand nombre de composés est bien décrite par leur lipophilicité, d'autres produits tels que les PCDD (e.g. 2,3,7,8-TCDD), qui sont aussi des composés hautement lipophiles, ne se comportent pas comme les autres POPs du moins à des doses de 10 ng/kg/j et plus. Cependant, pour des doses faibles (1 ng/kg/j), Carrier (1991) a démontré, avec les données de Kociba *et al.* (1978), que la distribution de 2,3,7,8-TCDD dans le tissu adipeux pouvait atteindre près de 62% de la charge corporelle (Carrier, 1991; Kociba *et coll.*, 1978). Pour des composés tels que les PCDD, il faudra donc considérer l'impact de processus biologiques tels que la liaison protéique, la diffusion limitée dans le cas d'exposition ponctuelle et l'application, de façon plus mécanistique, des notions d'inductions enzymatiques, non couvertes de façon systématique dans notre recherche.

La charge corporelle est une notion correspondant à la quantité maximale que peut contenir un organisme vivant avec une dose donnée. La cinétique classique décrit déjà la concentration dans le sang selon l'équation $[(Cb = \text{dose} / Vd)]$ où (Cb) correspond à la concentration sanguine, (dose) à

la dose d'exposition et (V_d) au volume de distribution. Sachant que le taux d'extraction pour des composés hautement lipophile tels que les BPC et les pesticides est faible, il a été possible de développer dans cette thèse un algorithme basé sur l'équivalence de lipide neutre contenue dans les différents compartiments de l'organisme, et démontré comme ayant un rôle majeur dans la distribution, pour prédire la concentration maximale que peut contenir des espèces données, exposées de façon chronique. L'article 4 présente une comparaison entre la charge corporelle calculée avec l'algorithme et la charge corporelle simulée pour différents coefficients d'extraction.

Pour des composés organiques hautement lipophiles (COHL), il est bien établi qu'ils se distribuent principalement dans les fractions lipidiques des compartiments tissulaires. Or, les membranes cellulaires sont constituées de lipides dans lesquelles on retrouve des protéines structurales et enzymatiques, impliquées dans la biotransformation. Il est aussi démontré que les COHL se lient aux membranes cellulaires et les déstabilisent. La conséquence évidente sera la perturbation des processus métaboliques et de transport qui modulent habituellement la fluidité de la membrane biologique. Les conséquences probables pourront générer un changement de l'intégrité de la cellule, des perturbations dans le métabolisme enzymatique, ou une modification dans l'épaisseur de la membrane cellulaire ce qui affectera le transport dans la cellule (e.g. diffusion passive,

transport actif). Par conséquent, la reconnaissance du rôle joué par la fraction lipidique dans la distribution de ces composés permet une modélisation des COHL en limitant la complexité du compartiment aux structures qui sont essentielles.

Dans cette recherche, il a été démontré que la fraction équivalente de lipide pouvait être utilisée pour décrire la distribution dans un contexte de modélisation toxicocinétique à base physiologique. Il a été démontré que le tissu adipeux et les fractions lipides dans les tissus sont les principaux réservoirs de stockage des composés hautement lipophiles. Deux cas de validation pour des mélanges environnementaux ainsi qu'un algorithme basé sur une équivalence de lipide neutre sont présentés. Ce travail démontre une réalité importante à savoir, que pour une même dose d'un mélange de composés (tels que les BPC en mélange de l'article II), la concentration en ug/g lipide NLE sera la même, peu importe les tissus considérés.

Ces résultats de recherche auront une application principalement en évaluation du risque et en modélisation. En modélisation, car elle diminue l'incertitude sur au moins 4 paramètres, en ne considérant pas les coefficients de partages tissus:sang, et; simplifiera l'utilisation du coefficient de partage sang:air par l'utilisation du coefficient octanol:air (article I). L'évaluation du risque à l'aide de ce modèle basé sur la fraction lipide va

permettre de simuler la distribution des composés organiques hautement lipophiles en mélange. Ceci ouvre la porte à une notion d'équivalence de toxicité (TEQ) similaire à celle déjà proposée pour les TCDD.

