

2m11.3046.2

Université de Montréal

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques,
des biomarqueurs d'exposition à la mesure de la charge électrophile tissulaire

par

Adela Tzekova

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise es sciences (M.Sc)

en Santé environnementale et santé au travail

Décembre, 2002

© Adela Tzekova, 2002



WA
5
U58
2003
V.012

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques,
des biomarqueurs d'exposition à la mesure de la charge électrophile tissulaire

présenté par:

Adela Tzekova

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury : Dr. Gaétan Carrier, M.D.,Ph.D

Directeur de recherche: Dr. Claude Viau, D.Sc

Membre du jury : Dr. Ginette Truchon, Ph.D

SOMMAIRE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants ubiquistes de l'environnement, certains d'entre eux reconnus comme cancérogènes probables et possibles chez l'humain. Ce fait indique la nécessité de surveiller l'exposition humaine à ces substances et de développer et valider des biomarqueurs (BM) d'exposition aux HAP. L'objectif principal de ce projet de recherche était donc de vérifier, dans le modèle du rat, la corrélation entre différents BM d'exposition aux HAP et, plus particulièrement, d'étudier le rôle complémentaire du 1-hydroxypyrene (1-OHP) urinaire comme BM d'exposition relié à un effet biologique (la charge électrophile tissulaire (CET), soit les adduits du benzo(a)pyrènediolépoxyde aux protéines tissulaires des organes cibles), étant donné que ce dernier a été proposé comme BM d'exposition globale aux HAP. Sur la base des expériences conduites et des données obtenues les conclusions suivantes ont été tirées:

Premièrement, la formation de la CET dans le foie, le coeur, le poumon et au niveau de l'hémoglobine (Hb) a été étudiée suivant l'exposition répétée par la voie I.P aux mélanges binaires de HAP (benzo(a)pyrène (BaP)+pyrène (P)) à trois doses constantes de BaP (2, 6, et 10 mg/kg) pour trois ratios BaP/P (0.2, 1 et 5). Des niveaux similaires de CET, dans tous les tissus examinés, ont été obtenus pour une dose donnée de BaP. Le pyrène, en quantité différente dans les mélanges n'influence pas la formation de la CET dans les tissus choisis. Le rôle des adduits à l'Hb comme mesure de substitution de la CET des tissus cibles de la cancérogénicité (c.-à-d. le poumon) a été confirmé.

Deuxièmement, la relation entre la CET dans les tissus cibles et le 1-OHP urinaire a été étudiée et une régression linéaire entre ceux-ci a été obtenus pour les ratios BaP/P=0.2 et 1 indiquant que le 1-OHP urinaire est relié à la CET des tissus cibles. Ceci a permis également de vérifier notre algorithme de l'ajustement de la valeur de référence du 1-OHP urinaire dans l'exposition à divers mélanges de HAP. La corrélation entre la CET et le 1-OHP ou le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHBaP) dans l'urine et les fèces a été également étudiée afin d'approfondir la connaissance sur l'utilité potentielle de ces BM d'exposition aux HAP. Concernant cette dernière relation, des meilleurs coefficients de corrélation ont été obtenus avec 1-OHP et 3-OHBaP urinaire, ceci indiquant que les métabolites urinaires du BaP et P étudiés sont des "indicateurs" plus fiables pour servir aux besoins de la surveillance biologique de l'exposition.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
DÉDICACE	viii
REMERCIEMENTS	ix
CHAPITRE PREMIER: INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	2
1.1.1. Identité, propriétés, sources et exposition	2
1.1.2. Les HAP et la cancérogénicité	4
1.2. Surveillance environnementale, surveillance biologique de l'exposition aux HAP et évaluation du risque	4
1.3. Les HAP modèles : le benzo(a) pyrène (BaP) et le pyrène (P)	6
1.3.1. Le BaP et ses métabolites	6
<i>1.3.1.1. Métabolisme et cinétique</i>	6
1.3.2. Le Pyrène (P) et ses métabolites	8
<i>1.3.2.1. Métabolisme et cinétique</i>	8
1.4. Biomarqueurs (BM) d'exposition aux HAP- connaissance et perspectives	9
1.4.1. Considérations générales	9
1.4.2. Des adduits de HAP comme biomarqueurs d'exposition	10

1.4.3. Des métabolites urinaires de HAP comme biomarqueurs d'exposition.....	11
1.4.4. Le 1-OHP urinaire dans la SBE - utilité et limites	13
<i>1.4.4.1. Corrélacion entre le 1-OHP urinaire et les concentrations de HAP totaux dans divers média.....</i>	<i>13</i>
<i>1.4.4.2. Relation entre le 1-OHP urinaire et des effets biologiques.....</i>	<i>14</i>
<i>1.4.4.3. Seuils repères de 1-OHP urinaire comme biomarqueur d'exposition professionnelle aux HAP</i>	<i>16</i>
<i>1.4.4.4. Méthodologie pour établir des indices biologiques d'exposition (IBE) de 1-OHP urinaire</i>	<i>17</i>
1.5. La problématique des mélanges de HAP.....	18
1.6. Problématique du projet de recherche	21
1.6.1. Problématique générale	21
1.6.2. Problématiques spécifiques.....	23
<i>1.6.2.1. Absence de données concernant la formation des adduits aux protéines tissulaires suite à l'exposition répétée à des mélanges de HAP chez l'animal.....</i>	<i>23</i>
<i>1.6.2.2. Vérification expérimentale d'une méthodologie de l'ajustement de la valeur de référence du 1-OHP urinaire dans l'exposition à divers mélanges de HAP.....</i>	<i>24</i>
<i>1.6.2.3. Insuffisance de données quantitatives sur l'influence de l'exposition répétée à des mélanges de HAP sur l'excrétion urinaire et fécale du 1-OHP et 3-OHBaP</i>	<i>24</i>
1.7. Objectifs de recherche.....	25
1.7.1. Objectif général.....	25
1.7.2. Objectifs spécifiques.....	26
BIBLIOGRAPHIE	27

CHAPITRE DEUXIÈME: PRÉSENTATION DES ARTICLES.....	43
ARTICLE 1: Electrophilic Tissue Burden in Male Sprague-Dawley Rats Following Repeated Exposure to Binary Mixtures of PAHs.....	44
ARTICLE 2 Correlation Between Biomarkers of PAH Exposure and Electrophilic Tissue Burden in a Rat Model.....	78
CHAPITRE TROISIÈME: DISCUSSION GÉNÉRALE.....	121

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BaP:	benzo(a)pyrène
BaPDE:	benzo(a)pyrènediolépoxyde
CET:	charge électrophile tissulaire
CLHP:	chromatographie liquide à haute performance
HAP:	hydrocarbures aromatiques polycycliques
P:	pyrène
3-OHBaP:	3-hydroxybenzo(a)pyrène
1-OHP:	1-hydroxypyrene
°C:	degré celsius
g:	gramme
kg:	kilogramme
µg:	microgramme
mg:	milligramme
mol:	moles
µmol:	micromoles
nmol:	nanomoles
pmol:	picomoles
L:	litre

DÉDICACE

À mon mari Liubomir,
à mes parents,
et à mon ami Steve

REMERCIEMENTS

Je suis reconnaissante au Dr.Claude Viau pour ses précieux conseils au cours de mes recherches et de la rédaction du mémoire.

Je remercie Suzanne Leroux et Ross Thuot pour leur assistance technique dans certains aspects de ce projet.

Je remercie tout le personnel du département de Santé environnementale et santé au travail qui a également contribué à ce que je vive ces belles années de recherche et de formation en toxicologie.

Je remercie enfin mon mari Liubomir, ma famille et mes amis pour leur soutien moral tout au long de mes études.

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

1.1.1. Identité, propriétés, sources et exposition

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants ubiquistes de l'environnement reconnus comme "substances d'intérêt prioritaire" au Canada (Armstrong et Newhook, 1992; Meek et al. 1994). Les HAP constituent une catégorie de composés chimiques comprenant environ une centaine de composés distincts qui contiennent des atomes de carbone et d'hydrogène formant au moins deux anneaux aromatiques condensés (Loening et al., 1990).

Les HAP purs sont des substances solides habituellement colorées, cristallines à la température ambiante. Leurs propriétés physiques varient selon leur masse moléculaire et leur structure. Leurs coefficients de partage octanol/eau (K_{oc}) sont relativement élevés, ce qui détermine un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes (CNRC, 1983). Les HAP dans l'atmosphère se trouvent soit en forme gazeuse ou particulaire (Nikolaou et al. 1984, Lesage et al. 1987). La distribution de la substance entre les deux phases dépend des pressions de vapeur. Les HAP de faible masse moléculaire (formés de moins de quatre anneaux aromatiques) peuvent être trouvés principalement en phase gazeuse, alors que les HAP de masse moléculaire élevée, tels que le BaP, sont plutôt adsorbés sur les particules (Atkinson et Arey, 1994).

Les HAP sont présents dans l'environnement sous forme de mélanges complexes difficiles à caractériser et à mesurer. Ils proviennent principalement des processus de pyrolyse et en particulier de la combustion incomplète de la matière organique (IARC, 1985, Nikolaou et

al.1984). Ils sont présents à l'état naturel dans des dérivés de charbon et d'autres produits pétroliers. Les HAP peuvent être libérés dans l'environnement par des phénomènes naturels comme les incendies de forêts, les éruptions volcaniques, la diagenèse et la biosynthèse (CNRC, 1983). Toutefois, on considère que les activités anthropiques (industries, milieu de travail, transport, fumée de cigarette, chauffage domestique) sont les principales sources d'émission de HAP. Dû à leur grande répartition dans l'environnement, ils sont présents dans l'air urbain et industriel, dans les aliments, dans l'eau, dans les sols et sédiments (Lindstedt et Sollenberg, 1982; Nikolaou et al.1984; Lee et al. 1995; Wild et Jones, 1995). Parmi les milieux industriels, les cokeries, les usines de production d'aluminium, les manufactures d'électrodes de carbone sont les sources majeures d'émission de HAP se caractérisant par des niveaux d'exposition à ces contaminants les plus élevés (selon les niveaux de BaP dans l'air ambiant à l'intérieur de ces industries $>10\mu\text{g}/\text{m}^3$). Les travaux tels que l'épandage de goudron, de créosote et d'asphalte lors de pavage des routes ou de la réfection des toitures sont aussi des sources importantes d'exposition à des HAP (Lindstedt et Sollenberg, 1982).

L'exposition aux HAP dans la population générale se fait surtout par la nourriture et la fumée de tabac, mais également par contact avec l'air extérieur (Jongeneelen, 1994, Liroy et al.1988). L'exposition en milieu de travail se fait surtout par inhalation (ACGIH, 1991; IARC, 1984) et par contact cutané, important et même prédominant dans certains milieux tels que l'industrie de production du coke et d'aluminium, l'industrie pétrochimique et les travaux impliquant la manipulation de la créosote (Boogaard et Van Sittert, 1994; Van Rooij et al., 1993, 1994; Bouchard et Viau, 1999).

1.1.2. Les HAP et la cancérogénicité

Un certain nombre de HAP individuels ont été classés comme cancérogènes probables chez l'humain par le Centre international de recherche sur le cancer (IARC, 1987). Il existe également des études épidémiologiques qui mettent en évidence une incidence accrue de cancers du poumon chez les travailleurs d'usines de production de coke et de gaz ainsi que chez des travailleurs des industries de production d'aluminium et des fonderies de fer et d'acier (Doll et al., 1972, Redmond et al., 1976, IARC 1984, Amstrong et al. 1994). Une preuve suffisante chez l'animal et une preuve limitée chez l'humain que la créosote est cancérogène a par ailleurs été mise en évidence (IARC, 1985).

1.2. Surveillance environnementale, surveillance biologique de l'exposition aux HAP et évaluation du risque

Étant donné le potentiel cancérogène de certains membres de la famille des HAP, il est important de bien "contrôler" l'exposition humaine à ces composés. Au départ, l'évaluation de l'exposition aux HAP a été basée sur l'analyse des concentrations atmosphériques. Des méthodes non spécifiques telles que la détermination des matières solubles dans le benzène (MSB) ont été utilisées (OSHA, 1976). Cette méthode ne permet toutefois pas de révéler l'identité des HAP, car d'autres composés organiques présents dans l'atmosphère peuvent également contribuer à ces MSB. Des techniques chromatographiques permettant d'identifier et de quantifier les HAP individuels présents dans les mélanges complexes ont par la suite été développées (Hansen et al. 1991, Quilliam et Sim 1988, Roussel et al. 1992; Wise et al. 1993). Les méthodes d'analyse les plus sensibles et sélectives incluent la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détection par fluorescence et la chromatographie capillaire en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse

(Law et Biscaya, 1994). NIOSH (1985) a par ailleurs recommandé une procédure standard pour l'analyse de 16 HAP individuels majeurs dans l'air ambiant après séparation par CLHP.

Souvent, l'exposition aux HAP est estimée par détermination des concentrations atmosphériques de BaP étant donné son potentiel cancérigène. Ces mesures environnementales permettent seulement d'estimer la dose inhalée. Toutefois, l'exposition par la voie cutanée peut être également importante dans certains milieux de travail. Étant donné que l'absorption par voie cutanée est plus lente que celle par voie respiratoire, cela influencera les valeurs de certains métabolites urinaires pris comme "mesure de l'exposition". D'où le besoin de développer des meilleures stratégies de surveillance biologique de l'exposition (SBE). Cette dernière, vise à estimer l'exposition interne de l'organisme, c'est-à-dire la dose effectivement absorbée (en intégrant toutes les voies d'exposition) et éventuellement la dose aux organes cibles, ce qui dénote son rôle complémentaire efficace pour l'évaluation du risque pour la santé associé à l'exposition aux HAP. Évidemment, une bonne stratégie de surveillance biologique, y compris le moment du prélèvement des fluides biologiques (sang, urine), demande une connaissance approfondie de la toxicocinétique des produits parents et de leurs métabolites dans l'organisme. De plus, le développement et la validation des bioindicateurs d'exposition sont particulièrement importants pour l'évaluation de l'exposition dans des études épidémiologiques en milieu de travail (Heizow et McLean, 1994; McMichael, 1994; Smith et Suk, 1994, Jongeneelen, 2001).

1.3. Les HAP modèles : le benzo(a) pyrène (BaP) et le pyrène (P)

Tel que discuté précédemment, les HAP se trouvent sous forme de mélanges complexes et parmi eux, le BaP et le P sont les plus étudiés.

1.3.1. Le BaP et ses métabolites

1.3.1.1. Métabolisme et cinétique

Le BaP est un procancérogène qui est retrouvé dans la plupart des mélanges de HAP. Il exerce son activité cancérogène suite à une activation enzymatique par les mono-oxygénases à fonctions multiples dépendantes du cytochrome P-450 (Phase I). La Phase I de la biotransformation du BaP entraîne la formation de différents métabolites oxydés (Angerer et al. 1997) qui sont ensuite transformés en produits conjugués (sulfates ou glucuronides) dans la Phase II. Parmi les nombreux métabolites du BaP identifiés, tels que des phénols, des dihydrodiols, des quinones, le (+)-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrène (encore appelé (+)-BaPDE-I) est reconnu comme cancérogène final pouvant se lier de façon covalente à l'ADN et aux autres macromolécules cellulaires (ARN, protéines) conduisant ainsi à la formation des adduits (Conney et al., 1994). Une corrélation entre la formation des adduits, plus particulièrement, des adduits à l'ADN, et l'occurrence du cancer a été démontrée dans les études animales (Poirier et Beland, 1992) et la mesure de ces adduits a été suggérée comme un outil important dans les pratiques d'intervention (Santella, 1997).

La distribution du BaP se fait initialement aux tissus adipeux, au foie et aux reins, quelle que soit la voie d'exposition. Au fur et à mesure du relargage du BaP du tissu adipeux vers

le sang, celui-ci est rapidement métabolisé principalement par le foie et ces métabolites sont excrétés préférentiellement dans les fèces et en faible quantité dans l'urine, un fait qui est lié à leur poids moléculaire élevé, ce qui favorise une excrétion biliaire plus importante (Camus et al. 1984; Withey et al., 1993).

Parmi les métabolites urinaires majeurs du BaP, le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHBaP) a été étudié d'une manière plus approfondie autant chez l'animal que chez l'humain (Bouchard et Viau, 1995; Angerer et al., 1997; Jongeneelen et al., 1985; Jongeneelen et al., 1986). Néanmoins une différence importante entre l'animal et l'humain est reliée à une activité hydroxylante du BaP plus faible dans les foies humains que dans ceux de rongeurs (Selkirk et al., 1983). Dans l'étude de Jongeneelen et al (1986) la proportion du BaP excrétée sous forme de 3-OHBaP urinaire était plus élevée chez le rat suite à une application cutanée de goudron de houille que chez les patients psoriasiques exposés à une dose comparable. Toutefois, le profil détaillé d'excrétion urinaire du 3-OHBaP a été déterminé chez des rats mâles Sprague-Dawley suite à une administration intrapéritonéale unique à $31.25\mu\text{mol}$ de BaP/kg (Bouchard et Viau, 1995). Ces derniers auteurs ont calculé que 94% de la quantité totale de 3-OHBaP excrétée dans l'urine pendant la période de collecte de 164 heures ont été éliminés dans les premières 72 heures suivant l'administration du BaP. Cette lente excrétion indique une augmentation de l'excrétion de 3-OHBaP urinaire suite à une exposition quotidienne répétée au BaP. Cet effet a été observé par Jongeneelen et al. (1985) suite à l'exposition des rats Wistar mâles à 10, 20, et $50\mu\text{mol}$ de BaP/kg par jour au cours de 3 jours consécutifs par voies orale et cutanée. Bouchard et Viau (1995) ont également observé une augmentation progressive de l'excrétion urinaire de 3-OHBaP chez des rats mâles Sprague-Dawley suivant une exposition répétée à des doses

de 1.25, 6.25 et 31.25 μ mol de BaP/kg par jour du mardi au vendredi pendant quatre semaines consécutives, autant dans les échantillons urinaires des lundis que des jeudis. Concernant les valeurs des lundis, cet effet a été expliqué par une accumulation de la charge corporelle en BaP ou ses métabolites au cours des semaines de traitement; concernant les échantillons des jeudis, cet effet a été relié à une induction enzymatique du BaP et à une augmentation probable de la charge corporelle en BaP ou ses métabolites. Il est également important d'établir le profil cinétique de 3-OHBaP dans l'urine chez l'animal suite à l'exposition répétée à des mélanges de HAP et de comparer le pourcentage de la dose de BaP excrété dans l'urine à celui obtenu dans les fèces sous forme de 3-OHBaP.

1.3.2. Le Pyrène (P) et ses métabolites.

1.3.2.1. Métabolisme et cinétique

Le pyrène est retrouvé en importante proportion (de 1 à 10%) dans la plupart des mélanges de HAP (Bouchard et Viau, 1999). Le pyrène et ses produits métaboliques n'exhibent pas de potentiel cancérigène (IARC, 1983). Le pyrène subit l'action de systèmes enzymatiques dépendant du cytochrome P-450 (Phase I) qui entraîne la formation de phénols, dihydrodiols et diphénols qui peuvent être conjugués (Phase II) à du glucuronide, à du sulfate et au glutathion (Boylard et Sim, 1964). Le glucuronide du 1-hydroxypyrene est le métabolite urinaire majeur du BaP qui a été le plus étudié. Le 1,2-dihydroxy-1,2-dihydroxy-pyrène a été retrouvé dans l'urine humaine en faible quantité (Grimmer et al. 1993). Le pyrène marqué au ^{14}C a été rapidement distribué, métabolisé et éliminé de l'organisme et le 1-hydroxypyrene (1-OHP) urinaire est un indicateur fiable de l'exposition systémique au pyrène. De plus, le 1-OHP urinaire représente une fraction constante du ^{14}C total dans l'urine et dans les fèces (Bouchard et al. 1998).

La demi-vie de l'excrétion urinaire du 1-OHP chez des individus avec une exposition professionnelle aux HAP a été estimée à 18 heures (Buchet et al.1992). Les demi-vies individuelles variaient de 6 à 35 heures (Jongeneelen et al., 1990). Boogaard et van Sittert (1994) ont rapporté une valeur moyenne de demi-vie de 13 heures chez 16 travailleurs. Ceci influence donc la stratégie de prélèvement urinaire dans la SBE aux HAP. L'excrétion totale du 1-OHP urinaire chez l'humain représente moins de 5 % de la dose d'exposition par voie orale ou par voie cutanée (Viau et al., 1995). Chez l'animal, plus de 90% de la dose du pyrène excrété sous forme de 1-OHP dans l'urine est excrétée dans les premières 24 heures suivant une exposition unique au pyrène (Bouchard et Viau, 1996). Ce fait indique, que pour une surveillance de routine, des prélèvements urinaires devraient minimalement être obtenus avant le quart de travail le lundi et après le quart de travail le vendredi lorsque l'exposition pulmonaire est la voie principale d'exposition aux HAP. D'un autre côté, quand la voie principale d'exposition aux HAP est la voie cutanée, les prélèvements urinaires avant le quart du travail de lundi et de vendredi devraient donc être recueillis (Bouchard et Viau, 1999).

1.4. Biomarqueurs (BM) d'exposition aux HAP- connaissance et perspectives

1.4.1. Considérations générales

L'exposition aux HAP pourrait être surveillée par différents biomarqueurs, tels que des métabolites de HAP dans l'urine, des thioéthers urinaires, la mutagénicité urinaire, des adduits de HAP aux protéines et à l'ADN. Toutefois, la mutagénicité urinaire ainsi que les thioéthers urinaires s'avèrent des indicateurs non spécifiques pour l'exposition aux agents

mutagènes (Jongeneelen, 2001). De plus, ces méthodes manquent de sensibilité dans le cas d'exposition professionnelle aux HAP et le tabagisme est un facteur confondant majeur (Clonfero et al. 1989; Ferreira et al., 1994a). En résumé, ces dernières méthodes ne sont pas utiles pour des applications de routine. Les adduits de HAP aux macromolécules cellulaires (DNA, protéines) ainsi que des métabolites urinaires de HAP ont été considérés comme biomarqueurs plus prometteurs d'exposition aux HAP et d'effet biologique (Angerer et al., 1997). Il va de soi cependant que dans un contexte de milieu de travail seuls des échantillons d'urine et, à la rigueur, de sang, peuvent être obtenus.

1.4.2. Des adduits de HAP comme biomarqueurs d'exposition

Les adduits de BaP à l'hémoglobine ont été rapportés comme reflétant l'exposition répétée au BaP dû au fait que les adduits persistent au cours de la vie biologique de la protéine, donc, une certaine accumulation des adduits à l'hémoglobine lors de l'exposition est prévisible, ce qui indique la possibilité de leur utilisation comme biomarqueurs d'exposition répétée au BaP (aux HAP) (Viau et Carrier, 1995). Toutefois, dans la population humaine sans exposition professionnelle aux HAP, il est très difficile de mesurer la concentration de ces adduits dans le sang étant donné que cette concentration est très faible et souvent près de la limite de détection de la méthode analytique. Néanmoins, il manque des données suffisantes sur l'utilité des adduits à l'hémoglobine dans la surveillance biologique de l'exposition et les premières études avec des travailleurs exposés se sont révélées d'une utilité limitée (Ferreira et al., 1994b). Des efforts majeurs ont été dirigés vers la détermination des adduits de HAP à l'ADN comme indicateur principal du dommage génétique potentiel causé par l'exposition aux HAP autant dans les études humaines que dans les études animales (Lewtas et al. 1993; Winker et al., 1995). Les globules blancs ont été utilisés comme cible ADN de substitution (Schoket, et al. 1995; Schoket, 1999; Schoket

et al. 1999). Toutefois, une relation claire et définitive entre l'exposition aux HAP et les adduits HAP-ADN n'a pas encore été établie (Jongeneelen, 2001). Dans deux études récentes les adduits aux lipides (aux triglycérides) provenant de métabolites du BaP ont été suggérés comme biomarqueurs d'intérêt potentiel dans la SBE et l'évaluation du risque dû à leur formation relié à la dose d'exposition, d'une part, et de petites quantités d'échantillons biologiques nécessaires pour effectuer des analyses, d'autre part (Kwack et Lee, 2000; Park et al., 2002). Néanmoins, il manque de données suffisantes dans cette direction et les protocoles expérimentaux sont exigeants.

