



Université de Montréal

**Caractérisation de la toxicocinétique de l'octylphénol  
chez le rat en vue d'une meilleure analyse de risque  
toxicologique des perturbateurs endocriniens**

par

Geneviève Hamelin

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Santé publique  
option Toxicologie de l'environnement

Avril, 2009

© Geneviève Hamelin, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de la toxicocinétique de l'octylphénol chez le rat en vue d'une meilleure  
analyse de risque toxicologique des perturbateurs endocriniens

présentée par :

Geneviève Hamelin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Joseph Zayed, Ph.D., président-rapporteur

Robert Tardif, Ph.D., directeur de recherche

Kannan Krishnan, Ph.D., co-directeur

Marc Baril, Ph.D., membre du jury

Pierre Ayotte, Ph.D., examinateur externe

Claude Viau, Ph.D., représentant du doyen de la FESP

## Résumé

Le *p-tert*-octylphénol est un produit présent dans l'environnement et issu de la dégradation des alkylphénols éthoxylés. Ce composé a la capacité de se lier au récepteur œstrogénique et d'exercer ainsi un léger effet œstrogénique. Les objectifs de cette étude étaient de 1) développer une méthode d'identification de l'octylphénol dans le sang et les tissus à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse jumelée à la spectrométrie de masse, 2) caractériser la toxicocinétique sanguine et tissulaire de l'octylphénol chez le rat Sprague-Dawley mâle et femelle et 3) développer un modèle toxicocinétique à base physiologique permettant de décrire la cinétique sanguine et tissulaire de l'octylphénol inchangé. Pour ce faire, des rats mâle et femelle Sprague-Dawley ont reçu des doses uniques d'octylphénol par les voies intraveineuse, orale et sous-cutanée. Deux autres groupes ont reçu des doses répétées d'octylphénol par voie orale pour une durée de 35 jours consécutifs pour les femelles ou 60 jours pour les mâles. Les concentrations sanguines et tissulaires d'octylphénol ont été mesurées à différents moments après administration à partir d'une méthode d'analyse développée dans nos laboratoires dans le cadre de ce projet. Les expériences impliquant des administrations uniques ont montré que les concentrations sanguines et tissulaires d'octylphénol étaient en général plus élevées chez les femelles que chez les mâles. Des expériences réalisées avec des microsomes hépatiques ont confirmé que ces différences étaient vraisemblablement liées au métabolisme de l'octylphénol. Les expériences impliquant des administrations répétées ont montré qu'il n'y avait pas d'accumulation d'octylphénol dans l'organisme aux doses étudiées. Les résultats obtenus expérimentalement ont servi à développer et valider un modèle toxicocinétique à base physiologique. Ce modèle a permis de simuler adéquatement les concentrations sanguines et tissulaires d'octylphénol suite à des expositions intraveineuses, orales et sous-cutanées. En conclusion, cette étude a fourni des données essentielles sur la toxicocinétique de l'octylphénol. Ces données sont nécessaires pour établir la relation entre la dose externe et la dose interne et vont contribuer à une meilleure évaluation des risques liés à l'octylphénol.

**Mots-clés:** toxicologie, perturbateurs endocriniens, *p-tert*-octylphénol, méthode analytique, toxicocinétique, modèle toxicocinétique, rats Sprague-Dawley

## Abstract

*p-tert*-Octylphenol is a degradation product of alkylphenol ethoxylates that can be found in the environment. It has been reported to act as a weak estrogenic compound by binding to the estrogen receptor. This study was undertaken to 1) develop a sensitive method for the determination of octylphenol in blood and various tissues using gas chromatography coupled with detection by mass spectrometry, 2) characterize the blood and tissues toxicokinetics of octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats and 3) develop a physiologically-based toxicokinetic model for octylphenol that can describe/predict unchanged blood and tissues octylphenol concentrations in rats. Male and female Sprague-Dawley rats were given a single dose of octylphenol either by oral gavage, intravenous injection or subcutaneous injection. In a repeated dosing experiment, rats were given octylphenol (oral) daily for 35 days (female) or 60 days (male). Blood and tissue samples were collected at various time following the onset of exposure and analyzed for octylphenol content using a method developed in our laboratory. These results showed that blood and tissues octylphenol concentrations were generally higher in female than male rats. Experiments done with rat liver microsomes confirmed that these differences were related to octylphenol metabolism. The results of the repeated exposure study indicate that there is no bioaccumulation of octylphenol at these exposure levels. A physiologically-based pharmacokinetic model for octylphenol was developed and validated using the data obtained in female and male rats. The model simulates adequately blood and tissues octylphenol concentrations following oral, intravenous or subcutaneous exposure. In conclusion, this study provided essential data on the toxicokinetics of octylphenol. These data are essential to predict the relationship between the internal and the external dose of octylphenol and will facilitate the risk assessment of octylphenol in humans.

**Keywords:** toxicology, endocrine disruptor, *p-tert*-octylphenol, analytical method, toxicokinetic, toxicokinetic modeling, Sprague-Dawley rats

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xix
1. Chapitre premier : Introduction générale.....	1
1.1. Principaux mécanismes impliqués dans la toxicologie de la reproduction.....	2
1.1.1. Mécanismes impliqués dans la toxicologie de la reproduction chez le mâle.....	4
1.1.2. Mécanismes impliqués dans la toxicologie de la reproduction chez la femelle.....	5
1.2. Les perturbateurs endocriniens.....	7
1.2.1. Le système endocrinien.....	7
1.2.2. Les œstrogènes.....	8
1.2.3. Les perturbateurs endocriniens.....	9
1.2.4. Utilité de la toxicocinétique dans l'étude des perturbateurs endocriniens....	11
2. Chapitre deuxième: L'octylphénol.....	13
2.1. Caractéristiques.....	14
2.1.1. Propriétés physico-chimiques.....	14
2.2. Sources d'exposition.....	16
2.2.1. Sources et utilisation.....	16
2.2.2. Niveaux retrouvés dans l'environnement.....	17
2.3. Exposition.....	19
2.3.1. Exposition chez les consommateurs.....	19
2.3.2. Exposition chez les travailleurs.....	19
2.3.3. Méthode de mesure de l'octylphénol dans les milieux biologiques.....	20

2.3.4.	Niveaux retrouvés dans les milieux biologiques.....	22
2.4.	Effets toxiques.....	23
2.4.1.	Mécanisme de toxicité .....	23
2.4.2.	Toxicité aiguë.....	24
2.4.3.	Toxicité chronique .....	25
2.4.4.	Reprotoxicité et toxicité néonatale.....	26
2.5.	Réglementations.....	28
3.	Chapitre troisième: La toxicocinétique de l'octylphénol.....	29
3.1.	Absorption.....	30
3.2.	Distribution .....	31
3.3.	Métabolisme.....	32
3.4.	Excrétion .....	35
4.	Chapitre quatrième : Objectifs du projet de recherche et démarche expérimentale .....	37
4.5.	Objectifs .....	38
4.5.1.	Objectif général.....	38
4.5.2.	Objectifs spécifiques .....	39
4.6.	Démarche expérimentale.....	39
4.6.1.	Scénario d'exposition .....	40
4.6.2.	Mesure de l'octylphénol dans le sang et les tissus .....	41
4.6.3.	Étude du métabolisme de l'octylphénol .....	42
4.7.	Modélisation toxicocinétique à base physiologique .....	43
5.	Chapitre cinquième : Présentation des articles.....	45
6.	Chapitre sixième: Determination of <i>p-tert</i> -octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry.....	47
7.	Chapitre septième: Toxicokinetics of <i>p-tert</i> -octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral or subcutaneous exposures.....	72

8. Chapitre huitième: Physiologically-based modeling of <i>p-tert</i> -octylphenol kinetics following intravenous, oral or subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats .....	107
9. Chapitre neuvième : Résultats non publiés .....	152
9.1. Comparaison du profil des concentrations sanguines d'octylphénol chez deux souches de rat .....	153
9.2. Glucuronidation de l'octylphénol .....	154
9.3. Caractérisation de la liaison de l'octylphénol aux protéines.....	156
10. Chapitre Dixième: Discussion et conclusion .....	158
Bibliographie.....	165
ANNEXES .....	177



## Liste des tableaux

### 2. Chapitre deuxième: L'octylphénol

Tableau 2-I: Principales caractéristiques physico-chimiques de l'octylphénol.....	15
Tableau 2-II: Principales méthodes de mesure de l'octylphénol dans les milieux biologiques.....	20
Tableau 2-III: Toxicité aiguë de l'octylphénol.....	25

### 6. Chapitre sixième: Determination of *p-tert*-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Table 6-I: Within-day coefficient of variation and recovery of OP for blood and different tissues (n=10).....	62
Table 6-II: Day to day coefficient of variations of OP in blood (n=10).....	64
Table 6-III: Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of OP for blood and different tissues.....	65

## **7. Chapitre septième: Toxicokinetics of *p*-tert-octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral or subcutaneous exposure**

Table 7-I: Mean maximal blood concentration (C<sub>max</sub>), area under the blood concentration versus time curve (AUC; ng/ml\*h), ratio of AUC to OP dose (AUC/Dose), bioavailability (F) calculated with the 4 mg/kg IV dose and terminal half-life (T<sub>1/2</sub>) in male (m) and female (f) rats. Data are expressed as mean ± SD (n=5).....95

## **8. Chapitre huitième: Physiologically-based modeling of *p*-tert-octylphenol kinetics following intravenous, oral and subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats**

Table 8-I: Physiological parameters used in the rat PBPK model for OP.....134

Table 8-II: Partition coefficients used in the PBPK model.....136

Table 8-III: Metabolic constants, diffusion constants, bioavailability constants and absorption constants used in the PBPK model.....137

## Liste des figures

### 3. Chapitre troisième: La toxicocinétique de l'octylphénol

Figure 3-1: Voie métabolique de l'octylphénol. Modifié de Nomura et coll. (2008).....33

### 6. Chapitre sixième: Determination of *p-tert*-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Figure 6-1: Typical chromatogram obtained at 135 m/z from a blood sample spiked with OP at a concentration of 133,3 ng/ml.....66

Figure 6-2: Mass spectra of *p-tert*-butylphenol obtained from a blood sample spiked with OP at a concentration of 133,3 ng/ml.....67

Figure 6-3: Mass spectra of *p-tert*-octylphenol obtained from a blood sample spiked with OP at a concentration of 133,3 ng/ml.....68

Figure 6-4: Comparison of OP concentration after different incubation times for the acetylation reaction (n=2).....69

Figure 6-5: Comparison of OP stability after keeping the samples on ice for less than 6 hours, storing the samples 2 days in the refrigerator or 2 days in the freezer (mean  $\pm$  S.D.; n=5).....70

Figure 6-6: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in male Sprague-Dawley rats up to 5 h after a single oral dose of OP (5 mg/ kg) or up to 3 h after a single IV dose of OP (10 mg/kg) (n=2).....71

## 7. Chapitre septième: Toxicokinetics of *p-tert-octylphenol* in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral or subcutaneous exposure

- Figure 7-1: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in male (A) and female (B) Sprague-Dawley rats after a single oral dose of 50, 125 or 250 mg OP/ kg.....96
- Figure 7-2: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in male and female Sprague-Dawley rats after a single IV dose of 2, 4 or 8 mg OP/kg \* Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ). .....97
- Figure 7-3: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  SD, n=5) in male and female Sprague-Dawley rats after a single SC injection of 125 mg OP/kg) \*\*Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ). .....98
- Figure 7-4: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  SD, n=5) in male (A) Sprague-Dawley rats 1 hr after a single oral dose or 1 and 4 hr after 57 daily doses and in female (B) rats 1 hr after a single oral dose or 1 and 4 hr after 33 daily doses of 25, 50 or 125 mg OP/kg \* Significant ( $p \leq 0.05$ ) differences between day 1 and day 57, 1 hr post-exposure.....99
- Figure 7-5: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 4 and 24 hr after a single oral dose of 125 or 250 mg OP/kg \*\* Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ). .....100
- Figure 7-6: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in sex organs from male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 4 and 24 hr after a single oral dose of 125 or 250 mg OP/kg.....101

Figure 7-7: OP tissue concentrations (mean $\pm$ S.D., n=5) in male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 1 and 3 hr after a single IV dose of 4 or 8 mg OP/kg. ** Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ).....	102
Figure 7-8: OP tissue concentrations (mean $\pm$ S.D., n=5) in reproductive tissues from male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 1 and 3 hr after a single IV dose of 4 or 8 mg OP/kg.....	103
Figure 7-9: OP tissue concentrations (mean $\pm$ S.D., n=5) after a daily oral dose of 25, 50 or 125 mg OP/kg in female (F; 35 days) and male (M; 60 days) Sprague-Dawley rats compared with OP tissue concentrations 24 hr after a single oral dose of 125 mg OP/kg). R = repeated exposure, S = single exposure.....	104
Figure 7-10: OP tissue concentrations (mean $\pm$ S.D., n=5) in reproductive tissues from Sprague-Dawley rats after 60 (A; male) and 35 (B; female) daily oral doses of 25, 50 or 125 mg OP/kg compared with OP tissue concentrations 24 hr after a single oral dose of 125 mg OP/kg. R = repeated exposure, S = single exposure.....	105
Figure 7-11: <i>In vitro</i> metabolism of OP with liver microsomes from male (A) and female (B) Sprague-Dawley rats incubated for 2 to 60 min with various concentrations of OP (71, 213 or 533 ng OP/mg protein).....	106

## **8. Chapitre huitième: Physiologically-based modeling of *p*-tert-octylphenol kinetics following intravenous, oral and subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats**

Figure 8-1: Conceptual representation of the PBPK model for OP. VMAX and Km refer to the maximal velocity of metabolism and Michaëlis constant.....	138
---	-----

- Figure 8-2: Schematic of the process of PBPK model development and validation for OP in male and female rats..... 139
- Figure 8-3: Comparison of PBPK model simulation (lines) with blood and tissues OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in male Sprague-Dawley rats up to 4h after a single IV dose of OP (2, 4, 8 mg/kg) (n=5). The model simulations were obtained following the description of OP uptake as a perfusion-limited process in all tissues (A) or as a diffusion-limited process in poorly perfused tissues, adipose tissues, liver and reproductive tissues (B).....140
- Figure 8-4: Comparison of model simulations (lines) with blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in male and female Sprague-Dawley rats up to 4 h after a single IV dose of OP (2, 4, 8 mg/kg) (n=5) or up to 24 h after a single oral dose of OP (50, 125, 250 mg/kg) (n=5) or up to 24 h after a single SC dose of OP (125 mg/kg) (n=5).....142
- Figure 8-5: Comparison of model simulations with blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats up to 24 h after a single oral dose or 1h and 4h after 33 (female) or 57 (male) daily exposure of OP (50, 125 mg/kg) (n=5).....143
- Figure 8-6: Comparison of model simulations (lines) with liver OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in male and female Sprague-Dawley rats 1 and 3 h after a single IV dose of OP (4, 8 mg/kg) (n=5) or 4 and 24 h after a single oral dose of OP (125, 250 mg/kg) (n=5).....144
- Figure 8-7: Comparison of model simulations with liver OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats 24 h after 33 (female) and 57 (male) daily oral exposure of OP (50, 125 mg/kg) (n=5).....145

- Figure 8-8: Comparison of model simulations (lines) with fat OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in male and female Sprague-Dawley rats 1 and 3 h after a single IV dose of OP (4, 8 mg/kg) (n=5) or 4 and 24 h after a single oral dose of OP (125, 250 mg/kg) (n=5).....146
- Figure 8-9: Comparison of model simulations with fat OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats 24 h after 33 (female) and 57 (male) days of daily oral dosing of OP (50, 125 mg/kg) (n=5).....147
- Figure 8-10: Comparison of model simulations (lines) with testes and uterus OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in Sprague-Dawley rats 1 and 3 h after a single IV dose of OP (4, 8 mg/kg) (n=5) or 4 and 24 h after a single oral dose of OP (125, 250 mg/kg) (n=5).....148
- Figure 8-11: Comparison of model simulations with testes and uterus OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats 24 h after 33 (female) and 57 (male) days of daily oral exposure to 50 and 125 mg/kg (n=5).....149
- Figure 8-12: Normalized sensitivity coefficient for various parameters used in the male PBPK model for OP. (M = matrix, B = blood, PO = oral).....150
- Figure 8-13: Normalized sensitivity coefficient for various parameters used in the female PBPK model for OP. (M = matrix, B = blood, PO = oral).....151