La contribution de cette recherche facilitera la compréhension de la pharmacocinétique des composés. En effet, des études sur des composés anesthésiques organiques hydrophobes ont montré une relation entre la concentration toxique de ces produits et le Kow. Ainsi McCarthy (1992) a proposé une équation dans laquelle, l'auteur prédit la toxicité pour un log Kow entre 1,5 et 6. Il existe, un seuil pour lequel la toxicité exprimée par la LC50 est constante lorsque le Kow croît.

Cette recherche n'a pas la prétention de prétendre que tout est expliqué par la seule utilisation des fractions lipidiques pour des COHL. Cependant, elle démontre très clairement que les lipides contribuent de façon hautement significative à la distribution des COHL dans les tissus biologiques. Cette recherche démontre aussi que l'on peut décrire la distribution des COHL dans la matrice lipidique d'un mammifère, en tenant compte de physiologie, et ainsi prédire le devenir de composés organiques hautement lipophiles.

Chapitre 7
Bibliographie

Bibliographie

- Albro, P. W., and Fishbein, L. (1972). Intestinal absorption of polychlorinated biphenyls in rats. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **8**, 26-31.
- Ali, I. B., Joiris, C. R., and Holsbeek, L. (1997). Polychlorinated biphenyls in Barents and Greenland Seas fish. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **58**, 885-892.
- Ali, N., and Tardif, R. (1999). Toxicokinetic Modeling of the combined exposure to toluene and n-Hexane in rats and human. *Journal of Occupational Medicine* **41**, 95-103.
- Amin, S., Moore, R. W., Peterson, R. E., and Schantz, S. L. (2000). Gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs alters adult expression of saccharin preference behavior in female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**, 675-682.
- Andersen, M. E., Gargas, M. L., and Ramsey, J. C. (1984). Inhalation Pharmacokinetics: Evaluating systemic extraction, Total in vivo metabolism, and the time course of enzyme induction for inhaled styrene in rats based on arterial blood:inhaled air concentration ratios. *Toxicology and Applied Pharmacology* **73**, 176-187.
- Andersen, M. E., Mills, J. J., Gargas, M. L., Kedderis, L., Birnbaum, L. S., Neubert, D., and Greenlee, W. F. (1993). Modeling receptor-mediated processes with dioxin: implications for pharmacokinetics and risk assessment. *Risk Analysis* **13**, 25-36.
- Anderson, M. W., Eling, T. E., Lutz, R. J., Dedrick, R. L., and Matthews, H. B. (1977). The construction of a pharmacokinetic model for the disposition of polychlorinated biphenyls in the rat. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **22**, 765-773.

- Arms, A. D. and Travis, C. C. Reference physiological parameters in pharmacokinetic modeling. EPA/600/6-88/004. 1988. EPA. Ref Type: Report
- Aronson, K. J., Miller, A. B., Woolcott, C. G., Sterns, E. E., McCready, D. R., Fish, E. B., Hiraki, G. Y., Lickley, L. A., Holloway, C., Ross, T., Hanna, W. M., SenGupta, S. K., and Weber, J.-P. (2000). Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and Breast Cancer Risk. *Central European Journal and Public Health* **9**, 55-63.
- Barton, H. A., and Andersen, M. E. (1998). A model for pharmacokinetics and physiological feedback among hormones of the testicular-pituitary axis in adult male rats: a framework for evaluating effects of endocrine active compounds. *Toxicol.Sci.* **45**, 174-187.
- Bertelsen, S. L., Hoffman, A. D., Gallina, C. A., Elonen, C. M., and Nichols, J. W. (1998). Evaluation of log Kow and tissue lipid content as predictors of chemical partitioning to fish tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 1447-1455.
- Birnbaum, L. S. (1983). Distribution and excretion of 2,3,6,2',3',6'- and 2,4,5,2',4',5'- hexachlorobiphenyl in senescent rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **70**, 262-272.
- Borlakoglu, J. T., and Walker, C. H. (1989). Comparative aspects of congener specific PCB metabolism. *Eur.J Drug Metab Pharmacokinet.* **14**, 127-131.
- Borlakoglu, J. T., and Wilkins, J. P. (1993a). Metabolism of di-, tri-, tetra-, pent- and hexachlorobiphenyls by hepatic microsomes isolated from control animals treated with aroclor 1254, a commercial mixture of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Comp Biochem.Physiol C.* **105**, 95-106.