Toutefois, il est important d'examiner la formation des adduits de HAP aux protéines tissulaires dans les organes cibles de cancérogénicité suivant une exposition répétée à ces substances. Étant donné l'abondance des protéines dans les cellules et la possibilité de l'accumulation des adduits au cours du temps et puisque les travailleurs sont exposés aux HAP chroniquement, les adduits de HAP aux protéines tissulaires pourraient servir dans un cadre expérimental animal comme mesure de la toxicité au niveau cellulaire et aussi comme une mesure indirecte de la génotoxicité des mélanges de HAP.

1.4.3. Des métabolites urinaires de HAP comme biomarqueurs d'exposition

En fait, la plupart des études scientifiques chez l'humain sont dirigées vers le développement et la validation d'autres indicateurs de l'exposition aux HAP qui se révèlent plus intéressants. Il s'agit de la mesure de certains métabolites hydroxylés de HAP dans l'urine tels que le 1-OHP, le 3-OHBaP, 3-hydroxybenz(a)anthracène, des phénanthrènes hydroxylés, etc (Jongeneelen et al.1985; Boogaard and van Sittert, 1994; Levin, 1995; Popp et al., 1997; Gundel et al., 1996; Gundel et al.,2000). Toutefois, la majorité des études

portent sur l'importance et l'utilité du 1-OHP urinaire comme bioindicateur dans la SBE aux HAP et la plus grande partie de la présente revue des connaissances y sera consacrée.

Néanmoins, le pyrène ne contribue pas à la cancérogénicité des mélanges complexes de HAP indiquant la nécessité d'étudier des métabolites d'autres HAP, tels que le BaP et le benzo(a)anthracène (BaA) ayant un potentiel cancérogène important, comme "biomarqueurs" d'exposition aux HAP. Un tel métabolite urinaire du BaP d'importance prioritaire est le 3-OHBaP. Bien que ce dernier semble être plus utile pour estimer l'exposition humaine aux HAP, étant donné le potentiel cancérogène du BaP, il est excrété dans l'urine en quantité beaucoup plus faible que celle du 1-OHP urinaire, ce qui entraîne des problèmes analytiques au niveau de sa quantification dans l'urine humaine associés au manque de sensibilité suffisante des méthodes analytiques courantes. (Ariese et al.1994; Grimmer et al.1997). Récemment, une approche originale possédant la sensibilité requise pour le travail de routine a été décrite dans la littérature (Simon et al., 2000).

Dans plusieurs études humaines la corrélation entre différents biomarqueurs (BM) d'exposition aux HAP a été examinée et des données contradictoires ont été rapportées. Cependant, une relation significative entre 1-OHP urinaire et 3-OHBaP urinaire a été établie chez des patients souffrant d'eczéma et qui ont été traités avec des crèmes contenant du goudron (Jongeneelen et al, 1986), d'une part, et entre 1-OHP urinaire et 3-hydroxybenzo(a)anthracène (3-OHBaA) chez des travailleurs d'une usine de production de briques réfractaires (Gundel et al, 2000). Ceci indique qu'en plus de 1-OHP urinaire, le 3-OHBaA pourrait être utilisé comme bioindicateur de la dose interne de HAP. De plus, c'est un métabolite d'un HAP carcinogène excrété en assez grande quantité dans l'urine des individus exposés dans leur milieu de travail aux HAP et il est également mesuré chez des

individus non exposés professionnellement aux HAP (Whiton et al, 1995). Toutefois des études supplémentaires sur le profil toxicocinétique de ce métabolite ainsi que des études sur la corrélation de ceci avec d'autres bioindicateurs d'exposition aux HAP d'intérêt particulier en SBE sont nécessaires. Une revue récente portant sur les biomarqueurs d'exposition aux HAP a suggérée le 1-OHP urinaire comme la mesure actuellement la plus utile pour estimer l'exposition individuelle aux HAP (Dor et al., 1999).

1.4.4. Le 1-OHP urinaire dans la SBE - utilité et limites

Le 1-OHP urinaire a été suggéré comme biomarqueur d'exposition globale aux HAP (Jongeneelen et al, 1986; 1987). Étant donné que la méthode d'analyse dans l'urine est simple et sensible cette méthode a été recommandée pour la SBE aux HAP. Toutefois, la proportion relative du pyrène dans les mélanges complexes de HAP varie dans les différents milieux de travail, ceci indique donc qu'un seul indice biologique de l'exposition (IBE) du 1-OHP urinaire ne peut pas être valide pour tous les milieux de travail. En effet, pour une proportion donnée de pyrène, la toxicité de divers mélanges peut être très variable. De plus, il manque d'informations sur la relation "dose-réponse" entre le 1-OHP urinaire et la mortalité, dérivée des études épidémiologiques (Jongeneelen, 2001).

1.4.4.1. Corrélation entre le 1-OHP urinaire et les concentrations de HAP totaux dans divers média

Plusieurs études ont été réalisées afin d'établir la relation entre le 1-OHP urinaire et les concentrations de HAP dans l'air des milieux de travail, exprimées sous forme de matières solubles dans le benzène (MSB), de HAP totaux ou de HAP individuels tels que le BaP et le P (Kuljukka et al., 1996; Tolos et al., 1990, Zhao et al., 1990,1992). Une bonne

corrélation linéaire a été rapportée pour différents milieux de travail ceci indiquant l'utilité du 1-OHP comme biomarqueur d'exposition aux HAP.

1.4.4.2. Relation entre le 1-OHP urinaire et des effets biologiques

Afin d'utiliser le 1-OHP urinaire pour estimer le risque associé à l'exposition humaine aux HAP une relation quantitative entre les niveaux de ce biomarqueur d'exposition et les effets toxiques reliés aux HAP devrait donc être établie. Des études épidémiologiques de type "cas-témoins" et de "cohorte" ont été effectuées afin d'examiner la relation entre l'exposition environnementale aux HAP et l'incidence de maladie, plus particulièrement, le cancer du poumon et de la peau (Lindstedt et Sollenberg, 1982; Armstrong et al., 1994; Partanen et Boffetta, 1994; Ronneberg et Andersen, 1995). Néanmoins, il manque d'études d'épidémiologie moléculaire dirigées vers l'établissement d'une relation entre le 1-OHP urinaire et la maladie. Toutefois, la relation entre l'excrétion du 1-OHP urinaire et des effets génotoxiques précoces tels que les cellules de haute fréquence (CHF), échanges de chromatides sœurs (ECS) a été étudiée chez l'humain.

Plusieurs auteurs ont examiné la corrélation entre l'excrétion urinaire de 1-OHP et la dose efficace à des organes cibles par mesure des adduits formés des métabolites électrophiles de HAP et l'ADN dans les cellules de globules blancs, ou au niveau des protéines sanguines (hémoglobine et albumine) comme mesure de substitution pour la dose aux tissus cibles. Dans ce but, un ou deux prélèvements urinaires ponctuels ont été faits dans ces études (Hemminki et al., 1994, 1997, Tas et al., 1994, Buchet et al., 1995, Clonfero et al., 1995). Une corrélation positive significative entre le 1-OHP urinaire et les CHF ou ECS dans les lymphocytes sanguins a été établie pour les travailleurs dans les usines de production d'électrodes de carbone (Buchet et al., 1995) et pour les travailleurs des fours à coke à des

bas niveaux d'exposition (Vanhummen et al., 1993). Une corrélation a été également rapporté entre les niveaux des adduits à l'ADN dans les cellules de globules blancs et l'excrétion urinaire de 1-OHP dans les prélèvements à la fin du quart de travail pour les travailleurs des fonderies (Hemminki et al., 1997) et des cokeries (Kuljukka et al., 1998). Van Shooten et al. (1995) ont observé une corrélation significative entre les niveaux moyens des adduits de HAP à l'ADN et la concentration urinaire du 1-OHP à la fin du dernier quart de travail de la semaine pour les travailleurs fumeurs des usines de production d'aluminium. Pourtant, cette relation n'était pas significative pour les non-fumeurs. Ces derniers auteurs ont relié les niveaux plus élevés des adduits de HAP à l'ADN chez les fumeurs à l'absorption des mélanges de HAP lors de la consommation de cigarettes. Ces mélanges contiennent des composantes pouvant influencer les cheminements métaboliques reliés à la formation des métabolites électrophiles pouvant se lier à l'ADN. Par contre, Ovrebo et al. (1994) ont observé un manque de corrélation entre les niveaux des adduits de HAP à l'ADN et l'excrétion urinaire du 1-OHP chez les travailleurs d'une usine de production d'électrodes. Cependant, ils ont noté que l'excrétion urinaire du 1-OHP reflète l'exposition récente alors que les adduits de HAP à l'ADN sont plus persistants et reflètent donc l'exposition moyenne pour une certaine période de temps. Toutefois, la différence individuelle dans l'absorption, le métabolisme et l'excrétion ainsi que les niveaux de HAP dans l'air du milieu de travail sont des facteurs importants pouvant influencer la formation des adduits et les niveaux d'excrétion du 1-OHP urinaire. Cela indique la nécessité d'étudier de manière plus détaillée, chez l'animal, la relation entre l'exposition répétée à divers mélanges de HAP et la formation des adduits aux macromolécules cellulaires d'une part, et la corrélation entre ces derniers et les niveaux du 1-OHP dans l'urine ou les niveaux urinaires d'autres métabolites de HAP avec utilité potentielle dans la SBE, d'autre part.

1.4.4.3. Seuils repères de 1-OHP urinaire comme biomarqueur d'exposition professionnelle aux HAP

Récemment, Jongeneelen (2001) a fait une proposition pour trois seuils repères de 1-OHP urinaire à partir de plusieurs études portant sur l'excrétion urinaire du 1-OHP chez des individus sans exposition professionnelle aux HAP, d'une part, (Jongeneelen et al., 1994; Vanrooij et al., 1994; Gundel et al., 1996) chez des travailleurs exposés dans leur milieu de travail aux HAP où une relation entre excrétion urinaire du 1-OHP et des effets génotoxiques a été examinée, d'autre part (Buchet et al, 1995; Popp et al., 1997; Van Schooten et al., 1995), et également à partir d'études dans lesquelles certaines recommandations pour des valeurs limites du 1-OHP dans l'urine correspondantes à des valeurs d'exposition moyennes pondérées (VEMPs) en vigueur ont été faites (Jongeneelen et al, 1990, 1992; Vanrooij et al. 1993; Kuljukka et al., 1996; Ny et al., 1993). En résumé, les concentrations les plus basses du 1-OHP urinaire exprimées comme 95^e centile chez des individus sans exposition professionnelle ont été utilisées pour proposer le premier niveau seuil repère, soit $0.24 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ créatinine pour non-fumeurs et $0.76 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ créatinine pour fumeurs. Le niveau le plus bas du 1-OHP urinaire pour lequel aucun effet génotoxique chez des travailleurs exposés a été observé, soit $1.4 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ créatinine était proposé pour le second niveau seuil repère. La corrélation entre les concentrations de HAP dans l'air du milieu de travail exprimés comme brai de goudron de houille et la concentration de 1-OHP dans l'urine à la fin du dernier quart de travail de la semaine a été utilisée pour estimer le niveau du 1-OHP urinaire correspondant à la VEMP de 0.2mg.m^{-3} brai de goudron de houille, et pour déterminer le troisième niveau seuil repère, soit $2.3 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ créatinine pour les travailleurs des fours à coke et $4.9 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ créatinine pour les travailleurs dans les usines de production d'aluminium utilisant le procédé

Soderberg ($4.3 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine correspondant à l'augmentation maximale de l'excrétion du 1-OHP au cours de la semaine de travail, $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine correspondant au niveau urinaire avant le quart de travail de la semaine). Pour d'autres milieux d'exposition professionnelle aux HAP il manque de données suffisantes pour pouvoir proposer des valeurs limites du 1-OHP dans l'urine assurant la protection de la santé humaine.

Étant donné que le troisième niveau seuil repère proposé pour les travailleurs dans les usines de production d'aluminium (Jongeneelen , 2001), coïncide avec la valeur pour 1-OHP urinaire calculé par la méthodologie de Bouchard et Viau (1999) à partir des ratios de concentrations de pyrène et concentrations de HAP cancérigènes dans l'air du milieu de travail exprimées en équivalent benzo(a)pyrène, cette méthodologie pourrait donc servir comme une nouvelle approche pour déterminer les IBEs pour 1-OHP, soit pour déterminer le troisième niveau seuil repère pour les autres milieux de travail pour lesquels l'exposition aux HAP se fait surtout par inhalation.

1.4.4.4. Méthodologie pour établir des indices biologiques d'exposition (IBE) de 1-OHP urinaire

Kuljukka et al. (1996) ont observé des corrélations significatives entre le 1-OHP urinaire et le BaP ou le P dans l'air du milieu de travail chez des travailleurs des fours à coke suggérant que le 1-OHP urinaire puisse être utilisé comme biomarqueur d'exposition aux HAP cancérigènes. Cependant, une utilisation optimale de ce métabolite dans ce secteur industriel impliquerait que le ratio entre le P et les HAP cancérigènes reste constant au cours du temps. D'autres études dans les milieux de travail ont également mis en évidence une bonne corrélation entre le 1-OHP urinaire et l'exposition aux HAP (Buchet et al. 1992;

Jongeneelen et al. 1990; Ny et al, 1993). À partir des résultats obtenus de ces études, Bouchard et Viau (1999) ont proposé une équation simple pour déterminer un IBE pour le 1-OHP urinaire pour un milieu d'exposition donné (#2) se basant sur un autre IBE déjà validé pour autre milieu de travail (#1) et sur les concentrations de HAP cancérigènes dans les deux milieux de travail exprimées en équivalent BaP:

$$IBE_{(2)} = IBE_{(1)} \times \frac{\left[\frac{[BaPeq]_1}{[P]_1} \right]}{\left[\frac{[BaPeq]_2}{[P]_2} \right]}$$

où, les $IBE_{1,2}$ sont les IBE du 1-OHP urinaire pour les milieux de travail 1 et 2 respectivement; $[BaPeq]_{1,2}$ sont les sommes des concentrations de HAP cancérigènes exprimées en équivalent BaP, et $[P]_{1,2}$ sont les concentrations de P dans l'air de milieu de travail 1 et 2. Évidemment, cette approche pourrait être utilisée lorsque l'exposition se fait surtout par inhalation et qu'on peut négliger la contribution de l'apport cutané à l'excrétion de 1-OHP.

1.5. La problématique des mélanges de HAP

Étant donné que le milieu de travail s'avère la source principale d'exposition aux HAP, étant donné que les HAP y sont présents sous forme de mélanges complexes, on peut supposer une influence possible de l'exposition à plusieurs HAP sur l'excrétion urinaire des métabolites d'un HAP spécifique aussi bien que sur la formation des adduits aux macromolécules cellulaires provenant d'un HAP donné. Il est bien certain, que les HAP subissent l'action d'un groupe d'enzymes appelées les mono-oxygénases à fonctions multiples, celles-ci regroupant les isoenzymes du cytochrome P-450. Conney et al. (1994) ont observé que le BaP, le 3-méthylcholanthrène et le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène

(DMBA) induisaient l'activité BaP hydroxylase, c'est-à-dire le système enzymatique métabolisant le BaP en produits phénoliques fluorescents alors que le pyrène et l'anthracène n'avaient aucun effet sur son activité. Ceci indique que la présence de certains HAP dans un mélange peut conduire à un effet sur le métabolisme d'autres membres de cette même famille de composés dans le mélange. Un tel effet a été observé par Jacob et al (1982) dans des études *in vitro* avec des microsomes de foies de rats. Une induction du métabolisme du pyrène par le BaP suite à l'exposition concomitante a été démontrée dans cette étude. Dans une autre étude plus récente, Bouchard et al. (1998) ont examiné l'effet de l'exposition à des mélanges binaires (BaP et pyrène) et ternaires (naphtalène, BaP et pyrène) de HAP sur l'excrétion urinaire du 1-OHP chez le rat et ont observé que la présence de naphtalène à toutes les doses utilisées dans cette étude et/ou BaP à faibles doses (0.5 $\mu\text{mol/kg}$) n'influencent pas l'excrétion globale de 1-OHP dans l'urine. Par contre, une augmentation significative du pourcentage de la dose de pyrène excrétée dans l'urine sous forme de 1-OHP a été observée à des doses élevées de BaP dans les mélanges binaires et ternaires considérés. Cet effet a été expliqué par une induction du métabolisme du pyrène par le BaP suite à des expositions concomitantes à ces mélanges de HAP à fortes doses. Cependant, cet effet est peu probable dans des conditions réelles d'exposition professionnelle où les doses d'exposition aux HAP sont beaucoup plus faibles que dans l'expérience discutée. De plus, il reste à clarifier plusieurs interrogations concernant l'exposition aux mélanges de HAP et les interférences toxicocinétiques possibles ainsi que les effets biologiques qui y sont associés.

Il est important de mentionner que la plupart des études expérimentales portant sur les mélanges de HAP et sur l'excrétion urinaire de métabolites de HAP spécifiques sont limitées exclusivement à des expositions à la créosote ou au goudron de houille chez l'animal ou l'humain. Dans une étude récente portant sur l'exposition subchronique de rats

mâles Sprague-Dawley au pyrène seul (0.046 mg/kg/jour) et aux mélanges complexes de HAP (contenant de 0.046, 0.15 et 0.46 mg pyrène/kg/jour), Bouchard et al. (2002) ont observé une augmentation progressive de l'excrétion du 1-OHP urinaire quelle que soit la dose d'administration de pyrène ou de mélanges de HAP. Cet effet a été relié à une libération, au cours de temps, du pyrène accumulé dans des compartiments de stockage ou à la circulation entéro-hépatique du 1-OHP ou d'autres métabolites du pyrène. Toutefois, il existe un intérêt scientifique croissant sur la voie cutanée d'exposition aux HAP qui s'avère importante à étudier étant donné les effets locaux sur la peau, d'une part, et les effets systémiques, d'autre part, qui y sont associés. Par exemple, Schoket et al. (1988) ont observé la formation d'adduits de HAP à l'ADN dans le poumon suite à une application cutanée de produits du goudron et du bitume chez la souris. Le risque de cancer du poumon suivant l'exposition cutanée aux mélanges de HAP devrait donc être considéré. Une autre étude représentative est celle de Jongeneelen et al. (1986) qui porte sur l'exposition des rats au goudron de houille par la voie cutanée et qui a démontré une absence d'influence d'autres HAP contenus dans le mélange sur la quantité de 3-OHBP et 1-OHP excrétée dans l'urine. Autrement dit, l'excrétion urinaire de ces métabolites augmentait de façon proportionnelle à la dose de P administrée. Par ailleurs, certains auteurs ont étudié l'excrétion urinaire du 1-OHP chez des patients psoriasiques suite à une application cutanée de goudron de houille pur ou d'onguent à base de goudron de houille et ont observé une augmentation du 1-OHP suivant le traitement (Clonfero et al. 1989; Hansen et al. 1993, Jongeneelen et al. 1985) ainsi que durant le traitement (Jongeneelen et al 1986). Il est important de mentionner que ces dernières études ne permettent pas de comprendre les mécanismes d'interactions entre les composants du mélange car elles n'ont pas été réalisées en conjonction avec des études portant sur des composés individuels ou sur des mélanges plus simples. L'influence d'un HAP sur la biotransformation d'un autre ou

d'autres HAP, ainsi que l'effet de l'administration du mélange par rapport à l'administration des composés individuels sur les niveaux d'excrétion de certains métabolites d'intérêt n'a pas été mis en évidence. Dans une autre étude, (Viau et al., 1995) ont comparé le profil cinétique et la valeur de demi-vie d'élimination du 1-OHP urinaire obtenue chez les volontaires exposés à la créosote et chez un patient psoriasique par rapport à des volontaires exposés au pyrène seul. Ils ont observé que le profil d'excrétion du 1-OHP, en général, n'est pas influencé par une exposition concomitante à d'autres HAP aux concentrations contenues dans la créosote ou dans le shampooing à base de goudron.

Il reste toutefois intéressant d'examiner une influence possible sur l'excrétion urinaire du 1-OHP en fonction de la composition particulière des mélanges différents de HAP. Il est important d'effectuer des études animales avec des doses de mélanges de HAP représentatives des différents milieux de travail dans différents scénarios d'exposition, y compris aiguë, subchronique et chronique afin d'examiner les réponses du système biologique (formation des adduits particuliers à l'ADN ou aux protéines tissulaires, excrétion de certains métabolites de HAP d'importance prioritaire en surveillance biologique de l'exposition etc.) ce qui permettra de développer de meilleurs indices biologiques d'exposition et ce qui permettra d'estimer plus précisément le risque pour la santé humaine.

1.6. Problématique du projet de recherche

1.6.1. Problématique générale

Le développement et la validation des bioindicateurs d'exposition aux HAP dans des études épidémiologiques et dans l'analyse du risque associé à l'exposition à ces contaminants

environnementaux sont parmi les problèmes prioritaires en toxicologie industrielle et en santé au travail. Étant donné l'abondance du pyrène dans la plupart des mélanges de HAP rencontrés, étant donné la facilité de mesurer son métabolite majeur, soit le 1-OHP, dans l'urine animale et humaine, étant donné que son excrétion est corrélée avec l'intensité de l'exposition, ce métabolite a été suggéré comme bioindicateur de l'exposition aux HAP totaux. Présentement, des efforts scientifiques sont dirigés également vers la validation du 1-OHP urinaire comme biomarqueur corrélé à des effets biologiques (c.-à-d. génotoxicité des HAP). Néanmoins, il n'y a que deux milieux de travail pour lesquels des indices biologiques d'exposition (IBE) pour 1-OHP ont été proposés : pour les travailleurs des fours à coke ($2.3 \mu\text{mol 1-OHP}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine) et ceux des usines de production d'aluminium utilisant le procédé Soderberg ($4.9 \mu\text{mol 1-OHP}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine). Pour les autres milieux d'exposition aux HAP, il manque des données permettant d'établir des indices biologiques d'exposition pour le 1-OHP. Dans ce but, nous avons développé dans notre laboratoire une nouvelle approche, qui pourrait être caractérisée comme "flexible" et "raisonnable", tenant compte des mesures environnementales et biologiques et qui permettra d'établir facilement les valeurs des IBE correspondant à un milieu donné d'exposition aux HAP. Cette nouvelle approche de détermination des IBE pour le 1-OHP devrait donc être validée dans un modèle animal.

De plus, le BaP est le composant des mélanges complexes de HAP le plus souvent utilisé comme "modèle" pour étudier la cancérogénicité des HAP chez l'animal. Les métabolites urinaires du BaP, bien que facilement mesurables chez l'animal, ne sont toutefois pas quantifiés aisément chez l'humain avec les méthodes analytiques courantes. Il est donc nécessaire de procéder au développement et à la mise au point de méthodes plus sensibles

que celles utilisées présentement, d'une part, et de développer et valider d'autres bioindicateurs corrélés aux effets biologiques, d'autre part. Ceci permettra d'estimer plus précisément la toxicité au niveau cellulaire (y compris la formation des adduits entre les cancérogènes ultimes provenant de HAP et macromolécules cellulaires), et ensuite d'analyser et de gérer le risque associé.

1.6.2. Problématiques spécifiques

1.6.2.1. Absence de données concernant la formation des adduits aux protéines tissulaires suite à l'exposition répétée à des mélanges de HAP chez l'animal

La plupart des études expérimentales portent sur une exposition unique au BaP seul par différentes voies d'exposition et la mesure des adduits à l'ADN ou aux protéines sanguines (hémoglobine ou albumine). Cependant, il existe des données sur l'exposition répétée au BaP par la quantification des adduits à l'hémoglobine ou à l'albumine. Par contre, il n'existe que des données limitées sur la formation des adduits aux protéines tissulaires dans les organes cibles et non cibles suite à l'exposition unique au BaP seul. Une distribution similaire des adduits de BaPDE aux protéines autant dans les organes cibles que non-cibles a été observée. Il est donc essentiel d'étudier cette distribution dans le contexte de l'exposition répétée aux mélanges de HAP (BaP + P dans cette étude) où une interférence métabolique pourrait entraîner une augmentation ou une diminution de la quantité des adduits d'un HAP donné par rapport aux résultats obtenus avec le BaP seul. Ceci influencerait la charge électrophile tissulaire (CET) formée lors de l'exposition et qui, de son côté, pourrait refléter la génotoxicité des mélanges complexes de HAP.

