

Université de Montréal

Établissement de la cinétique d'excrétion urinaire du 3-hydroxybenzo(a)pyrène suite
à l'injection de faibles doses de benzo(a)pyrène chez le rat Sprague-Dawley mâle

par

Ingrid Agbato

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, 2006

© Ingrid Agbato, 2006



WA
5
U58
2007
v.014

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 :

Établissement de la cinétique d'excrétion urinaire du 3-hydroxybenzo(a)pyrène suite
à l'injection de faibles doses de benzo(a)pyrène chez le rat Sprague-Dawley mâle

présenté par :

Ingrid Agbato

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Présidente du Jury : Dr Ginette Truchon, Ph.D.

Directeur de Recherche : Dr. Claude Viau, Ph.D.

Membre du jury : Dr Robert Tardif, Ph.D.

RÉSUMÉ

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des substances contaminant plusieurs milieux industriels et l'environnement général. La mesure de la dose interne d'exposition à ces substances est un des outils privilégiés de prévention. Parmi les HAP les plus étudiés figure le benzo(a)pyrène (BaP) un cancérogène et son métabolite le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3OHBaP). Jusqu'à récemment, il n'existait pas de méthodes d'analyses permettant de mesurer les concentrations de 3OHBaP habituellement rencontrées dans la population et chez les travailleurs qui sont nettement plus faibles que celles des métabolites du pyrène, biomarqueurs privilégiés à ce jour. Une méthode d'analyse par chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée qui permet la détection de faibles concentrations de 3OHBaP a été publiée. Nous avons utilisé cette méthode pour établir la cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP après avoir exposé des rats par voie intraveineuse à de faibles doses aiguës de BaP : 0,2; 1 et 5 $\mu\text{mol/kg}$. Les urines des rats rendus polyuriques en leur donnant accès à de l'eau sucrée qu'ils boivent en grandes quantités ont été collectées à des divers moments de 0 à 96 heures. Le profil cinétique obtenu est erratique et différent des profils obtenus dans d'autres études utilisant des doses plus élevées et des méthodes classiques de chromatographie liquide. Ce qui pourrait traduire une instabilité au fil du temps des faibles concentrations de 3OHBaP dans l'urine par ailleurs très diluée.

Mots clés : HAP, 3OHBaP, métabolites, faibles doses, rats, chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée.

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are industrial and general environmental contaminants. Measures of the internal dose of exposure of these substances represent one of privileged prevention tools. Benzo(a)pyrene (BaP), which is a carcinogenic PAH, is among the more studied PAHs, along with its metabolite 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3OHBaP). Until recently, there were no analytical methods able to measure 3OHBaP concentrations which are definitely lower than those of pyrene metabolites, which are more widely used biomarkers of exposure to PAH. An automated column-switching high-performance liquid chromatographic method, which allows detection of low 3OHBaP concentrations, was recently published. We used this method to establish the urinary kinetic excretion profile of 3OHBaP after intravenous exposure of laboratory rats to BaP acute low doses of 0,2; 1 and 5 $\mu\text{mol/kg}$. The urine of rats made polyuric by giving them access to sweetened water that they drink in large amounts were collected at different times from 0 to 96 hours after exposure. The kinetic profile obtained is somewhat erratic and different from kinetic profiles obtained in other studies using higher doses and classical chromatographic analytical methods. This could be due to the instability with time of low concentrations of 3OHBaP in very diluted urine samples.

Key words: PAH, 3OHBaP, metabolites, low doses, rat, automated column-switching high-performance liquid chromatography.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTES DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	xiii
DÉDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xvi
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION.....	1
1.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	2
1.1.1. Définition.....	2
1.1.2. Sources et exposition.....	3
1.1.3. Effets sur la santé.....	7
1.2. Problématique des mélanges de HAP.....	8
1.3. Évaluation et gestion du risque, surveillance environnementale, surveillance biologique de l'exposition aux HAP.....	11
1.4. HAP modèle : le benzo(a)pyrène.....	13
1.4.1. Toxicocinétique du B(a)P.....	14
1.4.1.1. Absorption.....	14

TABLE DES MATIÈRES (suite)

1.4.1.2. Distribution.....	14
1.4.1.3. Biotransformation.....	15
1.4.1.4. Excrétion.....	19
1.4.2. Effets cancérigènes et autres.....	20
1.4.3. Importance et utilité de l'étude des métabolites urinaires du B(a)P.....	21
1.4.4. Cinétique d'excrétion urinaire des métabolites du BaP chez l'animal.....	24
1.4.5. Facteurs influençant l'excrétion des métabolites urinaires du BaP chez l'animal.....	26
1.4.6. Valeurs toxicologiques de référence.....	28
1.5. Objectifs de recherche.....	30
1.5.1. Objectif général.....	30
1.5.2. Objectifs spécifiques.....	31

CHAPITRE DEUXIÈME : IMPLANTATION DE LA MÉTHODE

D'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

MULTIDIMENSIONNELLE SÉQUENCÉE.....	32
2.1. Contexte.....	33
2.2. Objectifs.....	33
2.3. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	34

TABLE DES MATIÈRES (suite)

2.4. Réactifs et produits chimiques	35
2.5. Appareillage	35
2.6. Système de HPLC utilisé pour les analyses	36
2.6.1. Principe	36
2.6.2. Présentation	36
2.6.3. Les solutions utilisées	38
2.6.4. Traitement des étalons.....	39
2.6.5. Traitement des échantillons.....	41
2.6.6. Procédure analytique.....	41
2.6.7. Résultats et discussion.....	44
Conclusion.....	49
CHAPITRE TROISIÈME : ÉTUDE ANIMALE.....	50
3.1. Appareillage, réactifs et produits chimiques.....	51
3.2. Les animaux utilisés.....	51
3.3. Le système de HPLC.....	52
3.3.1. Les solutions utilisées.....	53
3.3.2. Traitement des étalons pour l'élaboration de la courbe de calibration.....	55
3.3.3. Traitement des échantillons d'urine de rat	56
3.3.4. Analyse des urines	57
3.3.4.1. Pré-injection.....	57

TABLE DES MATIÈRES (suite)

3.3.4.2. Injection.....	58
3.3.4.3. Post-injection.....	58
3.4. Calcul des résultats.....	59
CHAPITRE QUATRIÈME : RÉSULTATS.....	61
4.1. Contrôle de qualité des mesures du 3OHBaP urinaire.....	62
4.2. Profil de la cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP.....	63
4.3. Effet de la dilution des échantillons d'urine collectés sur la concentration de 3OHBaP mesurée.....	66
4.4. Excrétion de 3OHBaP par pourcentage de dose injectée.....	68
CHAPITRE CINQUIÈME : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	70
5.1. Au sujet de l'implantation de la méthode de chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée.....	71
5.2. Au sujet de la cinétique d'excrétion à faibles doses du 3-hydroxybenzo(a)pyrène.....	74
BIBLIOGRAPHIE.....	79

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE DEUXIÈME

Tableau 1.	Préparation des étalons de 3OHBaP.....	40
Tableau 2.	Les différentes étapes de l'analyse des échantillons.....	43
Tableau 3 :	Valeurs de 3OHBaP obtenues après l'analyse des 18 échantillons par l'INRS et l'UDeM.....	45

CHAPITRE TROISIÈME

Tableau 4.	Préparation des concentrations de 3OHBaP nécessaires à l'élaboration de la courbe de calibration.....	56
Tableau 5.	Description des différentes étapes de la programmation des vannes de commutation et des événements à chaque étape de la partie automatisée du processus analytique.....	59

LISTE DES TABLEAUX (suite)**CHAPITRE QUATRIÈME :**

Tableau 6.	Excrétion cumulative de 3OHBaP par pourcentage de dose injectée et par intervalle de temps.....	69
------------	---	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE PREMIER

Figure 1.	Structure chimique des HAP les plus communs.....	6
Figure 2.	Métabolisme du Benzo(a)pyrène (INRS 1997).....	18
Figure 3.	Régions baie et K du Benzo(a)pyrène.....	19

CHAPITRE DEUXIÈME

Figure 4.	Illustration des composantes du système d'analyse.....	38
Figure 5.	Quelques exemples de chromatogrammes obtenus.....	48
Figure 6.	Régression linéaire des résultats obtenus par l'INRS et UDeM. Dans le graphique de gauche, nous avons utilisé les surfaces des pics pour calculer leur concentration alors que les hauteurs ont été utilisées dans le graphique de droite.....	49

LISTE DES FIGURES (suite)**CHAPITRE QUATRIÈME**

- Figure 7. Contrôle de qualité (CQ) pour les analyses de 3OHBaP.64
- Figure 8. Cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP suite à l'exposition intraveineuse des rats Sprague-Dawley aux doses de 0.2 μmol de BaP/kg (\blacktriangle) (n=4); 1 μmol de BaP/kg (\blacksquare) (n=4) et 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (\bullet) (n=4). Les barres verticales désignent l'erreur-type autour de la moyenne.....65
- Figure 9. Courbe de variation de la hauteur du pic de 3OHBaP en fonction de la proportion d'urine. La valeur des hauteurs est portée sur l'axe des ordonnées tandis que la proportion d'urine dans l'échantillon analysé est portée sur l'axe des abscisses. (\blacksquare) désigne les différentes valeurs obtenue pour la hauteur du pic de 3OHBaP.....67

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

µg:	microgramme
µl :	microlitre
3OHBaP:	3-hydroxybenzo(a)pyrène
ATSDR:	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BaP:	Benzo(a)pyrène
CLHP:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CSC:	Compagnie des Services Chromatographiques
EC:	Environnement Canada
g :	gramme
GC:	Gaz Chromatography
HAP:	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IARC:	International Agency for Research on Cancer
INERIS:	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRS:	Institut Nationale de Recherche et de Sécurité
JOCE:	Journal Officiel de la Communauté Européenne
kg:	kilogramme
L:	litre
M:	Molarité
m ³ :	mètre cube
MeOH:	Méthanol
mg:	milligramme

mL:	millilitre
mmol :	millimoles
MS:	Mass Spectrometry
N:	normalité
ng:	nanogramme
nm:	nanomètre
nmol:	nanomoles
°C:	degrés Celsius
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
pmol:	picomoles
UdeM:	Université de Montréal
US EPA:	United States Environmental Protection Agency
WHO:	World Health Organisation

À mes parents,
à mes frères
et à la mémoire de Francine

REMERCIEMENTS

À mon directeur de recherche, le Dr Claude Viau

Je vous remercie pour avoir accepté de diriger ce travail. Votre engagement, votre suivi et votre rigueur scientifique m'ont été d'une aide précieuse.

Au Dr Patrice Simon de l'INRS France

Ma reconnaissance pour vos conseils techniques et vos apports de solutions tout au long de ce travail.

À Asta Ruzgyté et Ross Thuot

Je ne saurais oublier votre assistance technique.

À mes parents, mes frères et amis

Je vous remercie pour votre soutien moral tout au long de ce travail.

Je remercie le Dr Michel Gérin, les professeurs et le personnel administratif du Département de Santé Environnementale et Santé et au Travail (DSEST) qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide.

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

1.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

1.1.1. Définition

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés ubiquistes de l'environnement. Ils ne sont composés dans leur structure chimique que d'atomes de carbone et d'hydrogène avec deux à sept cycles aromatiques fusionnés (Loening *et al.* 1990). Cependant, il existe des HAP qui contiennent dans leur structure des hétéroatomes tels que l'azote, le soufre et l'oxygène (National Research Council 1983). Ils se subdivisent en deux groupes : les HAP de faible masse moléculaire composés de moins de quatre noyaux, relativement solubles dans l'eau, et les HAP de masse moléculaire élevée qui sont généralement très peu solubles dans l'eau et qui constituent majoritairement le groupe des HAP particuliers (Desbiens 2004). À l'état pur, ces composés chimiques ont généralement une odeur plaisante (ATSDR 1995) et lorsqu'ils sont exposés à la lumière ultraviolette provenant des radiations solaires, ils peuvent subir une photo décomposition (WHO 2000).

Actuellement, il existe plus d'une centaine de HAP répertoriée, parmi lesquels certains plus communs (figure 1) sont reconnus comme des contaminants de l'environnement prioritaires au Canada (Environnement Canada 1994; Tremblay *et al.* 2000).

1.1.2. Sources et exposition

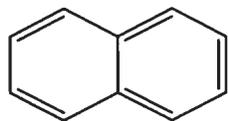
Les HAP constituent un groupe de contaminants qui proviennent de la pyrolyse incomplète du charbon, de produits pétroliers, de combustible, du bois, des déchets ou autres substances organiques (ATSDR 1995). Ce sont des constituants naturels des huiles de coupe et de plusieurs autres produits pétrochimiques (Lindstedt et Sollenberg 1982). Ils sont présents dans la fumée de tabac et sont aussi produits au cours de la combustion des combustibles fossiles (Zienolddiny *et al.* 2006). Ils sont également présents dans l'air urbain, ainsi que sur certains lieux de travail (Sugihara et James 2003) notamment lors de la conversion du charbon en goudron de houille au cours de la manipulation des produits dérivés du goudron de houille (IARC 2006) et au voisinage d'alumineries utilisant la technologie Söderberg à goujons horizontaux et à goujons verticaux (Germain 1997). Dans ces industries, l'inhalation de composés volatils ou de particules de HAP et l'absorption dermale de mélanges contenant des HAP pourraient être énumérées comme les voies importantes d'exposition aux HAP entraînant ainsi une exposition potentielle de centaines voire de milliers de travailleurs (Unwin *et al.* 2006).

L'ingestion d'aliments contaminés est la principale source d'exposition humaine chez les non-fumeurs (Butler *et al.* 1993; Phillips 1999). Ainsi, du lait provenant de mammifères se nourrissant près de sources anthropogéniques de HAP peut être une source d'exposition significative aux HAP (Lutz *et al.* 2006). En ce qui concerne la population générale, elle se retrouve exposée aux HAP par l'ingestion de nourriture surtout par les viandes ou aliments fumés, frits ou cuits au charbon de bois (Dennis *et*

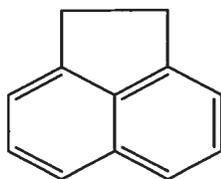
al. 1991), mais également par le contact avec l'air extérieur (Jongeneelen 1994) et l'ingestion de sols contaminés par les HAP notamment chez les petits enfants vivant à proximité de ces sols (van Schooten *et al.* 1997).

En dehors des sources précitées, les HAP peuvent aussi être émis au cours des feux de forêt, de l'herbage et des activités volcaniques (McElroy *et al.* 1989). Les activités anthropiques sources de production de HAP sont essentiellement, le chauffage au bois, le trafic automobile et la cuisson (WHO 2000).

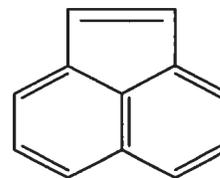
Aux États-Unis, le chauffage résidentiel au bois est la source la plus importante de production de HAP (ATSDR 1995). Quant au Canada, les principales sources d'émission naturelle de HAP sont les incendies de forêt qui en rejettent environ 2 000 tonnes par année et pour ce qui est des sources anthropiques, les alumineries viennent en tête avec une émission de 925 tonnes par année (Environnement Canada 1994).