- Borlakoglu, J. T., and Wilkins, J. P. (1993b). Microsomal oxidation of bromo-, chloro- and fluorobiphenyls. *Comp Biochem.Physiol C.* **105**, 119-125.
- Bradlow, H. L., Davis, D. L., Lin, G., Sepkovic, D., and Tiwari, R. (1995). Effects of pesticides on the ratio of 16 alpha-hydroxyestrone: A biological marker of breast cancer risk. *Environmental Health Perspectives* **103**, 147-150.
- Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L., and Belisles, R. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and Industrial Health* **13**, 407-484.
- Buckley, L. A. (1995). Biologically-based models of dioxin pharmacokinetics. *Toxicology* **102**, 125-131.
- Bungay, P. M., Dedrick, R. L., and Mattehws, H. B. (1981). Enteric transport of chlodecone (Kepone) in the rat. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **9**, 309-340.
- Bungay, P. M., Dedrick, R. L., and Matthews, H. B. (1979). Pharmacokinetics of halogenated hydrocarbons. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **320**, 257-270.
- Chan, H. M., Berty, P. R., Receveur, O., and Kuhnlein, H. V. (1997). Evaluation of the population distribution of dietary contaminant exposure in an Artic population using monte carlo statistics. *Environ.Health Perspect.* **105**, 316-321.
- Carrier, G. (1991). *Réponse de l'organisme humain aux BPC, dioxines et furannes et analyse des risques toxiques.* Le passeur, Québec.
- Carrier, G., Brunet, R. C., and Brodeur, J. (1995). Modeling of the toxicokinetics of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in mammals, including humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* **131**, 253-266.

- Chang, T. K. H., and Waxman, D. J. (1996). The CYP2A subfamily. In cytochromes P450 metabolic and toxicological Aspects (C. Ioannides, Ed.), pp. 99-134. CRC press, Boca Raton.
- Cho-Chung, Y. S., Clair, T., Bodwin, J. S., and Berghoffer, B. (1981). Growth arrest and morphological change of human breast cancer By dibutyryl Cyclic AMP and L-Arginine. *Science* **214**, 77-79.
- Clewell III, H. J., and Andersen, M. E. (1987). Dose, species, and route extrapolation using physiologically based pharmacokinetic models. In *Pharmacokinetics in risk assessment for drinking water and health* Vol 3 pp. 159-182. National academic press, Washington DC.
- Connell, D. W., Bowman, M., and Hawker, D. W. (1988). Bioconcentration of chlorinated hydrocarbons from sediment by oligochaetes. *Ecotoxicol. Environ. Saf* **16**, 293-302.
- Connell, D. W., Braddock, R. D., and Mani, S. V. (1993). Prediction of the partition coefficient of lipophilic compounds in the air-mammal tissue system. *Sci. Total Environ. Suppl Pt 2*, 1383-1396.
- Conolly, R. B., Reitz, R. H., Clewell, H. J., and Andersen, M. E. (1988). biologically structured models and computer simulation: application to chemical carcinogenesis. *Comments Toxicology* **2**, 305-315.
- Corsolini, S., Burrini, L., Focardi, S., and Lovari, S. (2000). How can we use the red fox as a bioindicator of organochlorines? *Arch. Environ. Contam Toxicol.* **39**, 547-556.
- Craan, A. G., and Haines, D. A. (1998). Twenty-five years of surveillance for contaminants in human breast milk. *Arch. Environ. Contam Toxicol* **35**, 702-710.
- Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D., and Anton-Culver, H. (1993). Medical Hypothesis: Xenoestrogens as

preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives* **101**, 372-377.

Davis, N. R., and Mapleson, W. W. (1981). Structure and quantification of a physiological model of the distribution of injected agents and inhaled anaesthetics. *Br.J.Anaesth.* **53**, 399-405.

Davis, P. W. (1992). *Differential equations for mathematics, science and engineering*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.

Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Lalibert, Muir, D. G., and Norstrom, R. J. (1993). Inuit exposure to organochlorine through the aquatic Food chain in Arctic Quebec. *Environmental Health Perspectives* **101**, 618.

Dewailly, E., Nantel, A., Weber, J. P., and Meyer, F. (1989). High levels of PCBs in breast milk of Inuit women from arctic Quebec. *Bull.Environ.Contam Toxicol.* **43**, 641-646.