1.6.2.2. Vérification expérimentale d'une méthodologie de l'ajustement de la valeur de référence du 1-OHP urinaire dans l'exposition à divers mélanges de HAP.

Tel que discuté précédemment, le 1-OHP urinaire est le seul métabolite urinaire de HAP dont la mesure dans l'urine humaine est utilisée comme biomarqueur d'exposition globale aux HAP. Toutefois, un seul IBE pour 1-OHP ne peut pas être utilisé dans tous les milieux d'exposition professionnelle dont les profils de HAP varient remarquablement. Pour cette raison, un simple algorithme a été développé dans notre laboratoire qui permet d'ajuster les IBE d'un environnement professionnel à un autre à partir des profils rapportés des HAP et de la proportionnalité entre la quantité du 1-OHP urinaire et la dose d'exposition du pyrène même quand ce dernier est administré en mélange avec d'autres HAP. On tente de vérifier cet algorithme en déterminant les niveaux du 1-OHP urinaire correspondant à des seuils donnés de charge électrophile tissulaire (CET) pour quelques tissus choisis.

1.6.2.3. Insuffisance de données quantitatives sur l'influence de l'exposition répétée à des mélanges de HAP sur l'excrétion urinaire et fécale du 1-OHP et 3-OHBaP

Étant donné que le 1-OHP urinaire est utilisé comme bioindicateur de l'exposition globale aux HAP, étant donné qu'une certaine quantité du 1-OHP est excrétée dans les fèces, il apparaît intéressant d'établir, à partir du modèle animal, la proportion de la dose de pyrène administrée, éliminée sous forme du 1-OHP par voie biliaire et fécale en comparaison avec celle qui est éliminée dans l'urine suite à l'exposition répétée à des mélanges de HAP. De plus, des expériences animales ont montré qu'une certaine proportion de la dose initiale de pyrène semblait être éliminée par la voie biliaire et fécale. Il est bien connu que les métabolites du BaP, tels que le 3-OHBaP, sont éliminés principalement dans les fèces et en

faible quantité dans l'urine; il importe donc d'établir l'effet de l'exposition aux mélanges de HAP et les doses des mélanges de HAP sur la quantité excrétée du 3-OHBaP dans l'urine et dans les fèces ainsi que sur le ratio 3-OHBaP fécale vs 3-OHBaP urinaire. Autrement dit, il est nécessaire de déterminer l'importance relative de l'excrétion fécale et urinaire de 1-OHP et 3-OHBaP en fonction de la dose binaire (BaP+P) pour une voie d'exposition donnée (la voie intrapéritonéale dans la présente étude). De plus, le transport biliaire est toutefois un processus saturable qui est susceptible d'être sujet à de l'inhibition compétitive. Étant donné que la plupart des HAP formeront des métabolites mono-hydroxylés, une inhibition compétitive du transport biliaire des conjugués du 1-OHP à cause de la présence d'autres conjugués d'un autre HAP (ou d'autres HAP) est possible. Cette inhibition entraînerait une plus grande élimination de ces derniers (des conjugués du 1-OHP) par voie urinaire pour une même dose d'exposition au pyrène.

1.7. Objectifs de recherche

1.7.1. Objectif général

L'objectif général de ce projet de recherche sera donc de vérifier notre hypothèse principale que le 1-OHP urinaire peut servir comme bioindicateur de la dose interne de HAP ainsi que comme mesure corrélée à la charge électrophile tissulaire (CET) dans les organes cibles pour la cancérogénicité. La CET, soit les adduits aux protéines tissulaires, a été prise comme mesure de toxicité étant donné les limites instrumentales de détection et l'impossibilité de quantifier spécifiquement les adduits à l'ADN pouvant servir comme mesure directe de la génotoxicité. Cela permettrait d'attribuer au 1-OHP le rôle de bioindicateur relié à l'effet biologique des mélanges complexes de HAP. Le modèle du rat a été choisi étant donnée la similarité entre la physiologie humaine et celle du rat afin

d'étudier la relation entre la CET et l'excrétion urinaire et fécale du 1-OHP et 3-OHBaP dans le but d'examiner la corrélation entre différents biomarqueurs d'exposition aux HAP pour trois différents scénarios d'exposition correspondant à différents ratios BaP/P. La voie intra-péritonéale a été choisie afin de s'affranchir des problèmes de solubilité des HAP sur toute la plage des doses utilisées. Les HAP sont en effet des substances lipophiles qui se solubilisent mal dans des solvants pouvant être injectés en I.V. Cette démarche permettra de vérifier une méthodologie qui a été développée dans notre laboratoire pour établir les IBE pour 1-OHP urinaire et qui ensuite pourrait être appliquée pour la surveillance biologique de l'exposition aux HAP et donc contribuerait à une meilleure évaluation du risque posé par l'exposition à ces contaminants environnementaux.

1.7.2. Objectifs spécifiques

- 1) Examiner l'effet de l'exposition répétée à des mélanges binaires de HAP sur la formation de la CET dans quelques tissus d'intérêt prioritaire (Article 1).

- 2) Déterminer la corrélation entre la CET et le 1-OHP urinaire ou d'autre biomarqueurs d'exposition aux HAP afin, d'une part, de vérifier un algorithme avec utilité potentielle dans la surveillance biologique de l'exposition aux HAP et, d'autre part, de comparer et discuter, en général, l'utilité potentielle des différents biomarqueurs d'exposition aux HAP. L'influence de l'exposition répétée à des mélanges de HAP sur l'excrétion urinaire et fécale du 1-OHP et 3-OHBaP a été également étudiée afin d'approfondir notre connaissance sur les interférences toxicocinétiques possibles suivant l'exposition aux mélanges de HAP (Article 2).

BIBLIOGRAPHIE

- ACGIH** (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) (1991). Documentation of the threshold limits and biological exposure indices. 6th edn. pp.1051-1054, ACGIH, Cincinnati, Ohio
- Angerer, J., Mannschreck, C., Gundel, J.** (1997). Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch.Occup.Environ.Health.*, 70: 365-377
- Ariese, F., Verkaik, M., Hoorweg, GP, Van de Nesse, R.J., etc** (1994). Trace analysis of 3-hydroxybenzo(a)pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J.Ann.Toxicol.*, 18, 195-204
- Armstrong, VC et Newhook** (1992). Assessing the health risks of priority substances under the Canadian environmental protection act. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 15, 111-121
- Armstrong, VC, Tremblay, C, Theriault, G** (1994). Lung cancer mortality and polynuclear aromatic hydrocarbons: a case-cohort study of aluminium production workers in Arvida, Quebec, Canada. *Am.J.Epidemiol*, 139: 3, 250-262
- Atkinson, R. et Arrey, J.** (1994). Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons - formation of atmospheric mutagens. *Environ.Health.Perspect.*, 102, 117-126

- Boogaard, PJ et Van Sitter, NJ (1994).** Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in petrochemical industries by measurement of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup.Environ.Med.*, 51, 250-258
- Bouchard, M., et Viau, C. (1995).** Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxy-benzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Arch.Toxicol.*, 69: 540-546
- Bouchard, M., et Viau, C. (1996).** Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 139:301-309
- Bouchard, M., Krishnan, K., Viau, C. (1998).** Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Arch Toxicol.*, 72: 475-482
- Bouchard, M et Viau, C. (1999).** Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and a methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers*, 4 (3), 159-187
- Bouchard, M, Thuot, R., Carrier, G., Viau, C (2002).** Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J.Toxicol.Environ.Health, Part.A*, 65, 101-115

- Boyland, E.** et Sims, P. (1964). Metabolism of polycyclic compounds.23. The metabolism of pyrene in rats and rabbits. *Biochem.J.*, 90, 391-398
- Buchet, JP,** Gennart, JP, Mercado-Calderon, F., et al. (1992). Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a coke production and a graphite electrode manufacturing plant: assessment of urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biological indicator of exposure. *Br.J.Ind.Med.*, 49, 761-768
- Buchet, JP,** Ferreira, M., JrBurrion, JB et al. (1995). Tumor markers in serum, polyamines and modified nucleosides in urine, and cytogenic aberrations in lymphocytes of workers exposed to PAH. *Am.J.Ind.Med.*, 27, 523-543
- Camus, A.,** Aitio, A., Sabadie, N., Wahrendorf, J. et Bartsch, H (1984). Metabolism and urinary excretion of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in C57 and DBA mice strains. *Carcinogenesis.*, 5, 35-39
- Clonfero, E.,** Zordan, M., Venier, P et al. (1989). Biological monitoring of human exposure to coal tar. Urinary excretion of total polycyclic aromatic hydrocarbons, 1-hydroxypyrene and mutagens in psoriatic patients. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 61, 363-368
- Clonfero, E.,** Granella, M., Marchioro, M., Barra, EL., et al (1995). Urinary excretion of mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, 16(3), 547-554

CNRC (Conseil national de recherche du Canada) (1983). "Les HAP dans le milieu aquatique: formation, source, devenir, et effets sur le biota. Comité associé du Conseil national de recherche sur les critères scientifiques couvrant l'état de l'environnement. No de publication CNRC 18981, Ottawa, ON, pp.209

Conney, AH., Chang, RL., Jerina, DM., Wei, SJC (1994). Studies on the metabolism of benzo(a)pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite. *Drug.Metab.Rev.*, 26, 125-163

Doll, R., Vessey, MP, Beasley, RWR, Buckley, AR, Fear, EC, Fisher, REW, Gammon, EJ, Gunn, W, Hughes, GO, Lee, K, and Norman-Smith, B (1972). Mortality in gasworkers-final report of a prospective study. *Br.J.Ind.Med*, 29, 394-406

Dor, F., Dab, W., Empereur-Bissonnet, P., Zmirou, D (1999). Validity of Biomarkers in Environmental Health Studies: The Case of PAHs and Benzene. *Crit.Rev.Toxicol.*, 29 (2): 129-168

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1983). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polycyclic Aromatic Compounds. Part 1, Chemical, environmental and experimental data, volume 32, IARC, WHO, Lyon, France.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1984). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polycyclic Aromatic

Compounds. Industrial exposure in aluminium production, Coal Gasification, Coke Production, and Iron and Steel Founding, Vol.34,part 3 (Lyon: IARC), pp.37-183

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1985). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polynuclear aromatic compounds, Part 4, Bitumens, coal-tars and derived products, shale-oils and soots, volume 35, (Lyon :IARC), pp.83-159

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1987). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Overall evaluations of Carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Supplement 7 (Lyon: IARC), pp.56-178

Ferreira, M., Bouchet, J.P., Burrion, J.B., Moro, J., Cupers, L., Delavignette, JP, Jacques, J., Lauwerys, R. (1994a). Determinants of urinary thioethers, D-glucaric acid and mutagenicity after exposure to PAH assessed by air monitoring and measurements of 1-hydroxypyrene in urine; a cross-sectional study in workers of coke and graphgite electrode producing plants. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.*, 65, 329-338

Ferreira, M., Tas, J., Dell'Omo, M., Goormans, G., Buchet, J.P, et Lauwerys, R (1994b). Determination of benzo(a)pyrenediol-epoxide adducts to hemoglobin in workers exposed to PAH. *Occup.Environ.Med.*,51, 451-455

- Grimmer, G.,** Dettbarn, G.P., Jacob, J (1993). Biomonitoring of PAH in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenanthrene and pyrene metabolites. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.*, 65, 189-199
- Grimmer, G.,** Jacob, J., Dettbarn, G.P., and Naujack, KW. (1997). Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.*, 69, 231-239
- Gundel, J,** Mannschreck, C., Buttner, K., Ewers, U., Angerer, J. (1996). Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-,2-,3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.*, 31, 585-590
- Gundel, J.,** Schaller, KH., Angerer, J. (2000). Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant:biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenz(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene *Int. Arch. Environ. Health.*, 73, 270-274
- Hansen, AM,** Olsen, ILB, Holst, E, et Poulsen, OM (1991). Validation of a high-performance liquide chromatography/fluorescence detection method for simultaneous quantification of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann.Occup.Hyg.* 35, 603-611

- Hansen, AM.,** Poulsen, OM., Menne, T (1993). Longitudinal study of excretion of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine from 2 psoriatic patients. *Acta.Derm.Venereol.*, 73, 188-190
- Heinzow, BGJ** et McLean, A (1994). Critical evaluation of current concepts in exposure assessment. *Clin.Chem.*, 40(7), 1368-1375
- Hemminki, K.,** Zhang, LF, Kruger, J. et al. (1994). Exposure of bus and taxi drivers to urban air pollutants as measured by DNA and protein adducts. *Toxicol.Letters*, 72, 171-174
- Hemminki, K.,** Dickey, C., Karlsson, S., et al. (1997). Aromatic DNA adducts in foundryworkers in relation to exposure, life style and CYP 1A1 and glutathion transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, 18 (2), 345-350
- Jacob, J,** Grimmer,G., Raab,G., Schmoltd, A (1982). The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. *Xenobiotica*, 12, 45-53
- Jongeneelen, FJ,** Anzion, RBM., Leijdekker, CM, Bos, RP., Henderson, PT (1985). 1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal-tar derived product. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.*, 57, 47-55

- Jongeneelen, FJ, Bos, RP, Anzion, RBM., Theuws, JL, et Henderson, PT (1986).**
Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Scand.J.Environ.Health., 12, 137-143
- Jongeneelen, FJ, Anzion, RBM., et Henderson, PT (1987).** Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine.
J.Chromatogr., 413, 227-232
- Jongeneelen, FJ., van Leeuwen, FE, Oosterink, S et al. (1990).** Ambient and biological monitoring of cokeoven workers; determinants of the internal dose of PAH.
Br.J.Ind.Med., 47, 454-461
- Jongeneelen, FJ (1992).** Biological exposure limit for occupational exposure to coal tar pitch volatiles at cokeovens. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 63, 511-516
- Jongeneelen, FJ (1994)** Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene in urine of people. *Toxicol.Lett.* 72, 205-211
- Jongeneelen, FJ (2001).** Benchmark Guidline for Urinary 1-Hydroxypyrene as Biomarker of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Ann.Occup.Hyg.*, 45 (1), 3-13

Kuljukka, T., Vaaranrinta, R., Veidebaum, T., Sorsa, M., Peltonen, K. (1996). Exposure to PAH compounds among cokery workers in the oil shale industry. *Environ.Health.Persp.*, 104 (suppl.3), 539-541

Kuljukka, T., Savela, K., Vaaranrinta, R., Mutanen, P et al. (1998). Low response in white blood cell DNA adducts among workers in a highly polluted cokery environment. *J.Occup.Environ.Med.*, 40(6), 529-537

Kwack SJ, Lee MB (2000) Correlation between DNA or protein adducts and benzo(a)pyrene dioepoxide I-triglyceride adduct detected in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 21, 4: 629-632

Law, RJ, et Biscaya, JL (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Mar.Pollut.Bull*, 29(4-5), 235-241

Lee, W-J., Wang, Y-F, Lin, T-C, Chen, Y-Y, Lin, W-C, Ku, C-C et Cheng, J-T. (1995) PAH characteristics in the ambient air of traffic source. *Sci.Total.Environ.* 159, 185-200

Lesage, J, Perrault, G. et Durand, P (1987). Evaluation of workers exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am.Ind.Hyg.Assoc.J.* 48, 753-759

Levin, JO (1995). First international workshop on hydroxypyrene as a biomarker for PAH exposure in a man-summary and conclusions. *Sci.Total.Environ.* 163, 165-168

Lewtas J, Mumford J, Everson RB, Hulka B, Wilcosky T, Kozumbo W, Tompson C, George M, Dobiac L, Sram R, Li X, Gallagher J (1993) Comparison of DNA Adducts to Complex Mixtures in Various Human Tissues and Experimental Systems. *Environ.Health.Perspect.* 99: 89-97

Lindstedt, G., et Sollenberg, J. (1982) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the occupational environment. *Scand.J.Work.Environ.Health.*, 8, 1-19

Lioy, PL, Waldaman, JM, Greeberg, A, Harkov, R et Pietarienen C (1988). The total human environmental exposure study (THEES) to benzo(a)pyrene: comparison of the inhalation and food pathways. *Arch.Environ.Health.* 43, 304-312

Loening, KL, Merritt, JE, Later,D et Wright,W (1990). *Polynuclear aromatic hydrocarbons. Nomenclature guide.* Battelle Press, Columbus, Ohio

McMichael, AJ (1994). Molecular epidemiology: New pathway or new traveling companion ? *Am.J.Epidemiol.*, 140, 1-11

Meek, ME, Chan, PKL et Bartlett, S (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ.Carcino.Ecotox.Rev.*C12,443-452

Nikolaou, K, Masclet, P et Mouvier, G (1984). Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere - a critical review. *Sci.Total.Environ.* 32, 103-132

Ny, ET., Heederik, D., Kromhout, H , Jongeneelen, F (1993). The relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons in air and in urine of workers in a Soderberg potroom. *Am.J.Ind.Hyg.Assoc.J.*, 54, 277-284

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) (1985). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Method 5506, Cincinnati, Ohio

OSHA (Occupational Safety and Health Administration), Department of Labor (1976). Exposure to coke oven emissions: occupational safety and health standards. *Federal Register*, 41, 46742-46790

Ovrebo, S., Haugen, A., Fjeldstad, PE., Hemminiki, K. et Szyfter, K (1994). Biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in an electrode paste plant. *J.Occup.Med.*, 36, 303-310

Park HS, Park YA, Lee BM (2002) Effects of pH and temperature on benzo(a)pyrene-DNA,-protein,and-lipid adducts in primary rat hepatocytes. *J.Toxicol.EnvIRON.Health.* Part A, 65: 205-214

Partanen, T., et Boffetta, P (1994). Cancer risk in asphalt workers and roofers: review and meta analysis of epidemiologic studies. *Am.J.Ind.Med.*, 26, 721-740

Poirier, MC and Beland, FA (1992). DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA

adduct-based human cancer risk assessment. *Chem Res Toxicol*: 5 (6):749-55

Popp, W., Vahrenholz, C., Schell, C., Grimmer, G., Dettbarn, G. et al. (1997). DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers. *Occup. Environ. Med.*, 54, 176-183

Quilliam, MA, et Sim, PG (1988). Determination of polycyclic aromatic compounds by high- performance liquide chromatography with simultaneous mass spectrometry and ultraviolet diode array detection. *J.Chromatogr.Sci.*, 26, 160-167

Redmond, CK, Strobino, BR, et Cypess, RH (1976). Cancer experience among coke by-product workers. *Ann.N.Y.Acad.Sci*, 271, 102-115

Ronneberg, A. et Andersen, A (1995). Mortality and cancer morbidity in workers from aluminium smelter with prebaked carbon anodes -part II: cancer morbidity. *Occup. Environ. Med.*, 52, 250-254

Roussel, R, Allaire, M, et Friar, RS (1992). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons at a point source of emissions. Part A: Identification and determination of polycyclic aromatic compounds in airborne particulate matter near a horizontal stud Soderberg plant. *J.Air.Waste.Manage.Assoc*, 42, 1609-1613

Santella, RM. (1997). DNA damage as an intermediate biomarker in intervention studies. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*; 216: 166-171

Schoket, B., Hewer, A., Grover, PL., Phillips, DH (1988). Covalent binding of compounds of coal-tar creosote and bitumen to the DNA of the skin and lungs of mice following topical application. *Carcinogenesis.*, 7, 1253-1258

Schoket, B., Poirier, MC, Vincze, I (1995). Biomonitoring of genotoxic exposure in aluminium plant workers by determination of DNA adducts in human peripheral blood lymphocytes. *Sci.Total.Environ.*, 163(1-3), 153-163

Schoket, B. (1999). DNA damage in humans exposed to environmental and dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat.Res.*, 424 (1-2), 143-153

Schoket B, Poirier MC, Mayer G, Torok G, etc (1999). Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutat Res.* 30, 445 (2): 193-203

Selkirk, J.K., MacLeod, M.C., Mansfield, B.K., Nikbakht, P.A., Dearstone, K.C. (1983). Species heterogeneity in the metabolic processing of benzo(a)pyrene. *Basic Life.Sc.* 24, 283-294

Simon, P., Lafontaine, M., Delsaut, P., Morele, Y. et Nicot, T. (2000). Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 748, 337-348

Smith, MT. et Suk, WA (1994). Application of molecular biomarkers in epidemiology.

Environ.Health.Perspect., 102, 229-235

Tas, S., Buchet, JP. et Lauwerys, R. (1994). Determinants of benzo(a)pyrenediol epoxide adducts to albumine in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons.

Int.Arch.Occup.Environ.Health, 66, 343-348

Tolos, WP, Lowry, LK, Shaw,PB (1990). The marker concept: 1-pyrenol as a biomarker for occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons containing pyren.

In: Fiserova-Bergerova, V., Ogata,M (Eds), Biological Monitoring of Exposure to Industrial Chemicals, Proc.United States-Japan Cooperative Seminar on Biological Monitoring, pp.147-150

Vanhumelen, P., Gennart, JP., Buchet, JP et al. (1993). Biological markers in PAH exposed workers and controls. *Mutation Research*, 300, 231-239

Van Rooij, GM, Bodelier-Bade, MA, Jongeneelen, FJ (1993). Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *Br.J.Ind.Med*, 50, 623-632

Van Rooij, GM, Bodelier-Bade, MA, Hopmans, PM, Jongeneelen, FJ (1994) Reduction of urinary 1-hydroxypyrene excretion in coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons due to improved hygienic skin protective measures.

Ann.Occup.Hyg, 38, 247-256

- Van Schooten, FJ.**, Jongeneelen, FJ., Hillebrand, MJX., Van Leeuwen, FE et al. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cell DNA and 1-hydroxypyrene in the urine from aluminium workers: relation with job category and synergistic effect of smoking. *Cancer.Epidemiol.Biomarkers.Prevent.*, 4, 69-77
- Viau, C.**, et Carrier, G. (1995). Kinetics of Hemoglobin and Albumin adducts in Rabbits Subchronically Exposed to Benzo(a)pyrene. *Fundam.Appl.Toxicol.*, 24, 140-144
- Viau, C.**, Carrier, G., Vyskocil, A., Dodd, C (1995). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and the dermal route. *Sci.Total.Environ.* 163, 179-186
- Whiton, RS**, Whitterspoon, CL, Buckley, TJ (1995). Improved high performance liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human urine *J.Chromatogr.B.*, 665, 390-394
- Wild, SR** et Jones, KC (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ.Pollut.*, 88, 91-108
- Winker, N**, Weniger, P., Klein W, Ott, E. et al (1995). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure damage using different methods in laboratory animals. *J.Appl.Toxicol.*, 15(1), 59-62

Wise, SA, Sander, LC, et May, WE (1993). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquide chromatography, *J.Chromatogr.*, 642, 329-349

Withey, JR., Shedden, J,et al. (1993). Distribution of benzo(a)pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with data obtained with pyrene. *J.Appl.Toxicol.*, 13, 193-202

Zhao, Z-H, Quan,W-Y, Tian,D-H (1990). Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator of human exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal-burning environment. *Sci.Total.Environ.* 92, 145-154

Zhao, Z-H, Quan,W-Y, Tian,D-H (1992). The relationship between polynuclear aromatic hydrocarbons in ambient air and 1-hydroxypyrene in human urine. *J.Environ.Sci.Health A* 27,1949-1966

CHAPITRE DEUXIÈME

PRÉSENTATION DES ARTICLES

ARTICLE 1

Electrophilic Tissue Burden in Male Sprague-Dawley Rats Following Repeated Exposure to Binary Mixtures of PAHs

Adela Tzekova, Suzanne Leroux and Claude Viau

Département de santé environnementale et santé au travail,
Université de Montréal, Montréal, Canada PO Box 6128, Station Centre-ville, Québec
H3C 3J7, Canada

✉ **Claude Viau**. Département de santé environnementale et santé au travail, Université de
Montréal, Montréal, Canada PO Box 6128, Station Centre-ville, QC H3C 3J7, Canada

Fax number: (514) -343-2200

E-mail: [REDACTED]

Prêt à être soumis pour publication à *Archives of Toxicology*

Adela Tzekova

M.Sc Santé environnementale et santé au travail

**Article: Electrophilic Tissue Burden in Male Sprague-Dawley Rats Following
Repeated Exposure to Binary Mixtures of PAHs**

Adela Tzekova, Suzanne Leroux and Claude Viau

Prêt à être soumis pour publication à *Archives in Toxicology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Adela Tzekova inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, des biomarqueurs d'exposition à la mesure de la charge électrophile tissulaire"

Coauteur: Suzanne Leroux

Signature:



Date:

16 décembre 2002

Coauteur: Claude Viau

Signature:



Date:

11 décembre 2002

Abstract:

The aim of this study was to investigate the ETB (electrophilic tissue burden) formation, assessed as covalent binding of the ultimate carcinogen benzo(a)pyrene diolepoxide (BaPDE) with cellular proteins, in liver, lung and heart, as well as with haemoglobin (Hb) following repeated exposure to binary mixtures of benzo(a)pyrene (BaP) and Pyrene (P). Male Sprague-Dawley rats were administered intraperitoneally (I.P), once daily for 10 consecutive days, binary mixtures of BaP and P in three different exposure scenarios corresponding to BaP/P ratios = 0.2, 1 and 5 and with three constant doses of BaP (2, 6 and 20 mg/kg) for each scenario. The ETB levels were measured as the ultimate analyte benzo(a)pyrene tetrol (BaPTeT) obtained after mild acid hydrolysis of BaPDE-adducts with proteins. HPLC/fluorescence technique was used to quantify the analyte. Similar ETB levels (within a factor of 4) were observed in all tissues studied at any given binary dose. However, ETB generally tended to be somewhat higher in metabolically active tissues (i.e liver, lung) than in metabolically non-active tissues (i.e. heart, haemoglobin). Lack of influence of pyrene onto ETB levels in all tissues was confirmed over the binary dose range examined. Linear BaP-dose-dependent ETB formation in all tissues (at $P \leq 0.05$) was observed. Linear regressions were found for all between-tissue relationships of ETB over the exposure doses with best linear correlations obtained for "ETB in Heart vs Hb" ($R^2=0.709$; $P < 0.0001$) and "ETB in Lung vs Hb" ($R^2=0.507$; $P < 0.0001$). Thus it has been suggested that BaPDE-Hb adducts could serve as a surrogate of the ETB in target for carcinogenicity tissues such as lung. The results obtained in this study indicate the role of the ETB as a promising molecular biomarker indicative for the potential cellular damage resulting from intracellular covalent binding in animal studies.