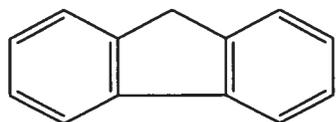
Naphtalène
($C_{10}H_8$)



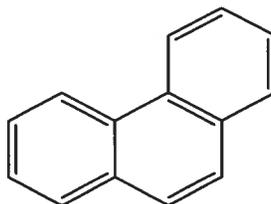
Acénaphthalène
($C_{12}H_{10}$)



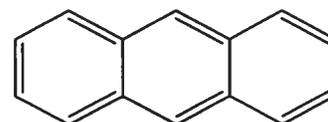
Acénaphthylène
($C_{12}H_8$)



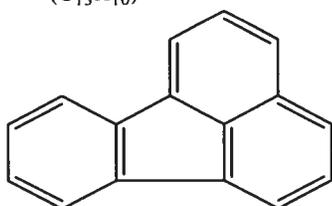
Fluorène
($C_{13}H_{10}$)



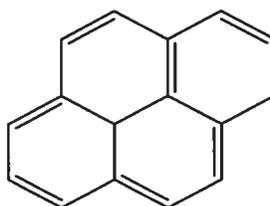
Phénanthrène
($C_{14}H_{10}$)



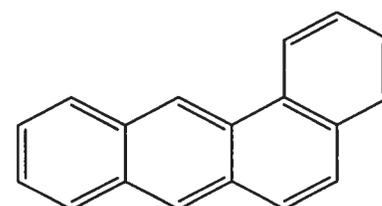
Anthracène
($C_{14}H_{10}$)



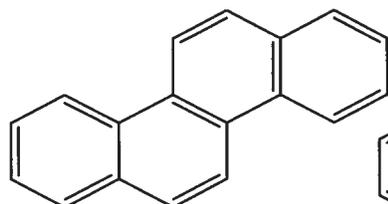
Fluoranthène
($C_{16}H_{10}$)



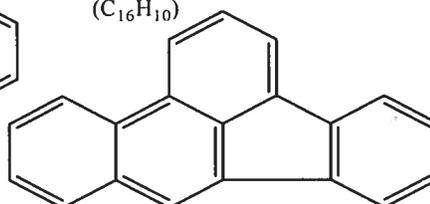
pyrène
($C_{16}H_{10}$)



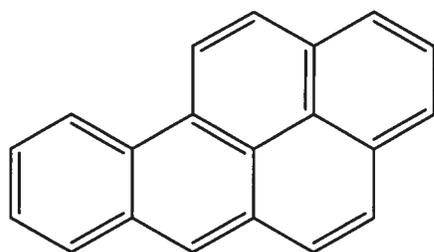
Benzo(a)anthracène
($C_{18}H_{12}$)



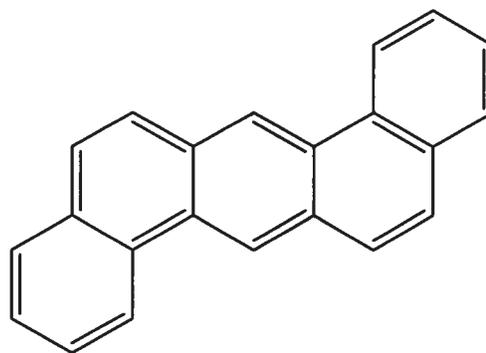
Chrysène
($C_{18}H_{12}$)



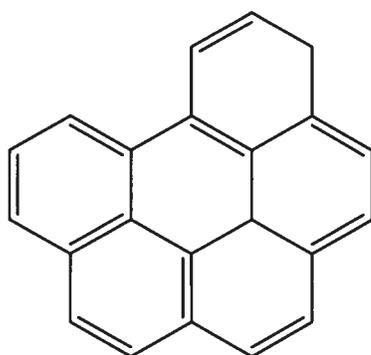
Benzo(b)fluoranthène
($C_{20}H_{12}$)



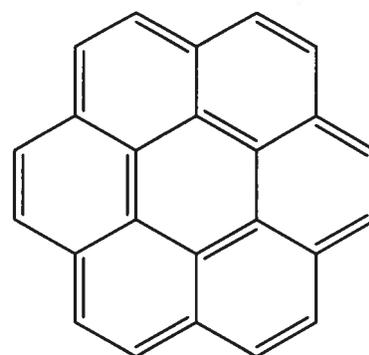
Benzo(a)pyrène
(C₂₀H₁₂)



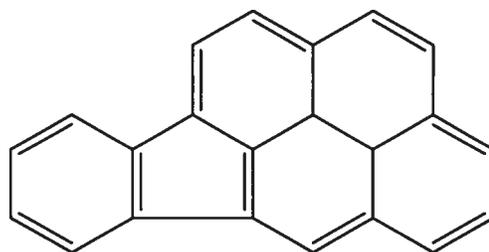
Dibenzo(ah)anthracène
(C₂₂H₁₄)



Benzo(ghi)pérylène
(C₂₂H₁₂)



Coronène
(C₂₄H₁₂)



Indeno(1,2,3,cd)pyrène
(C₂₂H₁₂)

Figure 1. Structure chimique des HAP les plus communs

1.1.3. Effets sur la santé

Les effets sur la santé suite à une exposition aux HAP sont divers et couvrent une gamme variée d'effets délétères.

Des effets toxiques hématologiques peuvent être observés suite à une exposition orale à de fortes doses de HAP. Ainsi, des souris après exposition à une dose orale journalière de 120 mg/kg de BaP ont présenté une décroissance sévère des cellules pluripotentes de la moelle osseuse (Anselstetter et Heimpel 1986).

Des changements cytogénétiques et immunologiques ont été également observés après exposition cutanée de patients souffrant de psoriasis traités par la thérapie de Goeckerman. Celle-ci combine l'exposition au goudron de houille et au rayon ultra violet dans le traitement du psoriasis (Borská *et al.* 2006).

Depuis la découverte du premier cas de cancer professionnel (cancer du scrotum chez les ramoneurs) en 1775 par Sir Pott Perceval, il a fallu attendre 1930 pour que le dibenzo(ah)anthracène soit isolé du goudron et reconnu comme la première substance cancérigène. Dès lors, l'intérêt pour la mise en évidence, des effets cancérigènes des HAP n'a cessé d'augmenter. Diverses études épidémiologiques (Armstrong *et al.* 1994; Thériault *et al.* 1990; Tremblay *et al.* 1994; Tremblay *et al.* 1995) ont démontré une forte relation entre l'incidence du cancer du poumon, du cancer de la vessie et les HAP. Dans une publication de l'OMS (2006), des études épidémiologiques de cohorte effectuées sur 11 000 travailleurs britanniques d'usines de production de

carburant ont montré un excès de l'incidence des cancers du poumon et de la vessie. Une autre étude présentée dans la même publication et effectuée sur 5 000 travailleurs allemands évoluant dans le même secteur d'activité a également démontré une incidence accrue des cancers du poumon, de l'estomac et du colorectum. Des résultats similaires ont été rapportés suite à une étude menée auprès de 3 000 travailleurs chinois évoluant aussi dans des usines de production de combustible.

1.2. Problématique des mélanges de HAP

Dans l'environnement de façon générale et dans les milieux de travail en particulier, l'une des problématiques à laquelle l'on est confronté est le mélange des HAP. En effet, l'homme se trouve exposé à plusieurs HAP à la fois à travers la fumée de tabac, les gaz d'échappement des automobiles, le goudron de houille, etc. Cet état de chose complique l'évaluation individuelle de l'exposition à ces composés. Ainsi, il est actuellement difficile de confirmer ou d'infirmer si les effets des HAP s'additionnent lorsqu'ils se retrouvent dans des mélanges ou si chaque HAP d'un mélange agissait individuellement. Par ailleurs, l'effet biologique suite à une exposition à un mélange de HAP dépendrait aussi bien de la composition du mélange que de la concentration de chacun des composés qui le constitue (Zedeck 1980). Les conséquences chez l'homme, après une exposition à un mélange de HAP, dépendraient également du potentiel fortement cancérigène, faiblement cancérigène ou non cancérigène des HAP présents dans ce mélange (ATSDR 1995). Par exemple, selon Akin *et al.*

(1976), les HAP contenus dans la fumée de cigarette requièrent la présence d'autres composés dans cette fumée pour exercer leur effet tumorigène.

Les cas de cancers associés à l'exposition à des HAP contenus dans un mélange touchent principalement les poumons et la peau suite respectivement à une exposition par inhalation ou une exposition dermale (ATSDR 1995) qui sont les principales sources d'exposition aux HAP en milieu professionnel.

Il a été démontré que certains HAP tels que l'anthracène, le BaP et le chrysène contenus dans un mélange sont susceptibles d'induire une néphrotoxicité chez le rat (Falahahtpisheh *et al.* 2001). De même, Musafia-Jeknic *et al.* (2005) ont observé une augmentation significative des taux d'adduits à l'ADN au niveau de cellules humaines traitées soit avec le BaP soit avec le dibenzo(ah)pyrène (DBP).

La présence de plusieurs HAP dans un mélange est aussi susceptible d'influencer l'excrétion urinaire des métabolites des HAP présents. Ainsi, une étude a été menée par Bouchard *et al.* (1998) sur des rats exposés à des mélanges binaires (BaP et pyrène; naphtalène et pyrène) et ternaires (naphtalène, BaP et pyrène) de HAP, pour évaluer l'effet de ces mélanges sur la cinétique d'excrétion urinaire du 1-hydroxypyrene (1OHP). Il a été constaté que le naphtalène à toutes les doses utilisées dans l'étude en présence ou non de BaP à faibles doses (0,5 $\mu\text{mol/kg}$) n'a pas d'influence sur l'excrétion du 1OHP. Cependant, une augmentation significative du pourcentage d'excrétion urinaire du 1OHP a été observée lorsqu'il y avait des doses élevées de BaP dans les mélanges binaires et ternaires.

Dans le même ordre d'idée, une exposition subchronique pendant 10 semaines de rats mâles Sprague-Dawley au pyrène uniquement à une dose de 0,046 mg/kg/jour ou à 0,3; 1 ou 3 mg/kg/jour de mélanges complexes de HAP contenant 0,046; 0,15 et 0,46 mg de pyrène/kg/jour a fait l'objet d'une étude. Au cours de cette étude, Bouchard *et al.* (2002) ont observé une augmentation progressive en fonction du temps de l'excrétion urinaire journalière du 1OHP quelle que soit la dose de pyrène et de mélanges de HAP administrés. Après les 10 semaines de traitement, les taux d'excrétion urinaire journalière de 1OHP étaient en moyenne 5 fois plus élevés que ceux observés suite à la première exposition. Cette augmentation en fonction du temps du taux d'excrétion urinaire du 1OHP a été expliquée par une libération lente du 1OHP accumulé dans les compartiments de stockage et/ou une recirculation entéro-hépatique du 1OHP et d'autres métabolites du pyrène qui pourraient jouer un rôle significatif dans la cinétique d'excrétion urinaire du 1OHP.

Ces études bien qu'importantes pour l'évaluation de l'impact de l'exposition à un mélange de HAP portent très peu sur le milieu de travail et utilisent de fortes doses d'exposition qui s'éloignent des faibles concentrations retrouvées en milieu de travail. De plus, l'analyse chimique des mélanges complexes dans l'air ambiant s'avère difficile depuis que l'on sait que plusieurs composés chimiques tel que le BaP et les composants biologiques actifs opèrent à de faibles concentrations (Musafia-Jeknic *et al.* 2005).

1.3. Évaluation et gestion du risque, surveillance environnementale, surveillance biologique de l'exposition aux HAP

Généralement, la détermination des HAP environnementaux se fait suivant une procédure en trois étapes (ATSDR 1995):

- l'extraction et l'isolement des HAP des matrices d'échantillons,
- le lavage pour débarrasser les mélanges de HAP des impuretés et leur fractionnement en sous groupes,
- l'identification et la détermination quantitative des composés individuels de chacun de ces sous-groupes.

La détermination quantitative s'effectue par des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie gazeuse (GC) avec colonne-capillaire, la chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS) qui sont les plus couramment utilisées pour la séparation et la détermination des HAP (Lee 2001). Bien que la GC ait un fort pouvoir de résolution, elle présente cependant certains inconvénients dus au fait que, exposés à de fortes températures, certains HAP peuvent se dégrader. De plus, les HAP tels que le benzo(b)fluoranthène et le benzo(k)fluoranthène sont très difficiles à séparer.

Une autre méthode de quantification utilisée est celle de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) avec un détecteur ultraviolet ou à fluorescence incluant une ou plusieurs colonnes de différents types suivant la nature des HAP à isoler. La plupart des différentes méthodes d'analyse par chromatographie nécessitent une étape d'extraction des matrices, suivie d'une étape de pré concentration pour

l'enrichissement des extraits qui sont assez chronophages. Il est aussi nécessaire de tenir compte des pertes par adsorption durant la collecte et la conservation des échantillons.

L'exposition aux HAP est souvent estimée à partir de la détermination des concentrations atmosphériques; cependant une telle mesure ne tient compte que de la dose inhalée donc pas des autres voies d'exposition qui ne sont pas négligeables.

En ce qui concerne l'évaluation de l'exposition humaine aux HAP suite à une exposition environnementale, bon nombre de méthodes ont été développées pour déterminer les biomarqueurs des HAP dans divers milieux biologiques. L'objectif poursuivi par ces méthodes consiste à mesurer des biomarqueurs d'exposition tels que les métabolites dans les urines, les fèces, la mesure des biomarqueurs d'effets génotoxiques précoces comme les aberrations chromosomiques, l'échange de chromatides sœurs au niveau des chromosomes de la circulation périphérique, la formation des adduits à l'ADN et aux protéines. Il existe aussi des tests immunochimiques pour mesurer les métabolites urinaires des HAP (Gomes et Santella 1990; Knopp *et al.* 1999).

En milieu professionnel, la mesure de l'exposition aux HAP se fait essentiellement sur des mesures de concentrations atmosphériques et des mesures biologiques. Pour les mesures biologiques, le HAP le plus utilisé est le pyrène et son métabolite urinaire le 1OHP omniprésent dans les émissions de HAP et en quantité suffisante dans l'urine et facilement quantifiable (WHO 2000). Toutefois, le pyrène n'est pas

cancérogène de sorte que son métabolite n'est peut être pas le meilleur biomarqueur de l'exposition aux risques posés par les HAP.

Les niveaux d'exposition aux HAP rencontrés en milieu professionnel varient d'une usine à une autre et suivant les produits utilisés.

1.4. HAP modèle : le benzo(a)pyrène

Le BaP est l'un des HAP le plus connu et le plus étudié pour l'investigation sur les HAP cancérogènes. C'est un composé que l'on ne retrouve pas isolément dans l'environnement ou en milieu de travail, mais plutôt mélangé à d'autres HAP, et qui à l'état pur se présente sous forme de cristaux jaunes. Le BaP est souvent retrouvé dans le goudron de houille et la fumée de cigarette. Il est formé lors de la combustion de l'essence, des déchets ou de dérivés d'animaux ou d'usine (EPA 1990). Compte tenu de sa faible pression de vapeur, on le retrouve plus largement dans la suie que dans la phase vapeur des émissions de combustion (EPA 1999; INRS 1997).

En milieu de travail, l'exposition à de fortes doses de BaP s'observe essentiellement dans les usines de production de goudron de houille, les cokeries, les raffineries de pétrole, les incinérateurs de détritux ou d'autres équipements qui brûlent le bois, le charbon ou le pétrole. La population générale quant à elle s'expose par les systèmes de chauffage résidentiels utilisant du charbon, du pétrole, du bois ou des brûleurs à

kérosène, la fumée de cigarette, la fumée d'échappement des voitures dans la circulation, et l'ingestion d'aliments contaminés (EPA 1999).

1.4.1. Toxicocinétique du B(a)P

1.4.1.1. Absorption

Le BaP est absorbé par l'inhalation d'air pollué et de la fumée de cigarette, par ingestion d'aliments contaminés par les émanations issues des combustions (IARC 1998) et par contact cutané avec des composés contaminés tels que le goudron, la houille, la suie.

Bien que le BaP soit rapidement absorbé après inhalation, sa vitesse et son pourcentage d'absorption varient en fonction de la forme sous laquelle il est administré et aussi de la taille des particules sur lesquelles il est adsorbé.

Par voie digestive le BaP est aussi rapidement absorbé. Quand à l'absorption par la voie cutanée, elle est estimée à 3% de la dose appliquée après 24 heures suivant une étude réalisée in vitro sur un modèle de peau d'origine humaine (Kao *et al.* 1985).

1.4.1.2. Distribution

Une fois absorbé, le BaP est rapidement et largement distribué dans divers tissus de l'organisme notamment dans les glandes mammaires et autres tissus adipeux, compte tenu de sa forte liposolubilité (Pichard 2006). Il est ensuite progressivement libéré des

tissus adipeux vers le sang (IARC 1983). Les concentrations retrouvées au niveau des différents tissus dépendent de la voie d'administration et du véhicule (ATSDR 1990). Chez le rat et la souris, il a été observé que le mécanisme de distribution du BaP semble similaire après administration subcutanée, intraveineuse et intra trachéale et des niveaux de BaP sont susceptibles d'être détectés dans les organes internes dans les minutes et les heures consécutives à l'administration (WHO 2000).

1.4.1.3. Biotransformation

Les HAP incluant le BaP sont principalement métabolisés au niveau du foie et aussi secondairement au niveau de la peau, des poumons et du tractus gastro-intestinal. Ce processus de biotransformation implique des enzymes du système des oxydases à fonction mixte (OFM) du cytochrome P450, notamment le cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), localisées principalement dans le foie.

Dans un premier temps, le BaP subit une oxydation induite par les cytochromes P450 pour donner lieu à des composés époxydes. Ces derniers sont transformés par l'époxyhydrolase en dihydrodiols qui sont alors oxydés en diol époxydes par l'action des cytochromes P450 puis en tétrols par l'époxyhydrolase.

Dans un deuxième temps, les composés oxygénés ou hydrolysés sont ensuite conjugués pour donner lieu à des composés plus hydrosolubles (figure 2) que l'on retrouve dans l'urine.

Parallèlement, le BaP peut subir une 3-hydroxylation suivi d'une conjugaison à l'acide glucuronide dont l'enzyme responsable est la UDP-glucuronide transférase et une conjugaison au sulfate avec le 3-phosphoadénosine-5-phosphosulfate (PAPS).

Une faible fraction du BaP absorbé et transformé en métabolites électrophiles se lie de façon covalente aux macromolécules des cellules, aux protéines, à l'hémoglobine, à l'ARN et à l'ADN pour former des adduits. Ces adduits s'ils ne sont pas réparés deviendront des agents d'initiation de la cancérogenèse et s'accompagneront de mutations génétiques dans les tissus.

C'est surtout sous la forme d'époxyde et de diolépoxyde que le BaP se liera aux macromolécules. Cette réaction s'effectue au niveau de la région K qui est une région de forte densité électronique ou dans la région baie qui est une région angulaire (figure 3). Le BaP est ainsi métabolisé par l'action des cytochromes et de l'époxyde hydrolase en son composé cancérogène final le 7,8-diol-9,10-époxydeBaP (Levin *et al.* 1982). Le 7,8-diol-9,10-époxydeBaP est un métabolite hautement électrophile susceptible de causer des mutations et de la cytotoxicité au niveau des cellules procaryotes et eucaryotes (Denissenko *et al.* 1999).

Bien que le CYP1A1 soit principalement impliqué dans le métabolisme du BaP, il a été reconnu que le CYP1B1 contribue aussi au métabolisme et à la bioactivation du BaP (Kim *et al.* 1998; Shimada *et al.* 1996).

Le BaP peut aussi accroître son propre métabolisme en se liant au récepteur cytoplasmique très spécifique des HAP, le récepteur d'hydrocarbure arylique (AhR) induisant ainsi l'expression des gènes contenant des éléments de réponses aux xénobiotiques (Harrigan *et al.* 2006). Ces gènes sont entre autres induits par les hydrocarbures aryliques entraînant une synthèse accrue d'enzymes du cytochrome P450 notamment le CYP1A1 et le CYP1A2 ainsi que de l'UDP-glucuronide transférase (Sutter et Greenlee 1992). L'AhR est lié à divers facteurs cytoplasmiques tels que les protéines de choc thermique (Hsp90) et les protéines d'interaction AhR (AIP), cette association confère à l'AhR une reconnaissance spécifique et optimale pour les HAP dont le BaP (Pichard 2006). Ainsi, l'expression des enzymes de métabolisation des différentes étapes de la biotransformation détermine le ratio de métabolites bioactivés/détoxifiés du BaP consécutif à une exposition donnée (Harrigan *et al.* 2006).