Di Francesco, C., and Bickel, M. H. (1985). Uptake in vitro of lipophilic model compounds into adipose tissue preparations and lipids. *Biochem.Pharmacol.* **34**, 3683-3688.

Durham, W. (1967). The interactions of pesticides with other factors. *Residue Reviews* **18**, 21.

Feldman, R. J., and Maibach, H. T. (1974). Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **28**, 126.

Fiserova-Bergerova, V., Tichy, M., and DiCarlo, F. J. (1984). Effects of biosolubility on pulmonary uptake and disposition of gases and vapors of lipophilic chemicals. *Drug Metabolism reviews* **15**, 1033-1070.

Fisher, J. W., and Whittaker, T. A. (1989). Physiologically based pharmacokinetic modeling of the pregnant rat: A multiroute

exposure model for trichloroethylene and its metabolite, trichloroacetic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* **99**, 395-414.

Gabric, A. J., Connell, D. W., and Bell, P. R. F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Water Research* **24**, 1225-1231.

Geyer, H. J., Scheunert, I., Bruggeman, R., Langer, D., Korte, F., Ketttrup, A., Mansour, M., Steinberg, C. E. W., Nyholm, N., and Muir, D. C. G. (1997). Half-lives and bioconcentration of lindane (g-HCH) in different fish and relationship with their lipid content. *Chemosphere* **35**, 343-351.

Gillette, J. R. (1987). Dose, Species, and route extrapolation general aspects. In *Pharmacokinetics in risk assessment* (NRC, Ed.), pp. 96-158. National Academy Press, Washington.

Haddad, S., and Krishnan, K. (2000). Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue:bloods partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. *Chemosphere* **40**, 839-843.

Haddad, S., Pelekis, M., and Krishnan, K. (1996). A methodology for solving physiologically based pharmacokinetic model without the use of simulation software. *Toxicology letters* **85**, 113-126.

Hawker, D. W., and Connell, D. W. (1986). Bioconcentration of lipophilic compounds by some aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **11**, 184-197.

Haynes, W., Durham, I., and Cueto, C. (1956). The effect of known repeated oral doses of chlorophenathane (DDT) in man. *JAMA* **162**, 890.

- Himmelstein, K. J., and Lutz, R. J. (1979). A review of the applications of physiologically based pharmacokinetic modeling. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **7**, 127-145.
- Hosie, S., Loff, S., Witt, K., and Waag, K.-L. (2000). Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes? *Eur.J.Pediatr.Surg.* **10**, 304-309.
- Howard, P. H., and Meylan, W. M. (1997). *Handbook of physical properties of organic chemicals*. CRC Lewis publishers, New York.
- Høyer, A. P., Jorgensen, T., Brock, J. W., and Grandjean, P. (2000). organochlorine exposure and breast cancer survival. *Journal of Clinical Epidemiology* **53**, 323-330.
- ILSI. Physiological parameter values for PBPK models. USEPA. 1-120. 1994.
- IPCS (1993). *Environmental Criteria 140 polychlorinated biphenyls and terphenyls*. WHO, Geneva
- Jarnberg, J., Johanson, G., and Lof, A. (1996). Toxicokinetics of inhaled trimethylbenzenes in man. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **140**, 281-288.
- Jegier, Z. (1969). IV. Occurrence and distribution of pesticide residues. Pesticide residues in the atmosphere. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **160**, 143-154.
- Jerina, D. M., and Daly, J. W. (1974). Arene oxides: a new aspect of drug metabolism. *Science* **185**, 573-582.
- Kaloyanova, F. P. Organic pesticides, in toxicology of pesticides. Interim no.9. 123. 1982. WHO.
- Kaloyanova, F. P., and El Batawi, M. A. (1991). organochlorine compounds. In human toxicology of pesticides (F. P. Kaloyanova, and M. A. El Batawi, Eds.), pp. 59-100. CRC Press, Boca Raton.