Key words: benzo(a)pyrene, benzo(a)pyrene diolepoxide, polycyclic aromatic hydrocarbon, pyrene, electrophilic tissue burden

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), ubiquitous pollutants in many different work environments, have been associated with an increased risk of contracting lung, urinary tract, brain and skin cancers among the exposed occupational population (Hammond et al. 1976; IARC 1983; Hansen 1989a; Hansen 1989b). However, among the PAHs encountered in work environments, 16 have been classified by US Environmental Protection Agency and NIOSH as priority pollutants, based on their relative abundance and toxicological profiles (US EPA 1979), and two of them - benzo(a)pyrene (BaP) and pyrene (P) – have been most extensively studied. The etiology of PAH toxicity is complex given the following: (i) PAHs are metabolically activated by Phase I enzymes to electrophilic intermediates that bind covalently to DNA, RNA and proteins; (ii) PAHs are biotransformed in water soluble derivatives by both Phase I and Phase II enzymes; (iii) PAHs induce numerous enzymes of CYT P 450 group via the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signalling pathway; (iv) PAHs governing CYT P 450 induction could produce an imbalance between detoxification and activation leading to activation of carcinogenicity (Hall and Grover 1990; Hankinson 1995; Witlock 1999; Delescluse et al. 2000). Consequently, many aspects concerning possible antagonism or synergism between the components of the complex mixtures PAHs are still to be clarified.

Since human target tissues for carcinogenicity are not readily accessible for monitoring PAH-DNA adducts formation, considered as direct measure of PAH genotoxicity, research efforts are directed to examine other "biological structures", such as white blood cells, haemoglobin, albumin, lipids etc. as surrogate markers of exposed DNA (Osterman-Golkar et al. 1976; Bjelogrić and Vahakangas 1991; Godschalk et al. 2000; Park et al. 2002).

Animal models for studying the reliable "surrogates" as well as the correlation between different "surrogates" have been contributing to elucidate the formation, persistence of carcinogenic PAH adducts with DNA and/or proteins in recent vs chronic exposure scenarios (Swenberg and Fennell 1987; Viau and Carrier 1995; Viau et al. 1993). Consequently biological monitoring and biochemical effect monitoring of PAH exposure have been continuously developing as an etiologically important step in assessing exposure and cancer risk (Angerer et al. 1997).

Many previous studies have been directed to determine and compare the levels of PAH metabolite-DNA adducts in target and non-target tissues and similar adduct levels have been reported in different tissues from a given animal regardless of the tissue vulnerability to PAH-induced carcinogenesis or the CYT P 450 dependent metabolic capacity of the tissue (Eastman et al. 1978; Pereira et al 1979; Adriaenssens et al. 1983). Given their abundance, cellular proteins can act as nucleophilic sink towards electrophiles. Determination of tissue protein adducts could thus serve as a measurement of electrophilic tissue burden (ETB). Binding of BaP metabolites to target and non-target tissue proteins have also been studied, following single administration of the toxic agent (acute exposure scenario) as a measure of total reactive metabolites in these tissue and even greater tissue-to-tissue variation in protein binding levels than that of DNA binding levels was reported (Stowers and Anderson 1984). However, in their work environments, workers are exposed repeatedly to BaP as well as to other PAHs could influence adduct formation in target tissues due to metabolic interference and/or adduct accumulation and persistence with the time course. The latter could reflect the carcinogenicity in target tissues.

Therefore, given the importance of understanding and "interpreting" complex mixture PAH derived toxicity, in context of repeated (chronic) exposure, we have chosen in the present study, as a model system of PAHs, a binary mixture of PAHs (BaP and P) administered repeatedly in a rat model. More specifically, our aim was: (i) to establish the relationship between the "biologically effective dose" in several tissues chosen (expressed as intracellular protein binding of (+)-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene, the ultimate carcinogen derived from BaP, abbreviated as BaPDE), and the exposure dose of BaP in the binary mixture for three different exposure scenarios; (ii) to verify the correlation in adduct levels between tissues; (iii) to examine the use of haemoglobin adducts as a possible surrogate for the ETB in target tissues, and (iv) to study the possible influence of the mixture composition on the formation of BaP-derived adducts in tissues.

Materials and Methods

Chemicals

Pyrene, scintillation grade 99+%, was purchased from Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WIS, USA). Benzo(a) pyrene, HPLC grade min. 98%, was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Rnase T1 (100 000 U/ml from *Aspergillus oryzae*) and Rnase A (100 mg/ml from bovine pancreas) were purchased from Roche Inc. (Laval, QC, Canada). Proteinase (24 U/mg from *Bacillus subtilis*) was purchased from Fluka Co.(Canada). Benzo(a)pyrene-r-7,t-8,9,c-10-tetrahydrotetrol (BaPTeT), which is liberated upon mild hydrolysis of the adducts, was obtained from the NCI Chemical Carcinogenic Reference Standards distributed by Midwest Research Institute (Kansas City, MO.) and used as standard in high-performance liquid chromatographic (HPLC) analyses. The commercially available corn oil "Mazola" was used as a vehicle for i.p administrations (see below). HPLC-grade methanol was obtained from Fisher Scientific Co. (Witsby, ON, Canada). Water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Mississauga, ON, Canada).

Animals and Treatment.

Male Sprague-Dawley rats (225-250 g, Charles River, St-Constant, PQ, Canada) were housed in a temperature and humidity controlled room with a 12-h light/dark cycle and standard rat chow and water were provided ad libitum. The animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The animals were housed 3 per cage during acclimating for 5 days and then were

randomized into 4 groups of 11 animals each. Individual animals from each group (one per cage) were i.p administered one of the binary mixture doses of BaP and P (Table 1) in corn oil (5 ml/kg), once daily for 10 consecutive days. Control animals (two per group) were injected with corn oil alone. After the tenth injection, food was withheld overnight and the animals were euthanized by CO₂ inhalation 24 hours later. Livers, lungs and hearts were collected and immediately frozen at -80 °C until further processing. Heparinized blood was collected from the abdominal aorta and was treated immediately for haemoglobin extraction and quantification.

Tissue processing

Tissues were minced individually, washed three times with 0.05 M Tris potassium chloride buffer, pH 7.4, containing Trisma base, Trisma HCL, KCL and then homogenized individually in TEM buffer, pH 7.4, containing Trisma base, Trisma HCL, 10 M Na-EDTA, 1 mM monothioglycerol (4ml/g tissue). The homogenate was centrifuged at 10,000×g for 15 min. The 10,000×g pellet was discarded and the 10,000×g supernatant (microsomes + cytosol) fraction was collected and further processed for quantification of the BaPDE-adducts with proteins. An aliquot of the supernatant was used to determine the protein concentration by the standard kit from Bio-Rad based on the Bradford assay (Bradford 1976).

Blood processing

Blood samples were processed as described by Shugart (1985) for mouse blood. Briefly, washing of the red blood cells five times with 0.9% solution of heparinized sodium chloride was performed followed by hemoglobin extraction repeated two times by addition of water. Haemoglobin content was determined by Total Haemoglobin Kit No.525-A (Sigma Diagnostic Inc., St.Louis, MO, USA). Aliquot of haemoglobin extract was kept for total protein analysis using the standard kit "Bio-Rad" to determine the efficiency of haemoglobin extraction. The latter was found to be over 90 %.

Analysis of the ETB (BaPDE adducts with tissue proteins)

The analytical procedure for the isolation of benzo(a)pyrene tetrol (BaPTeT) obtained after mild acid hydrolysis of the BaPDE-adducts is described elsewhere (Viau et al. 1993). To avoid possible interference from RNA-adducts in the supernatant on the determination of protein adducts levels, enzymatic digestion of the 10,000×g supernatant from the primary tissue homogenate with 750 µg of Rnase A and 5000 U of Rnase T1 for 30 min. was performed. This allowed the removal of RNAs adducts as adducted nucleotides together with the free cellular BaPTeT. Efficient separation of the "free" BaPTeT, resulting from intracellular hydrolysis of the BaPDE, from its "bound" analogue (BaPTeT obtained after acid hydrolysis of BaPDE-protein adducts) was requisite to estimate the amount of protein binding considered as Electrophilic Tissue Burden (ETB). In this respect a proteinase incubation step (65 mU enzyme per mg protein) was performed overnight in presence of 10% solution of SDS (1/10 v/v of the total homogenate volume for processing), to liberate

any possibly "hidden" free BaPTeT in the hydrophobic pockets of proteins, through enzymatic digestion of proteins into peptides, prior to "free" BaPTeT extraction with 3x3ml ethyl acetate saturated with water. After extraction of the "free" BaPTeT, the tissue homogenate was processed for "bound" BaPTeT quantification. To assure best separation of "free" and "bound" BaPTeT, three analytical procedures were tested in our preliminary investigations to compare their efficiency in isolating both BaP-tetrols as follows: 1) direct three times extraction of "free" BaPTeT from the homogenate prior to acid hydrolysis step that yields the "bound" BaPTeT; 2) incubation of the tissue homogenate with Rnase A and T₁ followed by incubation with Proteinase prior to "free" BaPTeT extraction and consequent acid hydrolysis to liberate the "bound" BaPTeT; 3) Proteinase incubation step followed by "free" BaPTeT extraction and then acid hydrolysis to yield the "bound" BaPTeT. The second procedure described above gave best efficiency of isolating both BaP-tetrols indicating that relatively significant amount of free BaPTeT remains hidden in the hydrophobic pockets of proteins, that no significant losses of "bound" BaPTeT occurred after "free" BaPTeT extraction, or proteinase digestion probably produces peptides but not plain amino acid residues that could be extracted together with the "free" BaPTeT leading to losses in "bound" BaPTeT. Therefore this second procedure was adopted in the present experiment. Since acid hydrolysis step (0,1 N HCL, for 3 h, 90°C) yielded a white compact precipitate, the amphoteric surfactant diethanol amine (DEA) in amount of 2.5 ml/sample was introduced as a dissolving agent prior to solid phase extraction step further utilized in "bound" BaPTeT analytical procedure. The "bound" BaPTeT was analyzed by a HPLC system composed of a quaternary pump 1100 Series (Agilent Technologies, USA), an automatic injector AS-100 (Bio-Rad, Richmond, CA,USA), an LC-8 Zorbax Eclipse 250x4.6 mm column (Agilent Technologies, USA), a fluorescence detector LC-240 (Perkin-Elmer) and a PE Nelson 900 interface (Perkin-Elmer). The column temperature

was set at 32 °C. The solvent system was (A) Milli-Q water and (B) methanol and the elution, at flow rate of 1 ml/min, was performed as follows: 54% B for 11 min, increase to 80% B for 6 min and decrease to 54 % B for 5 min. Injection volume was 150 µl throughout. Excitation and emission wavelengths were 244 and 398 nm, respectively. Standard of BaPTeT was run immediately before the HPLC runs for the tissue extracts in order to verify the expected elution time (8.36 min at the applied conditions). Adduct levels were presented in fmol/mg proteins. The results obtained were corrected for the recovery of BaPTeT from control homogenates spiked with authentic BaPTeT. The recovery of BaPTeT was similar for each tissue considered, namely: approximately 58 % for the heart; 66% for the lung; 56% for the liver and 55% for the haemoglobin. The determination limit for the analytical method was $0,12 \pm 0,06$ pmol BaPTeT/ml in vial submitted to HPLC analyses, established on the basis of the calibration line (0 to 1,5 pmol/ml) obtained with authentic BaPTeT. Analytical procedure for quantitation of BaPDE-adducts with haemoglobin did not include a Proteinase incubation step since around 70-100% of the measured tetrol originated from true adducts (Viau et al. 1993).

Statistical analyses.

Values for adducts are presented as mean \pm S.D of four animals. Linear regression analyses were performed by the JMP IN statistical software and R^2 , β , and P values were calculated. Level of $P \leq 0.05$ was considered as the level of significance. Linear regressions were performed to determine the relationships between BaPDE-adduct formation and the exposure doses of BaP as well as between tissue-to-tissue adduct formation. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to verify the influence of the different

amount of pyrene in the binary mixtures at any given constant dose of BaP for each ratio BaP/P onto the adduct formation in each tissue considered. One-way ANOVA test was also performed to compare ETB formation in all tissues examined at given binary dose (BaP+P). T-test was done to study the existence of statistically significant difference in ETB levels between all tissues of interest at any given binary dose (BaP+P).

Results

Experimental verification of the relationship between the levels of ETB in liver, lung, heart and blood haemoglobin and the exposures doses of BaP following i.p. administration of the binary mixtures (BaP+P) in ratios BaP/P=0.2, 1, 5

Figure 1 shows a linear "dose-response" relationship between the levels of ETB in liver and the exposure doses of BaP in the binary mixtures for the three ratios BaP/P. One-way ANOVA test performed to study the possible influence of pyrene onto BaPDE adduct formation in liver, at each given dose of BaP in the binary mixture for the three BaP/P ratios showed the following P values: P=0.654 at 2 mg BaP /kg; P=0.619 at 6 mg BaP /kg and P=0.794 at 20 mg BaP /kg. This indicates that the presence of pyrene as a second compound in a binary mixture with BaP does not influence the BaPDE- adduct formation in the liver at any given BaP/P ratio considered. Linear "dose-response" relationships were also observed for the other tissues analysed. Correlation coefficients: R^2 , β , and P values for all tissues are presented in Table 2. It is readily seen that the best correlations (highest R^2) were obtained for haemoglobin and heart. Absence of influence of pyrene on BaPDE-protein binding in the other tissues considered was also observed (ANOVA data not shown). Interestingly, the variation in ETB between tissues, expressed per mg protein, remained within a factor of four (Table 3). However, one way ANOVA test and t-test performed to compare the ETB between tissues at a given binary mixture dose showed no statistically significant difference in ETB between liver and lung, on the one hand, and between heart and haemoglobin, on the other hand. In other words, this last analysis indicates the following: 1) no statistically significant difference between metabolically active tissues (i.e liver, lung) in ETB levels at a given binary dose (BaP+P); 2) no

statistically significant difference between non metabolically active tissues, in which ETB results from systemically available BaPDE (i.e heart, Hb), in ETB formation at a given BaP dose in the binary mixture; 3) statistically significant difference in ETB exists between these two tissue categories. However, relatively high inter-individual difference in adducts formation, particularly in lung and liver, was observed.

Between-tissue correlations of electrophilic tissue burden

In general, good linear correlations were obtained for all between-tissue relationships studied (see Table 4) on the basis of all binary doses in this experiment and a total of 36 animals treated (n=36). Figure 2 shows a strong linear correlation between the ETB levels in lung vs hemoglobin with corresponding correlation coefficients: R^2 , β and P presented in Table 4. Linear regressions were found for all other between-tissue relationships examined (see Table 4) with best linear correlations (highest R^2 value) obtained for "ETB in Heart vs Hb".

Table 1. Exposure scenarios corresponding to BaP/P ratios of 0.2, 1, and 5 with three constant doses of BaP for each scenario in rat model.

Ratio BaP/P	0.2	1	5
Binary doses (BaP+P) mg/kg	2 + 10	2 + 2	2 + 0.4
	6 + 30	6 + 6	6 + 1.2
	20 + 100	20 + 20	20 + 4

Table 2. "Dose-response" relationships for ETB (BaPDE-adducts with proteins) formation in liver, lung, heart and haemoglobin following i.p administration of BaP in binary mixture with P in rats for 3 different exposures scenarios corresponding to BaP/P ratios = 0.2, 1, and 5. All relationships are obtained with individual data from a single animal.

		Relationship "ETB- BaP exposure dose"		
Ratio BaP/P	Tissue	Correlation coefficients:		
		R² value	β value	P value
0.2	Liver	0.511	2.782	0.0098
	Lung	0.576	4.524	0.0042
	Heart	0.807	2.818	<0.0001
	Hb	0.901	2.591	<0.0001
1	Liver	0.558	2.219	0.0052
	Lung	0.542	3.112	0.0064
	Heart	0.713	2.296	0.0005
	Hb	0.858	2.043	<0.0001
5	Liver	0.534	2.149	0.0069
	Lung	0.570	4.301	0.0045
	Heart	0.766	2.290	0.0002
	Hb	0.911	1.756	<0.0001

Table 3. ETB in liver, lung, heart and haemoglobin in rats exposed to a mixture of pyrene and BaP ^a

Binary doses (BaP+P) mg/kg	ETB in Liver (fmol/mg Proteins)	ETB in Lung (fmol/mg Proteins)	ETB in Heart (fmol/mg Proteins)	ETB in Hb (fmol/mg Proteins)
2 + 0.4	20 ± 3	17 ± 4	10 ± 6	6.2 ± 1.1
6 + 1.2	26 ± 19	68 ± 40	17 ± 8	17 ± 5
20 + 4	58 ± 25	105 ± 31	50 ± 17	39 ± 6
2 + 2	14 ± 12	16 ± 6	7.2 ± 5.4	6.2 ± 1.1
6 + 6	19 ± 7	50 ± 18	15 ± 11	14 ± 7
20 + 20	53 ± 27	79 ± 35	48 ± 19	43 ± 11
2 + 10	19 ± 9	14 ± 6	4.7 ± 2.7	6.7 ± 1.2
6 + 30	27 ± 10	34 ± 13	18 ± 5	22 ± 6
20 + 100	68 ± 40	96 ± 58	56 ± 20	55 ± 11

^a Mean ± S.D, n = 4.

Table 4. Correlation between ETB levels in all tissues concerned following i.p administration of binary mixtures of BaP and P in three doses of BaP for all of the three BaP/P ratios. Each data point represents an individual animal.

Correlation between ETB levels			
Tissue vs Tissue	Correlation coefficients:		
	R2 value	β value	P value
Lung - Liver	0.344	0.953	0.0002
Heart - Liver	0.492	0.595	<0.0001
Liver - Hb	0.347	0.847	0.0002
Heart - Lung	0.485	0.364	<0.0001
Lung - Hb	0.507	1.645	<0.0001
Heart - Hb	0.709	1.027	<0.0001

Captions to figures:

Figure 1. "Dose-response" relationship for electrophilic tissue burden (BaPDE-adducts with tissue proteins) formation in liver following i.p administration of BaP in binary mixture with P in rats for 3 different exposure scenarios (BaP/P ratios). Mean and standard deviation. Although the same three BaP doses (2, 6, and 20 mg/kg) were used for all three ratios, the points have been slightly displaced on the abscissa to avoid the overlap and allow better view of the data.

Figure 2. Correlation between ETB levels in lung vs. haemoglobin following i.p administration of binary mixture of BaP and P in three doses of BaP for all of the three BaP/P ratios. Each data point represents an individual animal (n=36).