## 9. Chapitre neuvième : Expériences non publiées

Figure 9-1: Comparaison des concentrations d'octylphénol dans le sang suite à une administration orale d'octylphénol (100 mg/kg de poids corporel) chez des rats mâles Sprague-Dawley et Fischer (n=2).....	154
Figure 9-2: Étude du métabolisme microsomial de l'octylphénol en présence d'UDPGA.....	156



## Liste des sigles et des abréviations

ACSL: Advanced Continuous Simulation Language

APE: Alkylphénols éthoxylés

AUC: Surface sous la courbe (area under the curve)

BCF: Facteur de bioconcentration

BP: *p-tert*-Butylphénol

BW: Poids corporel (body weight)

Cmax: Concentration maximale

CMENO: Concentration minimale avec effet nocif observé

CSENO: Concentration sans effet nocif observé

CV: Coefficient de variation

DL50 / DL100: Dose létale 50 / Dose létale 100

DMENO: Dose minimale avec effet nocif observé

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DSENO: Dose sans effet nocif observé

EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique

ER $\alpha$  et ER $\beta$ : récepteur des œstrogènes alpha et bêta

F: Biodisponibilité

FSH: Folliculostimuline

$\alpha$ FP:  $\alpha$ -Foeto-protéine

FRSQ: Fonds de la recherche en santé du Québec

GC: Chromatographie en phase gazeuse

G6P: Glucose-6-phosphate

HCL: Chlorure d'hydrogène

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance

INERIS: Institut national de l'environnement industriel et des risques

IV: Intraveineux

KCL: Chlorure de potassium

Ka: Constante d'affinité

Kd: Constante de dissociation

Km: Constante d'affinité de Miachaëlis-Menten

LH: Hormone lutéinisante

LOD: Limite de détection

LogP(oct): Coefficient de partage (octanol/eau)

LOQ: Limite de quantification

MgCl<sub>2</sub>: Chlorure de magnésium

MS: Spectrométrie de masse

MTBE: Éther de tert-butyle

NADP+: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NSERC/CRSNG: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada / Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada

OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques

OP: Octylphénol

OSPAR: Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du nord-est

PBPK: Physiologically based pharmacokinetic

pKa: Constante d'acidité

PO: *Per os*

SC: Sous-cutané

SBSE: Extraction de type "stir bar sorptive"

SHBG: Globuline se liant aux hormones sexuelles (*sex-hormone-binding-globulin*)

T<sub>1/2</sub>: Demi-vie

T<sub>max</sub>: Temps correspondant à la concentration maximale

UDPGA: Acide uridine 5'-diphosphate glucuronique

V<sub>max</sub>: Vitesse maximale de biotransformation

## Remerciements

Je désire d'abord remercier le Dr Robert Tardif et lui témoigner toute mon estime et ma reconnaissance. J'ai grandement apprécié ses judicieux conseils, son appui scientifique et son support moral. Il a été un directeur hors pair et la confiance qu'il m'a démontrée a su créer l'environnement nécessaire à la réalisation de ce projet. Merci.

Je remercie aussi le Dr Kannan Krishnan pour son support, ses précieux conseils et son appui scientifique.

Je tiens également à remercier Ginette Charest-Tardif pour son aide et ses judicieux conseils lors des manipulations expérimentales et de la modélisation ainsi que pour sa bonne humeur contagieuse, sa patience, sa disponibilité et son appui tout au long de ce projet. Ce fut un plaisir de travailler à ses côtés.

Merci à Mylène Beaudoin et Johanne Couture pour leur aide précieuse au laboratoire, ainsi qu'aux employés et étudiants du département de santé environnementale et santé au travail. Un merci particulier à Michelle Gagné pour son amitié et son soutien.

Je remercie du fond du cœur mes parents pour leur amour inconditionnel, leur support et leurs encouragements. Merci d'avoir eu la patience de m'écouter et de croire en moi et de m'avoir donné le courage et la confiance nécessaires pour mener à bien ce projet. Merci à mon frère Frédéric avec qui j'ai su développer une belle complicité au fil du temps.

Finalement, je voudrais témoigner de mon affection et de mon amour pour mon époux, Jean-Frédéric, qui a transformé ma vie. Merci d'avoir compris comme personne d'autres les hauts et les bas des études doctorales et de m'avoir apporté soutien et support jusqu'à la fin de mes études. Merci également à mon fils, Félix-Olivier, mon rayon de soleil.

**CHAPITRE PREMIER:**  
**INTRODUCTION GÉNÉRALE**

# **1. Chapitre premier : Introduction générale**

## **1.1. Principaux mécanismes impliqués dans la toxicologie de la reproduction**

Les humains sont exposés à plusieurs contaminants environnementaux qui peuvent exercer des effets nocifs sur les systèmes reproducteurs mâle et femelle, notamment plusieurs perturbateurs endocriniens. Il importe donc d'évaluer adéquatement le niveau d'exposition à ces substances et leurs effets sur la santé humaine. Les mécanismes de toxicité impliqués dans la toxicologie de la reproduction sont difficiles à étudier en raison de la complexité des processus des systèmes reproducteurs. En effet, les substances toxiques peuvent exercer leurs effets nocifs sur les systèmes reproducteurs mâle et femelle et perturber la reproduction en agissant à plusieurs niveaux et sur plusieurs processus cellulaires. Les substances toxiques peuvent exercer leurs effets de façon directe ou indirecte sur les différents processus de reproduction (fécondité, libido, gamétogenèse, transport et fonction des gamètes, accouplement, fertilisation, transport du zygote et implantation). Les organes cibles ne sont donc pas uniquement les ovaires et les testicules. Tous ces processus impliquent de multiples composantes qui peuvent toutes être affectées. De plus, il existe des moments spécifiques lors de la production de gamète ou du développement de l'embryon où les cellules ou l'organisme sont particulièrement vulnérables aux substances toxiques. Les gonades en développement sont extrêmement sensibles et les populations cellulaires ont des sensibilités différentes (Thomas et Thomas, 2001).

Le système reproducteur nécessite des systèmes de communication hormonale qui peuvent être perturbés à de nombreux endroits par les substances chimiques. Le système de rétroaction négative de l'axe hypothalamo-hypophysaire est un système très délicat qui peut

être perturbé à différents niveaux (Thomas et Thomas, 2001). Les produits chimiques peuvent agir directement sur le système nerveux central, particulièrement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, ce qui altérerait la sécrétion de certaines hormones dont les gonadotrophines (la folliculostimuline (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH)) ainsi que la gonadolibérine. Les gonades sont également la cible de plusieurs produits chimiques, ce qui peut causer des modifications au niveau de la synthèse d'hormone, de l'emmagasinage ou de la sécrétion d'hormone. Certains produits peuvent également affecter le transport et le métabolisme hormonal ce qui pourrait stimuler ou ralentir l'élimination des hormones, modifiant ainsi la quantité d'hormone qui atteint les récepteurs hormonaux. Les molécules peuvent également agir en se liant aux récepteurs membranaires et en agissant comme agoniste (en induisant l'action hormonale) ou antagoniste (en empêchant l'hormone d'exercer ses effets). Des produits chimiques peuvent également diminuer la synthèse des récepteurs hormonaux. Finalement, certaines substances modifient les réponses après la liaison de l'hormone au récepteur (Thomas et Thomas, 2001; Hoyer et Devine, 2002).

Les substances nocives pour le système reproducteur peuvent agir selon de nombreux mécanismes tels que des mutations, des aberrations chromosomiques, des modifications au niveau de la division cellulaire, des modifications dans la composition en acide nucléique, des modifications au niveau de la synthèse de protéines, une diminution des éléments essentiels pour la biosynthèse, une réduction de l'apport énergétique pour le développement de l'embryon et du fœtus, des modifications au niveau des systèmes enzymatiques, des modifications au niveau de l'équilibre en eau et en électrolytes et des modifications au niveau des caractéristiques des membranes (Hoyer et Devine, 2002).

### **1.1.1. Mécanismes impliqués dans la toxicologie de la reproduction chez le mâle**

Chez le mâle, il y a à tout moment, dans les testicules, des cellules à toutes les étapes du développement. Puisque les cellules et les acides nucléiques cellulaires sont plus vulnérables lors de la division cellulaire, les cellules ne sont pas toutes affectées également lors d'une exposition à une substance chimique (Ecobichon, 1997). La barrière hémato-testiculaire offre une certaine protection en empêchant l'entrée de certaines substances du sang vers le fluide situé dans les tubes séminifères. L'absorption de ces substances dépend du degré d'ionisation, de la liposolubilité et du poids moléculaire de la substance ainsi que de sa concentration sanguine. Les substances à faible poids moléculaire (eau, urée) peuvent facilement traverser la barrière hémato-testiculaire alors que les substances à poids moléculaire élevé sont bloquées. Cependant, plusieurs substances peuvent tout de même pénétrer dans les testicules. En effet, de nombreux facteurs peuvent modifier la perméabilité de cette barrière. Par exemple, la barrière hémato-testiculaire est moins développée dans les testicules immatures, ce qui permet le passage de plusieurs substances dans les tubes séminifères. Plusieurs enzymes sont présents dans les testicules et peuvent métaboliser les substances qui ont traversé la barrière hémato-testiculaire. Cependant, la biotransformation de ces substances peut donner naissance à des métabolites qui sont toxiques pour le système reproducteur (Lu et Kacew, 2002).

Les substances toxiques peuvent agir sur différents sites et selon divers mécanismes d'action. Au niveau de l'hypothalamus, les substances peuvent agir sur les neurotransmetteurs, sur la synthèse et la sécrétion de la gonadolibérine et sur les récepteurs de FSH, de LH et des hormones stéroïdiennes. Au niveau de l'adénohypophyse, les substances toxiques peuvent agir sur la synthèse et/ou la sécrétion de LH, de FSH et de prolactine ou agir au niveau des récepteurs de gonadolibérine, de LH, de FSH et/ou



d'hormones stéroïdiennes. Dans les testicules, les substances nocives peuvent agir sur les récepteurs de LH et de prolactine (situés sur les cellules de Leydig), sur les récepteurs de FSH (situés sur les cellules de Sertoli) et sur les récepteurs d'hormones stéroïdiennes. Elles peuvent également modifier la synthèse et la sécrétion de testostérone, la sécrétion d'inhibine, la perméabilité de la membrane hémato-encéphalique, la vascularisation, peuvent interférer au niveau du fonctionnement des cellules de Sertoli, au niveau de la mitose et de la méiose des spermatocytes, de la production quotidienne de sperme et peuvent causer la mort des spermatogonies. De plus, les substances toxiques peuvent agir au niveau des canaux efférents (en agissant sur la réabsorption ou sur la vascularisation), au niveau des épидидymes (en agissant sur la réabsorption, sur la concentration de certains produits dans le sang, sur l'activité enzymatique, sur le transfert de la substance dans le fluide luminal, sur la contraction des muscles et sur le transport du sperme) et sur les canaux déférents (en agissant sur la contraction des muscles et le transport du sperme). Finalement, les substances toxiques peuvent agir au niveau des glandes sexuelles accessoires (en favorisant la sécrétion de la substance toxique ou de produits nocifs pour les spermatozoïdes) ou directement au niveau du sperme (présence de la substance toxique) (Ecobichon, 1997; Lu et Kacew, 2002).

### **1.1.2. Mécanismes impliqués dans la toxicologie de la reproduction chez la femelle**

Chez les femelles, les ovaires possèdent également la capacité de biotransformer certaines substances, ce qui peut mener à des métabolites toxiques pour le système reproducteur. Contrairement au cycle reproducteur mâle, où la production de spermatozoïde est continue, le nombre d'ovules est maximal à la naissance. Les ovules ont donc plus de chances d'avoir des lésions avec le temps (Thomas et Thomas, 2001).

Comme chez les mâles, les substances toxiques peuvent agir chez les femelles de façon indirecte, par le biais de l'axe hypothalamo-hypophysaire ou de façon directe en agissant sur les ovaires ou sur les diverses structures du système reproducteur ou en empêchant l'ovulation, le développement des ovocytes ou les mécanismes permettant de recevoir l'embryon et de permettre son développement (Hover et Devine, 2002).

Au niveau de l'hypothalamus, les substances toxiques peuvent agir sur les neurotransmetteurs, sur la synthèse et la sécrétion de la gonadolibérine et sur les récepteurs de FSH, de LH et des hormones stéroïdiennes. Au niveau de l'adénohypophyse, les substances toxiques peuvent agir sur la synthèse et/ou la sécrétion de LH, de FSH et de prolactine ou agir au niveau des récepteurs de gonadolibérine, de LH, de FSH et/ou d'hormones stéroïdiennes. Au niveau des ovaires, les substances nocives peuvent agir directement sur les ovocytes (en diminuant leur nombre). Elles peuvent également interférer avec la méiose, modifier le nombre de récepteurs de LH ou de FSH ou modifier la synthèse et la sécrétion d'estradiol et de progestérone (Ecobichon, 1997).

Au niveau des ovules, les substances toxiques peuvent modifier les protéines responsables d'interagir avec les spermatozoïdes, modifier la *zona pellucida*, interférer avec les processus métaboliques, la fertilisation ou l'implantation. Dans les tubes utérins, les substances toxiques peuvent modifier les mouvements des *fimbriae*, modifier la production et le mouvement des cils, modifier le nombre de récepteurs d'estradiol et de progestérone, modifier la sécrétion de prostaglandines, de protéines et de glycoprotéines, interférer avec le transport et la survie des spermatozoïdes et modifier le fluide luminal et les processus d'accouchements. Les spermatozoïdes et l'embryon peuvent aussi être exposés aux substances qui sont présentes au niveau des sécrétions. Au niveau du col utérin, les produits toxiques peuvent agir comme une barrière contre les spermatozoïdes et empêcher leur

entrée. Au niveau du vagin, les spermatozoïdes peuvent être exposés aux substances présentes dans les sécrétions. Finalement, au niveau des glandes mammaires, les substances peuvent être présentes dans le lait maternel mais aussi modifier la composition du lait maternel et diminuer sa production (Ecobichon, 1997).

## **1.2. Les perturbateurs endocriniens**

### **1.2.1. Le système endocrinien**

Le système endocrinien est un des deux grands systèmes de communication de l'organisme, l'autre étant le système nerveux. Il est constitué de l'ensemble des glandes (endocrines) qui sécrètent les hormones. Les principales glandes endocrines sont l'hypothalamus, l'hypophyse, les glandes surrénales, la thyroïde, les gonades (ovaires et testicules), le pancréas, le thymus et l'épiphyse. Les hormones libérées par ces glandes stimulent la croissance et l'identité sexuelle, contrôlent la température corporelle, régulent le métabolisme, contribuent à la réparation des tissus, aident à générer de l'énergie et régulent les émotions (Vander et coll., 1995).

Les hormones sont des messagers chimiques extracellulaires qui circulent dans le sang et agissent sur des cellules cibles en se liant à un récepteur spécifique. Les hormones appartiennent à 3 classes de substances chimiques. On retrouve les hormones aminées (adrénaline, noradrénaline, dopamine et les hormones thyroïdiennes), les hormones peptidiques et les hormones stéroïdiennes (cortisol, aldostérone, testostérone et les oestrogènes tel l'estradiol) (Vander et coll., 1995).