- Kedderis, L. B., Mills, J. J., Andersen, M. E., and Birnbaum, L. S. (1993). A physiological based pharmacokinetic model for 2,3,7,8-Tetrabromodibenzo-p-dioxin (TBDD) in the Rat: Tissue distribution and CYP1A induction. *Toxicology and Applied Pharmacology* **121**, 87-98.
- Kelly, B. C., and Gobas, F. A. (2001). Bioaccumulation of persistent organic pollutants in lichen-caribou-wolf food chains of Canada's Central and Western Arctic. *Environ.Sci.Technol.* **35**, 325-334.
- Khor, S. P., and Mayersohn, M. (1991). Potential error in the measurement of tissue to blood distribution coefficients in physiological pharmacokinetic modeling. Residual tissue blood. I. Theoretical considerations. *Drug Metab Dispos.* **19**, 478-485.
- Kociba, R. J., Keyes, D. G., Beyer, J. E., Carreon, R. M., Wade, C. E., Dittenber, D. A., Kalnins, R. P., Frauson, L. E., Park, C. N., Barnard, S. D., Hummel, R. A., and Humiston, C. G. (1978). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl.Pharmacol.* **46**, 279-303
- Krishnan, K., and Andersen, M. E. (1988). Physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology. In *Principles and methods of toxicology* (W. Haynes, Ed.), pp. 149-188. Raven Press, New York.
- Krishnan, K., and Andersen, M. E. (1991). Interspecies scaling in pharmacokinetics. In *New trends in pharmacokinetics* (a. A. Rescigno, Ed.), pp. 203-226. Plenum Press, New-York.
- Krishnan, K., and Andersen, M. E. (2001). Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling in Toxicology. In *principles and methods of toxicology* (A. W. Hayes, Ed.), pp. 193-241. Raven Press, New York.

- Leung, H. W., Ku, R. H., Paustenbach, D. J., and Andersen, M. E. (1998). A physiologically based pharmacokinetic model for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57Bl/6J and DBA/2J mice. *Toxicology letters* **42**, 15-28.
- Leung, H. W., and Paustenbach, D. (1990a). Cancer risk assessment for dioxan based upon a physiological based pharmacokinetic approach. *Toxicology Lett.* **51**, 147-162.
- Leung, H. W., Paustenbach, D., Murray, F. J., and Andersen, M. E. (1990b). A physiological pharmacokinetic description of the tissue distribution and enzyme-inducing properties of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **103**, 399-410.
- Leung, H. W., Poland, A., Paustenbach, D., Murray, F. J., and Andersen, M. E. (1990c). Pharmacokinetics of (125-i)-2-Iodo-3,7,8-trichlorodibenzo-p-dioxin in Mice: Analysis with a Physiological Modeling Approach. *Toxicology and Applied Pharmacology* **103**, 411-419.
- Lewis, D. F. V. (1996). Molecular modeling of mammalian cytochrome P450. In *cytochrome P450 metabolic and toxicological aspects* (C. Ioannides, Ed.), pp. 355-398. CRC Press, Boca Raton.
- Lucier, G. W., McDaniel, O. S., Schiller, C. M., and Matthews, H. B. (1978). Structural requirements for the accumulation of chlorinated biphenyl metabolites in the fetal rat intestine. *Drug Metab Dispos.* **6**, 584-590.
- Luecke, R. H., Wosilait, W. D., and Young, J. F. (1997). Mathematical analysis for teratogenic sensitivity. *Teratology* **55**, 373-380.
- Lutz, R. J., and Dedrick, R. L. (1987). Implications of pharmacokinetic modeling in risk assessment analysis. *Environmental Health Perspectives* **76**, 97-106.