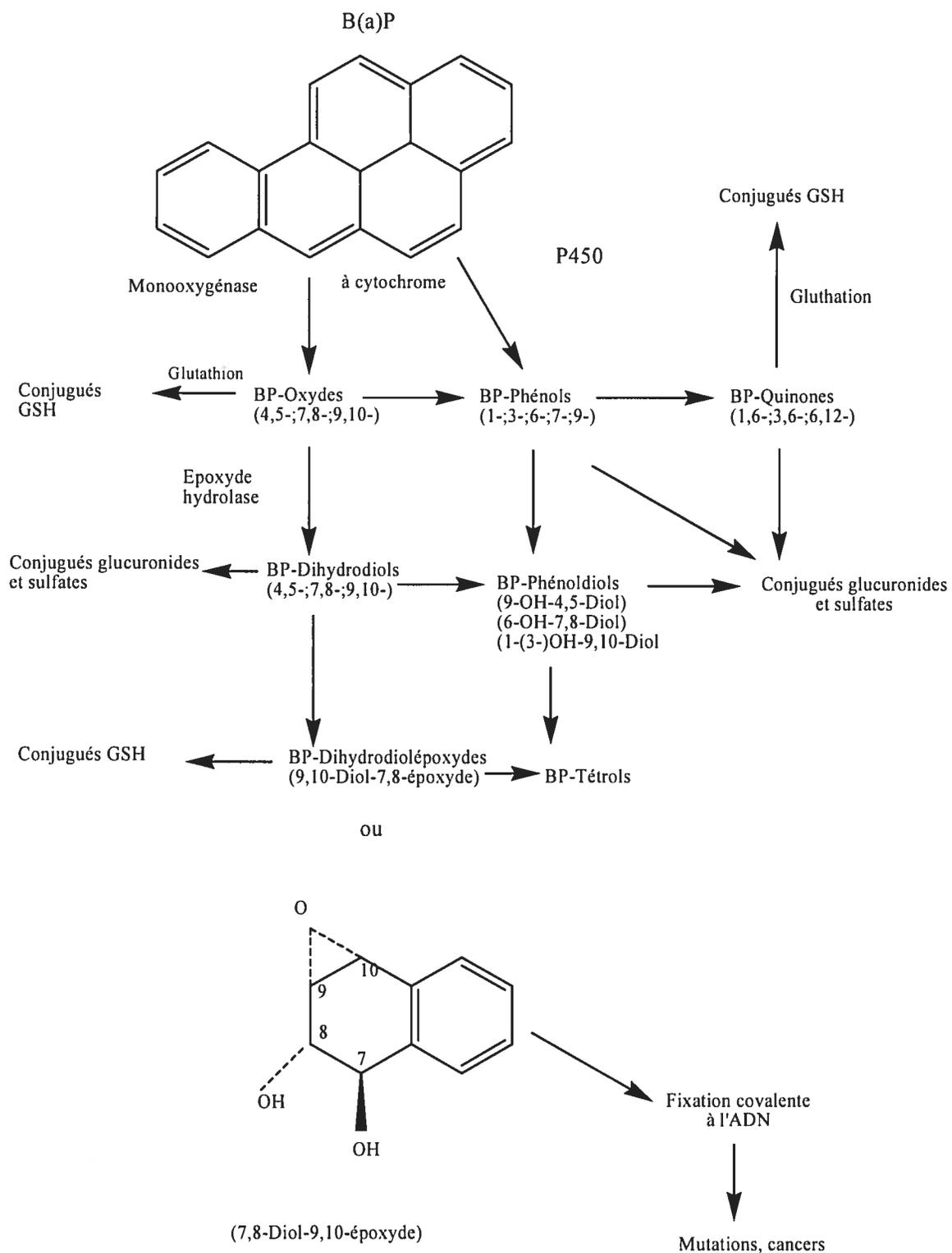


Figure 2. Métabolisme du Benzo(a)pyrène (INRS 1997)

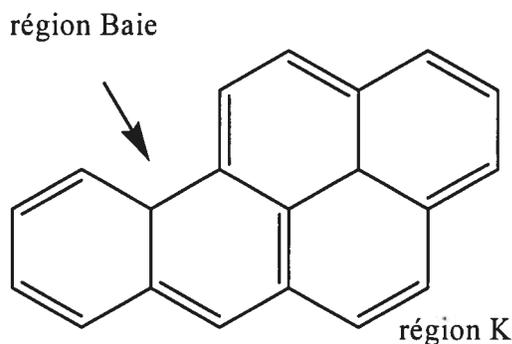


Figure 3. Régions baie et K du Benzo(a)pyrène

1.4.1.4. Excrétion

Indépendamment de la voie d'absorption, le BaP est principalement éliminé par les fèces et excrété par le système hépatobiliaire et le tractus gastro-intestinal. L'urine est une voie mineure d'excrétion en ce qui concerne le BaP; on y retrouve majoritairement des métabolites conjugués du BaP tels que le 3OHBaP conjugué par sulfoconjugaison ou par glucuronoconjugaison, des dérivés phénoliques et très peu de BaP non métabolisé. En effet, seuls 4 à 12% de l'élimination s'effectue par voie urinaire contrairement à 70 voire 75% par les fèces (Pichard 2006).

Les métabolites conjugués excrétés par l'urine peuvent être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale et être réabsorbés (WHO 2003). Le 3OHBaP est l'un des métabolites du BaP le plus étudié compte tenu de sa concentration plus élevée

donc plus susceptible d'être quantifié comparativement aux autres métabolites du BaP.

Bien que la voie fécale soit la voie d'excrétion majeure, il n'en demeure pas moins que pour l'évaluation de l'exposition au BaP, la manipulation des fèces ne s'avère pas aisée.

1.4.2. Effets cancérigènes et autres

Préalablement classé dans le groupe 2A (IARC 1998) des agents possiblement cancérigènes pour l'humain, le BaP fait actuellement partir du groupe 1 désignant les agents cancérigènes pour l'humain (IARC 2006; WHO 2006). Il est classé dans la catégorie 2 par l'Union européenne, catégorie selon laquelle, le BaP devrait être assimilé à des substances cancérigènes pour l'homme (Journal Officiel de la Communauté Européenne 2004) et dans la classe B2 de substance probablement cancérigène pour l'homme par l'US EPA (1994).

Des études sur des animaux ont montré que suite à des expositions à long terme au BaP, des problèmes de développement et de reproduction survenaient et qu'une exposition à court terme pourrait entraîner des dommages au niveau des globules rouges, de l'anémie et une suppression du système immunitaire (EPA 1999).

Comme effets cancérigènes, on observe principalement le cancer de la peau, de l'estomac et du poumon chez des animaux de laboratoire suite à une exposition chronique au BaP (IARC 1998).

Aussi, des études épidémiologiques ont montré une association claire entre l'exposition à divers mélanges de HAP contenant du BaP et une augmentation du risque de cancer (Ramesh *et al.* 2001). Il a été également confirmé dans une étude cas-témoin, un excès de risque du cancer de la vessie chez les travailleurs des salles de cuves Söderberg (Tremblay *et al.* 1994). Une étude plus récente a également démontré un risque élevé de développement du cancer de l'estomac en plus du cancer du poumon et de la vessie chez des employés d'une usine de réduction d'aluminium en Colombie Britannique, cependant en ce qui concerne les cancer du rein et du cerveau une association dose-réponse très faible ou absente a été observée lorsque les auteurs ont contrôlé l'effet du tabac (Spinelli *et al.* 2006).

1.4.3. Importance et utilité de l'étude des métabolites urinaires du B(a)P

Le BaP étant reconnu comme un HAP cancérigène, et faisant partie de la plupart des mélanges de HAP, il s'avère dès lors important et avantageux de s'intéresser aux métabolites urinaires de ce composé dans la surveillance biologique de l'exposition globale aux HAP. Beaucoup d'études jusqu'ici se sont surtout intéressées au pyrène et à son métabolite urinaire le 1OHP bien que le composé parent ne soit pas un HAP cancérigène. Ceci était en majeure partie dû au fait que les métabolites urinaires du BaP, notamment le 3OHBaP, métabolite urinaire majeur du BaP dans l'urine de souris et de rat, n'était pas mesurable par les techniques d'analyse pré existantes. La méthode d'analyse utilisée par Jongeneelen *et al.* (1987) pour le dosage du 1OHP urinaire après une hydrolyse enzymatique des métabolites conjugués et extraction en

phase solide suivi d'une mesure par HPLC avec détection fluorimétrique n'a pas pu permettre de détecter le 3OHBaP dans l'urine des travailleurs exposés aux HAP. La limite de détection de cette méthode était approximativement de 100 ng/L (373 pmol/L) pour ces deux métabolites. En effet, le 3OHBaP se trouve dans l'urine à de très faibles concentrations de l'ordre de 200 à 2500 fois plus faibles que les concentrations urinaires du 1OHP chez des patients traités par des onguents à base de goudron de houille qui constitue une source de forte exposition aux HAP (Ariese *et al.* 1994; Jongeneelen *et al.* 1986; Simon *et al.* 2000). Une étude sur des sujets travaillant dans le secteur de bitumage de route a été menée par Knopp *et al.* (1999) en utilisant une méthode immunochimique pour la mesure des métabolites urinaires des HAP avec confirmation par analyse HPLC après extraction en phase solide. Cette étude a montré que les anticorps utilisés s'étaient fortement liés au 1OHP (100%) mais en ce qui concerne le 3OHBaP cette liaison était faible car sa concentration était faible donc pas assez de molécules disponibles pour la reconnaissance par les anticorps.

Aussi, bien que le 1OHP soit couramment utilisé comme biomarqueur de l'exposition aux HAP en milieu de travail depuis des années, il n'existe officiellement pour l'instant aucun indicateur biologique d'exposition. Car, principalement le 1OHP n'est qu'un marqueur indirect de l'exposition aux HAP et par conséquent, une seule valeur ne pourrait être appliquée à divers milieux de travail (Lafontaine *et al.* 2004). Il devient alors nécessaire de s'intéresser à un marqueur direct plus représentatif du risque cancérigène tel que le 3OHBaP.

Parmi les métabolites urinaires du BaP mesurés spécifiquement chez les rongeurs, on retrouve majoritairement, le 3OHBaP, le 7,8-dihydrodiolBaP (7,8diolBaP) et le 9-hydroxydiolBaP (9diolBaP) et en faibles proportions le 9,10-dihydrodiolBaP (9,10diolBaP) et le 9-hydroxyBaP (9OHBaP) (Tyndyk *et al.* 1994). Ces métabolites se retrouvent en plus faibles proportions chez l'humain que chez l'animal compte tenu du fait d'une activité enzymatique (oxydation) plus faible chez l'humain comparativement aux rongeurs (Selkirk *et al.* 1983). De ces métabolites urinaires du BaP, le 3OHBaP est excrété à la concentration la plus forte (Bouchard et Viau 1997). À cet égard, Kim *et al.* (1998) ont montré que l'activité de l'isoenzyme P450 1B1 est plus élevée chez le rat que chez l'homme pour le métabolisme du BaP et du 7,8 diolBaP.

Il se pose dès lors, un problème de méthode d'analyse assez sensible pour déterminer de faibles concentrations urinaires de 3OHBaP. Dans cette optique, Simon *et al.* (2000) ont développé une méthode d'analyse par chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée qui permet de mesurer des concentrations de 3OHBaP urinaire de l'ordre de 0,1 ng/l à partir de l'analyse de 3 mL d'urine hydrolysée.

1.4.4. Cinétique d'excrétion urinaire des métabolites du BaP chez l'animal

Les études sur les métabolites urinaires du BaP ont souvent eu recours à de fortes doses d'exposition pour la mesure des différents métabolites (Bouchard et Viau 1996; Jongeneelen *et al.* 1986), les voies d'exposition utilisées sont diversifiées, qu'il s'agisse de la voie respiratoire, orale, veineuse, cutanée (Bouchard et Viau 1997; Campo *et al.* 2006; Ramesh *et al.* 2001). Les métabolites du BaP ont surtout été mesurés dans l'urine (Bouchard et Viau 1996, 1997; Lafontaine *et al.* 2006; Simon *et al.* 2000) rarement dans les fèces (van de Wiel *et al.* 1993; van Schooten *et al.* 1997). Likhachev *et al.* (1992), dans une étude sur des rats LIO exposés par la voie intrapéritonéale (aiguë) de 200 mg/kg de BaP ont observé une excrétion maximale du 3OHBaP et du 7,8diolBaP aux jours deux et trois suivie par une élimination lente et une élimination complète de ces deux métabolites avant les 30 jours de l'étude. Ils ont collecté les urines de 24 heures sur une période de 5 à 30 jours. Tyndyk *et al.* (1994) dans une autre étude toujours sur des rats LIO mâles ont exposés ceux-ci à dix doses de 10 mg/kg de BaP à des intervalles de dix jours. Les urines de 24 heures ont été collectées pendant huit jours après la première, la cinquième et la dixième injection. Ils n'ont pas pu déterminer une demi-vie d'élimination après la première injection. Ceci est dû au fait qu'aucun pic n'était apparent pendant les huit jours où les métabolites étaient quantifiables. Ils ont aussi observé une diminution de l'excrétion du 3OHBaP et du 7,8diolBaP après la cinquième et la dixième injection comparativement à ce qu'ils ont observé après la première injection. Ils ont expliqué

ce résultat par le fait que la capacité des enzymes à métaboliser le BaP changeait avec le temps.

Bouchard *et al.* (1995) ont déterminé un profil détaillé de la cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP chez des rats mâles Sprague-Dawley après une injection péritonéale d'une dose unique de 31,25 mg/kg de BaP. Les urines ont été collectées sur une période de 48 ou 164 heures. Ils ont observé l'atteinte d'un plateau persistant sur une période d'au moins 48 heures après l'injection et une cinétique d'excrétion avec deux phases d'élimination et des demi-vies de premier ordre de 6,7 et 25 heures pour des périodes suivant l'exposition de 52 à 72 heures et de 72 à 164 heures respectivement. Aussi, 94% du 3OHBaP était excrétés pendant les premières 72 heures.

Dans le cadre d'un suivi biologique, toutes les urines des travailleurs exposés aux HAP dans des usines de fabrication de cibles artificielles, de fabrication d'aluminium et d'électrometallurgie ont été recueillies pendant 48 heures (Gendre *et al.* 2002). L'analyse urinaire du 3OHBaP et du 1OHP par chromatographie liquide à haute performance a révélé un décalage important entre les excrétions de ces deux métabolites. Ainsi, le maximum d'excrétion pour le 3OHBaP a été observé 10 à 17 heures après celui du 1OHP. De plus, en temps réel, la corrélation entre les concentrations de 1OHP et de 3OHBaP n'était pas très bonne ($r = 0,21$), mais cette corrélation a été améliorée par la prise en compte du décalage d'excrétion ($r = 0,81$). Selon ces auteurs, ce décalage a été également observé dans des études d'intoxication de l'animal après exposition par voie intraveineuse ou par inhalation. Un décalage

important entre les temps d'excrétion du 1OHP et du 3OHBaP a été également noté dans un suivi biologique de travailleurs réalisé deux ans plus tard (Gendre *et al.* 2004) dans sept industries (deux industries d'aluminium, une industrie d'électrométallurgie, deux usines de fabrication de disques de frein de carbone, un atelier de créosotage et une usine de fabrication de cibles artificielles) dans le but d'évaluer l'exposition aux HAP. Après avoir dosé séparément le 1OHP et le 3OHBaP dans des urines collectées pendant 48 heures, l'écart observé entre les maximums d'excrétions de ces deux métabolites variaient de 3 à 24 heures. Ce qui suggérerait une éventuelle instabilité du temps d'apparition du maximum d'excrétion urinaire de ces deux métabolites.

Il est à noter que très peu d'études sur la cinétique d'excrétion urinaire des métabolites du BaP ont été menées à de très faibles doses de BaP aussi bien dans les expérimentations animales qu'en milieu de travail.

1.4.5. Facteurs influençant l'excrétion des métabolites urinaires du BaP chez l'animal

L'excrétion des métabolites urinaires du BaP est influencée aussi bien par la voie d'exposition au BaP que par l'espèce, la souche et le sexe du sujet ou de l'animal à l'étude.

Van de Wiel *et al.* (1993) ont exposé par voies orale et intrapéritonéale des rats mâles et femelles à 1 mmol/kg de BaP. Ils ont ainsi noté une différence dans le pic d'excrétion des différents métabolites du BaP. En comparant les quantités totales de métabolites urinaires de BaP excrétées, ils ont trouvé qu'elles étaient en moyenne quatre fois supérieures après injection intrapéritonéale que suite à l'exposition orale chez les mâles. Cependant, les concentrations des métabolites urinaires du BaP retrouvés chez les rats femelles étaient 2,4 fois plus faibles après injection intrapéritonéale qu'après l'exposition par voie orale.