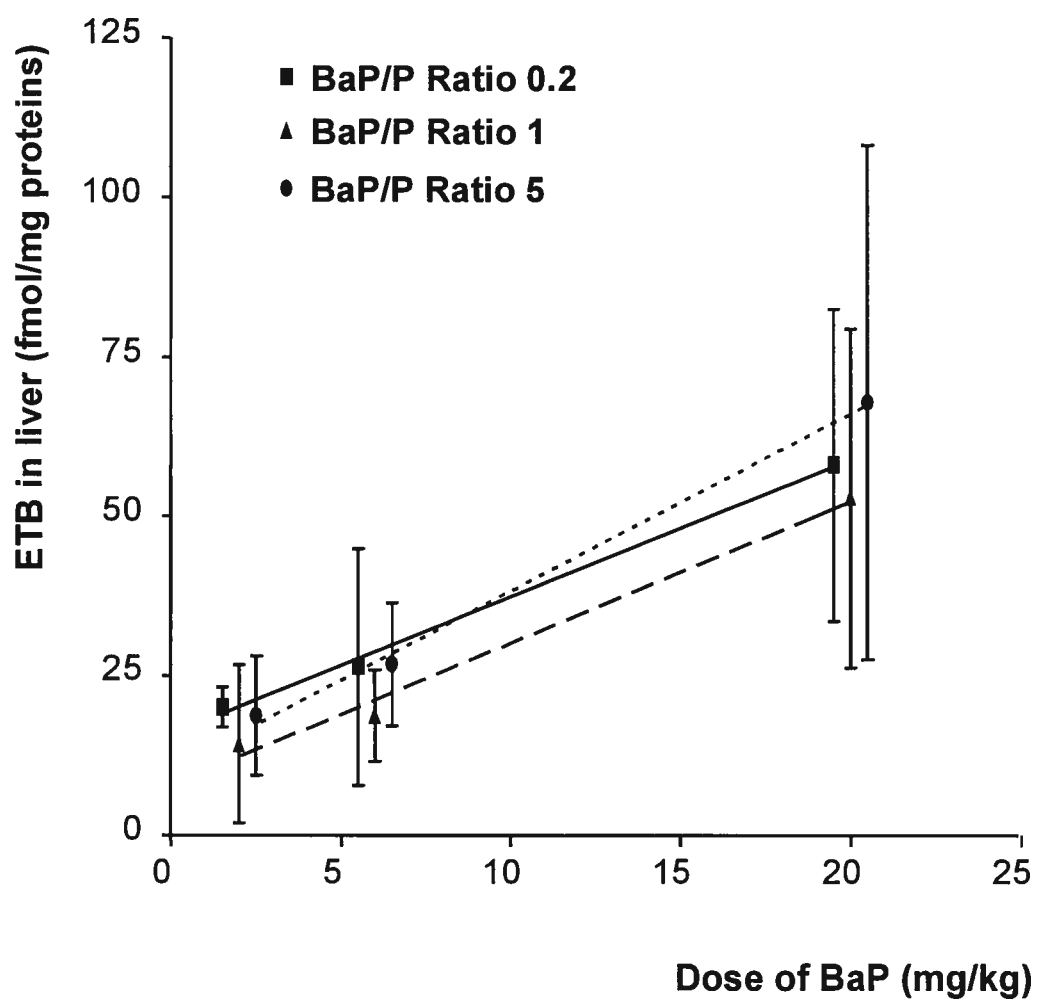
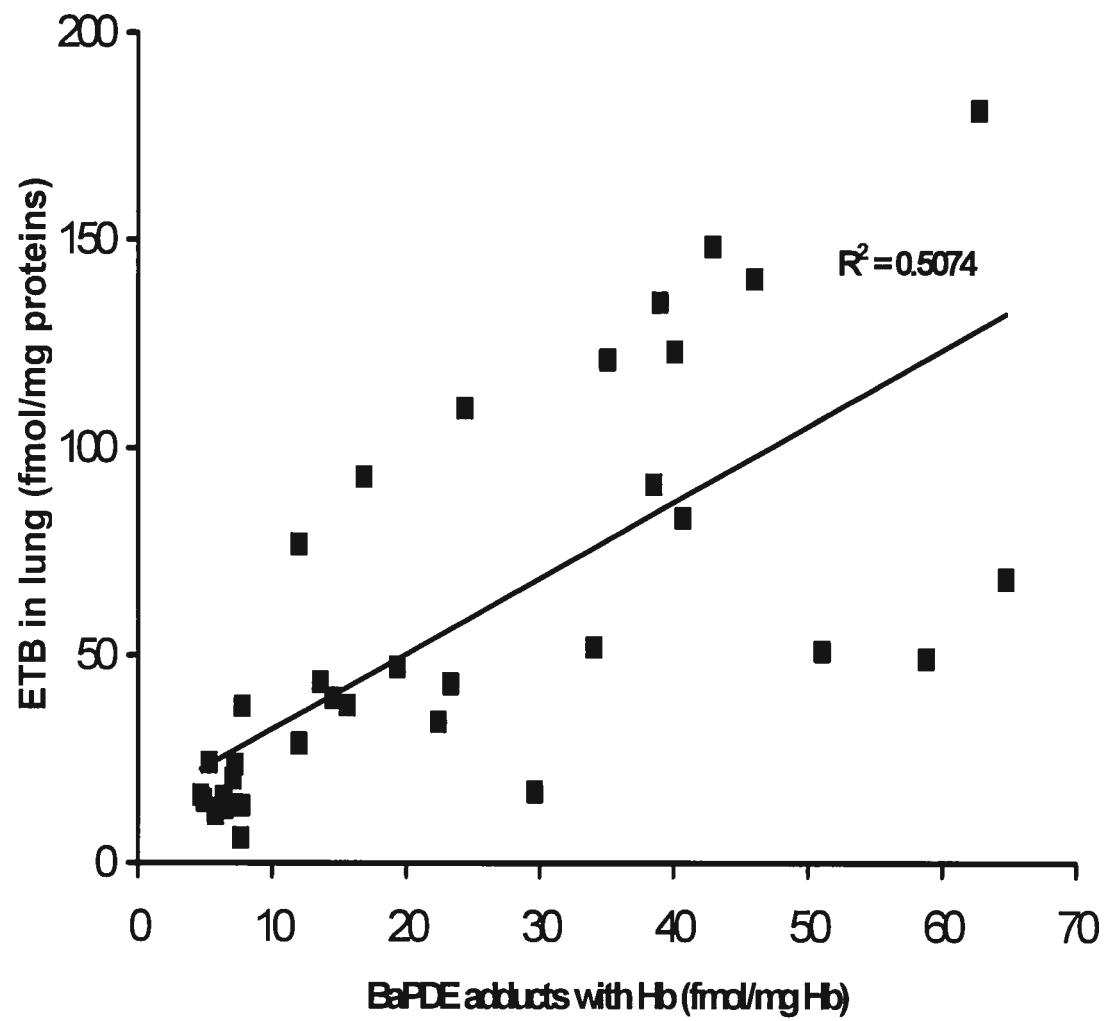
Figure 1.

Figure 2.

Discussion

The aim of this study was to determine the ETB, assessed as covalent binding of the ultimate carcinogen BaPDE with cellular proteins, in several target tissues chosen (lung, liver and heart) following repeated exposure to binary mixture of BaP and pyrene in three different ratios, in a rat model. Quantification of BaPDE-haemoglobin (Hb) adducts was also performed as a measure of the circulating level of the electrophilic metabolite BaPDE and its correlation with the ETB was examined. Given that a good linear correlation was reported between BaPDE-Hb adducts and BaPDE-DNA adducts in target tissues in rodents as well as in humans (Shugart, 1985; Shugart and Kao, 1985; Lee and Santella, 1988; Hemminki, 1992) we supposed a linear correlation between BaPDE- Hb adducts and ETB levels. Thus we wished to pave the way for further study of the usefulness of ETB as a possible surrogate for the BaPDE-DNA adducts in those tissues. This is the first study where ETB associated with intracellular proteins in target tissues was measured following repeated exposure to binary mixtures of PAHs in rat.

We have used tissue protein adducts to estimate the covalent binding of BaP derived electrophilic metabolites, particularly BaPDE, due to the following reasons: (i) due to their nucleophilic character and abundance, cellular proteins act as a major sink for BaPDE; (ii) linear dose-response relationships between blood protein adduct levels and/or DNA adduct levels and the exposure doses of BaP were reported in similar studies involving BAP and/or other PAHs; (iii) protein adducts, in general, are not subject to significant removal or repair over "short" times as it is the case of DNA adducts, and certain accumulation of adducts within the time course is presumed (Shugart 1985; Perera et al. 1988; dell'Omo and

Lauwerys 1993; Junior et al. 1994; Skipper et al. 1994; Lodovici et al. 1998). All this could make proteins a good surrogate to study the toxicity of electrophilic agents.

In the present study, we expected to detect highest ETB levels in liver due to the i.p exposure route (first pass effect) and the highest metabolic capacity of the liver towards PAHs metabolism. As seen in Table 3, in general, the highest ETB levels were found in lungs. We have also observed close adduct (ETB) levels (within a factor of four) in all tissues considered at any given doses of BaP in the binary mixture. Interestingly, Pereg et al. (2001) have reported a similar concentration of BaP in kidney and liver homogenates in 24 hours post-dosing following single i.p administration of [^{14}C]-BaP in female mice with a higher amount found in cytosols than in microsomes of sub-cellular fractions of these tissues. How this amount of BaP in cytosolic and microsomal sub-cellular fractions correlates with BaPDE-adducts level in these fractions is difficult to address, at least it has not been examined. These authors have assessed also the BaP- metabolites-nuclear protein covalent binding that was found to be similar in both tissue (liver and kidney) and about twice as high as that in lung. Apparently, both, the characteristics of specific cell proteins and their localisation in the cell are among the major determinants for protein covalent binding. If so, relationships between the levels of ETB in our context and nuclear protein binding could be interesting to establish. Moreover, our preliminary investigations have shown that BaPDE adduct levels of microsomal proteins (including cytochrome P450 enzymes) and of cytosolic proteins (including Phase II enzymes) were similar for all three tissues concerned (liver, lung and heart) at different exposure doses of BaP following a single i.p. or oral administration of BaP (data not shown).

As mentioned above, our results showed close BaPDE-protein binding levels, ETB formation, (within a factor of 4), in all tissues concerned for the three different exposure scenarios (see Table 3). Similar BaP metabolite-protein adduct formation in target and non-target tissues (lung, liver and forestomach) was reported by Stowers and Anderson (1984), although they have used mice and rabbits as a model system following single i.p administration of BaP alone. In other words our results, in general, also confirmed no correlation between the tissue-to-tissue differences in Cytochrome P450 metabolic activity and BaPDE-protein adduct formation in those tissues as previously reported (Adriaenssens et al. 1983; Stowers and Anderson, 1984). However, ETB generally tended to be somewhat higher in metabolically active tissues at a given binary dose. Similarly, a relatively high inter-individual difference in adducts formation was found in our study. In addition to analytical variability, this could be related to the genetic polymorphism of Cytochrome P450 and/ or other enzymes of Phase I and Phase II extensively studied in rodent and humans (Hirvonen. 1995; Maier et al. 1998; Pastorelli et al. 1998), on the one hand, and/or to the poor absorption of BaP from the peritoneal cavity, on the other hand. This latter statement relates to our experimental observation of residual oil traces in the peritoneal cavity found in some animals at the time of sacrifice.

It has to be noted, that ETB in our context could not be entirely assimilated to a measure of toxicity since protein adduction could be considered as a kind of "detoxification" process that protects DNA from adduction. On the other hand, part of the ETB determined in our study could originate from covalent binding of BaPDE with, e.g., phase II enzymes, such as glutathion S-transferases, that could lead to alteration in their detoxification function. In this instance, covalent binding to proteins at nucleophilic sites critical for their function

could contribute to overall cellular toxicity (Koen and Hanzlik 2002). Which is the relative contribution of such a toxic charge to the ETB measured is unclear in the present study.

As seen in Figure 1, linear dose-response relationships were observed between ETB in liver and the exposure doses of BaP in the binary mixtures for all three BaP/P ratios. This suggests that adduct accumulation occurs proportionally to the BaP dose, or at least follows the same patterns for each dose of BaP tested. The same is confirmed for the BaPDE-protein binding in the other tissues examined (see Table 2). The linear dose dependent BaPDE-Hb adducts formation observed in our study is in accordance with the results of other previous studies following single or repeated exposure scenarios (Shugart 1985; Bouchard et Viau, 1995), but contrasts with the lack of correlation, reported by Bechtold et al. (1991). Dose-related formation of BaP-metabolite-DNA, protein, and lipid adducts (specifically triglyceride (TG) adducts) was demonstrated in primary Sprague-Dawley rat hepatocytes treated with [³H]-BaP with highest adduct level detected in lipids (TG) followed by that in proteins and in DNA (Park et al. 2002). The latter suggested that lipid adducts would be of potential use as a biomarker in human biomonitoring and risk assessment due to the relatively small amount of human samples are required (Kwack and Lee, 2000). In this respect, our results address the role of the ETB as a possible biomarker of exposure to binary (or complex) PAH mixtures in animal studies. Given that Hb-adduct levels are proportional to DNA adducts (as mentioned above) as well as to the ETB as found in our study it could be assumed that ETB levels would correlate with DNA adduct levels also. The latter would indicate the role of the more easily quantified ETB as a possible surrogate for DNA adducts in target tissues. However, the relationship between ETB in target tissues and DNA adduct level in those tissues should be thoroughly studied as exposure dose related. The stability of intracellular proteins as a result of BaPDE

adduction as well as the kinetics of tissue protein adducts accumulation over the exposure time need to be elucidated. It is reasonable to assume that ETB approach is more reliable towards estimating of the "biological effective dose" in target organs than measure of circulating BaPDE-Hb adducts. However, BaPDE-Hb adducts meet the criteria for easy accessibility in human, stability and persistence over the lifespan of Hb, so that Hb, as a protein dosimeter, is still more promising "surrogate" tissue at that time, provided analytical detection limit problems are overcome.

Fig.2 shows quite good linear correlation between ETB in lung vs Hb at the relevant exposure conditions (R^2 , β , P values presented in Table 4). It was felt important to study this dependence given the fact that lung is most often related to risk of cancer development associated with PAH exposure (IARC, 1984) and given the continuous need to validate reliable biomarkers of exposure and cancer risk assessment, such as Hb-adducts. The linearity obtained in our case indicates that Hb adducts could serve as a "surrogate" of the ETB in target for carcinogenicity tissues, such as lung. Among all between-tissues correlations for adduct formation studied, best correlation coefficients were obtained for the relationship " ETB in heart vs Hb adducts". This is probably due to the fact, that both adduct levels result only from systemically available BaPDE, since CYT P450 enzymes are not present in heart. Therefore linear correlations could be anticipated in this case. Heart was included in the present study because it has been shown by Lewtas et al. (1993) that highest DNA adduct level was detected in human heart followed by that in lung while examining several autopsy tissues of humans previously exposed to tobacco smoke. The same authors have raised the importance of studying both lung and heart target cells toward improvement of the sensitivity of DNA adduct dosimetry on target cell population.

Consequently, relatively high BaPDE-protein binding was presumed in our case as it was found in fact.

As shown in the present study, pyrene had no significant effect on BaPDE-protein binding in the various tissues examined. However, BaP induction of pyrene metabolism has been previously reported (Bouchard et al. 1998).

In conclusion, the results obtained in our study indicate the role of the ETB as an alternative molecular biomarker indicative of the potential cellular damage resulting from intracellular covalent binding of toxic electrophiles. The potential role of ETB as a surrogate for DNA adducts in target tissues has been discussed but needs further investigations. The linear correlations between ETB levels and the BaP exposure doses for all tissues studied (including blood haemoglobin) could reflect the genotoxic potential of the exposure mixture doses. Pyrene in binary mixture with BaP at different BaP/P ratios does not influence ETB (BaPDE-protein adducts) formation in target tissues. More complex PAH mixtures should also be investigated, ideally at occupationally and environmentally realistic doses.

Acknowledgements: This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research.

References

- Adriaenssens PI, White CM, Anderson MW (1983) Dose-response relationships for the binding of benzo(a)pyrene metabolites to DNA and protein in lung, liver and forestomach of control and butylated hydroxyanisole-treated mice. *Cancer Res.* 43: 3712-3719
- Angerer J, Mannschreck C, Gündel J (1997) Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Occup. Environ. Health.* 70: 365-377
- Bechtold WE, Sun JD, Wolff RK, Griffith WC, Kilmer JW, Bond JA (1991) Globin Adducts of Benzo(a)pyrene: Markers of Inhalation Exposure as Measured in F344/Nrats. *J. Appl. Toxicol.*, 11: 115-118
- Bjelogrlic N, Vahakangas K (1991) Benzo(a)pyrene-globin adducts detected by synchronous fluorescence spectrophotometry: method development and relation to lung DNA adducts in mice. *Carcinogenesis* 12: 2205-2209
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254

Bouchard, M, Viau, C (1995). Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxy-benzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *ArchToxicol*, 69(8):540-6.

Bouchard M, Krishnan K, Viau C (1998) Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Arch.Toxicol* 72: 475-482

Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R (2000) Is CYP 1A1 induction always relates to AHR signaling pathway ? *Toxicology* 153: 73-82

Dell'Òmo, M, et Lauwers, RR (1993). Adducts to macromolecules in the biological monitoring of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit Rev Toxicol*, 23(2):111-26

Eastman A, Sweetenham J, Bresnick E (1978) Comparison of in vivo and in vitro binding of polycyclic hydrocarbons to DNA. *Chem.-Biol.Interac* 23: 345

Godschalk RWL, Moonen EJC, Schilderman PAEL, Broekmans WMR, Kleinjans JCS, Van Schooten FJ (2000) Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 1: 87-92

Hall M, Grover PL (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation, tumor-initiation. In Cooper CS, Grover PL (eds) *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*, Vol.1. Raven Press, New York, pp 327-372

Hammond EC, Selikoff IJ, Lawther PL, Seidman H (1976) Inhalation of benzpyrene and cancer in man. *Ann.N.Y.Acad.Sci* 271:116-124

Hankinson O (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 35: 307-340

Hansen ES (1989a) Cancer incidence in an occupational cohort exposed to bitumen fumes. *Scand.J.Work Environ.Health* 15: 101-105

Hansen ES (1989b) Cancer mortality in the asphalt industry: a ten year follow up of an occupational cohort.*Br.J.Ind.Med* 46: 582-585

Hemminki K (1992) Significance of DNA and protein adducts. In:Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ (eds), *Mechanisms of carcinogenesis and risk identification*. IARC, Lyon, France, pp.525-534

Hirvonen A (1995) Genetic factors in individual responses to environmental exposure. *J.Occup.Environ.Med* 37: 37-43

IARC (1983) Benzo(a)pyrene. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data*, vol.32. World Health Organization, Lyon, France, pp.33-224

IARC (1984) "IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polycyclic Aromatic Compounds, Part 3, Industrial Exposure in

- Aluminium Production, Coal Gasification Coke Production, and Iron and Steel Founding", vol.34. Lyon, France, pp.65-131
- Junior MF, Tas S, dell'Omo M, Goormans G, Buchet JP, Lauwerys R (1994) Determinants of benzo(a)pyrenediol epoxide adducts to haemoglobin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Occup. Environ. Med* 51: 451-455
- Koen MY, Hanzlik RP (2002) Identification of Seven Proteins in the Endoplasmic Reticulum as Targets for Reactive Metabolites of Brombenzene. *Chem. Res. Toxicol* 15: 699-706
- Kwack SJ, Lee MB (2000) Correlation between DNA or protein adducts and benzo(a)pyrene dioepoxide I-triglyceride adduct detected in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 21, 4: 629-632
- Lee BM, Santella RM (1988) Quantitation of protein adducts as a marker of genotoxic exposure: immunologic detection of benzo(a)pyrene-globin adducts in mice. *Carcinogenesis*, vol.9.no.10:1773-1777
- Lewtas J, Mumford J, Everson RB, Hulka B, Wilcosky T, Kozumbo W, Tompson C, George M, Dobiac L, Sram R, Li X, Gallagher J (1993) Comparison of DNA Adducts to Complex Mixtures in Various Human Tissues and Experimental Systems. *Environ. Health. Perspect* 99: 89-97

- Lodovici M, Akpan V, Giovannini L, Migliani F, Dolara P (1998) Benzo(a)pyrene diol-epoxide DNA adducts and levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in autopsy samples from human lungs. *Chem.-Biol.Interac* 116: 199-212
- Maier A, Micka J, Miller K, Denko T, Chang CY, Nebert DW et al.(1998) Aromatic hydrocarbon receptor polymorphism: Development of new methods to correlate genotype with phenotype. *Environ.Health.Perspect* 106: 421-426
- Osterman-Golkar S, Ehrenberg L, Segerbäck D, Hällström I (1976) Evaluation of genetic risks of alkylating agents.II. Haemoglobin as a dose monitor. *Mutat.Res* 34: 1-10
- Park HS, Park YA, Lee BM (2002) Effects of pH and temperature on benzo(a)pyrene-DNA,-protein,and-lipid adducts in primary rat hepatocytes. *J.Toxicol.Environ.Health. Part A*, 65: 205-214
- Pastorelli R, Guanci M, Cerri A, Negri E, Vecchia C, Fumagalli F, Mezzetti M, Cappelli R, Panigalli T, Fanelli R, Airoidi L (1998) Impact of Inherited Polymorphisms in Glutathion S-Transferase M1, Microsomal Epoxide Hydrolase, Cytochrome P450 Enzymes on DNA and Blood Proteins Adducts of Benzo(a)pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention* 7: 703-709
- Pereira MA, Burns FJ, Albert RE (1979) Dose response for benzo(a)pyrene adducts in mouse epidermal DNA. *Cancer Res* 39: 2556

Pereg D, Tampal N, Espandiary P, Robertson LW (2001) Distribution and macromolecular binding of benzo(a)pyrene and two polychlorinated biphenyl congeners in female mice. *Chem.-Biol.Interac* 137: 243-258

Perera FP, Hemminki TL, Yound DB, Kelly G, Santella RM (1988) Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells of foundry workers. *Cancer Res* 48: 2288-2291

Shugart L (1985). Quantitating exposure to chemical carcinogenes :in vivo alkylation of hemoglobin by benzo(a)pyrene. *Toxicology* 34: 211-220

Shugart L, Kao J (1985) Examination of Adduct Formation in Vivo in the Mouse Between Benzo(a)pyrene and DNA of Skin and Hemoglobin of Red Blood Cells. *Environ.Health.Presp* 62: 223-226

Skipper PL, Peng X, Soohoo CK, Tannenbaum SR (1994) Protein adducts as biomarkers of human carcinogen exposure. *Drug Metab.Rev* 26: 111-124

Stowers SJ, Anderson MW (1984) Ubiquitous binding of benzo(a) pyrene metabolites to DNA and Protein in tissues of the mouse and rabbit. *Chem.-Biol Interac* 51: 151-166

Swenberg JA, Fennell TR (1987) DNA damage and repair in mouse liver. *Arch.Toxicol.Suppl.* 10:162-171

US EPA (1979) Priority pollutant list. *Federal Register* 44: 69514-69517

Viau C, Carrier G (1995) Kinetics of Hemoglobin and Albumin Adducts in Rabbits Subchronically Exposed to Benzo(a)pyrene. *Fundam. Appl. Toxicol* 24: 140-144

Viau C, Mercier M, Blondin O (1993) Measurement of hemoglobine and albumin adducts of benzo(a)pyrenediol-epoxide and their rate of elimination in female Sprague-Dawley rat. *Arch Toxicol* 67: 468-472

Witlock JP (1999) Induction of Cytochrome P 450 1A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicology*. 39: 103-25

ARTICLE 2

Correlation Between Biomarkers of PAH Exposure and Electrophilic Tissue Burden in a Rat Model

Adela Tzekova, Ross Thuot and Claude Viau

Département de santé environnementale et santé au travail,
Université de Montréal, Montréal, Canada PO Box 6128, Station Centre-ville, Québec
H3C 3J7, Canada

✉ **Claude Viau.** Département de santé environnementale et santé au travail, Université de
Montréal, Montréal, Canada PO Box 6128, Station Centre-ville, QC H3C 3J7, Canada

Fax number: (514) -343-2200

E-mail: [REDACTED]

Prêt à être soumis pour publication à *Archives of Toxicology*

Adela Tzekova

M.Sc Santé environnementale et santé au travail

Article: **Correlation Between Biomarkers of PAH Exposure and Electrophilic Tissue Burden in Rat Model**

Adela Tzekova, Ross Thuot and Claude Viau

Prêt à être soumis pour publication à *Archives in Toxicology*

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Adela Tzekova inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, des biomarqueurs d'exposition à la mesure de la charge électrophile tissulaire"

Coauteur: Ross Thuot

Signature: 

Date:

11 dec 02

Coauteur: Claude Viau

Signature: 

Date:

11 décembre 2002

Abstract:

This study was aimed to investigate the correlation between biomarkers (BM) of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and, more specifically, to examine the role of urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) as a reliable measure of internal dose linked to the electrophilic tissue burden (ETB, assessed as covalent binding of the ultimate carcinogen benzo(a)pyrene diolepoxide (BaPDE) with cellular proteins) in target for carcinogenicity tissues and thus to experimentally verify a previously proposed algorithm for adjustment of Reference Values for urinary 1-OHP in exposure to different mixtures of PAH in a rat model. Hence, the relationships between ETB in liver, lung, heart as well as the BaPDE-haemoglobin (Hb) adducts level on the one hand, and urinary /faecal 1-hydroxypyrene (1-OHP) or urinary/faecal 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) on the other hand have been examined. Male Sprague-Dawley rats were administered intraperitoneally (I.P.), once daily for 10 consecutive days, binary mixtures of benzo(a)pyrene (BaP) and pyrene (P) in three different exposure scenarios corresponding to BaP/P ratios = 0.2, 1 and 5 and at three doses of BaP (2, 6 and 20 mg/kg) for each scenario. The ETB levels were measured as the ultimate analyte benzo(a)pyrene tetrol (BaPTeT) obtained after mild acid hydrolysis of BaPDE-adducts with proteins. HPLC/fluorescence technique was used to quantify the analytes. It was experimentally confirmed that: 1) urinary 1-OHP was a reliable BM linked to the ETB in target for carcinogenicity tissues, such as lung, for the ratios BaP/P=0.2 and 1 (linear regression $P=0.0099$ and $P=0.0293$ respectively); 2) urinary 3-OHBaP was correlated with the BaPDE-Hb adducts for all three exposure scenarios ($P=0.0011$ for BaP/P=0.2, $P<0.0001$ for BaP/P=1 and $P=0.0099$ for BaP/P=5). The experimental relationship between ETB and urinary 1-OHP was used to interpolate biological limit values for the urinary metabolite assuming three critical levels

of ETB. These were compared with the values calculated from the algorithm using the BaP/P = 1 mixture as a reference. The calculated/observed ratios varied from 1.0 to 1.6 for the BaP/P = 0.2 mixture and from 1.9 to 3.0 for the BaP/P = 5 mixture.

The results obtained in the present report indicate that the algorithm mentioned above applies well for 2 out of 3 exposure scenarios corresponding to realistic occupational BaP/P ratios of 0.2 and 1. This suggests that using ETB as an endpoint, the proposed algorithm will reasonably predict the critical value of urinary 1-OHP for mixtures having different BaP/P ratios. Stronger linear relationships between ETB in all tissues chosen and 1-OHP or 3-OHBaP were obtained with urinary metabolites than with their faecal analogues. Thus urinary 1-OHP and 3-OHBaP are more reliable biomarkers in biological monitoring strategies.