### 1.2.2. Les œstrogènes

Puisque l'octylphénol agit en se liant au récepteur œstrogénique, une brève description des œstrogènes est de mise. Les œstrogènes sont un groupe d'hormones stéroïdiennes qui servent d'hormone sexuelle femelle. La principale est l'estradiol. Ces hormones font partie de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La gonadolibérine est la première hormone de la série. Celle-ci est sécrétée par l'hypothalamus lorsque la concentration d'œstrogènes est faible et atteint le lobe antérieur de l'hypophyse, ce qui stimule la libération de la FSH et de la LH. Ces deux hormones agissent ensemble sur les gonades et vont provoquer la gamétogénèse et la production d'hormones sexuelles. Les œstrogènes seront donc sécrétés par les ovaires suite à leur stimulation par la FSH et la LH. Une autre hormone, l'inhibine, est sécrétée par les gonades et exerce une rétroaction négative sur le lobe antérieur de l'hypophyse. Dans les ovaires, la granulosa sécrète les œstrogènes au cours de la phase folliculaire alors qu'après l'ovulation, c'est le corps jaune qui sécrète les œstrogènes (Vander et coll., 1995).

Les œstrogènes agissent sur des récepteurs spécifiques situés dans le noyau cellulaire et donc issus de la famille des récepteurs nucléaires. Ces récepteurs sont des protéines intracellulaires qui provoquent la transcription de gènes précis. Il existe deux types de récepteurs qui sont codés par deux gènes distincts : le récepteur alpha ( $ER\alpha$ ) et le récepteur bêta ( $ER\beta$ ). La distribution de ces récepteurs dans les différents tissus n'est pas identique et leurs rôles physiologiques ne sont donc pas identiques. Puisque les récepteurs des hormones stéroïdiennes sont situés à l'intérieur des cellules cibles, ces hormones doivent être très liposolubles pour être en mesure de traverser facilement la membrane plasmique et se lier à leur récepteur intracellulaire spécifique (Mueller, 2004).

Les œstrogènes sont présents chez les deux sexes mais en quantité beaucoup plus importante chez la femelle. Ils exercent de nombreux effets. Ils ont un rôle dans la reproduction masculine et féminine mais également au niveau du système nerveux central, du squelette, du système cardio-vasculaire, du foie et des tissus adipeux. Ils sont impliqués notamment dans la prolifération des glandes mammaires, ils stimulent la formation des os, des graisses et des muscles, ils favorisent la multiplication cellulaire et aide à la prolifération endométriale dans l'utérus. Ils stimulent la croissance de l'ovaire et des follicules, stimulent la croissance du muscle lisse et de la prolifération des revêtements épithéliaux des voies génitales. Les œstrogènes stimulent la croissance des organes génitaux externes, des seins et le développement de la morphologie féminine et stimulent le développement de la pilosité pubienne de type féminin. Les œstrogènes jouent également un rôle dans la croissance osseuse et son interruption éventuelle. Ils protègent notamment contre l'ostéoporose. Ils ont un effet vasculaire. Leur absence provoque notamment des bouffées de chaleur chez la femme ménopausée. Ils ont un effet rétroactif sur l'hypothalamus et le lobe antérieur de l'hypophyse. Ils stimulent la rétention de liquide. Ils stimulent également la sécrétion de la prolactine mais inhibent l'effet de la prolactine sur la production de lait par les seins. Finalement, les œstrogènes ont un effet protecteur contre l'athérosclérose (Hadley, 2000; Vander et coll., 1995).

### **1.2.3. Les perturbateurs endocriniens**

Les humains sont exposés à plusieurs contaminants environnementaux pouvant agir comme perturbateurs endocriniens. Ces contaminants interfèrent avec les processus biologiques régulés par les hormones et peuvent avoir un effet sur la reproduction et le développement. Les perturbateurs endocriniens auraient la capacité d'imiter les actions des hormones endogènes et seraient donc responsables de plusieurs effets toxiques chez l'homme. Ces composés causeraient notamment des effets néfastes en causant un stimulus

hormonal à un moment inopportun du développement intra-utérin. Par exemple, une exposition *in utero* à des perturbateurs endocriniens ayant des propriétés œstrogéniques pourrait causer plusieurs effets néfastes tels que des cancers du sein, de la prostate et des testicules, certaines atteintes de la fonction reproductrice chez l'homme, l'endométriose, des problèmes de fertilité, des modifications du comportement sexuel, des retards d'apprentissage, des effets sur le système immunitaire et sur la fonction thyroïdienne. Un blocage de l'action des androgènes ou un stimulus œstrogénique à un moment précis de la grossesse pourraient tous deux résulter en une altération du développement de l'appareil reproducteur mâle (Cordier et coll., 2003).

Le système endocrinien est un système de communications hormonales très complexe. Il existe donc plusieurs sites et plusieurs processus cellulaires qui peuvent être la cible des perturbateurs endocriniens et altérer les fonctions des organes. Premièrement, les perturbateurs endocriniens peuvent causer des modifications au niveau de la synthèse hormonale. Par exemple, plusieurs substances toxiques ont la capacité d'inhiber la synthèse d'hormones stéroïdiennes dans les testicules en agissant au niveau d'étapes enzymatiques spécifiques ou au niveau de la transcription et de la traduction. D'autres substances peuvent également mimer ou bloquer l'action de la gonadolibérine, ce qui a un impact sur la production de FSH et de LH. Deuxièmement, les perturbateurs endocriniens peuvent perturber la distribution et l'accumulation d'hormones. Les hormones protéiques sont emmagasinées dans des granules de sécrétion alors que les hormones stéroïdiennes ne sont pas emmagasinées. Ainsi, toute substance qui agit sur l'activation de certains seconds messagers ou qui bloque des cascades de synthèse d'hormones peut modifier les niveaux sanguins d'hormones et ainsi leur biodisponibilité. Troisièmement, les perturbateurs endocriniens peuvent modifier le transport et l'élimination des hormones. Les hormones peuvent être transportées dans le sang sous forme libre ou liée à des protéines plasmatiques. Une modification de la concentration sanguine des protéines de liaison peut augmenter ou

diminuer la biodisponibilité de ces hormones au niveau de leurs récepteurs. De plus, des inducteurs de l'activité hépatique peuvent augmenter la clairance hépatique de certaines hormones, diminuant ainsi leurs concentrations sanguines. Quatrièmement, les perturbateurs endocriniens peuvent agir au niveau de la liaison au récepteur hormonal en imitant le ligand naturel (agissant ainsi comme un agoniste) ou en inhibant la liaison (agissant ainsi comme un antagoniste). Un exemple de ce type de perturbateur endocrinien est le *p-tert*-octylphénol puisqu'il agit comme xénoérogène. Cinquièmement, les perturbateurs endocriniens peuvent modifier la réponse cellulaire une fois l'hormone liée au récepteur. La liaison d'une hormone à son récepteur enclenche une cascade de réactions et la production de systèmes de seconds messagers qui peuvent être modifiés par les perturbateurs endocriniens. Sixièmement, les perturbateurs endocriniens peuvent induire du stress oxydatif. En effet, plusieurs substances peuvent induire la formation d'un nombre élevé de radicaux libres oxygénés ou inhiber la formation d'antioxydants. Le stress oxydatif peut contribuer à des déséquilibres hormonaux (Sikka et Naz, 2002; Damstra et coll., 2002).

#### **1.2.4. Utilité de la toxicocinétique dans l'étude des perturbateurs endocriniens**

L'analyse de risque toxicologique de l'exposition aux perturbateurs endocriniens et de leurs effets sur la santé humaine demeure difficile puisqu'il existe une incertitude quant à la façon d'estimer le risque d'interactions de ces substances avec le système endocrinien. En effet, même si une substance possède la capacité intrinsèque de perturber le système endocrinien, plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer le devenir de cette substance dans l'organisme et moduler ainsi cet effet. Avant qu'une substance puisse agir comme perturbateur endocrinien, elle doit d'abord atteindre l'organe cible en quantité suffisante. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'absorption d'une substance dans l'organisme et ont

un impact sur la toxicité d'un produit. Par ailleurs, plusieurs substances toxiques peuvent perturber le système endocrinien directement sous forme inchangée ou suite à une transformation métabolique. Une caractérisation adéquate de la toxicocinétique de ces substances est donc nécessaire pour déterminer si leurs niveaux internes seraient susceptibles de causer des effets néfastes ou pour permettre une extrapolation à différentes doses et pour différentes espèces. La dose interne est définie comme étant la quantité d'une substance chimique qui est absorbée par l'organisme et qui a donc la capacité d'être métabolisée, transportée et accumulée ou éliminée. Les études de toxicocinétique permettent de déterminer la relation entre la dose externe et la dose interne d'un produit et de définir les facteurs susceptibles d'influencer le devenir d'une substance dans l'organisme. Ces données permettent une meilleure évaluation des risques liés aux perturbateurs endocriniens (Damstra et coll., 2002; Lu et Kacew, 2002).



**CHAPITRE DEUXIÈME:**  
**L'OCTYLPHÉNOL**

## 2. Chapitre deuxième: L'octylphénol

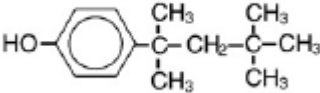
### 2.1. Caractéristiques

#### 2.1.1. Propriétés physico-chimiques

Le terme octylphénol désigne un grand nombre de composés dont la formule chimique est  $C_{14}H_{22}O$ . Le groupe octyle ( $C_8H_{17}$ ) peut être présent sous la forme de plusieurs isomères dont le plus important demeure le *p-tert*-octylphénol (OP) (OSPAR, 2006). L'utilisation du terme octylphénol dans ce document réfère uniquement à l'isomère *p-tert*-octylphénol.

L'octylphénol est un composé aromatique formé d'une chaîne de 8 carbones et d'un groupement alcool. À température ambiante, l'octylphénol est solide et de couleur blanche. C'est un composé peu soluble dans l'eau, très lipophile et peu volatil. Les principales propriétés physico-chimiques de l'octylphénol sont présentées au tableau 2-I.

Tableau 2-I: Principales caractéristiques physico-chimiques de l'octylphénol (selon OCDE, 1994; INERIS, 2005; Meylan et Howard, 1995; Gerhartz, 1999; Boublik et coll., 1984).

Caractéristiques	Informations pour l'octylphénol
Nom complet	<i>para-tert</i> -octylphénol
Synonymes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4-(1',1',3',3'-tétraméthylbutyl)phénol</li> <li>• 4-<i>tert</i>-octylphénol</li> <li>• P-(1',1',3',3'- tétraméthylbutyl)phénol</li> </ul>
Formule chimique	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
Structure	
Numéro d'identification CAS	140-66-9
Apparence	Solide, poudreux, blanc
Masse moléculaire	206,33
Densité de vapeur	7,12 (air=1)
Point de fusion	84-85 °C
Point d'ébullition	158 °C à 2 kPa 280-283 °C à 1 kPa

Tension de vapeur	Négligeable (0,000478 mm Hg à 25 °C)
Solubilité dans l'eau	Insoluble
Solubilité dans divers liquides	Soluble dans les solvants non-polaires ou légèrement polaires
Coefficient de partage (octanol/eau)	LogP(oct) = 5,28
Constante d'acidité	pKa = 10,33 à 25 °C

## 2.2. Sources d'exposition

### 2.2.1. Sources et utilisation

Les alkylphénols sont des substances chimiques très lipophiles. Il n'existe pas de synthèse naturelle d'alkylphénols. Leur présence dans l'environnement est donc uniquement d'origine anthropogénique. Les alkylphénols les plus utilisés sont les octylphénols et les nonylphénols.

Les alkylphénols sont fabriqués en grande quantité et servent d'intermédiaire dans la fabrication de polymères, de détergents, d'agents tensioactifs et principalement de résines phénoliques. Une autre source importante d'alkylphénols est la biodégradation des alkylphénols éthoxylés, qui sont des surfactants domestiques et industriels très utilisés (INERIS, 2005).

Les alkylphénols éthoxylés sont utilisés en tant que détergents dans l'industrie textile et comme additif de désencrage dans l'industrie papetière. Ils servent également d'émulsifiants, d'adjuvants dans la formulation de certains pesticides, d'additifs dans l'huiles de graissage, de stabilisants pour le caoutchouc et le plastique, de dispersants et de plastifiants pour les résines. Les alkylphénols éthoxylés sont aussi utilisés dans divers produits de nettoyage et des détergents à usage domestique et collectif (OSPAR, 2006; OCDE, 1994; INERIS, 2005).

### **2.2.2. Niveaux retrouvés dans l'environnement**

L'octylphénol est un produit très lipophile, stable, présent et persistant dans l'environnement. Il existe des méthodes pour traiter les rejets d'alkylphénols et leurs dérivés mais on en retrouve tout de même dans les effluents des usines de traitement des eaux usées, ce qui indique que leur traitement demeure incomplet (Ying et coll., 2002). On estime que la majorité de l'octylphénol issu de source industrielle est rejetée dans l'environnement. La présence d'octylphénol a été détectée dans les eaux naturelles et les eaux usées mais également dans l'air, les sédiments et le sol (Kawaguchi et coll., 2004; INERIS, 2005).

Par exemple, Lee et Peart (1995) ont mesuré des concentrations d'octylphénol allant de 0,12 à 1,7 µg/L dans des effluents d'eaux usées de la région de Toronto, de 9,2 à 12,1 µg/g dans les boues et de <0,005 à 0,91 µg/g dans les sédiments. La même équipe, cette fois en 2005 (Lee et coll., 2005), a mesuré des concentrations d'octylphénol allant de 0,38 à 3,56 µg/L (affluents) et de 0,01 à 0,47 µg/L (effluents) dans 8 usines de traitement des eaux usées situées dans le sud de l'Ontario. Une étude de Bennie et coll. (1997) effectuée dans la région du Fleuve Saint-Laurent et des Grands Lacs a permis de mesurer des concentrations

d'octylphénol de  $<0,005$  à  $0,084 \mu\text{g/L}$  dans des échantillons d'eau de surface, et des concentrations de  $<0,010$  à  $1,8 \mu\text{g/g}$  dans les sédiments.

Quednow et coll. (2008) ont mesuré des concentrations d'octylphénol allant de  $<10$  à  $420 \text{ ng/L}$  dans des échantillons d'eau de surface en Allemagne entre 2003 et 2005. Kuch et Ballschmiter (2001) ont mesuré des concentrations d'octylphénol allant de  $2,2$  à  $7,3 \text{ ng/L}$  dans des effluents d'usine de traitement des eaux usées et des concentrations allant de  $0,8$  à  $54 \text{ ng/L}$  dans des rivières situées en Allemagne. Une étude d'Espejo et coll. (2002) effectuée en Suisse a mesuré des concentrations de  $167$  à  $301 \text{ ng/L}$  dans les eaux usées de Genève. De plus, des concentrations d'octylphénol allant de  $<1$  à  $8,6 \mu\text{g/kg}$  ont été mesurées dans des sédiments récoltés au Portugal en 2001 (Petrovic et coll., 2002).

Jin et coll. (2004) ont rapporté des concentrations d'octylphénol allant de  $18,0$  à  $20,2 \text{ ng/L}$  dans des échantillons d'eau de surface de la rivière Haihe en Chine. Au Japon, des concentrations d'octylphénol de  $0,02$  à  $1,82 \mu\text{g/L}$  ont été mesurées dans des eaux usées et des concentrations de  $0,01$  à  $0,18 \mu\text{g/L}$  ont été mesurées dans des eaux de rivière alors que des concentrations d'octylphénol de  $0,003$  à  $0,67 \mu\text{g/g}$  ont été mesurées dans des sédiments (Isobe et coll., 2001).

L'octylphénol a également été mesuré dans l'air intérieur. Une étude japonaise a rapporté des concentrations d'octylphénol allant de  $<0,1 \text{ ng/m}^3$  à  $48,5 \text{ ng/m}^3$  (Inoue et coll., 2006).