Dans le même ordre d'idées, Bouchard *et al.* (1996) ont mené une étude pour évaluer l'impact de la voie d'exposition sur l'excrétion urinaire des métabolites urinaires du BaP. Pour cette étude, des rats mâles Sprague-Dawley ont été exposés à une dose aiguë de 2, 6, 20 ou 60 $\mu\text{mol/kg}$ de BaP par voie intraveineuse, orale et cutanée et trois collectes urinaires consécutives de 24 heures ont été effectuées. Après l'exposition et l'analyse des échantillons d'urine collectés par HPLC, il a été constaté que les quantités de 3OHBaP et de 4,5diolBaP excrétées pendant la période de 72 heures variaient selon la voie d'administration. Les quantités excrétées par voie intraveineuse étaient sensiblement égales à celle de la voie orale et ces deux voies étaient nettement supérieures à celle de la voie cutanée. Aussi, la voie d'entrée du BaP avait un impact sur la vitesse d'élimination des métabolites urinaires du BaP.

Diverses études ont aussi démontré l'influence de l'espèce, la souche et le sexe sur l'excrétion des métabolites urinaires du BaP. En effet, Tyndyk *et al.* (1994) ont

constaté après avoir exposé par voie intrapéritonéale (10 et 200 mg/kg de BaP) des rats LIO que le 7,8 diolBaP était excrété en plus grande quantité que le 3OHBaP.

Contrairement à cette étude, van de Wiel *et al.* (1993) ont remarqué que la quantité excrétée de 3OHBaP était mille fois supérieure à celle de 7,8 diolBaP chez des rats Wistar après expositions orale et intrapéritonéale.

Cependant, ces auteurs s'accordent sur le fait qu'en dépit de la voie d'administration, la fraction excrétée de métabolites urinaires totaux est plus faible chez les rats femelles que chez les rats mâles.

1.4.6. Valeurs toxicologiques de référence

Actuellement, il n'existe pas de valeur toxicologique de référence pour les effets non cancérogènes en ce qui concerne le BaP. Pour les effets sans seuil, l'US EPA (1994) propose pour l'exposition par voie orale, un excès de risque unitaire (ERUo) de $7,3 \text{ (mg/kg/j)}^{-1}$. Cette valeur est basée sur des études expérimentales effectuées chez le rat et la souris. L'OMS (2000) quant à elle propose pour une exposition par inhalation en milieu de travail, à partir de données épidémiologiques obtenues chez des travailleurs dans une cokerie, un excès de risque unitaire par inhalation (ERUi) de $8,7 \times 10^{-5} \text{ (ng/m}^3\text{)}^{-1}$. Santé Canada suggère pour l'environnement générale, une concentration tumorigène (CT_{0.05}) provisoire de $1,6 \text{ mg/m}^3$ pour une exposition par inhalation (Santé Canada 1996). La concentration tumorigène est la concentration généralement

dans l'air (exprimée en mg/m^3) qui cause une augmentation de 5% de l'incidence des tumeurs ou de la mortalité due à des tumeurs. Cette valeur proposée par Santé Canada est tirée d'une étude cancérigène expérimentale conduite chez le hamster exposé par inhalation au BaP aux doses de 0; 2,2; 9,5 et $45,6 \text{ mg}/\text{m}^3$ pendant 96 semaines (Thyssen *et al.* 1981). Le gouvernement du Québec (2001) a adopté dans les milieux de travail, une valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP) de $0,005 \text{ mg}/\text{m}^3$.

Toutes ces valeurs ne réfèrent qu'au BaP et non au 3OHBaP qui est le métabolite urinaire le plus abondant du BaP. Mises à part ces valeurs, il n'y aucune proposition de valeur de référence pour le 3OHBaP afin que l'on puisse évaluer le risque sanitaire encouru par un individu lorsqu'on mesure une certaine concentration urinaire de 3OHBaP chez ce dernier. Puisque ce que l'on mesure au cours d'une surveillance biologique est beaucoup plus les métabolites urinaires que le BaP lui-même il devient donc important d'élaborer une valeur guide pour ces métabolites.

Cependant, dans une étude sur une approche de détermination d'une valeur limite biologique en prenant le 3OHBaP urinaire comme biomarqueur d'exposition aux HAP après un suivi atmosphérique et biologique réalisées auprès de 38 personnes exposées aux HAP dans différents secteurs d'activité, Lafontaine *et al.* (2004) proposent sur la base de la recommandation française de $150 \text{ ng}/\text{m}^3$ pour le BaP, une valeur de $0,45 \text{ nmol}/\text{mol}$ de créatinine pour le 3OHBaP.

Il faudrait que d'autres études soient menées pour infirmer ou confirmer une telle valeur qui pourrait servir d'élément de base pour la proposition d'un indice biologique d'exposition.

1.5. Objectifs de recherche

1.5.1. Objectif général

L'objectif général de ce projet de recherche sera donc de maîtriser la nouvelle méthode d'analyse du 3OHBaP, la Chromatographie Liquide multidimensionnelle séquencée avec commutation de vannes (dénommée CLHP ou HPLC), mise au point par Simon *et al.* (2000) à l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) en France. Ceci dans le but de favoriser l'implantation ailleurs qu'à l'INRS de cette méthode très sensible à de faibles concentrations de ce métabolite du BaP et aussi pour confirmer l'hypothèse selon laquelle le 3OHBaP est un biomarqueur plus représentatif de l'évaluation de l'exposition aux HAP, notamment les HAP cancérigènes. Cette démarche permettra, entre autre l'emploi de faibles doses d'exposition dans les études sur le BaP ce qui n'était pas possible jusqu'à récemment (Bouchard et Viau 1996, 1997). L'utilisation du rat comme modèle animal se justifie par le souci de transposition des données obtenues à l'humain compte tenu des physiologies comparables de ces deux modèles. L'utilisation de la voie intraveineuse se justifie par le fait qu'elle est une voie de référence et qu'elle s'apparente à une administration par voie pulmonaire, l'une des principales voies d'exposition aux HAP en milieu de travail, quant à la cinétique d'excrétion des métabolites urinaires selon

les données de la littérature. Le choix d'exposer nos rats à de faibles doses (0,2; 1 et 5 $\mu\text{mol/kg}$) est dû au fait que ces doses sont assez réalistes sur le plan de l'exposition en milieu de travail où l'on retrouve des doses plus élevées.

1.5.2. Objectifs spécifiques

- 1) Valider la méthode d'analyse par Chromatographie Liquide multidimensionnelle séquencée par commutation de vannes dans les études sur les métabolites des HAP.

- 2) Établir la cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP pour de faibles doses d'exposition de BaP.

CHAPITRE DEUXIÈME
IMPLANTATION DE LA MÉTHODE
D'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE MULTIDIMENSIONNELLE SÉQUENCÉE

2.1. Contexte

Ce projet s'insère dans le cadre d'une convention signée le 29 juin 2004 entre le Docteur Claude Viau de l'Université de Montréal (UdeM) et l'INRS France- Centre de Lorraine.

Cette convention vise d'une part à corroborer les données obtenues par l'INRS sur le 3OHBaP ces dernières années et d'autre part à faire avancer les recherches sur ce métabolite du BaP.

C'est dans cette optique, que d'un commun accord avec l'INRS dont une équipe a mis au point la nouvelle méthode d'analyse par chromatographie liquide (Simon *et al.* 2000), ce projet a été initié pour élargir la sphère d'implantation de cette méthode assez sensible pour quantifier de faibles concentrations de 3OHBaP, mais qui pour l'instant est très peu utilisée.

2.2. Objectifs

Les objectifs de cette convention développés dans ce chapitre sont les suivants :

- Implanter la méthode d'analyse mise au point par l'INRS dans le laboratoire du Docteur Claude Viau
- Valider la bonne maîtrise de la méthode d'analyse à l'UdeM par des essais inter-laboratoires contrôlés par l'INRS.

2.3. La chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée (HPLC)

- Historique

L'utilisation de la chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée appelée à haute vitesse ou à haute pression a débuté en 1967 avec la publication des travaux de Huber et Hulsman (Hamilton et Sewell 1982). Mais, ce n'est qu'au milieu des années 1970 que ce type de chromatographie a connu son essor. Cette méthode chromatographique fut très vite améliorée avec le développement de matériaux pour garniture de colonne et la possibilité de couplage de détecteurs.

Dès les années 1980, l'HPLC fut utilisée pour les analyses courantes de séparation de composés chimiques. De nouvelles techniques furent mises au point pour améliorer les étapes de séparation, d'identification, de purification et de quantification. De plus, l'ordinateur et l'automatisation furent également combinés au système initial d'HPLC.

Les longues colonnes de diamètre 3 à 5 mm initialement utilisées pour l'HPLC ont fait place à des colonnes de plus en plus courtes à faibles diamètres de l'ordre de 3 à 200 μm garnies de petites particules. Ces nouveaux types de colonnes ont rendu plus aisée l'utilisation de l'HPLC en étendant son domaine d'application à la biotechnologie, aux analyses biomédicales, aux recherches biochimiques, à la chimie alimentaire ainsi qu'à l'industrie pharmaceutique.

2.4. Réactifs et produits chimiques

Pour cette étude, nous avons utilisé du 3OHBaP en poudre provenant de la commission des communautés européennes-bureau des références (réf.#343). Par ailleurs, de l'acide ascorbique de pureté 99,80%, de l'acide citrique avec une pureté de 100,90%, de l'hydroxyde d'ammonium concentré et du méthanol (qualité HPLC) de pureté 99,97% ont été achetés chez Fisher Scientifique (Ottawa, Canada).

L'eau MilliQ et le méthanol utilisés pour préparer les phases mobiles ainsi que les solutions de lavage pour le système de HPLC sont filtrés juste avant usage au travers d'un dispositif de filtration sous vide comprenant un filtre de porosité 0,45 μm de diamètre Ultipor N66 provenant de la Compagnie des Sciences Chromatographiques (Montréal, Québec).

2.5. Appareillage

L'appareillage utilisé en dehors du système d'analyse se compose de :

- Un bain chauffant Orbit water bath shaker cat. No 3535 provenant de Lab-Line Instruments (Illinois, États-Unis).
- Une balance à peser de marque Melter AE50 de chez Melter (Hightstown, États-Unis).

2.6. Système de HPLC utilisé pour les analyses

2.6.1. Principe

L'échantillon d'urine hydrolysée, une fois injecté dans le système d'analyse passe successivement sur trois colonnes de purification. Ces colonnes de purification débarrassent l'urine hydrolysée injectée des différentes substances polaires qui la composent et retiennent le 3OHBaP. Le 3OHBaP retenu passe ensuite sur une colonne analytique, colonne sur laquelle s'effectue la séparation. Cette dernière colonne est reliée au détecteur de fluorescence dont les longueurs d'onde sont fixées à 382 nm pour l'excitation et 441 nm pour l'émission. Le pic de 3OHBaP est ensuite quantifié à l'aide d'une courbe de calibration.

2.6.2. Présentation

Le système d'analyse de HPLC utilisé pour ce projet est composé de :

- Un ordinateur muni d'un logiciel Agilent Chemstation LC 3D A10.02 (1757).
- Un détecteur de fluorescence Agilent 1100 Series d'Agilent Canada.
- Deux pompes P1 et P2 Agilent 1100 Series, évoluant en mode isocratique provenant d'Agilent Canada. Chacune de ces pompes est contrôlée par un module de contrôle manuel.
- Une précolonne en acier inoxydable de 2 cm de longueur et 0,32 cm de diamètre. Cette précolonne contient une garniture interne de 100 mg de 40 µm

de Bondésil C1 provenant de chez Varian (Mississauga, Canada), réf : 112.3002.

- Trois colonnes de purification C1, C2 et C3 en acier inoxydable. La colonne C1 est une colonne de 5 cm de longueur et 0,2 cm de diamètre remplie d'une phase stationnaire de Spherisorb C8. La colonne C2 est une colonne de 5 cm de longueur et 0,32 cm de diamètre avec une phase stationnaire composée de 5 μm de Spherisorb OD/CN. Quant à la colonne C3, il s'agit d'une colonne de 7,5 cm de longueur et 0,46 cm de diamètre contenant une phase stationnaire constituée de 5 μm de phényle de nucléosil. Ces trois colonnes de purification ont été fabriquées et fournies par l'INRS.
- Une colonne analytique C4 en acier inoxydable de 15 cm de longueur avec un diamètre de 0,32 cm, garnie d'une phase inverse C18.
- Une vanne d'injection manuelle Vi à 6 ports ainsi que trois vannes de commutation V1, V2 et V3 à 6 ports.

Ces différents composants sont schématisés à la figure 4.

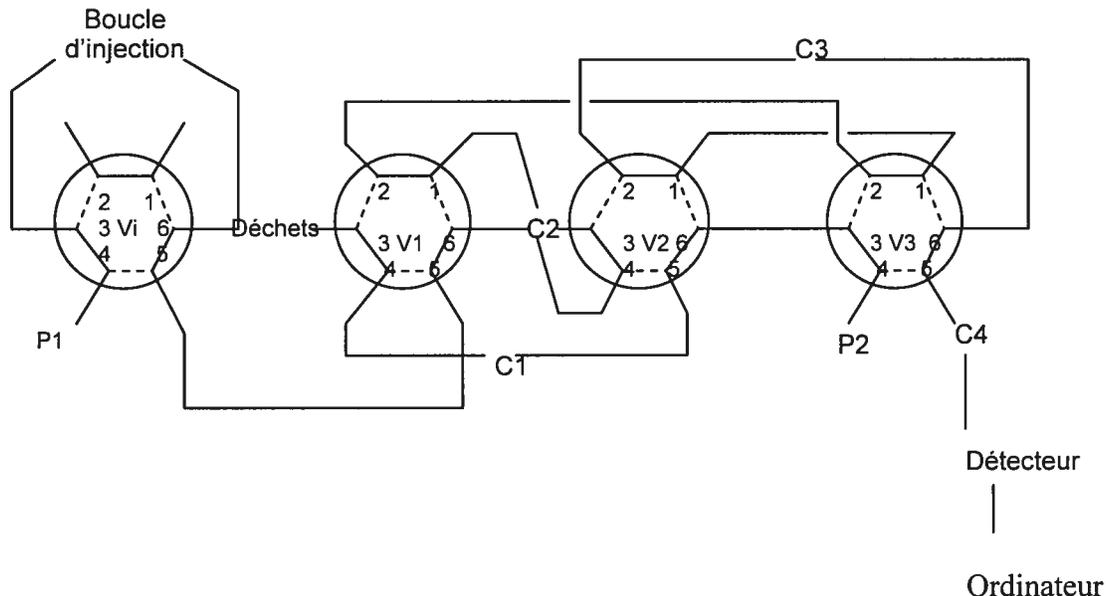


Figure 4. Illustration des composantes du système d'analyse

2.6.3. Les solutions utilisées :

- Éluants E1 et E2 et solutions de lavage :

- *Éluants E1 et E2*

Les éluants E1 et E2 désignent respectivement les phases mobiles qui alimentent la pompe 1 et la pompe 2.

L'éluant E1 est un mélange de 35% d'eau MilliQ et de 65% de méthanol contenant de l'acide citrique (5×10^{-3} mol/L) et de l'acide ascorbique (10 mg/L).

L'éluant E2 quant à lui est un mélange de 20% d'eau Milli Q et de 80% de méthanol, mélange auquel de l'acide citrique et de l'acide ascorbique sont ajoutés dans les

mêmes proportions que pour l'éluant E1. Les deux éluants sont fournis en mode isocratique à un débit de 0,5 mL/min.

L'eau MilliQ et le méthanol utilisés pour la préparation de ces éluants sont filtrés tout juste avant leur utilisation. L'acide ascorbique est ajouté à chacune des phases mobiles, juste avant l'utilisation pour éviter sa dégradation et assurer un bon maintien du pic de 3OHBaP (Bouchard *et al.* 1994).

- Solutions de lavage

Une solution de lavage composée d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à 0,5 mol/L dans du méthanol à 5% et 95% d'eau MilliQ et une autre solution de lavage constituée d'une solution d'acide citrique à 0,01 mol/L dans du méthanol à 20% et 80% d'eau MilliQ ont été utilisées durant le processus d'analyse pour rincer la précolonne entre les injections.

2.6.4. Traitement des étalons

Une solution d'étalon de 3OHBaP (2,1 µg/L) dans du méthanol fournie par l'INRS a été utilisée pour l'établissement de la courbe de calibration. Cette solution a été diluée dans du méthanol pour obtenir une solution de travail à 10 pmol/mL de 3OHBaP. La solution de travail est ensuite diluée avec du diluant pour étalon pour obtenir les différentes concentrations de 3OHBaP nécessaires à l'établissement de la courbe de

calibration (tableau 1). Le diluant pour étalon est constitué d'urine contrôle non commerciale diluée de moitié dans du tampon d'acétate de sodium (0,1 M pH 5,0) et hydrolysée toute une nuit dans un bain chauffant à 37°C en présence de glucuronidase/arylsulphatase (5 µL/mL d'urine contrôle). L'enzyme utilisée provient de chez Roche (Laval, Québec) et l'acétate de sodium de chez J.T. Baker (Phillipsburg, États-Unis). Après l'hydrolyse, on ajoute au mélange du Triton (250 µL de Triton X-100 dans 50 mL d'eau) de chez Bund Deutscher Hebammen (Allemagne). Nous avons procédé ainsi dans le but d'opérer dans les mêmes conditions que pour les échantillons. Un volume de 2 mL du mélange obtenu est injecté aux fins d'établissement de la courbe de calibration.