Key words: benzo(a)pyrene, 3-hydroxybenzo(a)pyrene, benzo(a)pyrene diolepoxide, polycyclic aromatic hydrocarbon, pyrene, 1-hydroxypyrene, electrophilic tissue burden

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants resulting from pyrolysis or incomplete combustion of organic materials and recognised as causative for lung and skin cancer (IARC 1983). They are present as complex mixtures with prevalence of phenanthrene, benzo(b)fluoranthene, fluoranthene, pyrene and benzo(a)pyrene among all of the PAHs measured in different work environments and many PAH metabolites have been studied to assess the "correlation" between external and internal PAH exposure and to investigate their use as probable biomarkers in biological monitoring (Ovrebo et al 1994, Angerer et al. 1997, Popp et al 1997, Gündel et al 2000). Among all PAHs encountered in the work environments benzo(a)pyrene (BaP) and pyrene (P) are most extensively studied. However, neither pyrene nor its metabolite intermediates have been documented as being carcinogenic to humans (IARC 1983, 1987). On the contrary, BaP is classified as probable human carcinogen (IARC 1983), which is metabolically activated by CYT P 450 to electrophilic intermediates that bind covalently to cell macromolecules. In this respect, the most important BaP electrophilic metabolite is (+) anti-benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (benzo(a)pyrene diolepoxide, abbreviated as BaPDE), known as the ultimate BaP human and animal carcinogen, exerting its genotoxic activity through covalent binding to DNA at the formation of BaPDE-DNA adducts, consequently leading to gene mutations (Poirier and Beland 1992, Peltonen and Dipple 1995).

Nevertheless, since Jongeneelen et al (1986, 1987) have proposed the urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), a major urinary metabolite of pyrene, as a biomarker of the overall exposure to PAHs it is still the most frequently used biomarker among all of the

PAH metabolites studied. At present no biological exposure limits have been widely adopted for the measured urinary PAH metabolites. Given that PAH profiles vary remarkably in different work environments a single biological limit value (BLV) for 1-OHP cannot apply to all workplaces (Levin, 1995). However, Jongeneelen (1992, 1993) and Ny et al (1993) have respectively proposed biological limit values of 2.3 $\mu\text{mol 1-OHP mol}^{-1}$ creatinine for coke oven workers and 4.3 $\mu\text{mol 1-OHP mol}^{-1}$ creatinine for Söderberg potroom workers of aluminium plants derived from the lower 1-OHP urinary excretion value corresponding to the Threshold Limit Values (TLVs) for Coal Tar Pitch Volatiles (CTPVs) and BaP. For other work environments where there are insufficient data to calculate BLVs by such an approach, Bouchard and Viau (1999) have proposed a methodology to adjust BLVs for urinary 1-OHP from one work environment to another one based on the reported profiles of airborne PAHs and on the fact that 1-OHP excretion remains proportional to the pyrene dose even when administered as a mixture of many PAHs.

The equation is as follows:

$$BLV_{(2)} = BLV_{(1)} \times \frac{\left[\frac{[BaPeq]_1}{[P]_1} \right]}{\left[\frac{[BaPeq]_2}{[P]_2} \right]} \quad (1)$$

Where $BLV_{(1)}$ and $BLV_{(2)}$ are the biological limit values for work environment 1 and 2 respectively, $[BaPeq]_1$ and $[BaPeq]_2$ are the concentrations of carcinogenic PAHs in work environment 1 and 2 expressed as BaP equivalent concentration using toxic equivalent

factors, $[P]_1$ and $[P]_2$ are the concentrations of airborne pyrene in work environment 1 and 2. Of course, this equation might not apply where dermal absorption of PAHs is comparable to or exceeds pulmonary absorption.

The general objective of the present study was to experimentally validate this algorithm through determination of urinary 1-OHP levels corresponding to given level of electrophilic tissue burden (ETB) assessed as covalent binding of the ultimate carcinogen (+)anti-benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (benzo(a)pyrene diolepoxide, BaPDE) with cellular proteins in several tissues chosen, following repeated exposure to binary mixtures of BaP and Pyrene in a rat model. In other words, assuming the BaP equivalent concentration (or dose) and the ETB are both proportional to the carcinogenic risk, we attempted to verify that:

$$1-OHP_{(2)} = 1-OHP_{(1)} \times \frac{\left[\frac{[ETB]_1}{[P]_1} \right]}{\left[\frac{[ETB]_2}{[P]_2} \right]} \quad (2)$$

Where $[1-OHP]_{1,2}$, $[ETB]_{1,2}$ and $[P]_{1,2}$ correspond to two different exposure scenarios, corresponding to different BaP/P ratios. Thus our aim was to examine the role of the urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) as a reliable measure of internal dose linked to the ETB in target for carcinogenicity tissues, such as lung. Correlation between ETB and urinary/faecal 1-OHP as well as urinary/faecal 3-hydroxy benzo(a)pyrene (3-OHBaP) has been also studied as related to the different ratios BaP/P respectively.

Materials and Methods

Chemicals

Pyrene, scintillation grade 99+%, was purchased from Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WIS, USA). Benzo(a)pyrene, HPLC grade min. 98%, was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Reference standard of 1-OHP was obtained from NCI Chemical Carcinogenic Reference Standards distributed by Midwest Research Institute (Kansas city, MO.). β -Glucuronidase and arylsulfatase (100 000 Fishman U/ml and 800 000 Roy U/ml from *Helix pomatia*), Rnase T1(100 000U/ml from *Aspergillus oryzae*) and Rnase A (100 mg/ml from bovine pancreas) were purchased from Roche Inc. (Laval, QC, Canada). Proteinase (24U/mg from *Bacillus subtilis*) was purchased from Fluka Co.(Canada). Benzo(a)pyrene-r-7,t-8,9,c-10-tetrahydrotetrol (BaPTeT), which is liberated upon mild hydrolysis of the adducts, was obtained from the NCI Chemical Carcinogenic Reference Standards distributed by Midwest Research Institute (Kansas city, MO.) and used as standard in high-performance liquid chromatographic (HPLC) analyses. The commercially available corn oil "Mazola" was used as a vehicle. HPLC-grade methanol was obtained from Fisher Scientific Co.(Witsby, ON, Canada). Water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Mississauga, ON, Canada).

Animals and Treatment.

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St.Constant, PQ, Canada) of 225 to 250 g were used in this experiment. Rats were housed in a temperature and humidity controlled room with a 12h-light/dark cycle and standard rat chow and water were provided ad libitum. The

animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The animals were housed 3 per cage during acclimating for 5 days and then were randomized into 4 groups of 11 animals each. Individual animals from each group (one per cage) were i.p administered, once daily for 10 consecutive days, one out of nine binary mixture doses of BaP and P, corresponding to the ratios BaP/P=0.2, 1 and 5 and in three constant doses of BaP equal to 2, 6 and 20 mg/kg for each ratio. The binary mixture doses were dissolved in corn oil as a vehicle and 5 ml of solution was injected per kilogram of body weight. Control animals (two per group) were injected with corn oil alone. After the tenth injection, animals were transferred in individual metabolic cages for urine and faeces collection and food was withheld overnight. 24 hours later, rats were euthanized by CO₂ inhalation. Livers, lungs and hearts were collected and immediately frozen at -80 °C until further processing. Blood was withdrawn from the abdominal aorta and was treated immediately for haemoglobin extraction and quantitation. Urine and faeces collected for a 24-hour period following the tenth injection were frozen at -20°C until further processing.

Tissue processing

Tissues were minced individually, washed three times with 0.05 M Tris potassium chloride buffer, pH 7.4, containing Trisma base, Trisma HCL, KCL and then homogenized individually in TEM buffer, pH 7.4, containing Trisma base, Trisma HCL, 10 M Na-EDTA, 1 mM monothioglycerol (4 ml/g tissue). The homogenate was further centrifuged at 10,000×g for 15 min. The 10,000×g pellet was discarded and the 10,000×g supernatant (microsomes + cytosol) fraction was collected and further processed for

quantification of the BaPDE-adducts with proteins. An aliquot of the supernatant was used to determine the protein concentration by the standard kit "Bio-Rad" based on the Bradford assay (Bradford, 1976).

Blood processing

Blood samples were processed as described by Shugart and Kao (1985) for mouse blood. Briefly, washing of the red blood cells five times with 0.9% solution of heparinized sodium chloride was performed followed by haemoglobin extraction repeated two times by addition of water. Haemoglobin content was determined by Total Haemoglobin Kit No.525-A (Sigma Diagnostic Inc., St.Louis, MO, USA). Aliquot of haemoglobin extract was kept for total protein analysis using the standard kit "Bio-Rad" to determine the efficiency of haemoglobin extraction. The latter was found to be over 90 %.

Analysis of the ETB (BaPDE adducts with proteins)

The analytical procedure for the isolation of benzo(a)pyrene tetrol (BaPTeT) obtained after mild acid hydrolysis of the BaPDE-adducts with proteins (considered as electrophilic tissue burden, ETB) is described by Tzekova et al (submitted) and is mainly based on the one described by Viau et al (1993). Briefly, enzymatic digestion of the 10,000×g supernatant from the primary tissue homogenate with 750 µg of Rnase A and 5000 U of Rnase T1 for 30 min. was performed to facilitate the discard of RNAs as adducted nucleotides together with the "free" BaPTeT. The latter was supposed to result from intracellular hydrolysis of the benzo(a)pyrene diolepoxide (BaPDE). Subsequently, the tissue homogenate was

submitted to enzymatic digestion with Proteinase (65 mU enzyme per mg protein) performed overnight in presence of 10% solution of SDS (1/10 v/v of the total homogenate volume for processing), to liberate any free BaPTeT possibly "hidden" in the hydrophobic pockets of proteins. After extraction of the "free" BaPTeT with 3x3 ml ethyl acetate saturated with water, the tissue homogenate was processed for "bound" BaPTeT (ETB) quantification. Since acid hydrolysis step (0,1 N HCL, 90°C, for 3 h) yielded a white compact precipitate, the ampholitic surfactant diethanol amine (DEA) in amount of 2.5 ml/sample was introduced as a dissolving agent prior to solid phase extraction step further utilized in "bound" BaPTeT analytical procedure. The "bound" BaPTeT was analyzed by a HPLC system composed of a quaternary pump 1100 Series (Agilent Technologies, USA), an automatic injector AS-100 (Bio-Rad, Richmond, CA,USA), an LC-8 Zorbax Eclipse 250x4.6 mm column (Agilent Technologies, USA), a fluorescence detector LC-240 (Perkin-Elmer) and a PE Nelson 900 interface (Perkin-Elmer). The column temperature was set at 32 °C. The solvent system was (A) Milli-Q water and (B) methanol and the elution, at flow rate of 1 ml/min, was performed as follows: 54% B for 11 min, increase to 80% B for 6 min and decrease to 54 % B for 5 min. Injection volume was 150 µl throughout. Excitation and emission wavelengths were 244 and 398 nm, respectively. Standard of BaPTeT was run immediately before the HPLC runs for the tissue extracts in order to verify the expected elution time (8.36 min at the applied conditions). Adduct levels were presented in fmol/mg proteins. The results obtained were corrected for the recovery of BaPTeT from control homogenates spiked with authentic BaPTeT. The recovery of BaPTeT was similar for each tissue considered, namely: approximately 58% for the heart, 66% for the lung, 56% for the liver and 55% for the haemoglobin. Analytical procedure for quantitation of BaPDE-adducts with hemoglobin did not include a Proteinase incubation

step since around 70-100% of the measured tetrol originated from true adducts (Viau et al. 1993).

Urine analysis

Urine was collected over thymol and frozen at -20°C until analysis. Urine samples were treated using the method of Jongeneelen et al (1987). Efficiency of the extraction of hydrolyzed metabolites was determined using untreated urine samples spiked with authentic reference standards. Recovery was found to be $78\% \pm 3\%$ (mean percentage \pm SD) for 1-OHP and $57\% \pm 2\%$ for 3-OHBaP.

Samples were analyzed by the same HPLC system as described for BaPTeT analyses.

For 1-OHP analysis, a LC-18 Supelcosil 250×4.6 mm column (Supelco, Oakville, ON, Canada) was used. The solvent system was (A) Milli-Q water and (B) methanol and the elution, at flow rate of 0.8 ml/min, was performed as follows: 50% B for 39 min, increase to 94% B for 10 min, increase to 100 % B for 9 min and decrease to 50 % B for 12 min. In order to improve the recovery and reproducibility of the chromatography 1 mg of ascorbic acid was added per liter of methanol eluent (Bouchard et al. 1994). Column temperature was set at 32°C . Injection volume was 20 μl throughout. Excitation and emission wavelengths were 242 and 388 nm, respectively. Naphthalene (1 mg/l) was used as an external standard. Standard of 1-OHP was run immediately before the HPLC runs for the urine extracts in order to verify the expected retention time (32 min under the applied conditions).

For 3-OHBaP analysis, a LC-18 Supelcosil 250-4.6 mm column (Supelco, Oakville, ON, Canada) was also used. The solvent system was (A) Milli-Q water and (B) methanol and

the elution was performed at 80 % B. Ascorbic acid (1 mg/L) was added to the eluent to improve analytical conditions (Bouchard et al. 1994). The injection volume was 20 μ l throughout. Column temperature was 32 °C and flow 0.8 ml/min. Anthracene (1 mg/l) was used as an external standard. Excitation and emission wavelengths were 265 and 430 nm, respectively. The retention time for 3-OHBaP was 14 min. under the applied conditions.

Faeces analysis

Faeces were analyzed using a method adapted from Chipman et al (1983) and Gerde et al (1997). A 6.25% (w/v) homogenate of all faeces voided by a given rat were prepared in a sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5.0). Aliquots of 4 ml of homogenate were transferred into Pyrex tubes and incubated overnight with 10 μ l of β -Glucuronidase/arylsulfatase in a shaking bath at 37 °C. Samples were extracted twice with 4 ml ethyl acetate saturated with water, shaken for 30 min, and centrifuged for 20 min at 3000 rpm at 4 °C. The organic phases were combined and evaporated to dryness and the residue was redissolved in 1 ml of acetonitrile. Recovery of 1-OHP from spiked faeces samples was 77 % \pm 3 % (mean \pm SD) and of 3-OHBaP was 66 % \pm 7 % (mean \pm SD) respectively.

Analyses of faecal 1-OHP and 3-OHBaP were performed using the same HPLC system as for tissue and urine samples and through the same experimental condition as for urine 1-OHP and 3-OHBaP.

Statistical analyses.

Linear regression analyses (least square method) were performed by the JMP IN statistical software (SAS Institute inc.) and R^2 , β , and P values were calculated. Level of $P \leq 0.05$ was considered as the level of significance. Linear regressions were performed to determine the following relationships: BaPDE-adduct (ETB) formation and urinary/faecal 1-OHP or ETB and urinary/faecal 3-OHBaP as well as to determine the BaP-dose dependent urinary/faecal 3-OHBaP excretion or Pyrene-dose dependent urinary/faecal 1-OHPexcretion.

Results

Experimental verification of the relationship between the levels of ETB in liver, lung, heart, blood haemoglobin and urinary/faecal 1-OHP.

In general, the relationship between ETB in all tissue studied and urinary 1-OHP was found to be linear for two out of three exposure scenarios corresponding to the ratios BaP/P=0.2 and 1 (see Table 1). Fig.1 shows linear regressions between the levels of the ETB in liver and urinary 1-OHP for the ratios BaP/P=0.2 and 1 and lack of linear regression for the ratio BaP/P=5, where a value of $P=0.067$ was obtained. In fact, concerning scenario BaP/P=5 a lack of linear relationship between ETB and urinary 1-OHP was found only for liver and lung tissue. For the latter a value of $P=0.0846$ was obtained.

Regarding the relationship "ETB in a given tissue vs. faecal 1-OHP levels", linear regressions for all tissues of interest were observed only for the ratio BaP/P=0.2 (see Table 1). Fig.2 shows the relationship between ETB in liver vs. faecal 1-OHP that was found to be linear for all three exposure scenarios. For the ratio BaP/P=1, lack of linear regressions were found only for the relationship "ETB in lung vs. faecal 1-OHP" and "ETB of Hb vs. faecal 1-OHP". Finally, concerning the scenario BaP/P =5, except for the liver tissue, for all other tissues studied no linear regression was confirmed ($P=0.5928$ for ETB in lung vs. faecal 1-OHP; $P=0.0796$ for ETB in heart vs. faecal 1-OHP; $P=0.2035$ for ETB of Hb vs. faecal 1-OHP).

Experimental verification of the relationship between the levels of ETB in liver, lung, heart, blood haemoglobin and urinary/faecal 3-OHBaP.

In general, remarkable difference in the correlation coefficients obtained for the relationship "ETB vs. urinary 3-OHBaP" was observed for all tissues of interest as well as for all ratios BaP/P examined. Interestingly, the relationship "ETB in liver vs. urinary 3-OHBaP" was the only one for which no linear relationship was observed for all three exposure scenarios. No linear regression was also found for "ETB in lung vs. urinary 3-OHBaP" for BaP/P=1 ($P=0.0753$). For all other tissues and scenarios studied linear relationships were obtained between ETB and urinary 3-OHBaP (see Table 2). Fig. 3 shows the relationship between ETB of Hb and urinary 3-OHBaP for which relatively strong linear regressions were observed for all three exposure scenarios.

Regarding the relationship "ETB in a given tissue vs faecal 3-OHBaP", only the scenario BaP/P=0.2 showed linear regressions for all tissues considered (see Table 2). Fig.4 shows the relationship between ETB in liver vs. faecal 3-OHBaP with linear regressions obtained for all scenarios studied. In fact, this is the only one tissue for which linear relationship between ETB and faecal 3-OHBaP was found for all BaP/P ratios examined. Lack of linear regression was observed between ETB in lung and faecal 3-OHBaP and "ETB of Hb vs. faecal 3-OHBaP" for BaP/P=1 as well as between ETB in lung or heart or Hb and faecal 3-OHBaP for BaP/P=5.

Dose-Response relationship for urinary/faecal 1-OHP as well as urinary/faecal 3-OHBP excretion.

A linear Pyrene dose dependent urinary 1-OHP excretion ($R^2=0.949$, $P<0.0001$) as well as faecal 1-OHP excretion ($R^2=0.694$, $P<0.0001$) was confirmed (data not shown). A linear BaP dose dependent urinary 3-OHBP excretion ($R^2=0.673$, $P<0.0001$) and faecal 3-OHBP ($R^2=0.421$, $P<0.0001$) was also observed. As seen, stronger linear regressions were obtained with urinary metabolites than with their faecal analogues.

Determination of the Mean Percentage of the Pyrene dose and BaP dose excreted in urine and faeces as 1-OHP and 3-OHBP, respectively, during the 24-h collection period.

As seen in Table 3, similar levels of the mean % of P dose excreted in urine as 1-OHP was observed for all binary doses examined. The same is confirmed for the mean % of P excreted as 1-OHP in faeces. However, large inter-individual difference in urinary and faecal excretion of this P metabolite was observed. The same tendency is confirmed for the mean percentage of BaP dose excreted as 3-OHBP in urine and faeces (see Table 3).

Experimental verification of equation (1)

A pattern of simulation was performed on the basis of the experimentally established relationships between the levels of ETB in liver vs urinary 1-OHP for the three ratios BaP/P (Fig.1 and Table 4) while assuming three critical levels of ETB, namely: 30, 40 and 50 fmol/mg proteins and determining the corresponding 1-OHP levels. In order to verify equation (1) the ratio BaP/P=1 was set as a reference ratio with reference values of urinary

1-OHP corresponding to any given critical level of ETB derived from the relationships "ETB in liver vs urinary 1-OHP" (see Fig.1). Thus while applying equation (1) for another BaP/P ratio (from Fig.1) a calculated value of urinary 1-OHP corresponding to any of the given critical ETB levels was obtained that was subsequently compared with the experimentally derived value for that BaP/P ratio (from Fig.1) named "observed value" as shown in Table 4. There is a reasonable agreement between the "predicted values" and the "observed values" of urinary 1-OHP for the ratios $BaP/P = 0.2$ and 1 as shown in Table 4, which indicates that equation (1) is verified for these BaP/P ratios. The same was confirmed when performing similar calculations for the other tissues considered (data not shown).

Table 1. Relationships between ETB (BaPDE-adducts with proteins) formation in liver, lung, heart and haemoglobin and urinary/faecal 1-OHP following i.p administration of BaP in binary mixture with P in rats for 3 different exposures scenarios corresponding to BaP/P ratios =0.2;1; 5. All relationships are obtained with individual data from a single animal.

		Relationship "ETB- urinary/faecal 1-OHP"					
Ratio BaP/P	Tissue	Correlation coefficients:					
		ETB vs urinary 1-OHP			ETB vs faecal 1-OHP		
		R ² value	β value	P value	R ² value	β value	P value
0.2	Liver	0.371	0.0093	0.0355	0.371	5.8709	0.0355
	Lung	0.502	0.0164	0.0099	0.898	13.8855	<0.0001
	Heart	0.793	0.0109	0.0001	0.593	5.9402	0.0034
	Hb	0.880	0.0099	<0.0001	0.599	5.1958	0.0031
1	Liver	0.787	0.0630	0.0003	0.762	33.423	0.0004
	Lung	0.427	0.0672	0.0293	0.215	25.714	0.1514
	Heart	0.726	0.0573	0.0009	0.556	27.081	0.0084
	Hb	0.575	0.0400	0.0069	0.217	13.283	0.1488
5	Liver	0.297	0.4306	0.0667	0.587	256.016	0.0037
	Lung	0.268	0.7924	0.0846	0.029	111.465	0.5928
	Heart	0.556	0.5243	0.0053	0.276	156.237	0.0796
	Hb	0.592	0.3799	0.0035	0.156	82.649	0.2035

Table 2. Relationships between ETB (BaPDE-adducts with proteins) formation in liver, lung, heart and haemoglobin and urinary/faecal 3-OHBaP following i.p administration of binary mixture of BaP and Pyrene for 3 different exposures scenarios corresponding to BaP/P ratios =0.2; 1 and 5. All relationships are obtained with individual data from a single animal.

		Relationship "ETB- urinary/faecal 3-OHBaP"					
Ratio BaP/P	Tissue	Correlation coefficients:					
		ETB vs. urinary 3-OHBaP			ETB vs. faecal 3-OHBaP		
		R ² value	β value	P value	R ² value	β value	P value
0.2	Liver	0.317	0.3575	0.0566	0.362	0.0267	0.0383
	Lung	0.369	0.5861	0.0363	0.862	0.0628	<0.0001
	Heart	0.809	0.4573	<0.0001	0.528	0.0259	0.0075
	Hb	0.672	0.3626	0.0011	0.547	0.0229	0.0060
1	Liver	0.315	0.3841	0.0723	0.795	0.0361	0.0002
	Lung	0.310	0.5524	0.0753	0.211	0.0270	0.1552
	Heart	0.761	0.5662	0.0005	0.577	0.0292	0.0067
	Hb	0.889	0.4805	<0.0001	0.216	0.0140	0.1496
5	Liver	0.168	0.3934	0.1861	0.534	0.0537	0.0069
	Lung	0.333	1.0735	0.0497	0.035	0.0264	0.5624
	Heart	0.529	0.6223	0.0073	0.244	0.0322	0.1026
	Hb	0.502	0.4260	0.0099	0.211	0.0211	0.1330

Table 3. Mean percentage of the Pyrene dose excreted as 1-OHP and mean percentage of the BaP dose excreted as 3-OHBP, in both urine and faeces, at 24 hours post-dosing following the 10th i.p administration of binary mixtures (BaP+P) (animals received a total of 10 i.p. injections, once daily)^a.