Les propriétés physico-chimiques de l'octylphénol favorisent son accumulation dans l'environnement. Les alkylphénols éthoxylés et leurs métabolites ont le potentiel de s'accumuler dans les sédiments et se lieraient fortement aux particules aquatiques (Ying et coll., 2002). Un facteur de bioconcentration (BCF) de 6000 a été calculé pour l'octylphénol, en utilisant le LogP de 5,28 (Meylan et Howard, 1995). Cet indice indique un potentiel de bioaccumulation élevé pour l'octylphénol dans les milieux terrestres et aquatiques. La dégradation de l'octylphénol dans l'environnement serait lente, particulièrement en condition anaérobique (Ying et coll., 2002).

## **2.3. Exposition**

### **2.3.1. Exposition chez les consommateurs**

Les humains peuvent être exposés à l'octylphénol de 4 façons distinctes. Ils peuvent être exposés en consommant de l'eau potable ou de la nourriture. Les humains peuvent également inhaler de l'octylphénol près d'un site de production. Finalement, ils peuvent être exposés par contact cutané avec des produits contenant de l'octylphénol (OCDE, 1994).

### **2.3.2. Exposition chez les travailleurs**

Les travailleurs des industries qui produisent l'octylphénol sont les plus susceptibles d'être exposés, principalement lors des opérations d'emballage. En milieu de travail, les travailleurs peuvent être exposés par les voies pulmonaire et cutanée. La voie gastro-intestinale est également possible en cas de mauvaise hygiène. Cependant, si les travailleurs portent un équipement de protection adéquat, l'exposition devrait être faible, compte tenu

de la faible volatilité de l'octylphénol. L'absorption cutanée a été peu étudiée (OCDE, 1994). Une étude japonaise portant sur la surveillance biologique de l'octylphénol dans l'urine chez des travailleurs d'une usine de fabrication d'octylphénol a démontré que celui-ci est absorbé et excrété dans l'urine des travailleurs exposés (Ikeda et coll., 1978).

### 2.3.3. Méthode de mesure de l'octylphénol dans les milieux biologiques

L'analyse de l'octylphénol dans les milieux biologiques demeure ardue puisqu'il peut facilement être libéré de plusieurs plastiques et donc causer des interférences analytiques. Néanmoins, plusieurs méthodes existent et impliquent généralement la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) combinées à différentes techniques de détection telles que la spectrométrie de masse (MS). Le tableau 2-II présente certaines caractéristiques de quelques méthodes d'analyse publiées.

Tableau 2-II : Principales méthodes de mesure de l'octylphénol dans les milieux biologiques

Auteurs	Méthode	Milieu biologique (limite de détection)
Certa et coll. (1996)	GC-MS suite à une extraction liquide-liquide avec l'éther de tert-butyle	Sang (1-5 ng/ml), tissus (5-10 ng/g tissus)



	(MTBE)	
Inoue et coll. (2000)	Extraction sur phase solide combinée à une méthode HPLC en phase inverse et une détection par détection colorimétrique à électrodes multiples	Plasma, sérum (0,5 ng/ml)
Inoue et coll. (2003)	Déconjugaison enzymatique par la $\beta$ -glucuronidase combinée à la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse avec ionisation de type electrospray	Urine (0,05 ng/ml)
Kuklenyik et coll. (2003)	Extraction sur phase solide combinée à une méthode GC-MS	Urine (0,1 ng/ml)
Kawaguchi et coll. (2004)	GC-MS suite à une extraction SBSE (stir bar	Plasma, urine (0,004 ng/ml)

	sorptive) et une désorption thermique	
Liu et coll. (2006)	Chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse et une détection par photodiode	Sérum (0,1 ng/ml)
Yang et coll. (2006)	Microextraction sur phase solide et silylation combinée à une méthode GC-MS	Sérum (0,02 µg/L)
Ye et coll. (2006)	Extraction sur phase solide combinée à une méthode HPLC/MS/MS	Lait maternel (2,55 ng/ml)

#### 2.3.4. Niveaux retrouvés dans les milieux biologiques

Dans une étude de Calafat et coll. (2008) portant sur l'exposition de la population générale des États-Unis à l'octylphénol, l'octylphénol a été détecté dans l'urine chez 57,4% des 2517 personnes âgées de plus de 6 ans participant à l'enquête "National Health and Nutrition Examination Survey". Les concentrations d'octylphénol mesurées dans cette étude étaient relativement faibles (médiane de 0,3 µg/L).

Dans une autre étude cette fois réalisée par Inoue et coll. (2003), chez des volontaires humains, les concentrations urinaires d'octylphénol étaient inférieures à la limite de détection de 0,3 µg/L (n=10). Dans une étude de Kawaguchi et coll. (2004) également réalisée chez des volontaires humains, les concentrations urinaires d'octylphénol étaient inférieures à la limite de détection de 0,02 µg/L (n=5) alors que les concentrations plasmatiques variaient de 0,1 à 0,2 µg/L. L'octylphénol a également été détecté dans 31 échantillons de sang de cordon ombilical (n=180) provenant du "University Malaya Medical Center" en Malaisie, à des concentrations allant de la limite de détection (0,05 µg/L) à 1,15 µg/L (Tan et Mohd, 2003).

L'octylphénol a été détecté dans l'urine de travailleurs œuvrant dans une usine de fabrication de ce produit. Cette étude a démontré qu'il existait une bonne relation entre l'exposition à l'octylphénol et les niveaux retrouvés dans l'urine. Les concentrations urinaires de ces travailleurs allaient de 1.6 à 4.8 µg/ml durant la période de travail (OCDE, 1994).

## **2.4. Effets toxiques**

### **2.4.1. Mécanisme de toxicité**

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que l'octylphénol est un perturbateur endocrinien qui se lie au récepteur œstrogénique, empêchant ainsi la liaison des œstrogènes endogènes au récepteur (Laws et coll. 2000, 2006; Kwack et coll. 2002). Une fois lié au récepteur œstrogénique, l'octylphénol serait en mesure d'induire la transcription des gènes liés à ce récepteur. Des études *in vitro* ont montré qu'il a une affinité de liaison représentant 0,02% de l'affinité de l'estradiol pour le récepteur

œstrogénique  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) et représentant 0.07% de celle de l'œstradiol pour l'ER $\beta$ . Une autre étude a rapporté une affinité relative de 0,01% pour l'ER $\alpha$  et 0,03 % pour l'ER $\beta$  comparé à l'œstradiol (Kuiper et coll., 1998). Laws et coll. (2006) ont également évalué l'affinité de l'octylphénol pour le récepteur œstrogénique. Ils ont déterminé une constante d'inhibition de  $37,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ . Routledge et coll. (2000) ont quant à eux mesuré une affinité relative de liaison au récepteur de 0,013 pour l'ER $\alpha$  et de 0,25 pour l'ER $\beta$  (par compétition avec l'œstradiol).

L'octylphénol est beaucoup moins actif que l'œstradiol et de faibles concentrations ne devraient pas causer d'effets néfastes chez l'homme (Certa et coll., 1996). Cependant, puisqu'il est largement utilisé et présent dans l'environnement, il est possible que l'octylphénol s'accumule et que les concentrations retrouvées chez l'humain soient suffisantes pour causer des effets toxiques. L'octylphénol présenterait donc un risque pour la santé humaine (Blake et coll., 2004).

#### **2.4.2. Toxicité aiguë**

Plusieurs études se sont penchées sur la toxicité aiguë de l'octylphénol en suivant les lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économique (OCDE, 1994). Les résultats de ces études sont présentés au tableau 2-III.

Tableau 2-III : Toxicité aiguë de l'octylphénol

<b>Tests</b>	<b>Espèce</b>	<b>Résultat</b>
Toxicité aiguë orale	Rat Sprague-Dawley	DL50 > 2000 mg/kg
Toxicité aiguë orale	Souris	DL50 : 3210 mg/kg
Toxicité aiguë cutanée	Lapin	DL50 : 1880 mg/kg
Toxicité aiguë intrapéritonéale	Souris	DL50 : 25 mg/kg

Selon ces résultats, la toxicité aiguë de l'octylphénol serait relativement faible chez l'animal. Par ailleurs, des études effectuées chez le lapin ont cependant démontré que l'octylphénol est un léger irritant pour la peau et un irritant sévère pour les yeux. Il ne cause cependant pas de réaction d'hypersensibilité chez le cobaye. Enfin, aucune information n'est disponible sur la toxicité aiguë de l'octylphénol chez l'homme.

Au niveau environnemental, l'octylphénol est très toxique pour les organismes aquatiques, ce qui pourrait avoir certaines répercussions à plus long terme (OCDE, 1994).

### **2.4.3. Toxicité chronique**

Trois études de toxicité chronique ont été réalisées chez le rat. La première, chez le rat BOR/WISW, a été réalisée par gavage sur une période de 3 mois. Les résultats de cette étude ont permis d'obtenir une concentration sans effet nocif observé (CSENO) pour

l'octylphénol de 30 ppm et une concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) de 300 ppm. Les effets nocifs ont été observés au niveau du foie et des reins. La deuxième étude a été effectuée selon les lignes directrices japonaises, chez le rat Crj:CD (SD). Les rats ont été exposés à l'octylphénol par la voie orale (gavage) durant 28 jours consécutifs. La dose sans effet nocif observé obtenue dans cette étude est de 15 mg/kg/jour. Finalement, la dernière étude a été effectuée selon les lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Dans cette étude, des rats Sprague-Dawley ont été exposés à l'octylphénol par la voie orale (gavage) durant 29 jours consécutifs. La dose sans effet nocif observé (DSENO) obtenue dans cette étude est de 15 mg/kg/jour alors que la dose minimale avec effet nocif observé (DMENO) est de 150 mg/kg/jour. Dans cette étude, des atteintes au foie et aux reins ont été observées. Des injections sous-cutanées d'octylphénol chez des souris C57 durant neuf semaines ont causé une dépigmentation de la peau. Finalement, la toxicité chronique de l'octylphénol n'a pas été évaluée chez l'homme (OCDE, 1994).

#### **2.4.4. Reprotoxicité et toxicité néonatale**

L'octylphénol agit sur les processus de reproduction mâle et femelle et ces effets sont largement documentés dans la littérature (Blake et coll. 2004). Les effets semblent plus prononcés chez les mâles puisque les niveaux d'œstrogène basal sont plus bas. De nombreuses études de toxicité *in vivo* ont été réalisées. Des études animales ont démontré que l'administration d'octylphénol à des femelles gestantes ou à des nouveau-nés affectent les systèmes reproducteurs mâle et femelle chez l'adulte (Sharpe et coll., 1995; Blake et Ashiru, 1997; Atanassova et coll., 2000).

Les effets de l'octylphénol chez le mâle incluent une toxicité pour les cellules de Sertoli et les cellules spermatogéniques. L'octylphénol causerait également une diminution de la production de sperme. La quantité et la qualité de sperme seraient affectées et des malformations des organes reproducteurs auraient été détectées. Une étude de Blake et coll. (2004) a montré que l'administration d'octylphénol dans l'eau potable à des rats adultes ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  ou  $1 \times 10^{-9}$  M) augmente le nombre d'anomalies des spermatozoïdes, interfère avec la motilité des spermatozoïdes et diminue le nombre de spermatozoïdes comparativement aux animaux témoins. Par ailleurs, des études ont démontré que l'exposition de rats mâles adultes à l'octylphénol causerait un rétrécissement des testicules, des épидидymes et des glandes sexuelles accessoires mâles et pourrait également altérer leurs structures (Boockfor et Blake, 1997). L'étude de Blake et Boockfor (1997) a démontré que l'octylphénol modifie la sécrétion d'hormones sexuelles (LH, FSH, prolactine et testostérone) et diminue la quantité de spermatozoïdes chez des rats mâles exposés de façon sous-cutanée à l'octylphénol durant 2 mois (20 ou 80 mg/injection). L'octylphénol diminuerait les concentrations de LH, de FSH et de testostérone et augmenterait les concentrations de prolactine. Ces modifications hormonales sont associées à des diminutions de poids et des effets adverses sur les testicules, les épидидymes, la prostate et les vésicules séminales.

Chez les femelles, l'exposition à l'octylphénol causerait principalement des modifications dans le cycle reproducteur. Une étude de Herath et coll. (2001) a montré que l'octylphénol interfère avec le cycle reproducteur et diminue la montée d'hormones sexuelles (LH, FSH et prolactine) induite par l'œstradiol chez les femelles adultes lorsqu'elles avaient été exposées à la naissance à l'octylphénol de façon sous-cutanée (100 mg/kg de poids corporel). Des expositions répétées durant 4 semaines (20 ou 40 mg/injection) par la voie sous-cutanée chez des rats femelles adultes a causé une perturbation du cycle reproducteur et un œstrus permanent (Blake et Ashiru, 1997).

Cependant, aucune activité œstrogénique n'a été observée lors d'une étude multigénérationnelle chez des rats exposés à des niveaux de 0,2, 2, 20, 200 ou 2000 ppm d'octylphénol dans la nourriture (Tyl et coll., 1999).

Une étude de toxicité de la reproduction a été réalisée chez le rat par gavage à des doses de 125, 250 et 500 mg/kg d'octylphénol. Cette étude a permis d'obtenir une dose sans effet nocif observé de 500 mg/kg par jour pour la toxicité parentale et une dose sans effet nocif observé de 125 mg/kg pour la reproduction et le développement des descendants (OCDE, 1994).

## **2.5. Réglementations**

L'octylphénol a été inscrit sur la liste des substances devant faire l'objet de mesure prioritaire par la convention internationale OSPAR. Selon cette commission, les rejets d'octylphénol doivent cesser d'ici l'an 2020 afin que les concentrations d'octylphénol dans les milieux marins soient réduites au minimum (OSPAR, 2006).

Il n'existe pas de réglementation au sujet des niveaux permis d'octylphénol dans l'environnement ou en milieu de travail au Canada et ce, tant au niveau provincial que fédéral.



**CHAPITRE TROISIÈME:**  
**LA TOXICOCINÉTIQUE DE L'OCTYLPHÉNOL**

### **3. Chapitre troisième: La toxicocinétique de l'octylphénol**

Alors que la toxicité de l'octylphénol a été largement étudiée, peu de données sont disponibles sur la toxicocinétique de ce produit. En fait, seulement 2 études (Certa et coll., 1996 et Upmeier et coll., 1999) portent sur la toxicocinétique de l'octylphénol et aucune n'a étudié la toxicocinétique de l'octylphénol à la fois chez les mâles et les femelles. Les prochaines sections décriront l'état des connaissances sur le sujet.

#### **3.1. Absorption**

Les humains peuvent être exposés à l'octylphénol par l'eau, l'alimentation ou les activités aquatiques. L'absorption par la voie orale serait donc importante. L'octylphénol a été détecté dans le sang moins de 10 minutes après une administration orale par gavage, ce qui indique que son absorption par le tractus gastro-intestinal se fait rapidement (Certa et coll. 1996). En comparant les aires sous la courbe des concentrations sanguines d'octylphénol en fonction du temps chez des rats mâles Wistar, pour des expositions orale et intraveineuse, la biodisponibilité orale de l'octylphénol a été estimée à 2% (50 mg/kg) et 10% (200 mg/kg) (Certa et coll., 1996) alors que celle des rats femelles DA/Han était de 12,3% (50 mg/kg) et 8,4% (200 mg/kg) (Upmeier et coll., 1999).

L'octylphénol, qui possède un coefficient de partage octanol/eau (LogP) de 5,28 devrait être bien absorbé par inhalation. Cependant, comme l'octylphénol est très peu volatil, l'exposition par inhalation demeure négligeable. L'absorption dermale est également possible mais a été peu étudiée. Le LogP est en général un bon indicateur du potentiel d'absorption dermale d'un composé et comme ce coefficient est d'une valeur de 5,28 pour l'octylphénol, l'absorption dermale pourrait être importante. Cependant, l'absorption du

nonylphénol, un composé semblable à l'octylphénol et qui possède un LogP de 5,99, a été étudiée par Monteiro-Riviere et coll. (2000). Cette étude a comparé l'absorption dermale *in vitro* du nonylphénol chez le rat, le porc et l'humain et a démontré que seulement 1% du nonylphénol était absorbé par la peau après 8 heures d'exposition et qu'une fraction importante de la dose appliquée sur la peau reste dans la couche cornée. L'absorption dermale de l'octylphénol pourrait par conséquent être également négligeable.