- Lutz, R. J., Dedrick, R. L., Matthews, H. B., and Eling, T. E. (1977). A preliminary pharmacokinetic model for several chlorinated biphenyls in the rat. *Drug Metabolism and Disposition* **5**, 386-396.
- Lutz, R. J., Dedrick, R. L., Tuey, D., Sipes, I. G., Anderson, M. W., and Matthews, H. B. (1984). Comparison of the pharmacokinetics of several polychlorinated biphenyls in mouse, rat, dog, and monkey by means of a physiological pharmacokinetic model. *Drug Metab Dispos.* **12**, 527-535.
- Lutz, R. J., Dedrick, R. L., and Zaharko, D. S. (1980). Physiological pharmacokinetics: An in vivo approach to membrane transport. *pharmacologic therapeutics* **11**, 559-592.
- Matthews, H. B., and Anderson, M. W. (1975). Effect of chlorinated on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyl. *Drug metabolism Dispos.* **3**, 371-380.
- Matthews, H. B., Tuey, D. B., and Anderson, M. W. (1977). Pharmacokinetic models for lipophilic compounds. *Environ.Health Perspect.* **20**, 257-262.
- McFarland, V. A., and Clarke, J. U. (1989). Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ.Health Perspect.* **81**, 225-239.
- Medinsky, M. A., and Klaassen, C. D. (1996). Toxicokinetics. In Casarett & Doull's Toxicology The basic science of poisons (C. D. Klaassen, Ed.), pp. 187-198. McGraw-Hill, New York.
- Menzel, B. D. (1988). Planning and using PBPK models: An integrated inhalation and distribution model for nickel. *Toxicol.Lett.* **43**, 67-83.
- Morales, N. M., and Matthews, H. B. (1978). In vitro binding of PCBs to hepatic macromolecules in mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **45**.

- Muhlebach, S., and Bickel, M. H. (1981). Pharmacokinetics in rats of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl, an unmetabolizable lipophilic model compound. *Xenobiotica* **11**, 249-257.
- Muir, D. C. G., Wagemann, R., Hargrave, B. T., Thomas, D. J., Peakall, D. B., and Norstrom, R. J. (1992). Arctic marine ecosystem contamination. *The Science of the Total Environment* **122**, 75-134.
- Nichols, J. W., Jensen, K. M., Tietge, J. E., and Johnson, R. D. (1998). Physiologically Based Toxicokinetic Model for maternal transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in brook trout (*Salvelinus Fontinalis*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 2422-2434.
- O'Flaherty, E. J. (1981). *Toxicants and Drugs : Kinetics and Dynamics*. Wiley-Interscience, New-York.
- O'Flaherty, E. J. (1998). Physiologically based models of metal kinetics. *Critical Reviews in Toxicology* **28**, 271-317.
- Ohki, S., and Spangler, R. A. (1992). Chapter 15 passive and facilitated transport. In *The structure of biological membranes* (P. Yeagle, Ed.), pp. 655-720. CRC press, Boca Raton.
- Osius, N., Karmaus, W., Kruse, H., and Witten, J. (1999). Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in children. *Environ.Health Perspect.* **107**, 843-849.
- Parham, F. M., and Portier, C. J. (1998). Using structural information to create physiologically based pharmacokinetic models for all biphenyls II rates of metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* **151**, 110-116.
- Pelekis, M., Poulin, P., and Krishnan, K. (1995). An Approach for incorporating tissue composition data into physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and Industrial Health* **11**, 511-522.

- Poulin, P., and Krishnan, K. (1995a). A biologically-based algorithm for predicting human tissue: blood partition coefficients of organic chemicals. *Human Experimental Toxicology* **14**, 273-280.
- Poulin, P. and Krishnan, K. (1995b) A tissue composition based algorithm for predicting tissue: air partition coefficients of organic chemicals. *Toxicolo. and Applied Pharmacol.*
- Poulin, P., and Krishnan, K. (1995c). And algorithm for predicting tissue: Blood partition coefficients of organic chemicals from n-octanol: water partition coefficient data. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **46**, 117-129.
- Poulin, P., and Krishnan, K. (1996). Molecular structure-based prediction of the partition coefficients of organic chemicals for physiological pharmacokinetic models. *Toxicology Methods* **6**, 117-137.
- Poulin, P., and Krishnan, K. (1999). Molecular structure-based prediction of the toxicokinetics of Inhaled Vapors in Humans. *International Journal of Toxicology* **18**, 7-18.
- Poulin, P., and Theil, F. P. (2001). A priori prediction of tissue:plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery. *J.Pharm.Sci.* **89**, 16-35.
- Ramsey, J. C., and Andersen, M. E. (1984). A pharmacokinetically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rat and human. *Toxicolo. and Applied Pharmacolo.* **73**, 159-175.
- Romieu, I., Hernandez-Avila, M., Lazcano-Ponce, E., Weber, J. P., and Dewailly, E. (2000). Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. *Am.J.Epidemiol.* **152**, 363-370.
- Roth, W. L., Freeman, R. A., and Wilson, A. G. (1993). A physiological based model for gastrointestinal absorption and excretion of chemicals carried by lipids. *Risk Analysis* **13**, 531-543.