Ratio BaP/P	Doses (BaP+P) mg/kg	Mean % of P dose excreted as 1-OHP		Mean % of BaP dose excreted as 3-OHBP	
		urine	faeces	urine	faeces
0.2	2+10	1.7 ± 0.3	0.005 ± 0.001	0.48 ± 0.05	9.5 ± 0.7
	6+30	1.1 ± 0.5	0.003 ± 0.002	0.31 ± 0.14	5.6 ± 2.8
	20 + 100	3.0 ± 0.4	0.004 ± 0.002	0.44 ± 0.17	5.7 ± 3.2
1	2 + 2	1.6 ± 0.7	0.002 ± 0.001	0.49 ± 0.13	4.7 ± 1.9
	6 + 6	1.0 ± 0.3	0.005 ± 0.002	0.21 ± 0.09	5.4 ± 2.2
	20 + 20	2.3 ± 0.5	0.004 ± 0.002	0.33 ± 0.09	4.4 ± 2.6
5	2 + 0.4	1.5 ± 0.7	0.011 ± 0.011	0.32 ± 0.10	13.7 ± 10.7
	6 + 1.2	0.9 ± 0.5	0.005 ± 0.003	0.25 ± 0.14	7.7 ± 2.5
	20 + 4	1.1 ± 0.3	0.003 ± 0.001	0.22 ± 0.08	3.1 ± 1.1

^a Calculation for the % of P and BaP dose excreted as the relevant metabolites in urine and faeces is based on the last 10th injection of BaP.

Table.4. Experimental verification of the Bouchard and Viau proposed algorithm for the determination of the threshold urinary 1-OHP based on a reference mixture. Reference was taken as the BaP/P = 1 mixture and determined assuming three critical toxic levels of ETB. Calculation was subsequently applied to the BaP/P ratios of 0.2 and 5 and results were compared with the experimental value interpolated ("Observed value") from Figure 1.

Ratio BaP/P	Critical level of ETB in liver (fmol/mg proteins)	"Observed value" of urinary 1-OHP ($\mu\text{mol}/24\text{h}$)	"Calculated value" for urinary 1-OHP ($\mu\text{mol}/24\text{h}$)	Ratio "calculated vs observed" values of urinary 1-OHP
5	30	20	59	2.96
	40	43	91	2.11
	50	66	123	1.85
1	30	296	296	1.00
	40	455	455	1.00
	50	614	614	1.00
0.2	30	933	1480	1.59
	40	2008	2275	1.13
	50	3083	3070	1.00

Captions to figures:

Figure 1. Relationship between the levels of the ETB in liver and urinary 1-OHP following i.p administration of binary mixtures of BaP and pyrene in three constant doses of BaP (2, 6 and 20 mg/kg) for each of the three different exposure scenarios: BaP/P=0.2 (Panel A); BaP/P=1 (Panel B) and BaP/P=5 (Panel C). Each data point represents an individual animal.

Figure 2. Relationship between the levels of the ETB in liver and faecal 1-OHP following i.p administration of binary mixtures of BaP and pyrene in three constant doses of BaP (2, 6 and 20 mg/kg) for each of the three different exposure scenarios: BaP/P=0.2 (Panel A); BaP/P=1 (Panel B) and BaP/P=5 (Panel C). Each data point represents an individual animal.

Figure 3. Correlation between the levels of the ETB of Hb and urinary 3-OHBaP following i.p administration of binary mixtures of BaP and pyrene in three constant doses of BaP (2, 6 and 20 mg/kg) for each of the three different exposure scenarios: (♦) BaP/P=5; (o) BaP/P=1 and (Δ) BaP/P=0.2. Each data point represents an individual animal.

Figure 4. Correlation between the levels of the ETB in liver and faecal 3-OHBaP following i.p administration of binary mixtures of BaP and pyrene in three constant doses of BaP (2, 6 and 20 mg/kg) for each of the three different exposure scenarios:

(▲) BaP/P=5; (□) BaP/P=1 and (o) BaP/P=0.2. Each data point represents an individual animal.

Figure 1.

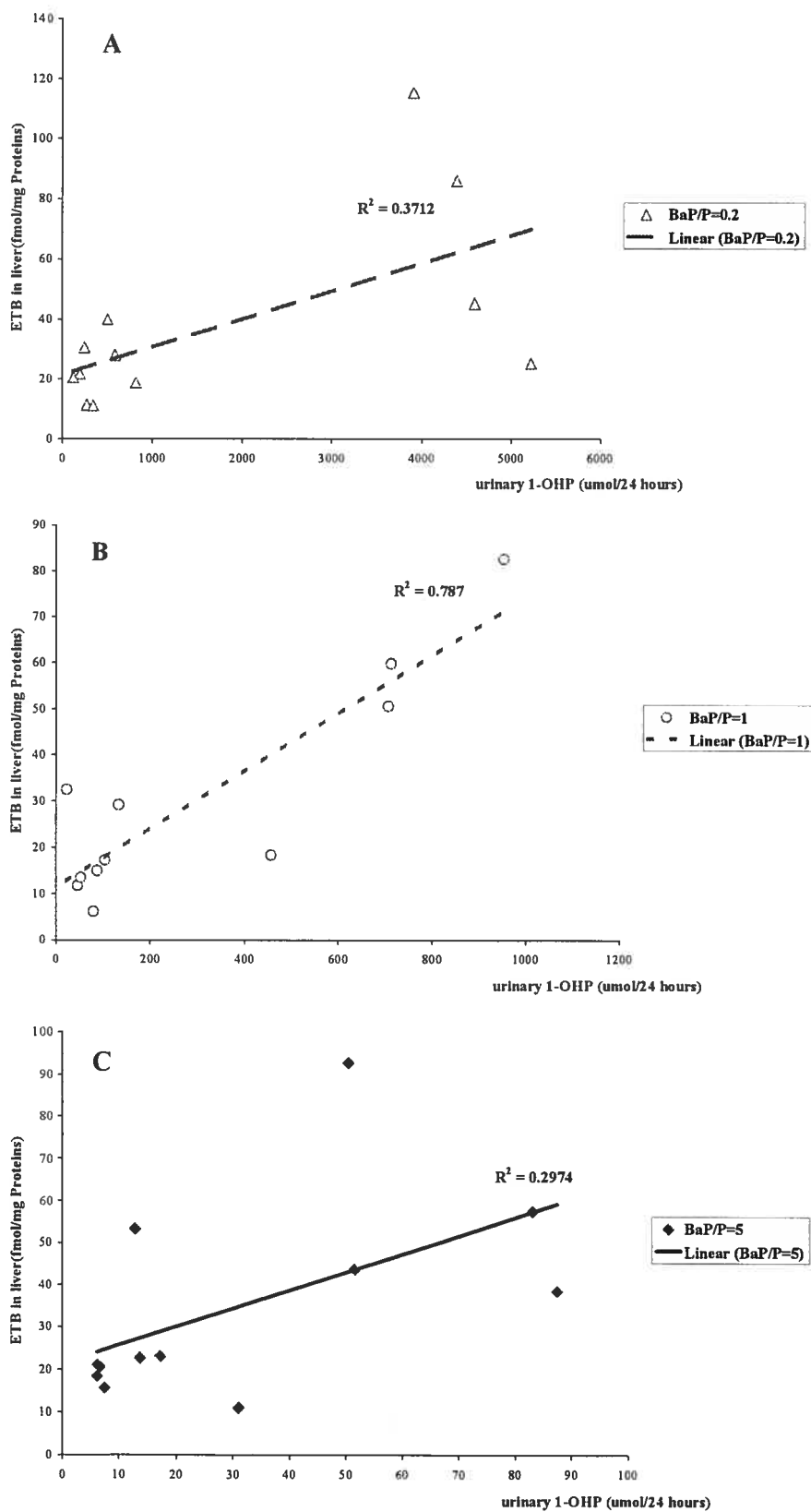


Figure 2.

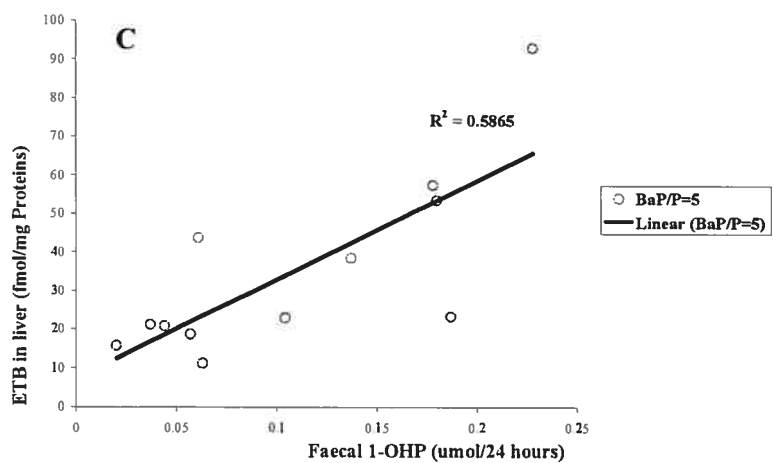
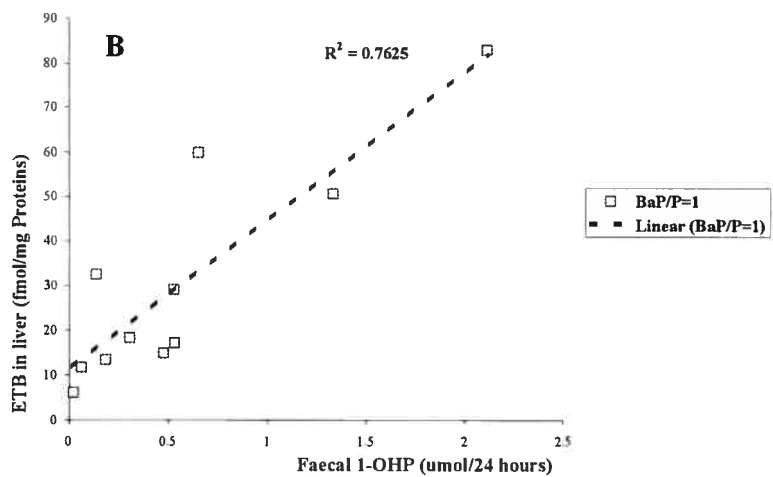
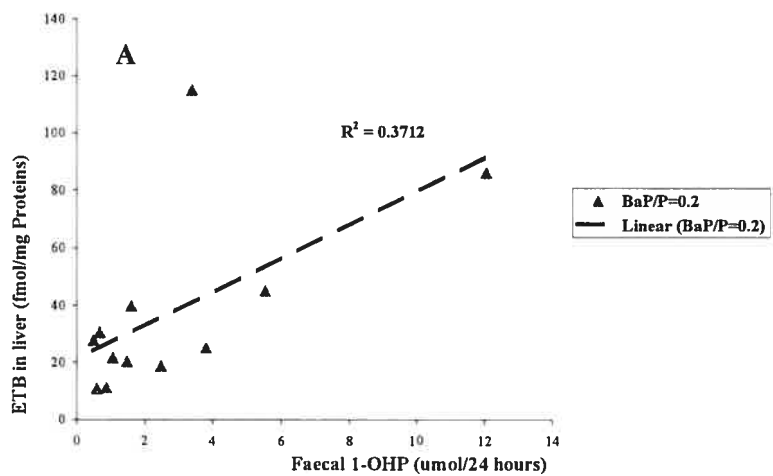


Figure 3.

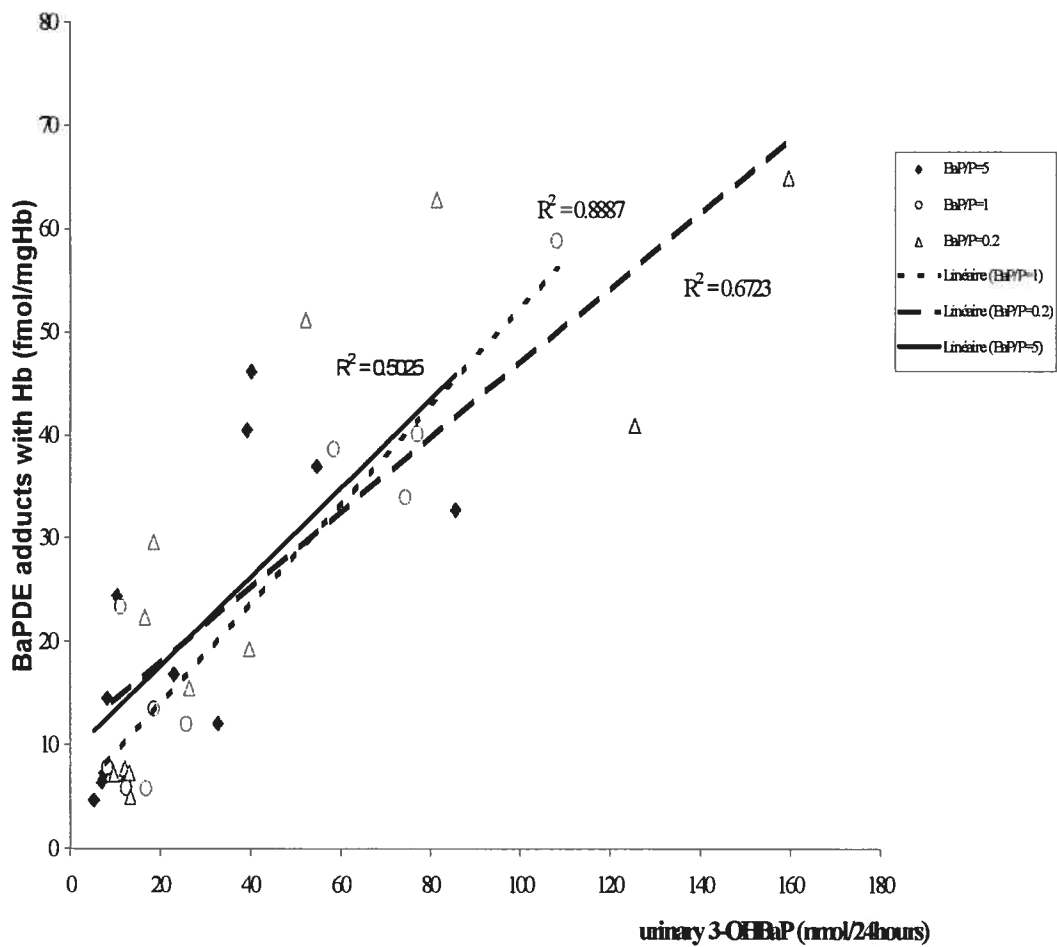
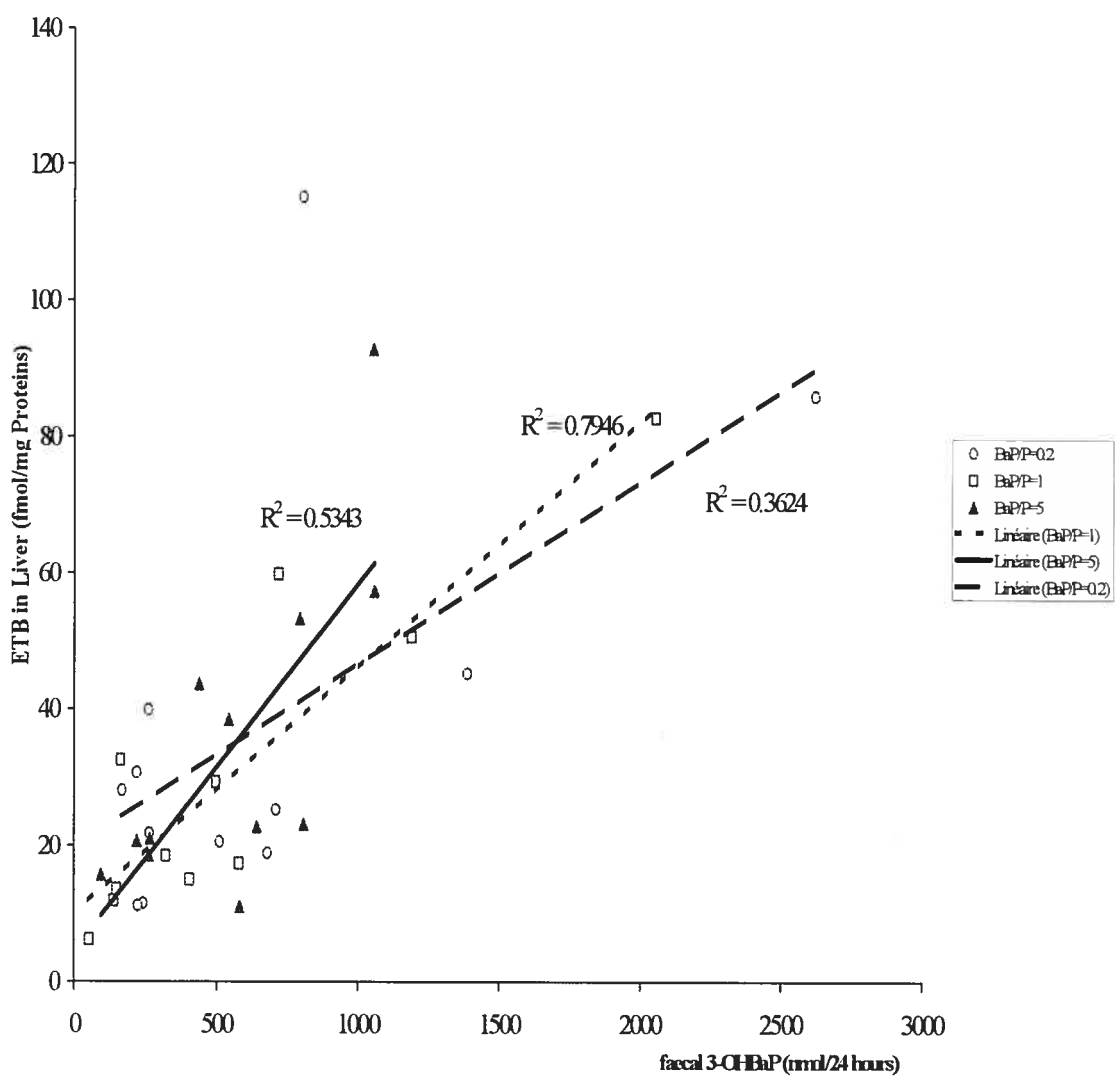


Figure 4.



Discussion

This study was carried out to verify our hypothesis that urinary 1-OHP could serve as biomarker of internal dose of PAHs, correlated with a toxicologically relevant biological effect (ETB formation) of PAH mixtures. Given that linear relationship between BaP dose and adduct formation has been observed in experimental studies (Shugart and Kao 1985), given that linear relationships have been reported between P dose (even as a mixture of PAHs) and urinary 1-OHP (Kuljukka et al. 1997), we expected a linear relationship between 1-OHP and BaPDE-adducts with cellular proteins (Electrophilic Tissue Burden, ETB) in target tissues. Importantly, Bouchard and Viau (1999) elaborated a simple algorithm (see “introduction”, equation (1)), that could be further utilized for modulation of biological limit values (BLVs) for 1-OHP according to the actual composition of individual PAHs in typical mixtures encountered in general and occupational environments that required experimental validation in an animal model. In the present study, we attempted to verify this algorithm in the rat model through verification of equation (2) (from the “introduction”) incorporating the ETB derived from PAHs exposure according to our hypothesis. This would be of high importance in biological monitoring strategies given that a single biological value for 1-OHP can not apply to all work environments due to the variety of PAH profiles encountered (Levin 1995; dell'Omo et al. 1998).

This study was conducted on binary mixtures at doses higher than those encountered in workplaces in order to allow adequate measurements of ETB. But it still represents an interesting tool towards understanding and interpreting the possible additive or antagonistic effects associated with PAHs exposure. Prior to this study, Bouchard et al. (1998) have investigated the effect of exposure to binary and tertiary mixtures of PAHs on the urinary

excretion kinetics of 1-OHP and no influence of BaP onto urinary excretion kinetics of P, but significant increase in the amount of 1-OHP excreted in urine at doses of 1.3 and 6.5 mg BaP/kg in mixture with 1 mg P/kg (single i.v administration in rats) has been reported, probably due to BaP induction of P metabolism. We have chosen higher doses of BaP and P in binary mixtures administered intraperitoneally to assure sufficient spread in urinary 1-OHP levels for each binary dose tested, making possible the verification of equation (2).

In other words, we attempted to determine the urinary 1-OHP levels that correspond to given threshold of ETB in four "target tissues" of interest: liver, lung, heart and blood haemoglobin. Heart was included in the "target group tissues" due to the study of Lewtas et al. (1993) reporting highest DNA adduct level in human heart among several other autopsy tissues examined from individuals previously exposed to tobacco smoke. In this respect high ETB level in heart was presumed in our case also. In order to verify the correlation between different biomarkers of PAH exposure, we have studied, as well, ETB associated with haemoglobin and its relationship with urinary/faecal 1-OHP and 3-OHBaP. Moreover, it has already been reported that BaPDE adducts with haemoglobin could serve as a "surrogate" of ETB in target for carcinogenicity tissues, such as lung (Tzekova et al, submitted). Although BaPDE adducts with haemoglobin (Hb) and albumin have been considered as important biomarkers of respectively repeated and recent human exposure to BaP or PAHs (Lee and Santella 1988; Bechtold et al. 1991; van Welie et al. 1992), such approach is still distant to genotoxicity endpoints evaluation. Assessing ETB as defined in this report is one step closer towards estimation of the biologically effective PAH dose in target tissues and, consequently, indirect estimation of PAHs genotoxicity in these tissues.

As seen in Table 1 and Figure 1, statistically significant linear relationships between the levels of ETB in all tissues considered and urinary 1-OHP were observed only for the exposure scenarios: BaP/P = 0.2 and 1. Thus, urinary 1-OHP could serve as an indicator of the internal dose linked with the ETB in target for carcinogenicity tissues, such as lung, at low BaP/P ratios (less than or equal to 1) over the range of the exposure doses tested. Taking into consideration the simulation performed in Table 4, this indicates that equation (1) is verified for BaP/P ratios equal to 0.2 and 1. However, these two BaP/P ratios correspond to those encountered in work environments (Petry et al. 1996; Bieniek, 1998; Gündel et al. 2000) contrary to the ratio BaP/P equal to 5. In other words, for this last scenario the diversion from the expected linearity in the relationship examined for the liver and lung tissue was not considered as an important issue for the typical occupational environments.

As seen in Table 1 and Figure 2, the relationship between ETB levels in all tissues considered and faecal 1-OHP was found to be linear for all tissues of interest only for the exposure scenario BaP/P=0.2. However, in the context of biological monitoring, the urinary metabolites examined are those of concern.

Interestingly, while studying the relationship between ETB in all tissues of interest and the urinary /faecal 3-OHBaP, the liver tissue was the only one for which no linear regression was confirmed between ETB and urinary 3-OHBaP for all three BaP/P ratios, and the only one for which linear regressions were obtained with faecal 3-OHBaP for the three exposure scenarios (see Table 2 and Figure 4), an observation that is difficult to explain. Also, relatively strong linear relationships were obtained for “BaPDE adducts with Hb vs. urinary 3-OHBaP” for BaP/P = 0.2, 1 and 5 (see Table 2 and Figure 3) indicating that urinary

3-OHBaP could serve as surrogate for BaPDE-Hb adducts. This confirms another previous study reporting high linear correlation between the urinary excretion of 3-OHBaP in Monday 24-h urine samples from rats and the levels of BaPDE-Hb adducts after 4 weeks of treatment with BaP (i.p administration, once daily), Tuesday to Friday (Bouchard and Viau, 1995). However, it is well known that BaP metabolites are mainly excreted in faeces and only a minor part (5-15%) is excreted in urine (Chipman et al. 1981; Mitchell, 1982). Also, given that the molecular weight of the glucorono-conjugate of 3-OHBaP (428) is higher than the threshold for biliary excretion in rats (325) it could be a reason for possible competitive inhibition of glucorono-conjugate of 1-OHP (305) biliary transport (Sathirakul et al. 1994). This could result in an increase in the percentage of P excreted as 1-OHP in urine and, consequently, lower proportion of 1-OHP recovered in faeces. However, a significant difference (higher values) in this percentage (ANOVA data) was observed only at the higher exposure binary doses tested (20 mg BaP/kg + 20 mg P/kg and 20 mg BaP/kg +100 mg P/kg). This could be related to somewhat more pronounced effect of BaP induction on the P metabolism although a quantitative estimation of such an induction was not performed in the present study. Thus our results for the percentage of P dose excreted as urinary 1-OHP align with those of Bouchard et al. (1998) reporting for mean of $1.41\% \pm 0.16$ and $1.71\% \pm 0.27$, of the P dose excreted as urinary 1-OHP following single i.v administration in rat of binary mixture (1.3 mg BaP/kg +1 mg P /kg, i.e BaP/P=1.3 and 6.5 mg BaP /kg + 1 mg P/kg, i.e BaP/P=6.5, respectively) compared to our $1.5\% \pm 0.7$ and $0.9\% \pm 0.5$ of the Pyrene dose excreted as urinary 1-OHP at the binary doses (2 mg BaP/kg + 2 mg P/kg , BaP/P=1 and 6 mg BaP /kg + 1.2 mg P /kg, BaP/P=5, respectively). This seems to be in accordance with other study of Viau et al. (1999) reporting that over 90% of the P dose excreted in urine as urinary 1-OHP is excreted in 24 hours following a single i.v, oral

and dermal treatment, suggesting that little accumulation of 1-OHP occurs within the 10 days i.p treatment period in our study. Therefore, urine and faecal collection was made during 24 hours following last injection. The same authors have reported a linear P dose dependent 1-OHP excretion as it was found in our study following repeated exposure to binary mixture (BaP+P). This is an indication that saturation of the P metabolism has not occurred over the doses examined in the current study.