Tableau 1. Préparation des étalons de 3OHBaP

Concentration finale de 3OHBaP (pmol/mL)	Solution de travail à 10 pmol/mL (µL)	Volume de MeOH (µL)	Diluant pour étalon (µL)
0	0	240	2160
0,015	20 µL de 2,5 pmol/mL	300	2880
0,031	7,5	232,5	2160
0,063	15	225	2160
0,125	30	210	2160
0,250	60	180	2160

2.6.5. Traitement des échantillons

Dix huit échantillons d'urine provenant de l'INRS ont été analysés conjointement par nos 2 laboratoires (UdeM et INRS). Les échantillons d'urine sont sortis du congélateur quelques heures avant leur traitement et mis à décongeler à la température du laboratoire. Une fois décongelés, ils sont agités vigoureusement pour homogénéisation. À un volume de 1,2 mL de chacun des échantillons d'urine est ajouté 1,2 mL de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5,0; puis 10 µL d'enzyme glucuronidase/arylsulphatase et 240µL de solution méthanolique de Triton dans un tube en téflon. Le tout est ensuite incubé à 37°C pour hydrolyse dans un bain chauffant toute une nuit. Un volume de 2 mL de l'urine hydrolysée est injecté pour l'analyse du 3OHBaP.

2.6.6. Procédure analytique

Après l'hydrolyse, les échantillons sont agités au vortex pendant 30 secondes et un volume de 2 mL d'urine hydrolysée est injecté manuellement dans la précolonne reliée à la vanne d'injection (Vi) à l'aide d'une seringue en verre. Le levier de la vanne d'injection initialement en mode «charge» est basculé en mode «injection» après l'injection d'urine hydrolysée pendant 1 min avant que le levier ne soit rebasculé en mode «charge». Avant l'injection de l'urine hydrolysée, la précolonne est rincée avec un volume d'eau MilliQ de 0,5 mL. Une fois l'urine hydrolysée injectée et après le retour du levier en mode «charge», la précolonne est rincée avec

0,5 mL d'eau MilliQ, 0,5 mL de la solution de lavage d'hydroxyde d'ammonium et 0,5 mL de la solution d'acide citrique. L'échantillon passe ensuite successivement au travers des trois colonnes de purification (C1, C2, C3) rattachées aux vannes de commutation (V1, V2, V3). Une fois, la troisième colonne traversée, l'échantillon est transféré sur la colonne analytique (C4) qui est rattachée à une deuxième pompe (P2) qui aspire l'éluant (E2) et à un détecteur de fluorescence. L'observation du pic de l'échantillon s'effectue au niveau du détecteur. Mise à part, l'injection manuelle, tout le reste du processus est automatisé et dure 40 min (tableau 2). L'analyse des étalons a été effectuée suivant la même procédure analytique.

Tableau 2. Les différentes étapes de l'analyse des échantillons

Les différentes étapes		Temps (min)
1	Injection manuelle de l'échantillon hydrolysé et des solutions de lavage	-
2	Début de l'étape automatisée. Rinçage de la précolonne avec l'éluant E1 à un débit de 0,5 mL/min et transfert de l'échantillon sur C1	0
3	Rinçage manuel de la précolonne et purification de l'échantillon sur C1	1
4	Transfert de l'échantillon de C1 à C2	3,20
5	Purification sur C2 et rinçage de C1 en mode rétrograde	6,60
6	Transfert de l'échantillon de C2 à C3	8,30
7	Purification sur C3 et rinçage de C1 et C2 en mode rétrograde	11,70
8	Transfert de C3 à C4. Rinçage de C1 et C2 avec l'éluant E2	13,80
9	Séparation sur C4. Rinçage de C1, C2 and C3 avec E1 pour leur reconditionnement	22,20

2.6.7. Résultats et discussion

Une courbe de calibration a été établie avant le début des analyses des 18 échantillons d'urine. Un point de cette courbe de calibration est repris chaque jour pour s'assurer de l'état de la calibration. Dans le cas, où la calibration n'était pas bonne, la courbe de calibration est reprise avant la poursuite des analyses. Des échantillons choisis au hasard ont été également dupliqués dans le but d'assurer une bonne reproductibilité.

Les valeurs individuelles pour ces échantillons dupliqués sont : échantillon 3 = 12 et 12 pmol/L ; échantillon 14 = 16 et 18 pmol/L ; échantillon 18 = 36 et 34 pmol/L.

Ce qui témoigne d'une bonne reproductibilité des valeurs trouvées pour un même échantillon à des intervalles de temps différents.

Les résultats obtenus (tableau 3) s'apparentent à 80% (14 sur 18) aux résultats obtenus par l'INRS France avec une limite de détection de 0,008 pmol/mL. Tandis que pour l'INRS, la limite de détection se situe autour de 0,0004 pmol/mL, 20 fois plus faible que la nôtre. Les 20% de nos résultats non comparables à ceux de l'INRS pourraient s'expliquer par cette différence entre nos deux limites de détection. Un autre facteur dissemblable pour nos 2 laboratoires est le temps de rétention des pics obtenus. En effet, le temps de rétention de nos pics tourne autour de 37 minutes tandis que celui de l'INRS se situe autour de 26 minutes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que notre colonne analytique C4 est plus longue que celle utilisée par l'INRS ce qui impliquerait un temps de passage plus long ou par le pourcentage de méthanol et d'eau dans nos phases mobiles. Ce dernier aspect ne devrait normalement pas influencer de façon significative sur la quantification des pics obtenus car nous avons

essayé différentes proportions de méthanol et d'eau avant de choisir celles utilisées au cours de nos analyses.

Tableau 3. Valeurs de 3OHBaP obtenues après l'analyse des 18 échantillons par l'INRS et l'UdeM

Échantillons	INRS 3OHBaP (pmol/L)	U de M 3OHBaP (pmol/L)
1	10,7	12
2	68	67
3	8,3	12
4	13,8	28
5	8,4	17
6	26,1	45
7	6,4	9
8	87,7	81
9	9,3	12
10	14,3	13
11	6,5	12
12	4,8	28
13	30,8	27
14	14,4	17
15	62,6	47
16	17,5	18
17	12	11
18	32,3	35

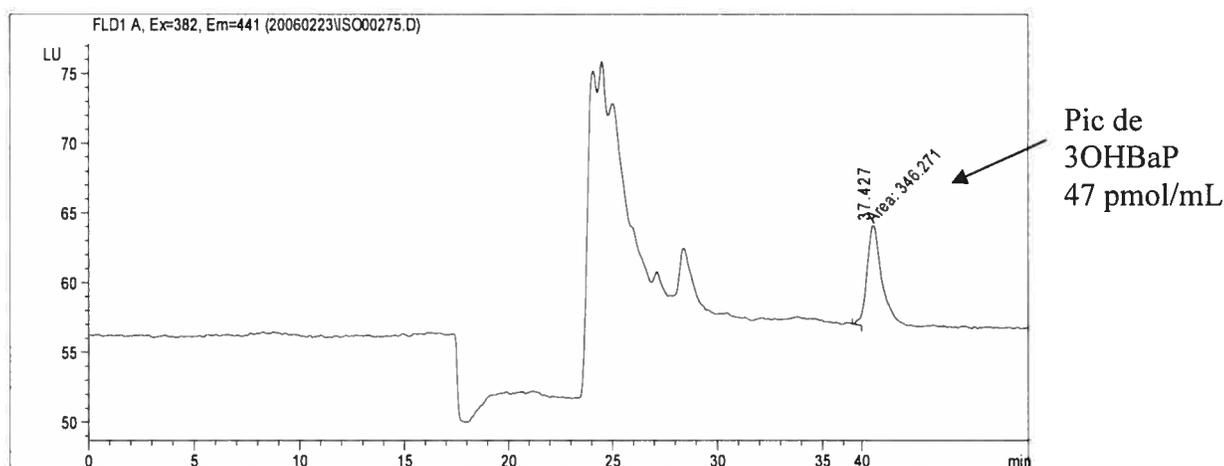
Par ailleurs, les différentes colonnes de purification comprises dans le système d'analyse ont joué un rôle important dans la netteté des chromatogrammes obtenus. Ainsi, la C1 est plus hydrophobe que la C2 ce qui lui permet de retenir le 3OHBaP et de laisser passer les substances polaires, le 3OHBaP est donc plus facilement porté

vers la C2 qui compte tenu de sa capacité hydrophile transfère plus rapidement le 3OHBaP à la C3. La C3 avec une phase stationnaire phényle apolaire, spécifique des composés aromatiques, retient le 3OHBaP qu'elle transmet par la suite à la colonne analytique C4. Les colonnes C1 et C2 sont ensuite débarrassées des substances hydrophiles retenues par rinçage en mode rétrograde. Cette succession de colonnes permet d'obtenir des chromatogrammes plus nets (figure 5).

Dans le but d'adopter une courbe de calibration passant par zéro pouvant nous permettre d'obtenir dans l'avenir une compatibilité de plus de 80% pour les résultats qu'obtiendront nos deux laboratoires, nous avons comparé d'une part un certain nombre de nos résultats à ceux obtenus par l'INRS en prenant en considération la surface et d'autre part la hauteur (figure 6). Ceci dans le but d'opter ultérieurement pour une courbe de calibration prenant en considération soit la hauteur des pics obtenus soit leur surface comme variable d'intérêt pour le calcul de la concentration de 3OHBaP. Nous avons ainsi procédé par une régression linéaire simple en prenant les résultats de l'INRS comme variable indépendante et ceux obtenus par notre laboratoire (UdeM) comme variable dépendante. Il n'est apparu presque pas de différence entre les valeurs obtenues pour les 2 coefficients de détermination ($R^2=0,7782$ et $R^2=0,7731$), cependant les pentes obtenues pour les deux équations de droites sont différentes. La pente est plus forte (73,72%) lorsque nous prenons en considération la hauteur que lorsqu'il s'agit de la surface (69,88%). Aussi, nous avons constaté que pour un même pic de 3OHBaP la valeur trouvée pour la surface varie d'un opérateur à l'autre, tandis que la valeur de la hauteur demeurerait presque

inchangée d'un opérateur à un autre. Nous avons donc décidé pour les expériences futures de tenir compte de la hauteur pour le calcul de la concentration de 3OHBaP.

Au cours de l'analyse des 18 échantillons d'urine, nous avons observé pour les différentes courbes de calibrations établies que le point de courbe 0 pmol/mL donnait une valeur zéro aussi bien pour la surface que pour la hauteur. Suite à ce constat, nous avons pris la décision de forcer notre courbe de calibration par l'origine (zéro). De plus, la plupart des concentrations de 3OHBaP obtenues après analyse se trouvait dans la gamme des faibles concentrations utilisées pour établir la courbe d'étalonnage. Il nous apparaissait donc plus opportun d'adopter une droite de calibration avec une équation du type $y = a x$, plus adaptée à nos réalités d'analyse et qui toutefois ne diminuerait pas la précision de notre courbe de calibration (Schwartz 1986).



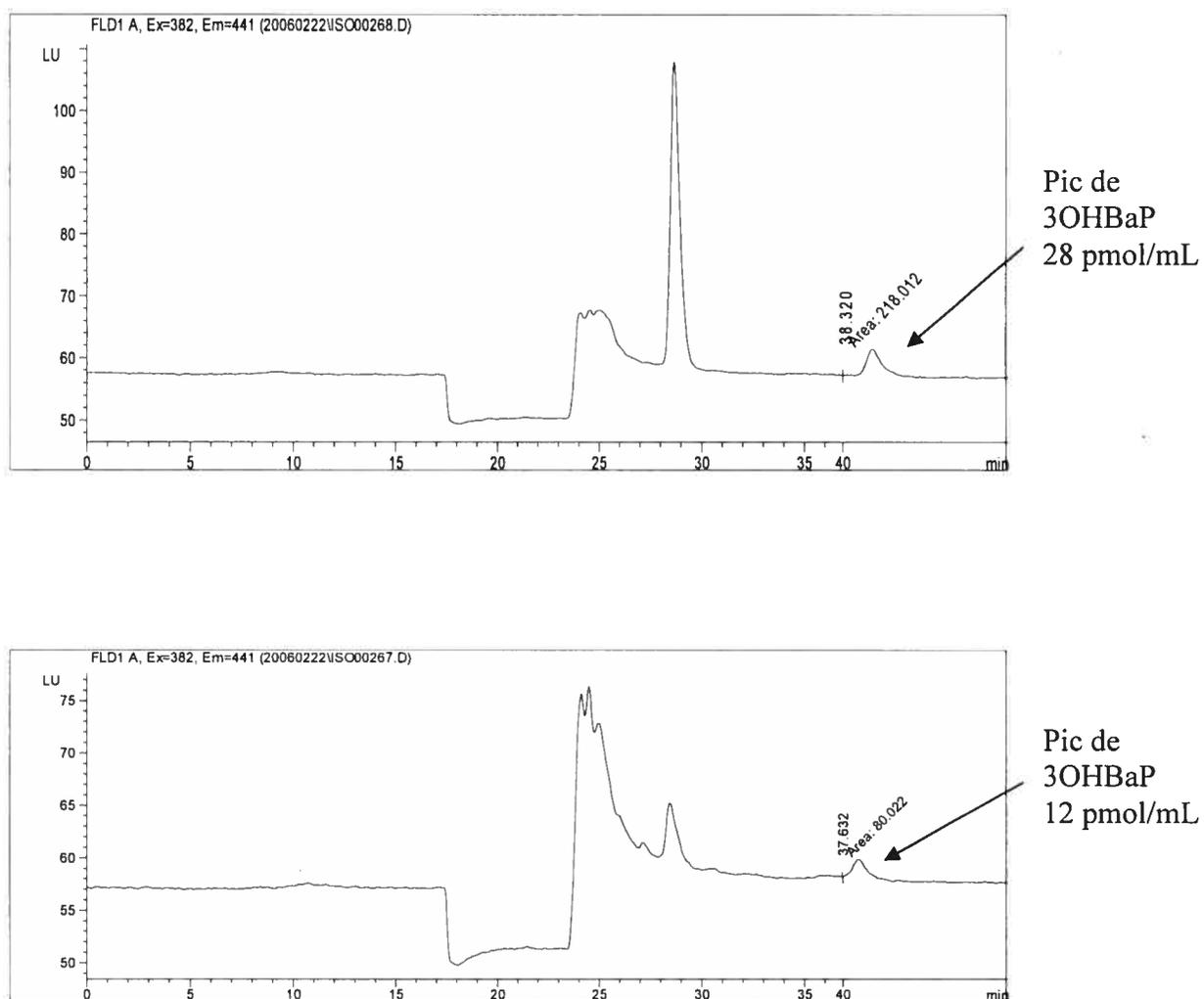


Figure 5. Quelques exemples de chromatogrammes obtenus

NB : Une erreur du logiciel place la valeur « 40 minutes » au mauvais endroit sur la droite des abscisses. Le temps de rétention est réellement de l'ordre de 37 min.

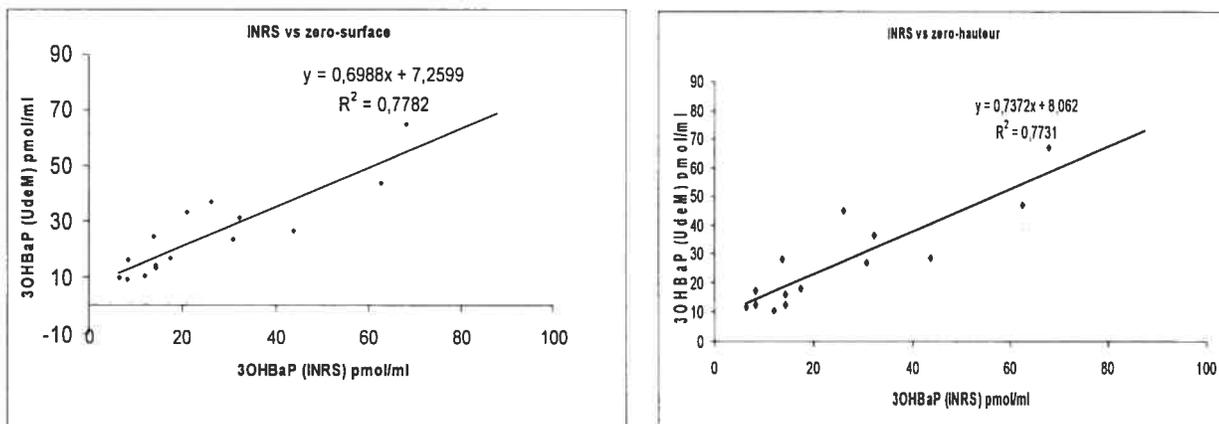


Figure 6 : Régression linéaire des résultats obtenus par l'INRS et l'UdeM. Dans le graphique de gauche, nous avons utilisé les surfaces des pics pour calculer leur concentration alors que les hauteurs ont été utilisées dans le graphique de droite.

Conclusion

Il ressort des résultats obtenus que l'analyse du 3OHBaP urinaire par la méthode de HPLC développée par l'INRS France ait été bien maîtrisée par notre laboratoire. Et aussi qu'elle serait adaptée pour notre étude animale avec les faibles doses d'exposition de BaP choisies.

CHAPITRE TROISIÈME

ÉTUDE ANIMALE

3.1. Appareillage, réactifs et produits chimiques

L'appareillage, les réactifs et les produits chimiques utilisés pour l'étude animale demeurent les mêmes que ceux utilisés lors de la validation de la méthode mis à part l'ajout d'un bain thermostaté de marque Haake G de chez Haake (Allemagne) et l'utilisation de BaP lyophilisé à 97,3% de pureté provenant de chez Sigma (Oakville, Ontario) lot : 46H3415 pour l'exposition des animaux.

3.2. Les animaux utilisés

Des rats mâles Sprague-Dawley provenant des laboratoires Charles River (Saint-Constant, Québec) et pesant entre 179 et 209 g ont été utilisés. Ces rats ont reçu de faibles doses en exposition aiguë de 0,2; 1,0 et 5,0 $\mu\text{mol/kg}$ de BaP au niveau de la veine caudale. Le BaP a été dissout dans un mélange de 20% d'emulphor et 80% de solution aqueuse isotonique de glucose (54,06 g/L). Un total de 12 rats à été exposé à ces doses à raison de 4 rats par dose.