- Safe, S. (1989). Metabolism, uptake, storage and bioaccumulation. In Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products (R. Kimbrough, and A. A. Jensen, Eds.), pp. 81-107. Elsevier Sciences.
- Safe, S. H. (1998). Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **38**, 121-158.
- Safe, S. H. (2000). Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environ.Health Perspect.* **108**, 487-493.
- Sala, M., Robas-Fito, N., Cardo, E., de Muga, M. E., Marco, E., Mazon, C., Verdu, A., Grimalt, J. O., and Sunyer, J. (2001). Levels of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds in cord blood: exposure accross placenta. *Chemosphere* **43**, 895-901.
- Spear, R. C., and Bois, F. Y. (1994). Parameter variability and the interpretation of physiologically based pharmacokinetic modeling results. *Environmental Health Perspectives Supplement* **11**,
- Tanabe, S, Nakagawa,Y., Tatsukawa,R.,(1981), Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with kenechlor products, *Agric. Biol. Chem.* **45**, 717-726.
- Teorell, T. (1937). Kinetics of distribution of substances administered to the body. *Archives internationales de Pharmacodynamie* **57**, 205-225.
- Tkalin, A. V., Samsonov, D. P., Lishavsaya, T. S., and Chernik, G. V. (2000). New data on organochlorine distributions in the marine environment near Vladivostok. *Marine Pollution* **40**, 879-881.
- Travis, C. C. (1987). Interspecies and dose-route extrapolations. In *Pharmacokinetics in Risk Assessment* (NRC, Ed.), pp. 208-220. National Academy Press, Washington.

- Tuey, D. B., and Matthews, H. B. (1977). Pharmacokinetics of 3,3',5,5'-tetrachlorobiphenyl in the male rat. *Drug Metab Dispos.* **5**, 444-450.
- Tuey, D. B., and Matthews, H. B. (1980a). Distribution and excretion of 2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl in rats and man: pharmacokinetic model predictions. *Toxicology and Applied Pharmacology* **53**, 420-431.
- Tuey, D. B., and Matthews, H. B. (1980b). Use of a physiological compartmental model for the rat to describe the pharmacokinetics of several chlorinated biphenyls in the mouse. *Drug Metab Dispos.* **8**, 397-403.
- Uhi, S., Schmid, P., and Schlatter, C. (1986). Pharmacokinetics of pentachlorophenol in man. *Arch Toxicol* **58**, 182.
- van der Molen, G. W., Kooijman, S. A., and Slob, W. (1996). A generic toxicokinetic model for persistent lipophilic compounds in humans: an application to TCDD. *Fundam.Appl.Toxicol.* **31**, 83-94.
- van Ommen, B., Adang, A. E. P., Brader, L., Posthumus, M. A., Müller, F., and van Bladeren, P. J. (1986). The Microsomal Metabolism of Hexachlorobenzene
Origin of the covalent binding to protein. *Biochemical Pharmacology* **35**, 3233-3238.
- Waliszewski, S. M., Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., and Siliceo, J. (2000). Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud Publica Mex.* **42**, 384-390.
- Wang, X., Santostefano, M. J., Evans, M. V., and Richardson, V. M. (1997). determination of parameters responsible for pharmacokinetic behavior of TCDD in female sprague-dawley Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **147**, 151-168.

- Whitlock, J. P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **39**, 103-125.
- Wolff, M. S., Toniolo, P. G., Lee, E. W., Rivera, M., and Dublin, N. (1993). Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *Journal National Cancer Institute* **85** (8) 21 April, 648-652.
- Yang, R. S. H., El-Masri, H. A., Thomas, R. S., Constan, A., and Tessari, J. D. (1995). The application of physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic (PBPK/PD) modeling for exploring risk assessment approaches of chemical mixtures. *Toxicology letters* **79**, 193-200.
- Yesair, D. W., Feder, P. I., Chin, A. E., Naber, S. J., Kuiper-Goodman, T., Scott, C. S., and Robinson, P. E. (1986). Development, evaluation and use of a pharmacokinetic model for hexachlorobenzene. *IARC Sci.Publ.* 297-318.