### 3.2. Distribution

Une fois absorbé, l'octylphénol est distribué dans tout l'organisme par la circulation sanguine. Dans le sang, il se lierait aux protéines plasmatiques. Cependant, la fraction libre dans le sang varie d'une étude à l'autre. Selon Nagel et al. (1997; 1999), la fraction libre dans le sérum humain serait de 0,3%. La constante de dissociation (Kd) utilisée par Teeguarden et coll. (2004) pour simuler la liaison de l'octylphénol à l'albumine et nécessaire pour simuler la fraction libre de 0,3% rapportée par Nagel et coll. (1997; 1999) est de 0,5  $\mu\text{M}$  et celle pour la *sex-hormone-binding-globulin* (SHBG) est de 2  $\mu\text{M}$ . Ces auteurs ont également utilisé une constante de dissociation (Kd) de 13  $\mu\text{M}$  pour l' $\alpha$ -foeto-protéine ( $\alpha\text{FP}$ ) dans leur modèle bien que l'affinité de l'octylphénol pour l' $\alpha\text{FP}$  pourrait être inférieure. Heringa et coll. (2006) ont tenté de déterminer expérimentalement la concentration libre d'octylphénol avec de l'albumine bovine. Ces auteurs ont déterminé une constante d'affinité de  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (constante de dissociation = 0.1  $\mu\text{M}$ ).

La fraction d'octylphénol qui circule librement a un effet direct sur la distribution de l'octylphénol puisqu'elle détermine quelle quantité d'octylphénol est disponible pour les tissus cibles, particulièrement dans les tissus qui ont une faible capacité métabolique. Dans ces tissus, le métabolisme n'affecte pas la concentration qui est transportée dans le tissu et

la liaison aux protéines empêche le transport de l'octylphénol à travers la membrane biologique. Ainsi, seule la fraction libre d'octylphénol est disponible pour atteindre les récepteurs œstrogéniques ou pour être métabolisée (Lipscomb et Poet, 2008).

Puisque l'octylphénol est un composé très lipophile, il s'accumule principalement dans les tissus adipeux. Dans une étude de Certa et coll. (1996), des rats ont reçu des doses de 200 mg/kg par gavage. Cette étude a montré que l'octylphénol peut être distribué dans plusieurs tissus puisque les concentrations tissulaires obtenues dans cette étude étaient de 1285 ng/g pour les tissus adipeux, 87 ng/g pour le foie, 71 ng/g pour le rein, 43 ng/g pour le muscle, 9 ng/g pour le cerveau et 7 ng/g pour le poumon.

La distribution de l'OP serait probablement limitée par la diffusion et non par la perfusion, du moins dans certains tissus, en raison de son poids moléculaire non négligeable.

### **3.3. Métabolisme**

La figure 3-1 présente la voie métabolique de l'octylphénol. Celui-ci est rapidement métabolisé en métabolites de phase I ou de phase II. Le métabolisme a lieu principalement dans le foie mais également à moins grande échelle dans l'intestin, le rein et les testicules (Nomura et coll., 2008). Chez le rat, la réaction initiale est une conjugaison à l'acide glucuronique ou une hydroxylation de l'anneau aromatique et de la chaîne alkylée suivi d'une conjugaison à l'acide glucuronique. La conjugaison au sulfate est également possible (Van der Berg et coll., 2003).

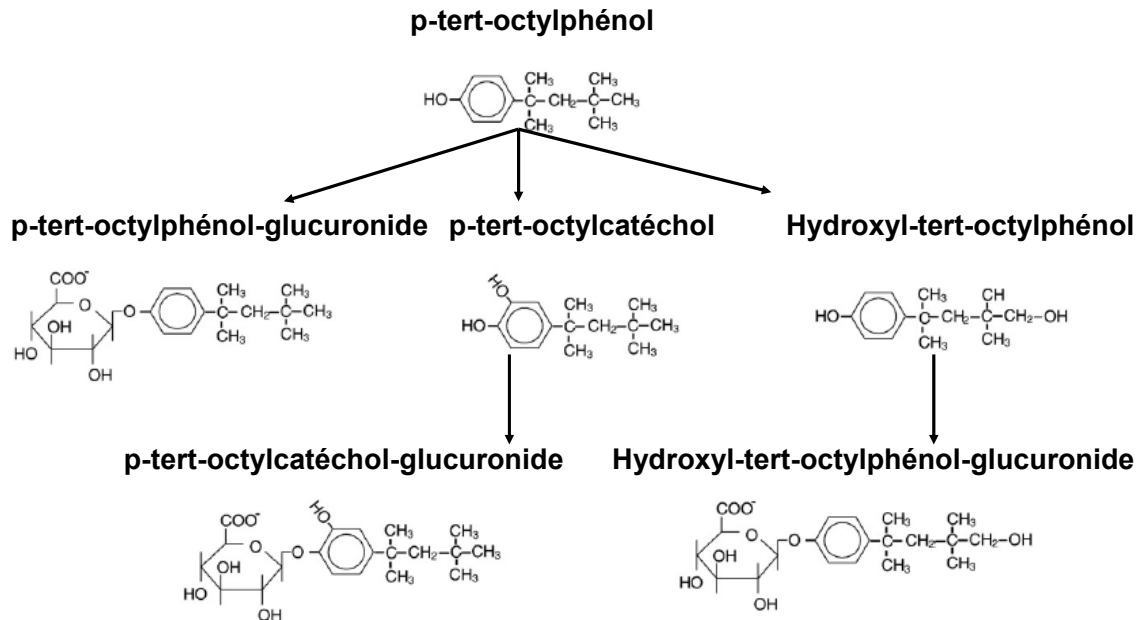


Figure 3-1: Voie métabolique de l'octylphénol. Modifié de Nomura et coll. (2008)

Des études *in vitro* (Pedersen et Hill, 2000a, 2000b) et *in vivo* (Pedersen et Hill, 2002) effectuées chez le poisson ont démontré que le métabolisme de l'octylphénol produit plusieurs intermédiaires oxydatifs. Ces intermédiaires pourraient avoir un rôle dans la toxicité de l'octylphénol.

Des études effectuées avec des inhibiteurs du cytochrome P-450 suggèrent que les isoformes CYP2K et CYP2M jouent un rôle dans le métabolisme du nonylphénol et de l'octylphénol chez le poisson. Ces enzymes sont similaires aux isoformes CYP1A, CYP2B et CYP3A des mammifères qui pourraient être impliquées dans le métabolisme de l'octylphénol (Pedersen et coll., 2000b). Chez le rat, ces enzymes sont particulièrement présentes chez les mâles, ce qui pourrait engendrer des différences liées au sexe au niveau du métabolisme (Van der Berg et coll., 2003). Hanioka et coll. (2000) ont étudié les effets

de l'octylphénol sur les enzymes hépatiques du rat. L'octylphénol a causé une diminution de l'activité de la testostérone 2 $\alpha$ -hydroxylase, associé à l'isoforme CYP2C11. L'activité de la testostérone 6 $\beta$ -hydroxylase, associée à l'isoforme CYP3A2 a également diminué.

Le métabolisme *in vitro* de l'octylphénol a été étudié à l'aide de microsomes et de cytosol issus de foies de rats Wistar mâles et il a été démontré qu'il est conjugué à l'acide glucuronique et au sulfate. Une vitesse maximale ( $V_{max}$ ) de 11,24 nmol/(min\*mg protéine microsomiale) et une constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de 8,77  $\mu$ mol/L ont été obtenues pour la glucuronidation de l'octylphénol alors qu'un  $V_{max}$  de 2,85 nmol/(min\*mg protéine microsomiale) et un  $K_m$  de 11,35  $\mu$ mol/L ont été obtenus pour la sulfatation (Certa et coll., 1996). Dans une autre étude effectuée à l'aide de microsomes obtenus de rats mâles Sprague-Dawley, Nomura et coll. (2008) ont obtenu un  $V_{max}$  de  $3,21 \pm 1,22$  nmol/min/mg protéine microsomiale et un  $K_m$  de 79  $\mu$ M pour la glucuronidation de l'octylphénol dans le foie. Les différences observées entre ces deux études seraient probablement causées par des différences de métabolisme entre les deux souches de rat étudiées. Ces mêmes auteurs ont également observé une activité métabolique dans d'autres tissus, soit un  $V_{max}$  de  $0,12 \pm 0,02$  nmol/min/mg protéine microsomiale et un  $K_m$  de 306  $\mu$ M pour le rein, un  $V_{max}$  de  $4,13 \pm 0,91$  nmol/min/mg protéine microsomiale et un  $K_m$  de 1241  $\mu$ M pour l'intestin, et un  $V_{max}$  de  $0,05 \pm 0,01$  nmol/min/mg protéine microsomiale et un  $K_m$  de 57  $\mu$ M pour les testicules (Nomura et coll., 2008).

La toxicocinétique suite à des expositions répétées a été étudiée chez des rats Wistar mâle ayant reçu de l'octylphénol par voie orale (gavage) durant 14 jours consécutifs (50 ou 200 mg/kg). Ces expériences ont démontré qu'aux doses étudiées, des expositions répétées n'entraînaient pas une augmentation des concentrations sanguines. Ces résultats montrent qu'il n'y aurait pas de bioaccumulation chez les rats recevant de faibles doses orales (Certa

et coll., 1996). Selon ces auteurs, le fait que la biodisponibilité de l'octylphénol soit plus importante à des doses orales élevées serait attribuable à l'effet de premier passage. Il y aurait donc une bioaccumulation chez le rat uniquement suite à des doses élevées provoquant une saturation du métabolisme de l'octylphénol.

La toxicocinétique de l'octylphénol a également été étudiée par Upmeier et coll. (1999) chez les rats DA/Han femelles après injections intraveineuses (5 mg/kg) et gavage (50 ou 200 mg/kg). Les concentrations sanguines maximales obtenues dans cette étude étaient 3 à 4,5 fois plus élevées que les concentrations obtenues dans l'étude de Certa et coll. (1996) chez les rats mâle Wistar.

### **3.4. Excrétion**

L'octylphénol est éventuellement excrété sous forme de conjugué à l'acide glucuronique et au sulfate (Upmeier et coll., 1999). La glucuronidation et la sulfatation sont considérées comme des mécanismes de détoxification puisqu'elles diminuent l'affinité de l'octylphénol au récepteur œstrogénique (Van der Berg et coll., 2003).

La demi-vie de l'octylphénol est relativement courte. La demi-vie d'élimination suite à une injection intraveineuse de 5 mg/kg d'octylphénol chez le rat Wistar mâle est de 310 minutes (5,2 heures) (Certa et coll., 1996) alors que celle obtenue chez le rat DA/Han femelle est de 36,1 heures (Upmeier et coll., 1999).

L'excrétion de l'octylphénol se fait par l'urine et la bile. Selon Certa et coll. (1996), la masse moléculaire du *p-tert*-octylphénol-glucuronide est de 381 et celle du conjugué sulfate est de 285. Ces masses moléculaires sont très près de la masse moléculaire qui détermine si les composés sont excrétés par l'urine ou la bile (300). Chez le rat, l'octylphénol serait donc principalement excrété par la bile. De plus, selon Upmeier et coll. (1999), le métabolisme de l'octylphénol chez les rats femelles DA/Han serait caractérisé par une importante recirculation entérohépatique alors que cet effet serait moins important chez le rat mâle (Certa et coll., 1996). Par contre, chez l'homme, les composés de masses moléculaires allant jusqu'à 475 sont surtout excrétés par l'urine. L'excrétion de l'octylphénol chez l'homme se ferait donc principalement par l'urine.



**CHAPITRE QUATRIÈME:**  
**OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE ET**  
**DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE**

## **4. Chapitre quatrième : Objectifs du projet de recherche et démarche expérimentale**

Ce projet de recherche s'inscrit dans un projet plus large intitulé "A novel pharmacokinetic-gene expression model for toxicological risk assessment of endocrine-disrupting chemical" dont l'objectif était de développer un modèle toxicocinétique et toxicodynamique à base physiologique pour les 2 sexes qui intégrerait les profils d'expression génétique pour l'exposition aux perturbateurs endocriniens. Les objectifs spécifiques du projet étaient de 1) caractériser l'affinité de l'octylphénol pour les récepteurs d'œstrogènes, 2) caractériser la toxicocinétique de l'octylphénol chez des rats des deux sexes, 3) développer un modèle toxicocinétique à base physiologique pour l'octylphénol, 4) caractériser la relation dose-réponse de l'octylphénol chez des rats mâles et femelles, 5) caractériser les profils d'expression génétique pour l'exposition à l'octylphénol et 6) développer un modèle toxicodynamique pour les rats mâles et femelles qui intègre toutes les données obtenues. Nous avons la responsabilité des volets 2 et 3 de ce projet.

### **4.5. Objectifs**

#### **4.5.1. Objectif général**

L'objectif principal de ce projet était de caractériser la toxicocinétique de l'octylphénol chez le rat Sprague-Dawley mâle et femelle suite à des expositions intraveineuse, orale et sous-cutanée afin d'évaluer le risque sur la reproduction chez les 2 sexes.

### **4.5.2. Objectifs spécifiques**

Les objectifs spécifiques du présent projet étaient de réaliser une étude chez le rat Sprague-Dawley mâle et femelle exposés à l'octylphénol afin de :

1. développer une méthode d'identification de l'octylphénol dans le sang et les tissus à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse jumelée à la spectrométrie de masse,
2. caractériser la toxicocinétique de l'octylphénol chez le rat mâle et femelle dans le sang et les tissus suite à des expositions intraveineuse, orale et sous-cutanée,
3. évaluer les paramètres de biotransformation et de liaison de l'octylphénol.
4. développer un modèle toxicocinétique à base physiologique permettant de simuler les concentrations sanguines et tissulaires d'octylphénol obtenues chez les rats.

### **4.6. Démarche expérimentale**

La démarche expérimentale qui a été utilisée est intégrée aux articles présentés aux chapitres 6, 7 et 8. Ces articles présentent également les résultats obtenus tout en les analysant et en les discutant. Nous présentons dans les pages suivantes un bref résumé du protocole expérimental.

## **4.6.1. Scénario d'exposition**

### **4.6.1.1. Exposition aiguë**

Des groupes de 5 rats mâles et 5 rats femelles ont été exposés de façon aiguë par les voies intraveineuse, orale ou sous-cutanée à l'octylphénol. Lors des expositions intraveineuses, les rats ont reçu des doses de 2, 4 et 8 mg/kg de poids corporel d'octylphénol. Lors des expositions orales (gavage), les rats ont reçu des doses de 50, 125 et 250 mg/kg de poids corporel alors que pour les expositions sous-cutanées, seule une dose de 125 mg/kg de poids corporel d'octylphénol a été administrée.

Des échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine de la queue à divers intervalles jusqu'à 4 heures pour les expositions intraveineuses ou 24 heures pour les expositions orales ou sous-cutanées après le début des expositions afin de mesurer la concentration d'octylphénol.

Des groupes d'animaux ayant été exposés de façon similaire ont été sacrifiés 1 heure et 3 heures (intraveineux) ou 4 heures et 24 heures (oral) après le début des expositions et divers tissus (cerveau, foie, muscle, rein, tissus adipeux, utérus, ovaire, épидидyme, testicule) ont été prélevés. Les échantillons de tissus ont été conservés à une température de -80°C jusqu'à ce qu'ils soient analysés.

#### **4.6.1.2. Expositions répétées**

Des groupes de 5 rats mâles et de 5 rats femelles ont également été exposés de façon répétée par voie orale (gavage) durant 35 jours (femelles) ou 60 jours (mâles) consécutifs. La durée des expositions répétées a été déterminée en fonction du nombre de cycles œstral ou spermatogénétique nécessaires pour évaluer adéquatement la présence d'effets œstrogéniques.