Des échantillons d'urine de 24 heures ont été collectés avant l'exposition des rats au BaP. Ces échantillons ont servis d'échantillons contrôles pour l'analyse du 3OHBaP. À l'analyse de ces échantillons, aucun pic de 3OHBaP n'a été observé.

Après injection, les rats ont été placés dans des cages métaboliques individuelles où leurs urines ont été collectées pendant 96 heures. Pendant les premières 12 heures, les

urines ont été collectées à chaque 2 heures, à chaque 6 heures pendant les 18 heures suivantes et finalement à chaque 8 heures pendant les dernières 66 heures. Au cours de la collecte, les rats ont été retirés des cages et ceci à la même heure une fois par tranche de 24 heures pendant une heure pour être nourris. Durant cette période, ils ont été mis ensemble dans des cages ordinaires par groupe de dose. Les urines ne sont pas collectées durant cette période pour éviter les pertes qui pourraient résulter de l'adsorption du conjugué de 3OHBaP sur les particules alimentaires et qui contamineraient les urines. De l'eau ordinaire leur est donnée pendant la période de repas pour éviter qu'ils n'urinent beaucoup. Cependant, lorsqu'ils sont dans les cages métaboliques, ils ont à leur disposition une eau de boisson composée de D-glucose (40 g/L) et de la saccharine (1,5 g/L) pour induire une polydipsie qui par conséquent entraînera une polyurie (Chouinard et Viau 1992) nous permettant ainsi de pouvoir obtenir assez d'urine aux fréquences de collecte. Nous avons collecté au total 216 échantillons d'urine sur du thymol. Le thymol a pour rôle d'empêcher la poussée de bactéries dans les échantillons d'urines, une fois ceux-ci collectés. Les échantillons d'urine collectés sont ensuite mis au congélateur à -20°C jusqu'au moment d'effectuer les analyses par HPLC.

3.3. Le système de HPLC

Le système d'analyse décrit par Simon *et al.* (2000) a été utilisé. Ce système comprend deux pompes (P1 et P2) Agilent 1100 Series (Agilent Canada) qui fonctionnent durant les analyses à un débit constant de 0,5 mL de phase mobile par

minute. Chacune de ces pompes est contrôlée par un module de contrôle manuel Agilent 1100 Series. Mise à part les pompes, ce système comporte également cinq colonnes, dont une précolonne de charge, trois colonnes de purification (C1, C2 et C3) et une colonne analytique C4. Les caractéristiques des colonnes sont les mêmes que celles décrites dans le chapitre précédent à la seule différence que la colonne C1 a été remplacée par une colonne Uptisphère 5 C8 provenant de Interchim (Montluçon, France). Les quatre colonnes de purification sont maintenues à une température constante de 35°C durant les analyses par le bain thermostaté. La vanne d'injection et les vannes de commutation sont également demeurées inchangées. Un pré-filtre de 4 mm d'épaisseur et 2 µm de porosité n° 28689 provenant de chez Alltech (Ontario, Canada) a été inséré à l'entrée de la phase mobile E1 au niveau de la vanne 1 pour éviter que des particules provenant de la colonne de charge ne viennent s'accumuler sur la colonne C1 et entraîner une augmentation de pression.

3.3.1. Les solutions utilisées

- Éluants E1 et E2 et solutions de lavage

- *Éluants E1 et E2*

Les éluants E1 et E2 désignent respectivement les phases mobiles qui alimentent la pompe 1 et la pompe 2 telles que décrites dans le chapitre précédent. Un volume de 500 mL de ces deux éluants est préparé chaque jour. Les proportions de MeOH et d'eau MilliQ de l'éluant E1 ont été modifiées pour s'adapter à la nouvelle colonne C1. Nous avons alors utilisé un éluant E1 contenant 60% de MeOH et 40% d'eau

MilliQ. Des solutions de 500 mL d'eau Milli Q et de MeOH ont été préparées dans deux flacons différents. Ces 2 solutions contenaient chacune 100 μ L d'acide ascorbique dans du méthanol (500 mg d'acide ascorbique dans 10 mL de MeOH) pour une concentration finale de 10 mg/L et 480 mg d'acide citrique pour une concentration finale de 0,96 g/L. Le mélange de ces deux solvants dans les proportions de 60% et 40% s'effectue au niveau de la pompe 1.

Les proportions de MeOH et d'eau MilliQ pour l'éluant E2 ont également été changées pour être respectivement de 90% et 10%. Des solutions de 500 mL de MeOH et d'eau MilliQ ont été également préparées séparément dans deux contenants distincts et le mélange dans les proportions de 90% et 10% est fait au niveau de la pompe 2. De l'acide citrique et ascorbique ont été ajoutés à ces deux solutions dans les mêmes proportions que pour l'éluant E1.

Tout comme dans le chapitre précédent, l'acide ascorbique est ajouté à chacune des phases mobiles juste avant leur emploi.

- Solutions de lavage

La composition des solutions de lavage demeure la même que celle utilisée lors de la validation de la méthode d'analyse dans le chapitre précédent.

3.3.2. Traitement des étalons pour l'élaboration de la courbe de calibration

De l'urine lyophilisée provenant de chez Bio-Rad (Mississauga, Ontario) est reconstituée avec un volume de 10 mL d'eau milliQ. La solution ainsi obtenue est diluée suivant un ratio de un sur deux (1/2) avec du tampon acétate de sodium à 0,1 M à un pH 5,0 suivi de l'ajout de l'enzyme β -glucuronidase/arylsulfatase à un volume de 5 μ L/mL d'urine pour obtenir une solution stock d'urine qui servira à la préparation des concentrations d'étalon pour l'élaboration de la courbe de calibration. À cette étape, nous avons retiré l'ajout du triton contrairement à ce qui a été fait lors de la validation de la méthode. Le triton a ainsi été retiré car nous avons constaté au cours d'une expérience avec triton et sans triton que cela ne changeait pas notablement la hauteur et le temps de sortie du pic de 3OHBaP. La solution stock d'urine est mise dans un bain chauffant à 37°C pour hydrolyse pendant toute une nuit. Nous avons procédé ainsi afin de pouvoir opérer dans les mêmes conditions que pour les échantillons d'urine de rat. Une solution concentrée de 3OHBaP (6 000 nmol/mL) dans du méthanol est ensuite préparée avec du 3OHBaP commercial. À partir de cette solution, une solution de travail de 3OHBaP à 10 pmol/mL dans du méthanol est préparée. La solution de travail ainsi obtenue est utilisée pour préparer les différentes concentrations (0,015; 0,031; 0,063; 0,125 et 0,250 pmol/mL) de la courbe de calibration dans la solution d'urine stock préparée au départ (tableau 4). Un volume de 2 mL est ensuite injecté dans le système de HPLC pour analyse.

Tableau 4. Préparation des concentrations de 3OHBaP nécessaires à l'élaboration de la courbe de calibration

Concentration (pmol/mL)	Solution de travail 10 pmol/mL (µL)	Volume de MeOH (µL)	Volume de diluant à étalon (µL)
0	0	240	2160
0,015	20 µL de 2,5 pmol/mL	300	2880
0,031	7,5	232,5	2160
0,063	15	225	2160
0,125	30	210	2160
0,250	60	180	2160

3.3.3. Traitement des échantillons d'urine de rat

Avant analyse, les échantillons d'urine sont sortis du congélateur et mis à décongeler à la température du laboratoire. Ils sont alors agités vigoureusement pour homogénéisation et ensuite leur volume est mesuré. Ils sont ensuite dilués suivant un ratio de un sur deux (1/2) avec la solution de tampon d'acétate de sodium suivi d'un ajout de la solution d'enzyme β -glucuronidase/arylsulfatase à raison de 5 µL/mL d'urine. L'ajout du triton est également retiré pour les mêmes raisons que celles énoncées précédemment. Le mélange ainsi obtenu est mis à hydrolyser toute une nuit à 37°C. Un volume de 2 mL de l'urine hydrolysée est ensuite injecté dans le système de HPLC pour analyse. Les injections sont faites avec une seringue en verre série 1000 Gastight model 1005 de 5 mL de chez Fisher Scientific (Ottawa, Canada) à laquelle est adaptée une aiguille métallique HUB 22 G/2" pointe 3. Un ensemble

seringue aiguille est utilisé pour les solutions de lavage et un autre est utilisé pour l'injection des échantillons.

3.3.4. Analyse des urines

Nous avons opéré dans les mêmes conditions pour la courbe de calibration et les échantillons d'urine collectés. Un contrôle positif (urine de rat exposé au BaP) est testé chaque jour ainsi qu'un point de la courbe de calibration. Les valeurs du contrôle positif sont enregistrées dans un fichier. La courbe de calibration est reprise lorsque la valeur obtenue pour le contrôle positif sort de l'intervalle « moyenne \pm 2 écart-types ». La programmation du système de HPLC a été modifiée (tableau 5).

3.3.4.1. Pré-injection

Avant les injections, la chambre du Reodyne® qui mène à la vanne d'injection est rincée avec 10 mL d'eau MilliQ à l'aide d'une seringue en plastique. Un volume de 1 mL d'eau MilliQ est ensuite injecté dans la colonne de charge à un débit de 1 mL par minute.

3.3.4.2. Injection

Après s'être assuré que le levier de la vanne d'injection est en position «charge», on injecte l'urine hydrolysée à un débit approximatif de 1 mL par minute. La seringue toujours maintenue dans la vanne d'injection, on actionne le levier dans la position « injection ». Après une attente de 1,4 minute, le levier est remis dans la position initiale et l'aiguille d'injection est retirée. Tout le reste du processus d'analyse est ensuite automatisé.

3.3.4.3. Post-injection

Après l'injection de l'urine hydrolysée, la colonne de charge ou précolonne est rincée avec 2 mL d'eau MilliQ, 2 mL de la solution de lavage d'hydroxyde d'ammonium et 2 mL de la solution de lavage d'acide citrique.

La seringue d'injection est également rincée de la même façon pour la préparer à l'injection suivante.

À la fin de chaque journée d'analyse, le port d'injection et la colonne de charge sont rincés avec 3 mL de MeOH et 3 mL d'eau MilliQ.

Tableau 5. Description des différentes étapes de la programmation des vannes de commutation et des évènements à chaque étape de la partie automatisée du processus analytique.

Temps (min)	Position des vannes			Évènement (s)
	Vanne 1	Vanne 2	Vanne 3	
0	1	2	1	Transfert et analyse sur C1 avec élimination des déchets par lavage (P1) avec C2 et C3 fermées.
9,30	1	1	1	Transfert de C1 à C2 ouvert sur C3 et analyse. Le lavage de C1 continue.
22,50	2	1	2	Transfert sur C4 alimentée par P1 (60 :40, MeOH :Eau). Lavage en mode rétrograde de C1 et C2.
31,50	1	1	1	Analyse sur C4 alimentée par P2 (90 :10, MeOH :Eau). Lavage en mode rétrograde de C2 et C3.

3.4. Calcul des résultats

- *Calcul de la concentration de 3OHBaP en pmol/mL de volume urinaire analysé*

Cette concentration est désignée par C_1 :

$C_1 = y/a * FD$ où « y » est la hauteur mesurée pour le pic de 3OHBaP ;

« a » est la pente de la courbe de calibration et « FD » le facteur de dilution de l'urine du rat par le tampon d'acétate de sodium. Bien que les échantillons d'urine collectés chez le rat aient été traités de la même façon que les concentrations de la courbe d'étalonnage, certains échantillons avaient une concentration trop élevée. Nous

avons donc procédé à une dilution de ces échantillons ce qui justifie l'emploi d'un facteur de dilution dans la présente formule.

- *Calcul de la quantité de 3OHBaP dans le volume total (V_T) uriné par le rat*

Cette quantité est désignée par Q :

$$Q = C_i * V_T$$

- *Calcul de l'excrétion E de 3OHBaP exprimée en pmol/heure*

$$E = Q/\Delta T \quad \text{où } \Delta T \text{ désigne la durée de la collecte.}$$

Nous avons également calculé la moyenne arithmétique de l'excrétion pour les quatre rats de chaque dose à chaque temps de collecte ainsi que l'écart-type et l'erreur-type autour de cette moyenne.

CHAPITRE QUATRIÈME

RÉSULTATS

4.1. Contrôle de qualité des mesures du 3OHBaP urinaire

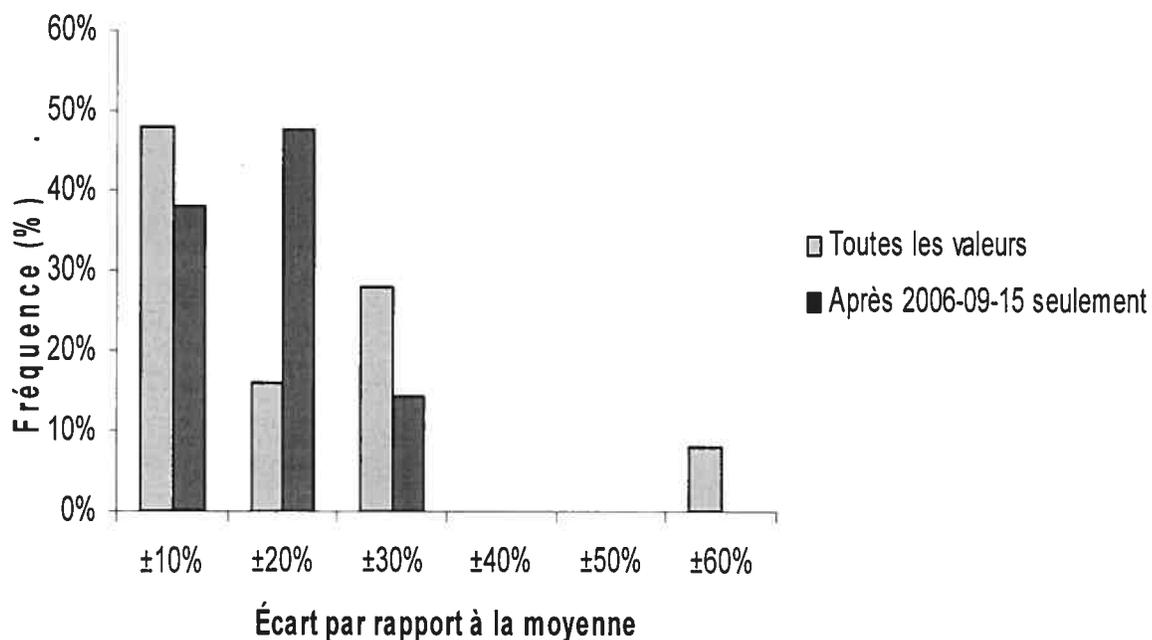
La figure 7 montre la distribution de la fréquence des valeurs de 3OHBaP obtenues pour l'analyse du contrôle positif durant toute la période d'analyse des échantillons d'urine collectés suivant différents écarts fixes autour de la valeur moyenne du contrôle positif. Cette figure présente d'une part, l'ensemble des valeurs obtenues pour le contrôle positif et d'autre part les valeurs du contrôle positif obtenues à partir du 15 septembre 2006 (2006-09-15).

Sur un total de 25 analyses de contrôle positif effectuées, seuls 4 ont été effectuées avant le 15 septembre 2006, les 21 analyses restantes ont été effectuées à partir de cette date. Les urines contrôles de 24 heures ont été analysées avant le 15 septembre 2006. Les échantillons d'urine collectés après l'exposition des rats aux différentes doses de BaP utilisées ont été analysés à partir de cette date du 15 septembre.

Nous constatons sur cette figure que sur l'ensemble des concentrations en 3OHBaP obtenues pour le contrôle positif, 92% se situent dans l'intervalle « moyenne \pm 30% ». Cependant lorsque nous considérons, les valeurs obtenues à partir du 15 septembre, cette proportion atteint 100%. On note donc une constance relative des différentes valeurs du contrôle positif pendant la période d'analyse des échantillons d'urines collectés après l'exposition des rats au BaP. La proportion de 8% de l'ensemble des valeurs obtenues pour le contrôle positif se situant dans l'intervalle moyenne \pm 60% qui représente une variation importante, serait donc reliée à la période des analyses des urines contrôles et non pas la période d'analyse dont les

valeurs ont été prises en compte dans l'établissement de la cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP.

Figure 7. Contrôle de qualité (CQ) pour les analyses de 3OHBaP.



La fréquence des concentrations en 3OHBaP en pourcentage du contrôle positif est portée sur l'axe des abscisses et les écarts par rapport à la valeur moyenne du contrôle positif sur l'axe des ordonnées.

4.2. Profil de la cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP

La figure 8 montre le profil temporel d'excrétion du 3OHBaP. Sur cette figure, on remarque trois points isolés qui sont les valeurs obtenues pour les différentes doses au

temps $T= 46$ heures. Lorsque nous incluons cette valeur dans les données on observe à ce niveau, un affaissement biologiquement inexplicable de toutes les courbes. Nous avons donc décidé de ne pas inclure cette valeur dans l'établissement des différents profils d'excrétion.

Pour la dose de $5 \mu\text{mol}$ de BaP/kg, on observe un maximum d'excrétion au temps $T= 12$ heures après l'exposition et un autre maximum d'excrétion au temps $T= 30$ heures. On observe un plateau qui s'étend de 4 à 10 heures après l'exposition et un second plateau de 30 à 54 heures après l'exposition. Ce dernier plateau est suivi d'une décroissance de l'excrétion jusqu'au temps 70 heures et une remontée de l'excrétion de 70 heures à 86 heures. À 96 heures après l'exposition, le 3OHBaP n'est plus détectable.