Recently, Bouchard et al. (2002) have studied the urinary excretion kinetics of 1-OHP in male Sprague-Dawley rats following subchronic oral exposure, on Tuesdays and Fridays for 10 consecutive weeks, to 0.046 mg/kg/d of pyrene or to 0.046, 0.15, and 0.46 mg/kg/d of pyrene in mixture with other 12 PAHs and have found that whatever the administered dose, repeated exposure to both pyrene and PAH mixtures resulted in a progressive time-dependent increase in the urinary excretion of 1-OHP. This was related to slow release of residual P accumulated in a long-term compartment and/or to the enterohepatic recirculation of 1-OHP and other pyrene metabolites. However, our results for the percentage of the P dose excreted as urinary 1-OHP seems to be somewhat lower. Also, relatively high inter-individual difference in 1-OHP urinary excretion in rats was observed in this experiment as it was found in other previous studies following exposure to a given PAH mixture. In addition, it was recently shown that there is a strong correlation in the individual yield of urinary 1-OHP when comparing the excretion of the metabolites in a group of rats between different administrations of pyrene. In other words, animals displaying a low yield of urinary 1-OHP upon a first administration of pyrene will keep this characteristic when injected at a later time (Payan, Viau et al. in preparation).

Concerning the ratio between the percentage of the BaP dose excreted in faeces vs. that in urine for 24 hours collection period following last (10th) i.p injection of binary mixture (BaP+P) we have obtained values of 9.5 to 43.3 for all exposure mixture doses tested. As previously found by Bouchard and Viau (1996), there was a non-statistically significant trend of the feces/urine excretion ratio to increase with the BaP/P ratio of the injected mixture and to decrease with increasing BaP doses. Thus this ratio is over two times higher in our case than the value of 4 obtained for the same ratio in the study of Tyndyk et al (1994), regarding cumulative excretion for 8 days after a single i.p administration of 10 mg BaP /kg alone. The same authors have observed that after 10 i.p injections with 10 days cessation of exposure between injections (8 days cumulative excretion) this ratio remains constant, but the quantities of 3-OHBaP excreted in both urine and faeces dropped 1.5-2 times due to age-related changes in BaP-metabolizing enzymes. An average of 0.1% of BaP dose excreted in urine as 3-OHBaP over the 8 days collection period after treatment was reported. Given that around 94 % of the total amount of 3-OHBaP excreted in urine over 164-h (7 days) is eliminated during the first 72 hours after a single i.p treatment (Bouchard et Viau, 1995), repeated exposure to BaP once daily for 10 days could result in excretion of residual 3-OHBaP from past days suggesting a probable accumulation of BaP and its metabolites upon repeated exposure as well as probable enzymatic induction. Thus our results (0.21% to 0.49 % of BaP dose excreted as urinary 3-OHBaP at 24-h post dosing, calculated on the basis of a single BaP dose i.e 10th injection) are two to five times higher than those obtained by Tyndyk et al (1994) after a single i.p administration of BaP. In support to this assumption, Bouchard and Viau (1995) have found that values of urinary 3-OHBaP in Mondays urine sample following one week of treatment (Monday through Friday, once daily with about 8 mg BaP /kg, i.p administration) represented, on average, 33% of previous Thursday sampling values suggesting that BaP might accumulate in the

organism upon repeated dosing and be redistributed, biotransformed and eliminated upon cessation of exposure. However, BaP amount in storage compartments, such as fatty tissues in rat has not been measured in the current study. More over, our aim in this study was first, to verify equation (1) and, second, to "elucidate" the correlation between different biomarkers of PAH exposure following concomitant exposure to binary mixtures of BaP and P and thus to better assess their usefulness in biological monitoring. On the other hand, a linear BaP dose- dependant 3-OHBaP excretion in both urine and faeces was observed in our experiment, suggesting that BaP metabolizing enzymes were not saturated over the range of doses used in the current study.

Again, it is difficult to compare our results for the % of BaP dose excreted in urine as 3-OHBaP with other reported previously because of differences in the administration protocols. However, our results (0.20 - 0.49 % of BaP dose excreted as urinary 3-OHBaP) are somewhat similar to those obtained by Jongeneelen et al (1985), reporting 0.22-0.35 % of BaP dose excreted in urine as 3-OHBaP during 6 days following 3 consecutive days of oral treatment of rats with BaP alone at doses of about 2.4, 5 and 12 mg/kg, calculated on the basis of the last given dose. It has to be kept in mind that the exposure route, duration of exposure, exposure doses, urine collection as well as diet differed in both studies. Our results did not confirm the findings of Jongeneelen et al (1985) that the lower the BaP exposure dose the higher is the percentage of BaP dose excreted in urine as 3-OHBaP. However, it is well known that repeated exposure of rats to BaP may trigger induction of CYT P 450 enzyme system. There is also possible saturation of BaP metabolism at high BaP doses, and possible metabolic interference in the case of complex PAH mixture exposures, all impacting on the excretion kinetics of urinary 3-OHBaP.

In conclusion, the results obtained in the present report indicate that equation (1) is verified for 2 out of 3 exposure scenarios corresponding to realistic occupational BaP/P ratios of 0.2 and 1. This suggests that using ETB as an endpoint, the proposed algorithm will reasonably predict the critical value of urinary 1-OHP for mixtures having different BaP/P ratios. The predicted value is better for BaP/P ratios ≤ 1 . Furthermore, there is a large interindividual variability in both urinary metabolites and tissue ETB for exposure to a given mixture. Stronger linear relationships between ETB in all tissues chosen and 1-OHP or 3-OHBaP were obtained with urinary metabolites than with their faecal analogues. Thus urinary 1-OHP and 3-OHBaP are more reliable (promising) “indicators” to be used as biomarkers in biological monitoring strategies.

Acknowledgements: This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research.

References:

- Angerer J, Mannschreck C, Gündel J (1997) Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health* 70: 365-377
- Bechtold WE, Sun JD, Wolff RK, Griffith WC, Kilmer JW, Bond JA (1991) Globin Adducts of Benzo(a)pyrene: Markers of Inhalation Exposure as Measured in F344/Nrats. *J.Appl.Toxicol* 11: 115-118
- Bieniek G (1998) Aromatic and Polycyclic Hydrocarbons in Air and Their Urinary Metabolites in Coke Plant Workers. *Am.J.Ind.Med* 34: 445-454
- Bouchard M, Dodd C, Viau C (1994) Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monooxyhydroxylated PAH metabolites in urine. *J.Anal.Toxicol* 18: 261-264
- Bouchard M, Viau C (1995) Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxy-benzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol* 69: 540-546
- Bouchard M, Viau C (1996) Urinary excretion of benzo(a)pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo(a)pyrene administration (1996) *Can J Physiol Pharmacol* 75: 185-192

- Bouchard, M.; Krishnan, K.; Viau, C. (1998) Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Arch Toxicol.* ; 72: 475-482.
- Bouchard M , Viau C (1999) Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers*, vol.4.No.3:159-187
- Bouchard, M, Thuot, R., Carrier, G., Viau, C (2002). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J.Toxicol.Environ.Health, Part.A*, 65, 101-115
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254
- Chipman JK, Hirom PC, Graham SF, Millburn P (1981) The biliary excretion and enterohepatic circulation of benzo(a)pyrene and its metabolites in the rat. *Biochem Pharmacol*, Vol 30, No.9: 937-944
- Chipman JK, Millburn P, Brooks TM (1983). Mutagenicity and invivo disposition of biliary metabolites of benzo(a)pyrene. *Toxicol.Lett* 17: 233-240

Dell'Omo, M.; Muzi, G.; Marchionna, G.; Latini, L.; Carrieri, P.; Paolemili, P, et al. (1998)

Preventive measures reduce exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons at a graphite electrode plant. *Occup. Environ. Med.*; 55: 401-406.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1987). IARC Monographs on the

Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Overall evaluations of Carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Supplement 7 (Lyon: IARC), pp.56-178

Gerde P, Muggenburg BA, Thornton- Manning JR, Lewis JL, Pyon KH, Dahl AR (1997)

Benzo(a)pyrene at an environmentally relevant dose is slowly absorbed by, and extensively metabolized in, tracheal epithelium. *Carcinogenesis* 18: 1825-1832

Gündel J, Schaller KH, Angerer J (2000) Occupational exposure to polycyclic aromatic

hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenz(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene. *Int. Arch Occup Environ Health* 73: 270-274

IARC (1983) Monographs on the evaluation on the carcinogenic risk of chemicals to

humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data. Vol. 32. WHO, Lion, France, pp.33-224

Jongeneelen FJ, Leijdekkers CM, Bos RP, Theuws JLG, Henderson PT (1985). Excretion

of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene and mutagenicity in rat urine after exposure to benzo(a)pyrene. *J Appl. Toxicol* 5:277-282

Jongeneelen FJ, Bos RP, Anzion RBM, Theuws JLG, Henderson PT (1986) Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolites in urine. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 12, 137-143

Jongeneelen FJ, Anzion RBM, Henderson PT (1987) Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of Chromatography*, 413, 227-232

Jongeneelen FJ (1992) Biological exposure limit for occupational exposure to coal tar pitch volatiles at cokeovens. *Int Arch Occup Environ Health* 63: 511-516

Jongeneelen FJ (1993) Biological exposure limit for occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the coke industry. *Eurotox Newsletter* 16: 55-58

Kuljukka, T.; Vaaranrinta, R.; Mutanen, P.; Veidebaum, T.; Sorsa, M.; Kalliokoski, P., et al. (1997) Assessment of occupational exposure to PAHs in an Estonian coke oven plant: Correlation of total external exposure to internal dose measured as 1-hydroxypyrene concentration. *Biomarkers.*; 2: 87-94.

Lee BM, Santella RM (1988) Quantitation of protein adducts as a marker of genotoxic exposure: immunologic detection of benzo(a)pyrene-globin adducts in mice. *Carcinogenesis*, vol.9,10:1773-1777

Levin JO (1995) First workshop on hydroxypyrene as a biomarker for PAH exposure in man-summary and conclusions. *Sci Total Environ* 163: 165-168

Lewtas J, Mumford J, Everson RB, Hulka B, Wilcosky T, Kozumbo W, Tompson C, George M, Dobiac L, Sram R, Li X, Gallagher J (1993) Comparison of DNA Adducts to Complex Mixtures in Various Human Tissues and Experimental Systems. *Environ.Health.Perspect* 99: 89-97

Mitchel, CE (1982) Distribution and retention of benzo(a)pyrene in rats after inhalation. *Toxicol Lett*:11: 35-42

Ny ET, Heederik D, Kromhout H, Jongeneelen FJ (1993) The relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons in air and in urine of workers in a Söderberg potroom. *Am Ind Hyg Assoc J* 54: 277-284

Ovrebo S, Haugen A, Fjeldstad PE, Hemminki K, Szyfter K (1994) Biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in an electrode paste plant. *J.Occup.Med* 36: 303-310

Payan et al. (en preparation)

Peltonen K, Dipple A (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry of DNA adduct formation. *J.Occup.Environ.Med* 37: 52-58

- Petry T, Schmid P, Schlatter Ch (1996) Airborne exposure to Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anod plant workers. *Ann.Occup.Hyg.*,vol 40, No.3, 345-357
- Poirier M.C, Beland FA (1992) DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models-implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem.Res.Toxicol* 5: 749-755
- Popp W, Vanrenholz C, Schell C, Grimmer G, Dettbarn G, Kraus R, Brauksiepe A, Schmeling B, Gutzeit T, von Bülow J, Norpoth K (1997) DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in limphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers. *Occup Environ Med* 54: 176-183
- Sathirakul K, Suzuki H, Yamada T, Hanono M, Sugiyama Y (1994) Multiple transport systems for organic anions across the bile canalicular membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 65-73
- Shugart L, Kao J (1985) Examination of Adduct Formation in Vivo in the Mouse Between Benzo(a)pyrene and DNA of Skin and Hemoglobin of Red Blood Cells. *Environ.Health.Presp* 62: 223-226
- Tyndyk ML, Zabezhinski MA, Bykov VJ, Dikun PP, Dymochka LA, Nepomnyaschaya OB, Yatsuk OS, Yermilov VB, Likhachev AJ (1994) Individual values of excretion of benzo(a)pyrene metabolites and susceptibility to its carcinogenic effect in rats. *Cancer Lett* 78: 163-170

Tzekova A, Leroux, S, Viau C (2002) Electrophilic Tissue Burden in Male Sprague Dawley Rats Following Repeated Exposure to Binary Mixtures of PAHs. ArchToxicol (submitted)

Van Welie RTH, van Dijck RGJM, Vermeulen NPE, Vansittert NJ (1992) Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. Crit Rev Toxicol 22: 271-306

Viau C, Mercier M, Blondin O (1993) Measurement of hemoglobine and albumin adducts of benzo(a)pyrenediol-epoxide and their rate of elimination in female Sprague-Dawley rat. Arch Toxicol 67: 468-472

Viau C, Bouchard M, Carrier G, Brunet R, Krishnan K (1999) The toxicokinetics of pyrene and its metabolites in rats. Toxicol Lett 108: 201-207

CHAPITRE TROISIÈME

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail de recherche a été consacré à l'étude expérimentale du 1-hydroxypyrene (1-OHP) urinaire comme biomarqueur corrélé à des effets biologiques (c.-à-d. génotoxicité des HAP) associés à l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Dans ce but la charge électrophile tissulaire (CET), soit les adduits du benzo(a)pyrène diolépoxyde (BaPDE) (le métabolite cancérigène de benzo(a)pyrène (BaP)) aux protéines tissulaires, a été utilisée comme mesure de la toxicité ou comme mesure d'un effet biologique "précoce" probablement lié, quoique indirectement, à la génotoxicité et, par extension, à la cancérigénicité des organes cibles. La corrélation entre la CET des tissus choisis et le 1-OHP urinaire a ensuite été étudiée afin d'examiner le rôle du 1-OHP urinaire comme mesure d'exposition interne reliée à un effet biologique critique, dans le contexte de l'exposition à des mélanges de HAP. Ceci donc pourrait guider les stratégies de surveillance biologique de l'exposition dirigée vers la protection de la santé humaine et la diminution du risque de cancer.

D'après les données scientifiques la mesure du 1-OHP dans l'urine peut servir comme mesure de la dose interne de pyrène et de HAP, ce qui en conséquence lui a attribué le rôle de biomarqueur d'exposition aux HAP totaux autant chez la population exposée professionnellement aux HAP que chez la population générale. Mais il n'y a que deux milieux de travail pour lesquels il existe des indices biologiques d'exposition (IBE) proposés pour le 1-OHP urinaire, à savoir: pour des travailleurs des fours à coke ($2,3 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine) et pour ceux des usines de production d'aluminium ($4,9 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine). D'où l'importance de la méthodologie développée par Bouchard et Viau (1999) qui tient compte des mesures environnementales (concentration des HAP dans l'air du milieu de travail) et des mesures biologiques (des valeurs de 1-OHP dans l'urine) et qui

permettra d'établir des IBE pour le 1-OHP urinaire applicables à d'autres milieux d'exposition professionnelle aux HAP pour lesquels il n'existe pas des IBE proposés.

Néanmoins, aucune étude épidémiologique n'a mis en évidence de relation entre le 1-OHP urinaire et la maladie, soit le cancer. Plusieurs études, y compris celles qui sont issues de notre groupe de recherche, visent la validation du 1-OHP urinaire comme biomarqueur corrélé à des effets biologiques, soit la génotoxicité des HAP dans les tissus cibles. Dans ce but, en supposant que les concentrations de HAP cancérigènes exprimées en équivalent de BaP ainsi que la CET sont proportionnelles au risque de cancer, on a tenté de vérifier l'approche proposée par Bouchard et Viau (1999) dans un modèle animal utilisant le rat. Pour ce faire, nous avons examiné la relation entre l'excrétion urinaire de 1-OHP et la CET chez des rats exposés à des mélanges binaires de BaP et de pyrène. Pour ce faire, nous avons choisi trois rapports BaP/P: 0.2, 1 et 5, dont les deux premiers sont représentatifs de ce qu'on retrouve dans certains milieux de travail alors que le dernier a été pris seulement pour vérifier une applicabilité plus large du modèle. Ainsi, on tentait d'étudier l'influence du rapport BaP/P dans des mélanges binaires sur l'excrétion urinaire de 1-OHP aussi bien que sur la formation de la CET dans les tissus cibles choisis. L'exposition aux mélanges binaires (BaP+P) a été choisie afin de comprendre et d'interpréter le comportement des mélanges de HAP dans les systèmes biologiques. Dans ce cas, une interférence toxicocinétique, y compris une compétition entre les composantes de ces mélanges pour les mêmes enzymes de biotransformation, pourrait entraîner une augmentation ou une diminution de l'excrétion de certains métabolites d'intérêt dans la SBE, d'une part, ou de la formation d'adduits de métabolites cancérigènes de HAP aux macromolécules cellulaires (ADN, protéines), d'autre part. Ces adduits pourraient refléter la génotoxicité des mélanges de HAP par rapport à une exposition aux HAP cancérigènes. De plus, un régime

d'exposition répétée aux HAP a été choisi étant donné que les travailleurs sont exposés chroniquement, d'une part, et que les données portant sur la formation de la CET et sur l'excrétion urinaire du 1-OHP suite à l'exposition répétée aux HAP chez l'animal et chez l'humain sont, en général, insuffisantes, d'autre part.

Selon la revue de la littérature une formation similaire de la CET (adduits de BaPDE aux protéines tissulaires) a été observée dans des tissus différents (autant cibles que non cibles de cancérogénicité) d'un animal donné suite à l'exposition unique au BaP seul sans tenir compte de la vulnérabilité tissulaire à la cancérogénicité induite par des HAP ou de la capacité métabolique des tissus dépendant du CYT P450. Étant donné que pour les protéines, en général, il n'existe pas de mécanisme de réparation contrairement au cas de l'ADN, une exposition répétée au BaP devrait donc entraîner une accumulation des adduits de BaPDE aux protéines tissulaires, ce que nous avons défini comme la CET. Cette dernière pourrait par ailleurs refléter la charge électrophile à l'ADN, soit les adduits de BaPDE à l'ADN, donc pourrait servir comme une mesure indirecte de la génotoxicité, surtout dans les situations d'exposition chronique. De plus, l'administration des mélanges binaires contenant des quantités variables de pyrène pourrait influencer la formation de la CET provenant d'une dose donnée de BaP dans des mélanges. Selon nos données obtenues, des niveaux semblables de CET ont été obtenus pour tous les tissus d'intérêt, y compris l'hémoglobine, pour chaque dose binaire. On note cependant une faible tendance à observer des niveaux de CET un peu plus élevés dans les tissus métaboliquement actifs (le foie, le poumon) par rapport aux autres tissus examinés (le coeur, l'hémoglobine). Toutefois, on ne peut pas pour autant en déduire une relation directe entre la formation de la CET dans les tissus choisis et la vulnérabilité tissulaire à la cancérogénicité induite par les HAP. Aussi, il a été observé que la présence de P en mélange binaire avec le BaP n'influence pas la

formation de la CET des tissus choisis pour les plages de doses utilisées dans cette expérience (Article 1).

Concernant notre étude sur la relation entre le 1-OHP urinaire et la CET dans les tissus d'intérêt, une régression linéaire entre ceux-ci a été obtenue pour les ratios BaP/P de 0.2 et 1 indiquant que le 1-OHP urinaire est relié à la CET des tissus cibles. Ceci a permis également de vérifier notre algorithme de l'ajustement de la valeur de référence du 1-OHP urinaire dans l'exposition à divers mélanges de HAP (voir équation (1) de l'Article 2). Étant donné l'importance d'approfondir notre connaissance sur l'utilité potentielle d'autres biomarqueurs d'exposition aux HAP les corrélations entre la CET et le 1-OHP fécal ou le 3-OHBaP dans l'urine et les fèces ont été également examinées dans cette étude. Le fait, qu'une relation linéaire a été obtenue entre les adduits à l'Hb et le 3-OHBaP urinaire pour les trois ratios: BaP/P=0.2, 1 and 5 indique que le 3-OHBaP urinaire pourrait servir comme mesure de substitution des adduits à l'Hb dans les situations d'exposition chronique à des doses journalières relativement stables. Concernant la relation entre la "CET des tissus choisis et le 1-OHP/3-OHBaP dans l'urine ou les fèces", les meilleurs coefficients de corrélation ont été obtenus avec les métabolites urinaires par rapport aux métabolites fécaux indiquant que les métabolites urinaires du BaP et du pyrène étudiés sont des "indicateurs" plus fiables pour servir aux besoins de la surveillance biologique de l'exposition.

Tel qu'observé dans notre expérience, le pourcentage de la dose de BaP excrété sous forme du 3-OHBaP dans l'urine et les fèces était constant pour une dose donnée du BaP dans les mélanges binaires indépendamment de la dose de P. Aussi, il a été confirmé que le BaP à de faibles doses (2 and 6 mg/kg) n'influence pas le pourcentage de la dose du P excrété comme 1-OHP dans l'urine et les fèces. De plus, le fait qu'une bonne relation "dose-

excrétion" a été obtenue pour 1-OHP urinaire ainsi qu'une bonne relation "dose-formation des adduits de BaPDE aux protéines tissulaires (CET)" a été également observée suggère l'absence de saturation dans le métabolisme du pyrène, du BaP et l'excrétion du 1-OHP pour les doses utilisées dans l'expérience. Ceci indique donc qu'une influence de la composition des mélanges de HAP sur l'excrétion des métabolites de HAP d'intérêt dans la SBE est peu probable pour les environnements réalistes d'exposition professionnelle aux HAP.

En conclusion, les résultats de ces expériences indiquent qu'en utilisant la CET comme mesure de toxicité, l'équation (1) de l'Article 2 pourrait donc prédire de manière raisonnable des valeurs critiques d'excrétion du 1-OHP urinaire associées à l'exposition à des mélanges complexes de HAP ayant des ratios BaP/P différents. Étant donné que de meilleures valeurs prévues ont été obtenues pour des ratios $BaP/P \leq 1$, qui sont des ratios réalistes pour certains milieux de travail, ceci suggère donc que cet algorithme puisse servir comme une base solide vers la validation d'une nouvelle approche de détermination des IBEs pour 1-OHP urinaire dans la SBE se basant sur l'équation (1) de l'Article 2. Le rôle du 1-OHP urinaire comme mesure de la dose interne corrélée à la CET des organes cibles de cancérogénicité pour des bas ratios BaP/P (inférieure ou égale à 1) a été confirmé. Les adduits de BaPDE à l'hémoglobine (Hb) peuvent servir comme mesure de substitution de la CET des tissus cibles. Le 3-OHBaP urinaire peut servir comme mesure de substitution des adduits de BaPDE à l'Hb dans les situations d'exposition chronique à des doses quotidiennes relativement stables. Cependant, il est important d'effectuer des études animales avec des mélanges plus complexes de HAP et avec des doses de HAP représentatives des différents milieux de travail, ce qui permettra de développer de

meilleurs indices biologiques d'exposition et d'estimer plus précisément le risque pour la santé humaine.