Des échantillons de sang ont été prélevés 1 heure et 4 heures après le début de l'exposition, le premier jour d'exposition, ainsi que 1 heure après le début du dernier jour d'exposition. La concentration d'octylphénol a été analysée dans ces échantillons.

Divers tissus (gras, foie, testicule, épидидyme, utérus, ovaire) ont été prélevés 24 heures après la fin des expositions et leur concentration d'octylphénol a été mesurée. Les tissus ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

#### **4.6.2. Mesure de l'octylphénol dans le sang et les tissus**

Une nouvelle méthode analytique a été développée dans le cadre de ce projet de recherche afin de quantifier la concentration d'octylphénol dans diverses matrices biologiques. En résumé, des échantillons de sang, de tissus (dilution 1 : 3 dans la saline) ou de microsomes ont été extraits en milieu acide avec du méthyle tert-butyle éther. Le *p-tert*-butylphénol a été utilisé à titre de standard interne. Une fois extraits, les échantillons ont été agités mécaniquement puis centrifugés. La couche organique a été transférée dans un tube conique en borosilicate. Les échantillons ont alors été placés sous un léger jet d'azote

jusqu'à évaporation. L'octylphénol et le *p-tert*-butylphénol ont alors été dérivés (acétylation) par une réaction impliquant l'anhydride acétique et la pyridine. Les concentrations d'octylphénol et de *p-tert*-butylphénol dérivés ont été mesurées à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse jumelé à un spectre de masse. Finalement, nous avons validé la méthode en déterminant les coefficients de variation, les limites de détection et de quantification et, en vérifiant la stabilité et la linéarité de la méthode.

### **4.6.3. Étude du métabolisme de l'octylphénol**

Du tissu hépatique (microsomes) a servi à caractériser les paramètres de biotransformation de l'octylphénol chez le rat.

#### **4.6.3.1. Préparation des microsomes**

Des groupes de rats mâles et femelles ont été exsanguinés. Les foies ont été prélevés, pesés et homogénéisés en présence de tampon Tris-KCl. Les homogénats ont été centrifugés à deux reprises (10000 x g, 20 minutes à 4°C et 105000g, 60 minutes à 4°C) et le culot a été suspendu dans du tampon Tris-acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA)-sucrose, homogénéisé puis centrifugé (105000g, 60 minutes à 4°C). Les culots ont été suspendus à nouveau dans du tampon Tris-EDTA-sucrose puis les solutions des groupes de rats de même sexe ont été mélangées et leurs concentrations en protéines (microsomes) ont été mesurées grâce à la méthode de Lowry et coll. (1951). Finalement, les microsomes ont été congelés à -80°C jusqu'à l'utilisation (St-Pierre et coll., 2005).

#### 4.6.3.2. Étude du métabolisme oxydatif microsomial

Du tampon phosphate 0,1 M contenant du EDTA, du glucose-6-phosphate (G-6-P), du G-6-P déhydrogénase et du chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) ainsi que du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP+) ont été introduits dans des tubes en verre. Les tubes ont été pré-incubés à 37.5°C pour 10 minutes. Différentes concentrations d'octylphénol ont été ajoutées aux tubes ainsi qu'une quantité de 1 mg/ml de protéines microsomiales. Les protéines servent à démarrer la réaction. Après une incubation de 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes à 37.5°C, la réaction a été arrêtée avec du HCl (16µl). La concentration d'octylphénol inchangé a ensuite été mesurée par GC-MS en utilisant le *p-tert*-butylphénol comme standard interne. Des échantillons témoins contenant des microsomes dénaturés ont également été analysés.

### 4.7. Modélisation toxicocinétique à base physiologique

Un modèle toxicocinétique à base physiologique a été développé afin de simuler la toxicocinétique de l'octylphénol chez le rat Sprague-Dawley mâle et femelle. Le modèle a permis de décrire/prédire les concentrations d'octylphénol dans le sang et les tissus suite à des expositions intraveineuse, orale et sous-cutanée. Les compartiments décrits sont le gras, le foie, les muscles, les organes sexuels, les tissus richement perfusés et les tissus faiblement perfusés et sont reliés entre eux par la circulation sanguine. Le modèle permet de décrire l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion de l'octylphénol suite à une exposition par gavage, par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse et a été validé à l'aide de concentrations sanguines et tissulaires mesurées chez le rat lors de cette étude. Le modèle a été écrit à l'aide du logiciel ACSLXtreme (Advanced Continuous Simulation Language).

Une analyse de sensibilité a également été effectuée afin d'identifier les paramètres du modèle ayant une influence sur la cinétique de l'octylphénol dans le sang. L'approche consistait à faire varier la valeur de chaque paramètre du modèle et de vérifier l'influence de cette modification sur la valeur de la concentration sanguine d'octylphénol. L'analyse de sensibilité a permis de vérifier l'impact des modifications pouvant affecter les fonctions physiologiques et donc d'avoir un impact sur la toxicocinétique de l'octylphénol.



**CHAPITRE CINQUIÈME:  
PRÉSENTATION DES ARTICLES**

## 5. Chapitre cinquième : Présentation des articles

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse de doctorat sont présentés sous la forme de trois articles scientifiques. Le premier article intitulé "Determination of *p-tert*-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry" porte sur la méthode développée pour mesurer l'octylphénol dans le sang et divers tissus. Cet article a été publié dans la revue "Journal of Analytical Toxicology" en mai 2008. Le deuxième article intitulé "Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral or subcutaneous exposure" décrit les résultats obtenus suite aux expériences effectués chez les animaux de laboratoire. Les résultats ou une partie des résultats de cet article ont été présentés dans les événements suivants : aux 37<sup>ème</sup>, 38<sup>ème</sup> et 39<sup>ème</sup> colloque de la Société de Toxicologie du Canada à Montréal (2004, 2005 et 2006), au colloque annuel du Centre Toxen à Montréal (2005), au 9<sup>ème</sup> colloque annuel du Chapitre Saint-Laurent à Montréal (2005), au 1<sup>er</sup> colloque étudiant en Santé Publique à Montréal (2006), au 45<sup>ème</sup> congrès annuel de la Society of Toxicology à San Diego (2006), au 1<sup>er</sup> colloque annuel du Réseau de recherche en santé environnementale à Montréal (2006) et au 11<sup>ème</sup> Congrès International de Toxicologie à Montréal (2007). Cet article a été publié dans la revue "Journal of Toxicology and Environmental Health" en janvier 2009. Finalement, le troisième article intitulé "Physiologically-based modeling of *p-tert*-octylphenol kinetics following intravenous, oral or subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats" porte sur le modèle toxicocinétique à base physiologique développé pour l'octylphénol. Ce modèle a fait l'objet de deux présentations : 47<sup>ème</sup> congrès annuel de la Society of Toxicology à Seattle (2008) et au 3<sup>ème</sup> colloque annuel du Réseau de recherche en santé environnementale à Laval (2008). Cet article sera soumis prochainement.

**CHAPITRE SIXÈME:**  
**DETERMINATION OF *P-TERT*-OCTYLPHENOL IN**  
**BLOOD AND TISSUES BY GAS**  
**CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS**  
**SPECTROMETRY.**

## **6. Chapitre sixième: Determination of *p-tert*-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry.**

G. Hamelin<sup>1</sup>, G. Charest-Tardif<sup>1</sup>, K. Krishnan<sup>1</sup>, D.G. Cyr<sup>2</sup>, M. Charbonneau<sup>2</sup>, P.J. Devine<sup>2</sup>, S. Haddad<sup>3</sup>, G. M. Cooke<sup>4,5</sup>, T. Schrader<sup>4</sup> and R. Tardif<sup>1</sup>

1. Département de santé environnementale et santé au travail. Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
2. INRS-Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, Pointe Claire, Québec, Canada.
3. Département des sciences biologiques. Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.
4. Toxicology Research Division, Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada, Sir Frederick G. Banting Research Centre, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario, Canada
5. Departments of Cellular and Molecular Medicine and Obstetrics and Gynecology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada.

Please address correspondence to:

Robert Tardif, Ph. D.

Département de santé environnementale et santé au travail

Université de Montréal

2375, Chemin de la Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada, H3T 1A8

Tel.: (514) 343-6111 ext. 1515, Fax: (514) 343-2200, E-mail: [robert.tardif@umontreal.ca](mailto:robert.tardif@umontreal.ca)

## ABSTRACT

A sensitive and reproducible procedure using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) is described for the determination of *p-tert*-octylphenol (OP), a persistent degradation product of alkylphenol ethoxylates that binds to the oestrogen receptor, in blood and tissues. The first step involves extraction of blood (200  $\mu$ l) or tissue homogenate (400  $\mu$ l) with methyl *tert*-butyl ether including *p-tert*-butylphenol (BP) as internal standard. After extraction, the sample is evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen at 45 °C and OP and BP are derivatized with an acetylation reaction involving acetic anhydride and catalyzed by pyridine. Samples are then analyzed by a gas chromatograph equipped with a mass spectrometer (single ion monitoring) with a Varian VF-5ms capillary column. The limit of detection and the limit of quantification of the method in blood are 4.6 and 15.5 ng/ml, respectively. The linearity and the reproducibility of the method were found acceptable with coefficients of variation of approximately 10% for blood and ranging between 9 and 27% for tissues. This method was applied for the determination of unchanged OP in blood and tissues obtained from Sprague-Dawley rats after oral and IV OP administration.

Keywords: *p-tert*-octylphenol, analytical method, GC-MS, biological samples, Sprague-Dawley rats, toxicokinetics.

## INTRODUCTION

*p*-*tert*-Octylphenol (OP) is a persistent degradation product of alkylphenol ethoxylates that has been found as an environmental contaminant in several sites including wastewater and river water.<sup>(1,2)</sup> OP has been reported to act as a weak estrogenic compound (*in vivo* and *in vitro*) by binding to the estrogen receptor.<sup>(3,4)</sup>

The potential for human exposure to OP is great because of its extensive use in phenol synthesis, waste water processing, sewage treatment and emulsion polymerization. OP is found in many consumer products, including detergents, vinyl paints, electrical insulating varnishes, pesticides, ink, paper and tires.<sup>(5)</sup> Trace amounts of OP have been found in human blood samples.<sup>(6,7)</sup> OP has been measured in biological matrices by using gas chromatography or high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with various detection techniques. For example, Certa et al.<sup>(8)</sup> analysed OP in blood and tissue samples by GC-MS subsequent to liquid/liquid extraction with methyl *tert*-butyl ether. Inoue et al.<sup>(6)</sup> determined OP concentrations in human plasma and serum samples by a solid-phase extraction (SPE) method coupled with reverse-phase HPLC with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. Kawaguchi et al.<sup>(7)</sup> measured OP in human urine and plasma samples by stir bar sorptive extraction coupled with thermal desorption and GC-MS. Liu et al.<sup>(9)</sup> developed an online liquid chromatography coupled with photodiode array detection and mass spectrometry with restricted access media pre-column and dilution line for the determination of OP in serum samples. Yang et al.<sup>(10)</sup> analysed OP in biological samples using direct immersion solid phase microextraction and headspace on-fiber silylation coupled with GC-MS. Ye et al.<sup>(11)</sup> measured OP in breast milk using isotope dilution online SPE coupled with HPLC-tandem mass spectrometry (MS/MS). Some of these methods are time consuming and require relatively large amounts of sample to achieve the desired sensitivity while others require expensive apparatus.

Moreover, the majority of these methods did not exist when the research project started and only the method proposed by Certa et al.<sup>(8)</sup> measured OP concentrations in tissue samples. Unfortunately, we were unable to reproduce successfully the method proposed by Certa et al.<sup>(8)</sup> because the organic layer had to be concentrated to 100  $\mu$ l, which introduced variability. Also, OP concentrations were increasing over time, and the reported recovery of the method (50.27 to 65.67%) was not satisfactory.

Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) is a common technique for the determination of phenol compounds that allows the measurement of analytes in different biological matrices. Its main advantages are simplicity and sensitivity. This technique is usually paired with a derivatization in order to have sharper peaks and a high sensitivity.<sup>(12)</sup>

This paper describes a highly sensitive method for the quantitative determination of OP in biological samples with a GC-MS. This method can be used for precise, accurate and cost-effective analysis of large numbers of samples. It was applied to analyse blood and tissue samples obtained from Sprague-Dawley rats exposed to OP either by gavage or IV injection.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

4-*tert*-Octylphenol (97%), 4-*tert*-butylphenol (99%), Propylene glycol (1,2-propanediol; 99,5%), methyl *tert*-butyl ether (99%), acetic anhydride (98%), pyridine (98%) and hydrochloric acid (37%) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Oakville, Ontario, Canada). Alkamuls (EL-620) was purchased from Debros (Dorval, Quebec, Canada).

### **Animals**

Male (240-260 g) and female (170-190 g) Sprague-Dawley rats were used. They were housed in a humidity and temperature (20-22°C) controlled room with a 12h light/dark cycle. Animals had free access to food and tap water until the beginning of the experiment. All experiments were done in accordance with the guidelines of the animal ethics committee of the Université de Montréal.

### **Animal treatment**

Male Sprague-Dawley rats (n=2) were given a single dose of OP either orally (5 mg/ kg) or by intravenous (IV) injection (jugular vein) (5 mg/kg). Propylene glycol (oral) and alkamuls (20%, IV) were used as vehicle. Blood samples were collected from the tail vein for up to 3 h (IV) or 5 h (oral) post-exposure and analysed for OP content. Blank blood samples were collected from untreated animals on the day of the experiment.



### **Biological samples**

Blood and tissues were obtained from Sprague-Dawley rats sacrificed using isoflurane (CDMV; St-Hyacinthe, Quebec, Canada). Blood samples were stored in the refrigerator and analyzed within 24 hours. All tissue samples were stored at -80°C until analysis. Blood was collected from the tail vein.

### **Standard solutions**

Standard solutions were prepared daily. 50 µl of OP solutions ranging from 60 to 1600 ng OP/ml were added to 200 µl of control blood or 400 µl of tissue homogenate with final concentrations ranging from 15 to 400 ng OP/ml of blood or 30 to 800 ng OP/g of tissue.

### **Analysis of OP in blood**

In a stoppered conical glass tube, hydrochloric acid (300 µl; 0.15 M) was added to blood (200 µl) samples in order to adjust the pH to around 2. Samples were then extracted with methyl *tert*-butyl ether (5 ml). *p-tert*-Butylphenol (BP) was used as internal standard. The samples were then vortexed for 30 seconds, shaken for 10 minutes and centrifuged for 10 minutes (2400 rpm at 4 °C). The organic layer was then transferred to a conical borosilicate tube. The sample was evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen in a dry bath maintained at 45 °C. Acetic anhydride (90 µl) and pyridine (10 µl) were added and the mixture was vortexed for 5 seconds and then heated for 20 minutes at 45 °C. Acetylated OP and BP were then determined by GC/MS analysis.

### **Analysis of OP in tissues**

Tissue samples were diluted (1:3) in NaCl (0.9%) and homogenized with a Polytron homogenizer (Kinematika; Kriens-Luzern, Switzerland). Tissue homogenate (400 µl) samples were then treated as described for blood samples except that the pH was adjusted to 2 by the addition of 100 µl of hydrochloric acid (0.08 M for fat, 0.30 M for muscles and kidney and 0.15 M for all other tissues) and that derivatization was carried out with 75 µl of acetic anhydride and 25 µl pyridine.