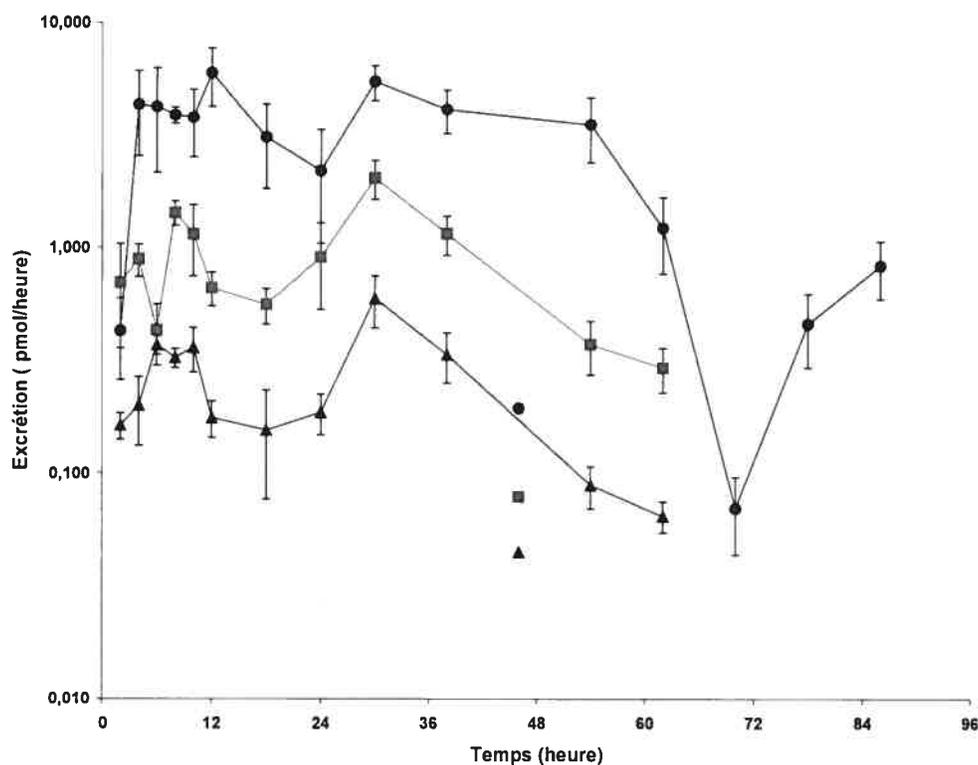


Figure 8. Cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP suite à l'exposition intraveineuse des rats Sprague-Dawley aux doses de 0,2 µmol de BaP/kg (▲) (n=4); 1 µmol de BaP/kg (■) (n=4) et 5 µmol/kg (●) (n=4). Les barres verticales désignent l'erreur-type autour de la moyenne.

Quant aux doses de 0,2 et 1 µmol de BaP/kg, elles présentent un profil d'excrétion similaire particulièrement de 12 à 62 heures après l'exposition. Les maximums d'excrétion pour la doses 0,2 µmol de BaP/kg se situent à T= 8 heures et T= 30 heures après l'exposition. Pour la dose de 1 µmol de BaP/kg, ces maximums se

situent à T= 10 heures et T= 30 heures. De la 30^{ème} heure jusqu'à la 62^{ème} heure après l'exposition, nous observons pour ces deux profils, une décroissance de l'excrétion du 3OHBaP. À partir de la 62^{ème} heure, le 3OHBaP n'était plus détectable pour ces deux doses. Pour la période 30 à 62 heures, les demi-vies calculées sont respectivement de 9,3 et 8,9 heures pour les doses de 0,2 et 1 µmol/kg.

4.3. Effet de la dilution des échantillons d'urine collectés sur la concentration de 3OHBaP mesurée

Les urines collectées ont été très diluées d'une part par la polydipsie des rats compte tenu de l'eau sucrée qui leur était accessible dans les cages et d'autre part au cours de la collecte par le rinçage des cages pour s'assurer que toute l'urine a été collectée. Aussi, compte tenu des doses utilisées qui sont assez faibles et du profil irrégulier obtenu pour chacune des doses utilisées, nous avons procédé à une expérience en ajoutant de l'urine contrôle positif à de l'eau suivant diverses proportions afin d'évaluer l'impact qu'a la proportion de matrice (urine) sur les concentrations de 3OHBaP obtenues lorsque les échantillons sont trop dilués. La concentration finale en 3OHBaP dans chacun de ces mélanges était de 0,11 pmol/mL avec 6 solutions injectées au total.

Nous avons constaté (figure 9) que lorsque la proportion d'urine est à 100% donc pas du tout d'eau dans l'échantillon, la hauteur du pic de 3OHBaP obtenu est plus élevée

que lorsque ce pourcentage diminue. Cependant, cette diminution n'est pas proportionnelle à la proportion d'urine présente dans le mélange analysé. Car, nous observons une remontée de la hauteur du pic de 3OHBaP lorsque la proportion d'urine diminue (10 à 0%) et que la proportion d'eau augmente (90 à 100%). La variabilité de la hauteur du pic de 3OHBaP n'est donc pas fonction de la proportion d'eau et n'est pas prévisible. Notons toutefois que tous ces échantillons ont été analysés le même jour. La variabilité de la hauteur du pic de 3OHBaP pourrait peut être s'accroître avec le temps, mais nous ne pouvons pas le certifier à partir de ces seuls résultats.

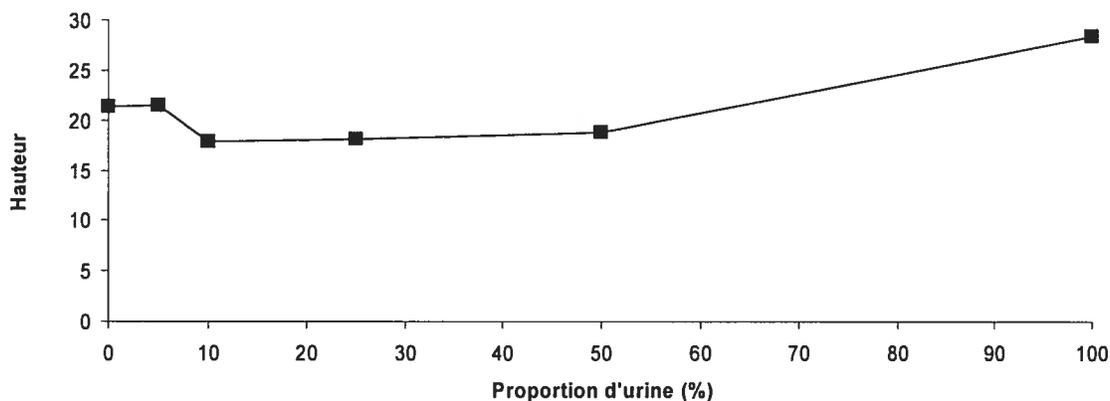


Figure 9. Courbe de variation de la hauteur du pic de 3OHBaP en fonction de la proportion d'urine. La valeur des hauteurs est portée sur l'axe des ordonnées tandis que la proportion d'urine dans l'échantillon analysé est portée sur l'axe des abscisses. (■) désigne les différentes valeurs obtenues pour la hauteur du pic de 3OHBaP.

4.4. Excrétion de 3OHBaP par pourcentage de dose injectée

Le tableau 7 présente l'excrétion cumulative de 3OHBaP par intervalle de temps de 24 h pendant toute la période de collecte et pendant la période au cours de laquelle le 3OHBaP était encore détectable pour toutes les trois doses, c'est-à-dire de 0 à 72 heures après l'exposition.

Jusqu'à 48 heures après l'exposition, on a observé une constance du pourcentage de 3OHBaP excrété pour toutes les doses utilisées. Ce pourcentage tourne autour de 0,01%. De 48 à 72 heures, ce pourcentage a diminué jusqu'à 0,003 %. Après 72 heures, il atteignait une valeur de 0,001% pour la dose de 5 μmol de BaP/kg, le 3OHBaP, n'étant plus détectable après 62 heures pour les autres doses. Il est à noter que la tranche horaire de 24 à 48 heures couvre en fait la période de 24 à 46 heures; la tranche horaire de 48h-72 heures couvre la période de 46 à 70 heures et la dernière de 70 à 96 heures.

Lorsque nous regardons ce même paramètre sur la période de 0 à 72 heures, on note que les rats exposés aux plus faibles doses excrètent plus de 3OHBaP par pourcentage de dose injectée que les rats exposés à une plus forte dose. La différence de moyenne de pourcentage d'excrétion de 3OHBaP par dose observée au niveau des différents groupes de rats est statistiquement significative ($p=0,002$).

Tableau 6. Excrétion cumulative de 3OHBaP par pourcentage de dose injectée et par intervalle de temps

Métabolite excreté Moyenne \pm écart-type (% de dose)	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Intervalle de temps (h)				
		0-24	24-48	48-72	72-96	0-72
3OHBaP	0,2	0,013	0,015	0,005	ND	0,029
		\pm	\pm	\pm		\pm
		0,002	0,007	0,003		0,014
	1	0,010	0,011	0,003	ND	0,019
		\pm	\pm	\pm		\pm
		0,004	0,002	0,001		0,008
	5	0,008	0,006	0,003	0,001	0,017
		\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
		0,002	0,001	0,002	0,002	0,001

h= heure

n= 4 par dose

ND= non détectable

CHAPITRE CINQUIÈME

DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1. Au sujet de l'implantation de la méthode de chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée

Ce travail présente en partie, l'implantation de la méthode de chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée dans notre laboratoire et la validation de la bonne maîtrise de cette méthode par l'analyse inter laboratoire d'échantillons d'urine contenant du 3OHBaP. Nous avons également utilisé cette méthode d'analyse mise au point par Simon *et al.* (2000) pour la mesure du 3OHBaP dans les urines de rats exposés à de faibles doses aiguës de BaP pour l'établissement de la cinétique d'excrétion urinaire du 3OHBaP.

La plupart des recherches mettent l'accent sur le pyrène et sur son métabolite le 1OHP compte tenu du fait qu'il est excrété en concentrations plus fortes que le 3OHBaP donc plus facilement mesurable. À titre d'exemple, on a estimé que le 1OHP était excrété en quantités environ de 100 à 1 000 fois plus importantes que le 3OHBaP dans diverses populations de travailleurs (Gendre *et al.* 2002). Mais cela ne devrait plus être un obstacle puisque avec la technique de chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée, il est maintenant possible de mesurer de faibles concentrations de 3OHBaP.

Lorsqu'on compare cette nouvelle méthode à d'autres méthodes de HPLC, elle semble plus avantageuse sur plusieurs points. Ainsi, une intéressante méthode de chromatographie liquide avec une succession de colonnes, entièrement automatisée a été développée par Boos *et al.* (1992) et améliorée par Lintelmann *et al.* (1994) pour

la mesure de faibles concentrations des métabolites des HAP. Cette méthode nécessite l'emploi d'une précolonne taillée sur mesure très coûteuse. Les pompes fonctionnent en mode gradient pour l'analyse des échantillons, ce qui nécessite un surplus de programmation. Gundel et Angerer (2000) ont utilisé cette méthode pour la mesure de concentrations urinaires de 3OHBaP chez des travailleurs dans une usine de production de matériaux ignifuges avec une limite de détection de 6 ng/L. Cette limite de détection n'est pas assez basse pour la surveillance biologique de l'exposition environnementale à de faibles doses de HAP. Aussi, mis à part le coût élevé de la précolonne, il est nécessaire de procéder à une extraction solide-liquide des échantillons ce qui est contraignant et rallonge le temps des analyses.

Pour la chromatographie liquide multidimensionnelle séquencée, le fonctionnement des pompes en mode isocratique est plus pratique et n'implique pas une programmation supplémentaire. La précolonne utilisée avec la phase interne, Bondésil C1, dont elle est garnie permet de concentrer l'urine hydrolysée en moins de 2 min. Le Bondésil C1 n'est pas coûteux et la garniture de la précolonne peut être faite par soi-même. Cette injection directe de l'hydrolysate urinaire dans le système chromatographique permet également d'éviter l'extraction solide-liquide qui est souvent préalable aux analyses de ces métabolites.

L'hydrolyse de nuit des échantillons d'urine a permis d'assurer une hydrolyse complète de tout le 3OHBaP conjugué et a été moins contraignante pour l'analyse des échantillons d'urine collectés. Certaines études préconisent qu'une heure d'hydrolyse est largement suffisante. Cependant, des échantillons d'urine collectés après une

exposition aiguë de 400 μmol de BaP/kg et incubés avec 12,5 μL de β -glucuronidase/arylsulfatase dans un bain à remous à 37°C pendant 2, 4, 6, 8, 16, 24 et 48 heures ont été analysés et aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre les moyennes des valeurs obtenues pour cette différentes périodes d'hydrolyse (Bouchard et Viau 1997).

Bien que nous n'ayons pas pu améliorer la limite de détection depuis l'implantation de la méthode d'analyse, nous avons pu apporter des modifications notables à la programmation des vannes. Cette nouvelle programmation permet un rinçage plus long des colonnes de purification aussi bien par la phase mobile 1 que par la phase mobile 2. Ceci a permis d'obtenir des chromatogrammes plus nets. Des différences notamment au niveau de la longueur de la colonne analytique utilisée et du détecteur (Shimadzu à l'INRS et Agilent pour nous) pourraient expliquer le fait que nos deux laboratoires n'aient pas la même limite de détection. Nous avons eu pour 2 mL d'urine hydrolysée injectée une limite de détection de l'ordre de 2 ng/L. Cependant, nous avons pu obtenir une concordance de 80% entre les valeurs trouvées pour les concentrations de 3OHBaP par notre laboratoire et celui de l'INRS.

L'utilisation d'acide ascorbique à 10 mg/L s'est justifiée par le fait qu'à une concentration de départ de 5 mg/L, les pics de 3OHBaP que nous avons obtenus pour un même échantillon d'urine injecté plusieurs fois le même jour perdait de la hauteur et de la surface. Mais à la concentration de 10 mg/L, la hauteur et la surface des pics de 3OHBaP pour un même échantillon sont demeurés presque constants plusieurs jours successifs (résultats non présentés dans ce document).

En somme, il s'agit d'une méthode d'analyse complexe, sensible et susceptible d'être modifiée ou d'y inclure des composants pour parfaire les analyses. Nous, nous avons opté pour une injection manuelle mais il est possible de lui adapter un injecteur automatique qui permettrait une standardisation de l'injection des échantillons et une diminution des différences techniques liées aux manipulateurs.

5.2. Au sujet de la cinétique d'excrétion à faibles doses du 3-hydroxybenzo(a)pyrène

La cinétique d'excrétion à faibles doses des métabolites urinaires du BaP est très peu étudiée (Boos *et al.* 1992; Gundel et Angerer 2000; Simon *et al.* 2000) et encore moins l'utilisation courante de méthodes analytiques assez sensibles pour être susceptibles de mesurer les faibles concentrations retrouvées dans le milieu environnemental.

Bien que bon nombre de métabolites urinaires du BaP soient facilement mesurables chez les rongeurs (Likhachev *et al.* 1992; van de Wiel *et al.* 1993), le métabolite urinaire majeur du BaP, le 3OHBaP se retrouve à de faibles doses chez les travailleurs (Ariese *et al.* 1994). De plus, il est à déplorer le manque d'études sur l'exposition à de faibles doses de BaP chez l'animal.

Cette étude a été initiée pour comprendre la cinétique d'excrétion à faibles doses du 3OHBaP en utilisant une méthode pratique et peu coûteuse afin de pouvoir

documenter cet aspect non encore bien connu du 3OHBaP. Ainsi, on pourra mesurer des concentrations aussi faibles que celles qui sont retrouvées en milieu environnemental et faire une surveillance biologique efficace de l'exposition aux HAP par le biais du BaP qui est un composé cancérigène. Une autre raison d'être de cette étude a été de voir s'il y a une différence entre les profils cinétiques d'excrétion urinaire du 3OHBaP suite à une exposition aiguë à de faibles doses de BaP et ceux qui ont été obtenus dans d'autres études suite à une exposition aiguë à de fortes doses de BaP.

Les doses que nous avons choisies n'ont pas encore été utilisées auparavant pour l'établissement de la cinétique d'excrétion du 3OHBaP. La plupart des doses couramment utilisées dans les études animales sont de l'ordre de 793 μmol de BaP/kg (Likhachev *et al.* 1992), 60, 40, 20 μmol de BaP/kg, 6 et 2 μmol /kg pour les plus faibles doses (Bouchard et Viau 1997; Tyndyk *et al.* 1994). Nous avons alors décidé d'utiliser de faibles doses car cela n'avait pas encore été fait et aussi compte tenu du fait qu'il a été observé qu'à des doses de 5 μmol de BaP/kg et plus, le BaP semblait produire une induction enzymatique qui pourrait modifier le rendement d'excrétion du 3OHBaP (Bouchard *et al.* 1998). Nous avons donc voulu voir l'allure des profils obtenus à des doses qui ne causaient pas une telle induction.

Les profils obtenus pour les différentes doses injectées semblent surprenants lorsque nous les comparons aux profils obtenus à plus fortes doses d'exposition dans des études antérieures. Nous avons observé au temps 46 heures après l'exposition une baisse marquée de l'excrétion pour les 3 doses utilisées. Nous n'arrivons pas à

expliquer la baisse importante observée pour les concentrations au temps 46 heures, surtout qu'il s'observe de la même manière pour ces trois doses. Nous ne saurions dans ce cas attribuer ce fait à une erreur d'analyse, vu que tous les échantillons ont été traités de la même façon et que même après ré-analyse des échantillons cette baisse n'a pas été corrigée. Cela sera un phénomène à investiguer ultérieurement, car vu les profils obtenus dans d'autres études, cela semble sortir de l'ordinaire.

De plus, les pourcentages de dose excrétée de 0 à 72 heures pour les trois différentes doses utilisées varient de 0,017 à 0,029% ce qui est nettement inférieur aux valeurs couramment observées dans d'autres études. Ainsi en comparaison à une étude réalisée suite à une exposition intraveineuse avec des doses de 2 et 6 μmol de BaP/kg, les pourcentages de dose excrétée variaient de 0,058 à 0,085% (Bouchard et Viau 1997). Cependant dans cette même étude, les pourcentages d'excrétion observés pour les faibles doses de 0,2 et 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ sont plus élevés que celui obtenu pour la dose plus forte qui dans notre étude est de 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$.

Aussi, il ne semble pas y avoir eu d'induction enzymatique à la dose de 5 μmol de BaP/kg puisque nos résultats suggèrent un faible rendement d'excrétion à 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (0,017%) par rapport à la dose de 0,2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (0,029%).

Ces différents constats pourraient être dus au fait qu'à de faibles doses, il a été observé que le 3OHBaP est instable dans l'urine et que cette instabilité peut conduire à une perte de 20 à 100% après un certain temps de conservation (Simon, P. communication personnelle).

En injectant différents échantillons d'urine contrôle positif contenant différentes proportions de matrice (urine) et d'eau Milli Q au cours d'une même journée (figure 9) nous avons constaté une certaine variation de la hauteur des pics de 3OHBaP. Cependant, cette variation n'était pas proportionnelle à la quantité de matrice. Ce qui ne nous permet pas de conclure systématiquement que plus un échantillon d'urine est dilué plus il y a une instabilité du 3OHBaP. Toutefois cette instabilité pourrait se révéler si le même échantillon est conservé trop longtemps avant d'être analysé. Ce qui est le cas de nos échantillons d'urines qui ont été conservés une certaine période de temps avant d'être analysés. De plus certains échantillons ont été conservés plus longtemps que d'autres puisqu'il n'était possible de tous les analyser en un court laps de temps.

Sur les différents profils obtenus, on constate une augmentation rapide de l'excrétion avant les 10 heures suivant l'exposition suivie d'une période de plafonnement de l'excrétion. Quant aux excrétions élevées retardées observées se traduisant par une remontée de la courbe d'excrétion au temps 30 heures, elles pourraient s'expliquer par une accumulation du BaP lui-même et éventuellement de 3OHBaP dans les tissus de stockage, qui serait libéré progressivement par la suite. Withey *et al.* (1993; 1992) ont rapporté que le pyrène et des métabolites du BaP se sont accumulés dans divers tissus de l'organisme après une administration soit de pyrène radioactif ou de BaP radioactif à des rats en calculant la différence entre la mesure de la radioactivité totale dans les tissus et la mesure spécifique des composés parents par HPLC.

Pour les doses de 1 et de 0,2 μmol de BaP/kg, le 3OHBaP n'était plus détectable à partir de la 70^{ème} heure après l'exposition. Dans le cas de la dose de 5 μmol de BaP/kg, le 3OHBaP était détectable jusqu'à la 86^{ème} heure après l'exposition, à la 96^{ème} heure le 3OHBaP n'était plus détectable. Pour les faibles doses de 0,2 et 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ nous avons obtenu respectivement des demi-vies de 9,3 et 8,9 heures. Pour une dose de 40 μmol de BaP/kg par exposition intraveineuse à des rats Sprague-Dawley, Bouchard et Viau (1996) ont obtenu une demi-vie de 8,1 heures ce qui est comparables aux demi-vies que nous avons obtenus pour des doses plus faibles.

En conclusion, il apparaît que les profils cinétiques d'excrétion du 3OHBaP obtenus dans cette étude pour les faibles doses d'exposition de BaP utilisées ne pourraient être exploitables tels quels et qu'ils doivent donc être mieux documentés afin de pouvoir s'en servir pour la surveillance biologique de l'exposition à de faibles doses de HAP et pour l'établissement d'un indice biologique de référence pour le 3OHBaP. Il est à noter que pour la méthode d'analyse utilisée, nous n'avons pas un profil cinétique d'excrétion à de faibles doses d'exposition du BaP en guise de référence. Cependant les données obtenues dans cette étude pourront servir de piste pour d'autres études ultérieures.

BIBLIOGRAPHIE

Akin, F. J., Snook, M. E. et Severson, R. E. (1976). Identification of polynuclear aromatic hydrocarbons in cigarette smoke and their importance as tumorigens. *Journal of the National Cancer Institute* **57**, 191-195.

Anselstetter, V. et Heimpel, H. (1986). Acute hematotoxicity of oral benzo(a)pyrene: the role of the Ah locus. *Acta Haematologica Basel* **76**.

Ariese, F., Verkaik, M., Hoornweg, G. P., van de Nesse, R. J. et Jukema, S. R. (1994). Trace analysis of 3-hydroxy benzo[a]pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Analytical Toxicology* **18**, 195-204.

Armstrong, B. G., Tremblay, C., Baris, D. et Thériault, G. P. (1994). Lung cancer mortality and polynuclear aromatic hydrocarbons: a case-cohort of aluminum production workers in Arvida, Quebec, Canada. *American Journal of Epidemiology* **139**, 250-262.

ATSDR (1990). Toxicological profile for benzo(a)pyrene. U.S. Environmental Protection Agency (EPA).

ATSDR (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (P. H. S. Atlanta. U.S. Department of Health and Human Services, ed. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).

Boos, K. S., Lintelmann, J. et Kettrup, A. (1992). Coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the determination of 1-hydroxypyrene in urine of subjects exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography* **600**, 189-94.

Borská, L., Fiala, Z., Krejsek, J., Hamáková, K., Andrýs, C., Šmejkalova, J., Vokurková, D. et Kremláček, J. (2006). Cytogenetic and immunological changes after dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UV radiation. *Physiological Research* **55**, 317-323.

Bouchard, M. et Viau, C. (1995). Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxybenzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rat subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Archives of Toxicology* **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. *Toxicology and Applied Pharmacology* **139**, 301-309.

Bouchard, M. et Viau, C. (1997). Urinary excretion of benzo(a)pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo(a)pyrene administration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **75**, 185-192.

Bouchard, M., Krishnan, K. et Viau, C. (1998). Kinetics of tissue distribution and elimination of pyrene and 1-hydroxypyrene following intravenous administration of [¹⁴C]Pyrene in rats. *Toxicological Sciences* **46**, 11-20.

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

Bouchard, M., Thuot, R., Carrier, G. et Viau, C. (2002). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* **65**, 101-115.

Butler, J. P., Post, G. B., Liroy, P. J. et Waldman, J. M. (1993). Assessment of carcinogenic risk from personal exposure to benzo[a]pyrene. *Journal of the Air and Waste Management Association* **43**, 970-977.

Campo, L., Addario, L., Buratti, M., Scibetta, L., Longhi, O., Valla, C., Cirila, P. E., Martinotti, I., Foa, V. et Fustinoni, S. (2006). Biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons by determination of unmetabolized compounds in urine. *Toxicology Letters* **162**, 132-138.

Denissenko, M. F., Cahill, J., Koudriakova, T. B., Gerber, N. et Pfeider, G. P. (1999). Quantification and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxing B1-8,9-epoxide and microsoal activation systems. *Mutation Research* **425**, 205-211.

Dennis, M. J., Massey, R. C., Cripps, G., Venn, I., Howarth, N. et Lee, G. (1991). Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Additives and Contaminants* **8**, 517-530.

Desbiens, I. (2004). Caractérisation et distribution des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) particulaires et dissous dans le Saguenay (Québec, Canada), Vol. M.Sc., p. 139. Université du Quebec à Rimouski, Rimouski.

Environnement Canada (1994). Hydrocarbures aromatiques polycycliques. In Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation, pp. 1-76. Environnement Canada-Santé Canada, Ottawa.

EPA (1990). Toxicological profile for benzo[a]pyrene (O. R. N. Laboratory, ed., p. 125. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR).

EPA (1994). Benzo(a)pyrene- B2, probable human cancirnogen. In IRIS Database. United States Environmental Protection Agency.

EPA (1999). Great lakes binational toxics strategy benzo(a)pyrene and hexachlorobenzene. In Draft Report for Benzo(a)pyrene (B(a)P): Sources and Regulations - Analytical Process Reports, pp. 1-30. United States Environmental Protection Agency.

Falahatpisheh, M. H., Donnelly, K. C. et Ramos, K. S. (2001). Antagonistic interactions among nephrotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **62**, 543-60.

Gendre, C., Lafontaine, M., Morele, Y., Payan, J. P. et Simon, P. (2002). Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds* **22**, 761-769.

Gendre, C., Lafontaine, M., Delsaut, P. et Simon, P. (2004). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene: assessment of an appropriate sampling time. *Polycyclic Aromatic Compounds* **24**, 433-439.

Germain, A. (1997). Hydrocarbures aromatiques polycycliques- État de la situation au Québec de 1989 à 1994. Environnement Canada, Montréal.

Gomes, M. et Santella, R. M. (1990). Immunologic methods for detection of Benzo(a)pyrene metabolites in urine. *Chemical Research in Toxicology* **3**, 307-310.

Gouvernement du Québec (2001). Règlement sur la santé et la sécurité du travail. Dans " Loi sur la santé et la sécurité du travail".

Gundel, J. et Angerer, J. (2000). High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenz[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* **738**, 47-55.

Harrigan, J. A., McGarrigle, B., Sutter, T. R. et Olson, J. R. (2006). Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicology in Vitro* **20**, 426-438.

IARC (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. In Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemical to humans (IARC, ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

IARC (1998). Polynuclear aromatic compound, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. In Volume 32, pp. 1-55. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

IARC (2006). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In Summary of Data Reported and Evaluation. pp. 1-18. International Agency for Research in Cancer, Lyon.

INRS (1997). Benzo[a]pyrène. In Cahiers de notes documentaires-Hygiène et sécurité du travail, pp. 1-6. Institut National de Recherche et de Sécurité, Paris.

Jongeneelen, F. J., Bos, R. P., Anzion, R. B., Theuws, J. L. et Henderson, P. T. (1986). Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Metabolites in urine. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* **12**, 137-143.

Jongeneelen, F. J., Anzion, R. B. M. et Henderson, P. T. (1987). Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of Chromatography* **413**, 227-232.

Jongeneelen, F. J. (1994). Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene in urine of people. *Toxicology Letters* **72**, 205-211.

Journal Officiel de la Communauté Européenne (2004). Commission directive 2004/73/EC, 29th time Council directive 67/548EEC.

Kao, J., Patterson, F. K. et Hall, J. (1985). Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicology and Applied Pharmacology* **81**, 502-516.

Kim, J. H., Stansbury, K. H., Walker, N. J., Trush, M. A., Strickland, P. T. et Sutter, T. R. (1998). Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* **19**, 1847-1853.

Knopp, D., Schedl, M., Achatz, S., Kettrup, A. et Niessner, R. (1999). Immunochemical test to monitor human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: urine as sample source. *Analytica Chimica Acta* **399**, 115-126.

Lafontaine, M., Gendre, C., Delsaut, P. et Simon, P. (2004). Urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limit value. *Polycyclic Aromatic Compounds* **24**, 441-450.

Lafontaine, M., Champmartin, C., Simon, P., Delsaut, P. et Funck-Brentano, C. (2006). 3-hydroxybenzo(a)pyrene in the urine of smokers and non-smokers. *Toxicology Letters* **162**, 181-185.

Lee, H. K. (2001). Modern techniques for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. In Handbook of analytical separations. Environmental analysis (W. Kleiböhmer, ed., Vol. 3, pp. 39-52. Elsevier Science, Germany.

Levin, W., Wood, A., Chang, R., Ryan, D., Thomas, P., Yagi, H., Thakker, D., Vyas, K., Boyd, C., Chu, S.-Y., Conney, A. et Jerina, D. (1982). Oxidative metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons to ultimate carcinogens. *Drug Metabolism Reviews* **13**, 555-580.

Likhachev, A. J., Beniashvili, D. S., Bykov, V. J., Dikun, P. P., Tyndyk, M. L., Savochkina, I. V., Yermilov, V. B. et Zabezhinski, M. A. (1992). Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic agents-excretion and carcinogenic risk of benzo(A)pyrene metabolites. *Environmental Health Perspective* **98**, 211-214.

Lindstedt, G. et Sollenberg, J. (1982). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the occupational environment. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* **8**.

Lintelmann, J., Hellemann, C. et Kettrup, A. (1994). Coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the determination of four metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons, 1-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene and 1-hydroxypyrene, in urine. *Journal of Chromatography B, Biomedical Applications* **660**, 67-73.

Loening, K., Meritt, J., Later, D. et Wright, W. (1990). *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Nomenclature Guide*. Battelle Press.

Lutz, S., Feidt, C., Monteau, F., Rychen, G., Le Bizec, B. et Jurjanz, S. (2006). Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 263-268.

McElroy, A. E., Farrington, J. W. et Teal, J. M. (1989). *Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press
Boca Raton, FL.

Musafia-Jeknic, T., Mahadevan, B., Pereira, C. et Baird, W. M. (2005). Long-term effects of a standardized complex mixture of urban dust particulate on the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human cells in culture. *Toxicological Sciences* **88**, 358-66.

National Research Council (1983). *Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of sources and effects* (N. A. Press, ed., Washington, D.C.

Phillips, D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research* **443**, 139-147.

Pichard, A. (2006). Benzo[a]pyrene. In Fiche de tonnée toxicologiques et environnementales des substances chimiques (INERIS, ed., pp. 1-44. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques Paris.

Ramesh, A., Greenwood, M., Inyang, F. et Hood, D. B. (2001). Toxicokinetics of inhaled benzo[a]pyrene: plasma and lung bioavailability. *Inhalation Toxicology* **13**, 533-555.

Santé Canada (1996). Concentrations/doses journalières admissibles et concentrations/doses tumorigènes des substances d'intérêt prioritaire calculées en fonction de critères sanitaires.

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

Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P. et Sutter, T. R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Research* **56**, 2979-2982.

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

Spinelli, J. J., Demers, P. A., Le, N. D., Friesen, M. D., Lorenzi, M. F., Fang, R. et Gallagher, R. P. (2006). Cancer risk in aluminum reduction plant workers (Canada). *Cancer Causes Control* **17**, 939-948.

Sugihara, N. et James, M. O. (2003). Binding of 3-hydroxybenzo(a)pyrene to Bovine Hemoglobin and Albumin. *Journal Biochem Molecular Toxicology* **17**, 239-247.

Sutter, T. R. et Greenlee, W. F. (1992). Classification of members of the Ah gene battery. *Chemosphere* **25**, 223-226.

Thériault, G. P., Tremblay, C. et Armstrong, B. G. (1990). Bladder cancer screening among primary aluminium production workers in Quebec. *Journal of Occupational Medicine* **32**, 869-872.

Thyssen, J., Althoff, J., Kimmerle, G. et Mohr, U. (1981). Inhalation studies with benzo[a]pyrene in Syrian golden hamsters. *Journal of the National Cancer Institute* **66**, 575-577.

Tremblay, C., Armstrong, B., Thériault, G. et Brodeur, J. (1994). Cancer following exposure to a complex mixture of mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): risk estimation from epidemiological and toxicological data.

Tremblay, C., Armstrong, B., Thériault, G. et Brodeur, J. (1995). Estimation of risk of developing bladder cancer among workers exposed to coal tar pitch volatiles in the primary aluminum industry. *American Journal of Industrial Medicine* **27**, 335-348.

Tremblay, C., Bouchard, M., Gagnon, F., Cartier, J.-F., Bégin, P., Larouche, L. et Dionne, L. (2000). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques: exposition et risques dans la population générale. Dans "Bulletin d'information en santé environnementale", Vol. 11, pp. 1-12.

Tyndyk, M. L., Zabezhinski, M. A., Bykov, V. J., Dikun, P. P., Dymochka, L. A., Nepomnyaschaya, O. B., Yatsuk, O. S., Yermilov, V. B. et Likhachev, A. J. (1994). Individual values of excretion of benzo[a]pyrene metabolites and susceptibility to its carcinogenic effect in rats. *Cancer Letters* **78**, 163-170.

Unwin, J., Cocker, J., Scobbie, E. et Chambers, H. (2006). An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Annals of Occupational Hygiene* **50**, 395-403.

van de Wiel, J. A. G., Fijneman, P. H. S., Duijf, C. M. P., Anzion, R. B. M., Theuws, J. L. G. et Bos, R. P. (1993). Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and feces of rats-influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicology* **80**, 103-115.

van Schooten, F. J., Moonen, E. J. C., van der Wal, L., Levels, P. et Kleinjans, J. C. S. (1997). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces, and urines of rats orally exposed to PAH contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **33**, 317-322.

WHO (2000). Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). In : air quality guidelines for Europe, pp. 1-24. World Health Organisation Regional Office for Europe, Copenhagen.

WHO (2003). Guidelines for drinking-water quality. In Vol 3, pp. 1-32. World Health Organisation, Geneva.

WHO (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons. In Vol 92. World Health Organisation.

Withey, J. R., Shedden, J., Law, F. P. et Abedini, S. (1992). Distribution to the fetus and major organs of the rat following inhalation exposure to pyrene. *Journal of Applied Toxicology* **12**, 223-31.

Withey, J. R., Shedden, J., Law, F. C. et Abedini, S. (1993). Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *Journal of Applied Toxicology* **13**, 193-202.

Zedeck, M. S. (1980). Polycyclic aromatic hydrocarbons a review. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* **3**, 537-567.

Zienolddiny, S., Ryberg, D., Svendsrud, D. H., Eilertsen, E., Skaug, V., Hwer, A., Phillips, D. H., te Riele, H. et Haugen, A. (2006). Msh2 deficiency increases susceptibility to benzo[a]pyrene-induced lymphomagenesis. *International Journal of Cancer* **118**, 2899-2902.