### **GC-MS conditions**

OP and BP concentrations were determined by a gas chromatograph equipped with a mass spectrometer (single ion monitoring) and a Varian VF-5ms capillary column (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm). The oven temperature was maintained at 100 °C for 1.5 min and then increased at a rate of 25°C/min to 280°C. The analytical system used was a Varian 3900 gas chromatograph coupled with a Saturn 2100 T (ion trap) mass spectrometer and a CP 4800 auto sampler. The mass detector operated in electron impact at 70 eV in full scan mode, acquiring ions of m/z 100 to 260. The quantitation was based on the ratio of the major fragment (135) of BP and OP at their respective retention time, according to the method of Certa et al.<sup>(7)</sup>

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Specificity**

The proposed analytical method was satisfactory for the quantitative determination of OP. The specificity of the method was demonstrated by analyzing blank blood samples and no significant interfering signals were found at the OP and BP retention times. A typical chromatogram of blood obtained from an exposed rat is shown in Figure 6-1. Typical mass spectra for BP and OP are presented in Figure 6-2 and Figure 6-3. The retention time of BP was around 5 min while the retention time of OP was around 6.5 min.

### **Linearity**

The linearity of the method was studied using concentrations ranging from 15 to 400 ng OP/ml in blood and from 30 to 800 ng OP/g of tissues. The correlation coefficient in blood varied between 0.9928 and 0.9988 (mean: 0.9961) based on 5 samples injected twice. In tissues, the correlation coefficient varied between 0.9904 and 0.9999 (mean: 0.9953).

### **Coefficients of variation**

Within-day coefficients of variation (CV) were analysed by evaluating the standard-deviation of 10 spiked samples of identical concentration. The concentrations used were 14.9 ng OP/ml of blood or 29.8 ng OP/g of tissues. Day-to-day CVs (blood only) were determined by analyzing the same 10 samples, stored in the refrigerator, over 5 consecutive days. The CVs are presented in Table 6-I and Table 6-II. Within-day CVs are about 10% for blood and range between 9 and 27% (mean: 16.7%) for tissues. Results of the CVs

indicate that the proposed analytical method is precise and can be used effectively for the quantitation of OP in tissue and blood samples.

### **Recovery and reaction time**

OP concentrations in blood were compared after different incubation time for the acetylation reaction (20 to 120 min). The reaction time for acetylation was optimized at 20 minutes (Figure 6-4). The analytical recovery was calculated with both a low and a high OP concentration for blood and tissues and expressed as the concentration of a spiked sample divided by the theoretical sample concentration (%). The samples were spiked after extraction but before evaporation. The results are presented in Table 6-I. The recovery was acceptable for blood and most tissues studied.

### **Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ)**

The LOD and LOQ values obtained by the proposed method are presented in Table 6-III. The LOD is defined as the concentration equal to 3 times the standard deviation of the lowest standard, based on 10 replicate measurements. The LOD is 4.6 ng OP/ml for blood OP and ranges for tissue samples from 7 (kidney) to 34 (muscle) ng OP/g of tissue (mean = 18 ng OP/g of tissue).

The LOQ is defined as the concentration equal to 10 times the standard deviation of the lowest standard, based on 10 replicate measurements. The LOQ for blood OP is 15 ng OP/ml and for tissue samples ranges from 22 (kidney) to 113 (muscle) ng OP/g of tissue (mean = 60 ng OP/g of tissue). The LOD and LOQ associated with other procedures reported in the literature are comparable.

### **Stability and preservation of blood samples**

OP and BP stock solutions, diluted in methanol, were stable for at least 5 months when stored in the refrigerator. The effect of preservation of blood samples on OP determination was studied. Blood samples collected from the abdominal aorta were obtained from 5 Sprague-Dawley rats 4 hours after p.o. administration. Standard solutions were prepared daily and OP blood concentrations were measured in the samples on the same day and compared to the concentrations measured either after keeping the samples on ice for less than 6 hours or storing the samples for 2 days in the refrigerator or 2 days in the freezer (-80°C). The results are presented in Figure 6-5 and demonstrate that blood OP concentrations were stable.

### **Kinetics of unchanged OP in blood**

The method was applied to study the kinetics of unchanged OP in blood. The mean blood OP concentrations ( $\pm$  SD) measured in male Sprague-Dawley rats up to 5 h after the onset of exposure following a single oral dose of 5 mg OP /kg and up to 3 h after the onset of exposure following a single IV dose of 10 mg OP/kg are shown in Figure 6-6. These results show that there was a rapid decline in OP concentrations following oral and IV exposure. The mean maximal blood concentration ( $C_{max}$ ) were measured 1 h after oral administration ( $730 \pm 14$  ng OP/ml) or 15 minutes after IV administration ( $1313 \pm 65$  ng OP/ml).

## CONCLUSION

In conclusion, the analytical method described in this paper enables the precise determination of OP in biological samples by GC-MS. The proposed method has many advantages including its simplicity and small volume sample (blood: 200  $\mu$ l and tissues: 100 mg). Another advantage is the relatively low cost compared to other methods. About 50 samples per day can be analyzed in this way in a single GC-MS apparatus equipped with an autosampler. The availability of autosamplers that allow automated sampling and injection renders this technique attractive especially when many samples have to be analyzed.

Acknowledgements: The authors wish to thank Johanne Couture and Mylène Beaudoin for their excellent technical assistance. Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is gratefully acknowledged. G. H. is a recipient of a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

## REFERENCES

1. T. Isobe and H. Takada. Determination of degradation products of alkylphenol polyethoxylates in municipal wastewaters and rivers in Tokyo, Japan. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(3):599-605 (2004).
2. D. Voutsas, P. Hartmann, C. Schaffner and W. Giger. Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13(5):333-41 (2006).
3. S.C. Laws, S.A. Carey, J.M. Ferrell, G.J. Bodman and R.L. Cooper. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol. Sci.* 54(1):154-67 (2000).
4. S.J. Kwack, O. Kwon, H.S. Kim, S.S. Kim, S.H. Kim, K.H. Sohn, R.D. Lee, C.H. Park, E.B. Jeung, B.S. An and K.L. Park. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65(5-6):419-31 (2002).
5. OSPAR Commission (Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic). Hazardous Substances Series: Octylphenol. 32 pp. (2006)
6. K. Inoue, Y. Yoshimura, T. Makino and H. Nakazawa. Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. *Analyst.* 125(11):1959-61 (2000).

7. M. Kawaguchi, K. Inoue, N. Sakui, R. Ito, S. Izumi, T. Makino, N. Okanouchi and H. Nakazawa. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol in human biological samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 799(1):119-25 (2004).
8. H. Certa, N. Fedtke, H.J. Wiegand, A.M. Muller and H.M. Bolt. Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in male Wistar rats. *Arch. Toxicol.* 71(1-2):112-22 (1996).
9. M. Liu, Y. Hashi, F. Pan, J. Yao, G. Song and J.M. Lin. Automated on-line liquid chromatography-photodiode array-mass spectrometry method with dilution line for the determination of bisphenol A and 4-octylphenol in serum. *J. Chromatogr. A.* 1133(1-2):142-8 (2006).
10. L. Yang, C. Lan, H. Liu, J. Dong and T. Luan. Full automation of solid-phase microextraction/on-fiber derivatization for simultaneous determination of endocrine-disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 386(2):391-7 (2006).
11. X. Ye, Z. Kuklenyik, L.L. Needham, A.M. Calafat. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 831(1-2):110-5 (2006).
12. M. Kawaguchi, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, S. Izumi, T. Makino, and H. Nakazawa. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic



xenoestrogens in human urine samples. *J. Chromatogr. B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.* 820(1):49-57 (2005).

Table 6-I: Within-day coefficient of variation and recovery of OP for blood and different tissues (n=10)

Tissues	Spiked OP concentration	Measured OP concentration (Mean $\pm$ SD)	Within-day CVs	OP recovery
Blood	14.9 ng/ml	15.5 $\pm$ 1.5 ng/ml	10.0%	121.9%
	44.7 ng/ml	40.7 $\pm$ 2.7 ng/ml	6.6%	110.5%
	402.2 ng/ml	403.2 $\pm$ 75.8 ng/ml	18.8%	97.5%
Fat	29.8 ng/g	29.3 $\pm$ 7.0 ng/g	23.7%	88.3%
	268.1 ng/g	263.7 $\pm$ 23.7 ng/g	9.0%	70.4%
Testes	29.8 ng/g	31.5 $\pm$ 4.6 ng/g	14.7%	72.1%
	268.1 ng/g	248.1 $\pm$ 33.5 ng/g	13.5%	68.1%
Muscle	29.8 ng/g	47.4 $\pm$ 11.3 ng/g	23.9%	50.5%
	266.7 ng/g	265.5 $\pm$ 73.7 ng/g	27.7%	85.1%
Liver	29.8 ng/g	28.9 $\pm$ 6.7 ng/g	23.2%	77.9%
	266.7 ng/g	234.8 $\pm$ 29.7 ng/g	12.6%	82.3%
Kidney	29.8 ng/g	26.2 $\pm$ 2.2 ng/g	8.5%	61.9%
	266.7 ng/g	228.0 $\pm$ 41.5 ng/g	18.2%	50.4%
Brain	29.8 ng/g	29.5 $\pm$ 4.9 ng/g	16.6%	80.7%

	266.7 ng/g	246.1 ± 23.9 ng/g	9.6%	88.6%
Uterus	29.8 ng/g	24.6 ± 4.9 ng/g	20.0%	78.8%
	266.7 ng/g	276.7 ± 35.2 ng/g	12.7%	98.8%

Table 6-II: Day to day coefficient of variations of OP in blood (n=10)

Tissues	Spiked OP concentration	Measured OP concentration (Mean $\pm$ SD)	Day-to-day CVs
Blood	14.8 ng/ml	15.6 $\pm$ 1.4 ng/ml	9.7%
	133.5 ng/ml	123.9 $\pm$ 12.5 ng/ml	11.1%

Table 6-III: Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of OP for blood and different tissues

Tissues	LOD	LOQ
Blood	4.6 ng/ml	15.5 ng/ml
Fat	20.9 ng/g	69.5 ng/g
Testes	13.9 ng/g	46.3 ng/g
Muscle	34.0 ng/g	113.2 ng/g
Liver	20.2 ng/g	67.2 ng/g
Kidney	6.7 ng/g	22.3 ng/g
Brain	14.7 ng/g	48.9 ng/g
Uterus	14.7 ng/g	49.1 ng/g

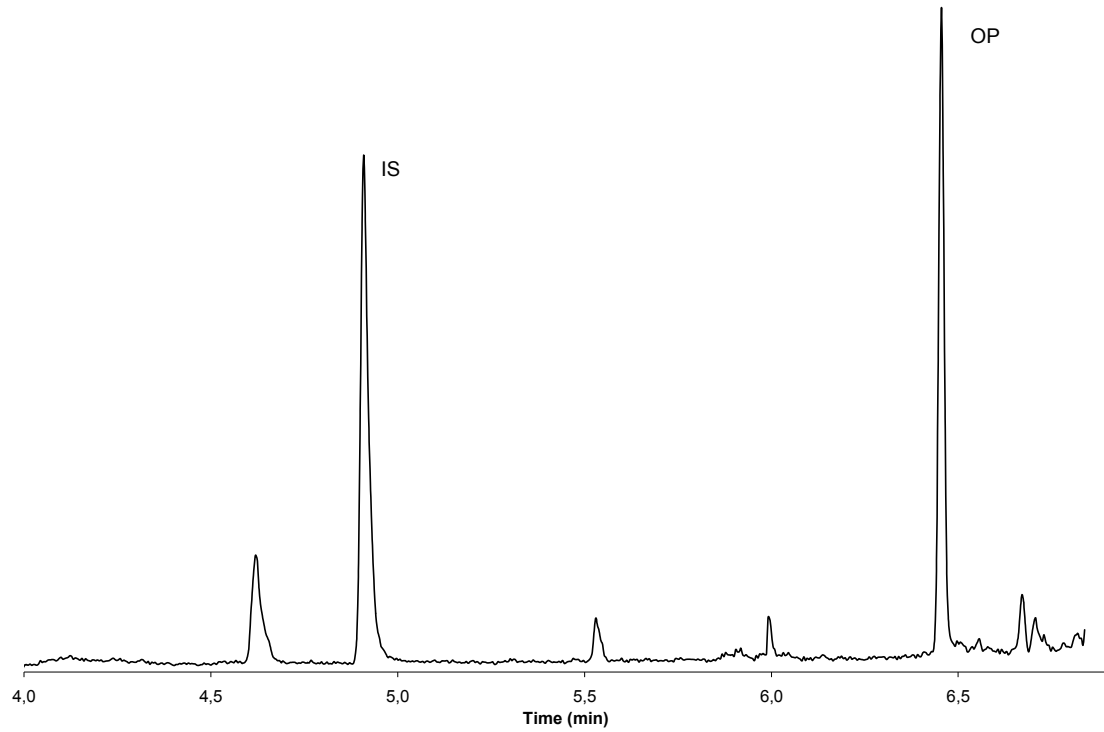


Figure 6-1: Typical chromatogram obtained at 135 m/z from a blood sample spiked with OP at a concentration of 133,3 ng/ml

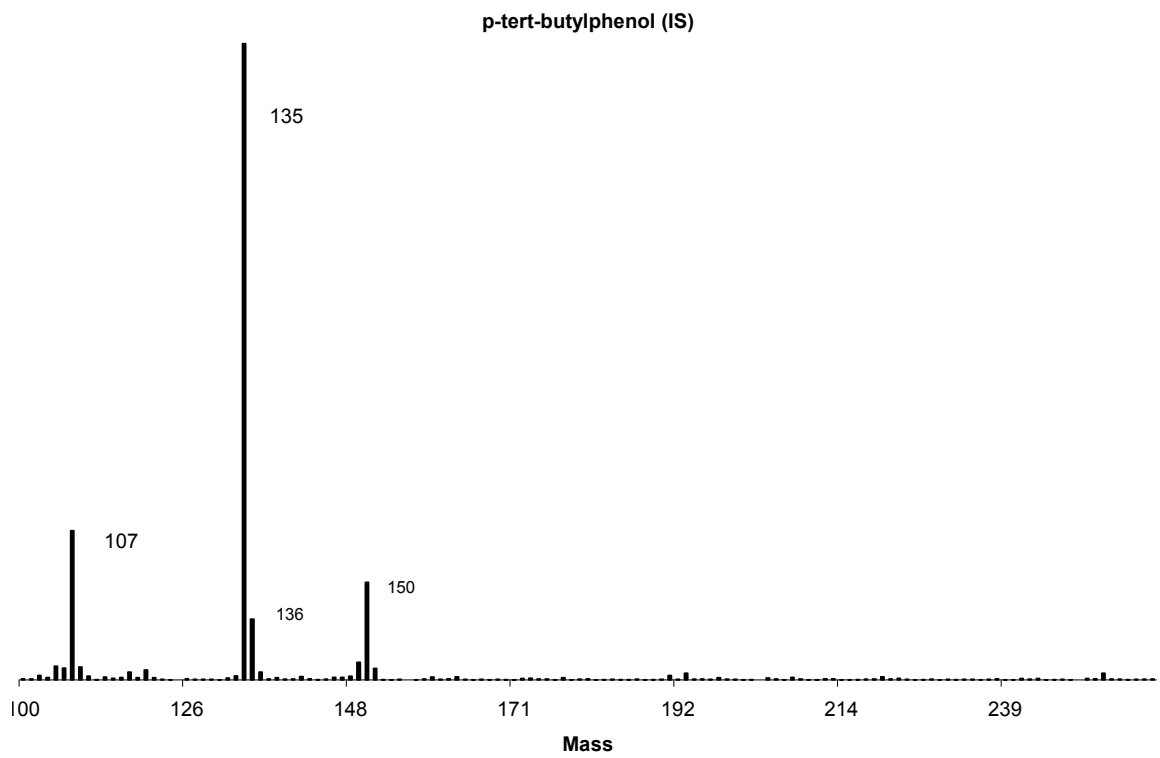


Figure 6-2: Mass spectra of *p-tert*-butylphenol obtained from a blood sample spiked with OP at a concentration of 133,3 ng/ml

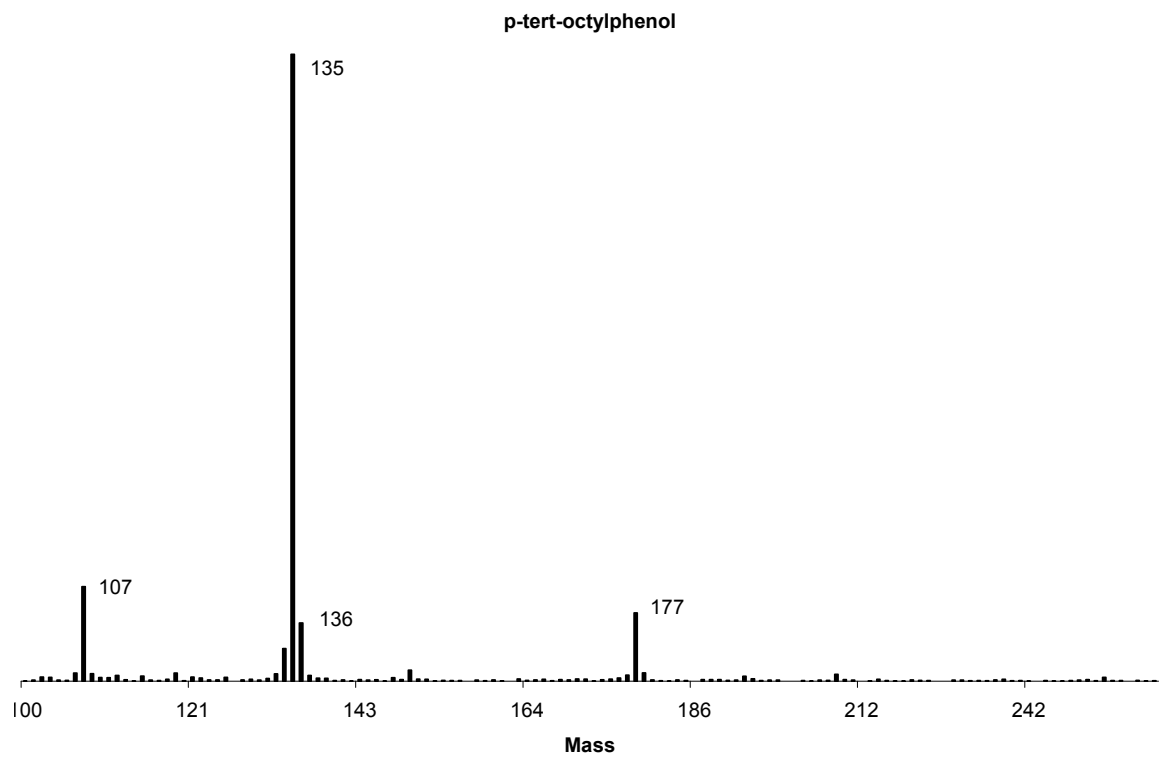


Figure 6-3: Mass spectra of *p-tert-octylphenol* obtained from a blood sample spiked with OP at a concentration of 133,3 ng/ml



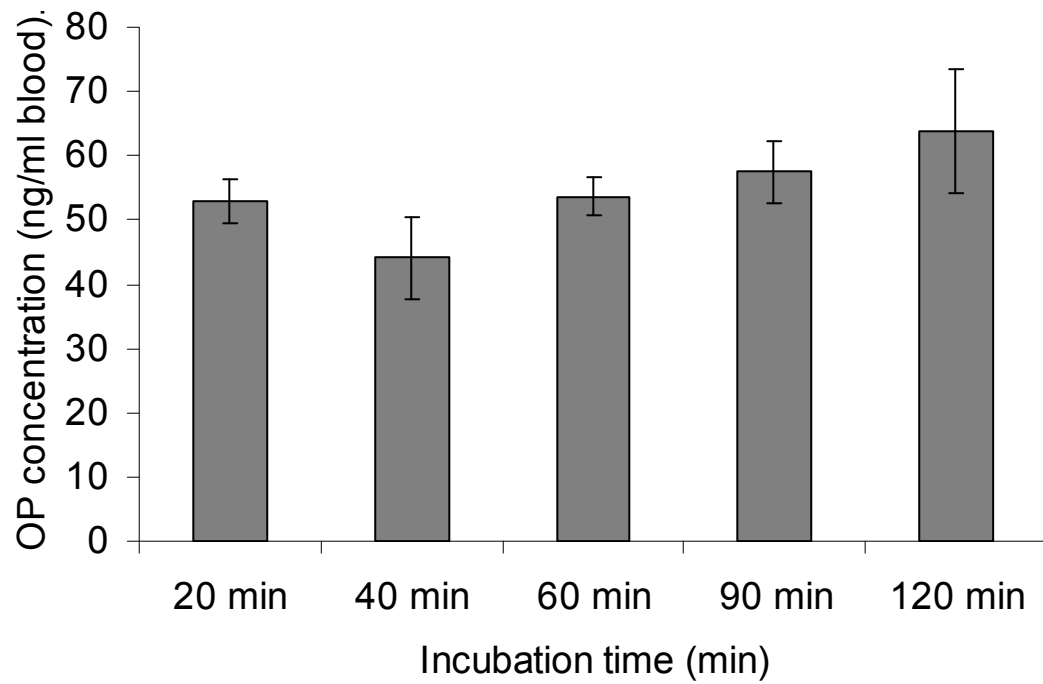


Figure 6-4: Comparison of OP concentration after different incubation times for the acetylation reaction (n=2)

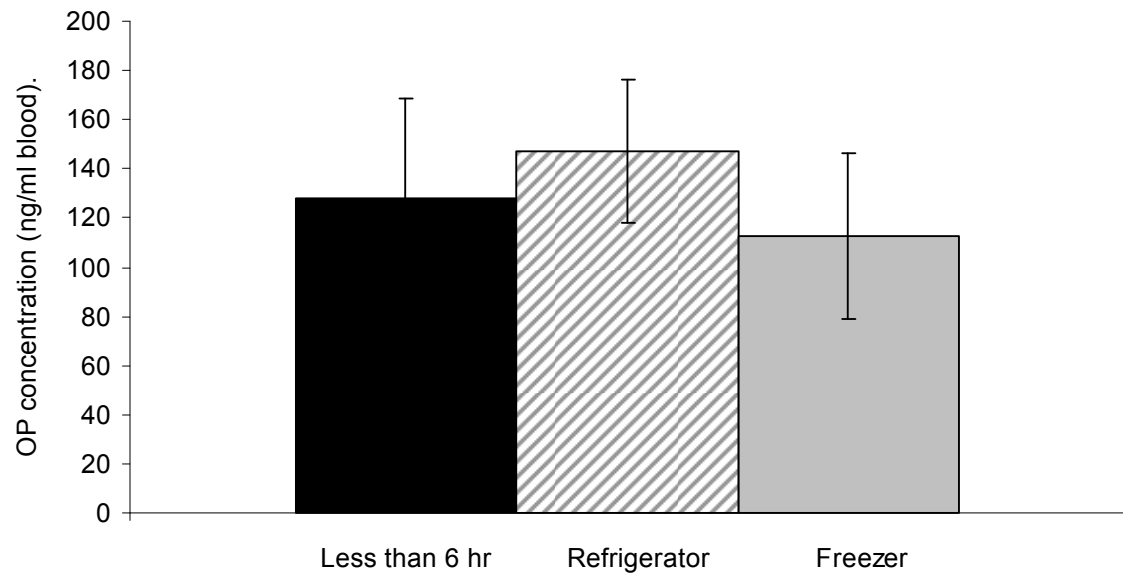


Figure 6-5: Comparison of OP stability after keeping the samples on ice for less than 6 hours, storing the samples 2 days in the refrigerator or 2 days in the freezer (mean  $\pm$  S.D.; n=5)

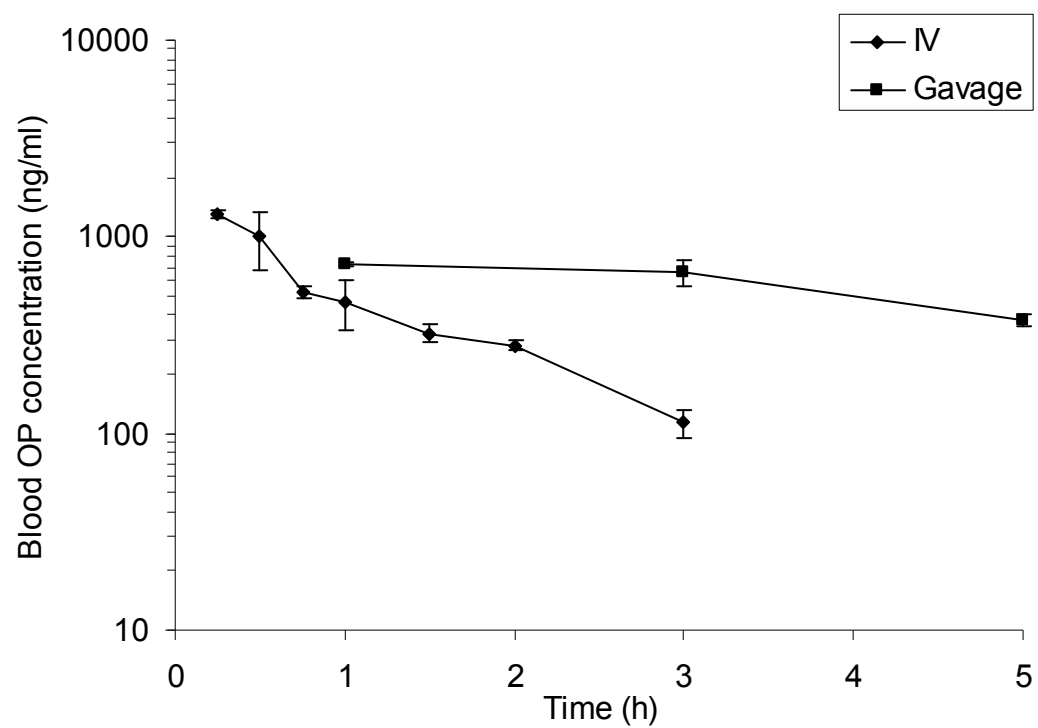


Figure 6-6: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in male Sprague-Dawley rats up to 5 h after a single oral dose of OP (5 mg/kg) or up to 3 h after a single IV dose of OP (10 mg/kg) (n=2).

**CHAPITRE SEPTIÈME:**  
**TOXICOKINETICS OF *P*-TERT-OCTYLPHENOL IN**  
**MALE AND FEMALE SPRAGUE-DAWLEY RATS**  
**AFTER INTRAVENOUS, ORAL OR**  
**SUBCUTANEOUS EXPOSURE**

## **7. Chapitre septième: Toxicokinetics of *p*-tert-octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral or subcutaneous exposures**

G. Hamelin<sup>1</sup>, G. Charest-Tardif<sup>1</sup>, K. Krishnan<sup>1</sup>, D. Cyr<sup>2</sup>, M. Charbonneau<sup>2</sup>, P.J. Devine<sup>2</sup>, S. Haddad<sup>3</sup>, G.M. Cooke<sup>4,5</sup>, T. Schrader<sup>4</sup> and R. Tardif<sup>1</sup>

- 1) Département de santé environnementale et santé au travail. Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
- 2) INRS-Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, Laval, Québec, Canada.
- 3) Département des sciences biologiques. Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.
- 4) Toxicology Research Division, Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada, Sir Frederick G. Banting Research Centre, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario, Canada
- 5) Departments of Cellular and Molecular Medicine and Obstetrics and Gynecology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada.

Please address correspondence to:

Robert Tardif, Ph. D.

Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal

2375, Chemin de la Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada

H3T 1A8

Tel.: (514) 343-6111 ext. 1515

Fax: (514) 343-2200

E-mail: [robert.tardif@umontreal.ca](mailto:robert.tardif@umontreal.ca)

## ABSTRACT

This study was undertaken to characterize the toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol (OP), a weak estrogenic compound, in male and female rats. Male and female Sprague-Dawley rats were given a single dose of OP either by oral gavage (50, 125 or 250 mg/kg), by intravenous (IV) injection (2, 4 or 8 mg/kg) or by subcutaneous (SC) injection (125 mg/kg). In a repeated dosing experiment, rats were given OP (oral) daily (25, 50 or 125 mg/kg) for 35 days (female) or 60 days (male). Blood and tissue samples were collected and analyzed for OP content using gas chromatography with detection by mass spectrometry. Blood OP concentrations were generally higher in female than male rats following a single oral or SC administration but were similar following a single IV injection. Tissue OP concentrations were also higher in female than male rats following oral exposure, consistent with the faster metabolism of OP observed in male rat liver microsomes. After subchronic administration, blood OP concentrations were higher at the end of exposure for female (33 days) (2.26-fold, not significant) and male (57 days) (3.47-fold) rats than single dosing but there was no change in the tissue OP concentrations. Gender differences in tissue OP concentrations may contribute, in part, to gender differences in the toxicity of OP in rats. The fact that OP was found in all reproductive tissues confirms its potential for direct endocrine-like effects.

Key words: *p-tert*-octylphenol, toxicokinetics, Sprague-Dawley rats, gender differences, repeated exposure

## INTRODUCTION

Alkylphenol ethoxylates (APE) are non-ionic surfactants that have been used in a variety of industrial, agricultural or commercial applications (detergents, emulsifiers, cleaners, plastics, pesticide, etc.). *p-tert*-Octylphenol [OP; p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol] is an intermediate used in the production of APE as well as a degradation product of APE that are found in the environment. (Blake and Boockfor, 1997; Ying *et al.*, 2002). It has also been detected in human blood and urine samples, suggesting that humans are exposed to these chemicals (Inoue *et al.*, 2000; Kawaguchi *et al.*, 2004; Calafat *et al.* 2008).

A number of *in vivo* toxicity studies were conducted with OP. The principal adverse effect of OP is on reproductive systems. Studies showed that administration of OP to pregnant or neonatal animals affected male and female reproductive systems of adults (Sharpe *et al.*, 1995; Blake and Ashiru, 1997; Atanassova *et al.*, 2000). Blake *et al.*, (2004) showed that administration of OP in drinking water for 4 months to adult rats ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  or  $1 \times 10^{-9}$  M) increased sperm abnormalities, interfered with sperm motility and decreased sperm number. It was reported that exposure of adult male rats to OP produced shrinkage of testes, epididymis and male accessory sex glands and might alter normal histological structure (Boockfor and Blake, 1997). OP was found to alter the secretion of sexual hormones (luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), prolactin, testosterone) and decrease sperm counts in male rats exposed subcutaneously (SC) for up to 2 months to OP (20 or 80 mg/injection) (Blake and Boockfor, 1997). In females, OP blocked cyclicity and reduced the estradiol-induced surge of sexual hormones (LH, FSH, prolactin) in adulthood when neonatal female rats were exposed subcutaneously to OP (100 mg/kg body weight) (Herath *et al.*, 2001). SC exposure of adult CD female rats to OP for up to 4 weeks (20 or 40 mg/injection) produced acyclicity and persistent estrus (Blake and Ashiru, 1997). OP did not result, however, in any estrogen-like activity in a multigeneration

study with CD rats exposed to dietary levels of 0.2, 2, 20, 200 or 2000 ppm (Tyl *et al.*, 1999) even though it was found to act as a weak estrogen in a number of species (*in vivo* and *in vitro*) by binding to the estrogen receptor (Laws *et al.* 2000, 2006; Kwack *et al.* 2002).

Few studies examined the toxicokinetics of OP (Certa *et al.*, 1996; Upmeier *et al.*, 1999). These studies showed that OP is highly lipophilic and tends to accumulate in adipose tissues. OP is rapidly metabolized in rats to either phase I (4-*tert*-octylcatechol, hydroxyl-*tert*-octylphenol) or phase II (4-*tert*-octylphenol-glucuronide, 4-*tert*-octylcatechol-glucuronide, hydroxyl-*tert*-octylphenol-glucuronide) metabolites and excreted via urine and bile following conjugation to glucuronic acid or sulfate (Certa *et al.*, 1996; Hanioka *et al.*, 2000a, 2000b; Nomura *et al.*, 2008; Pedersen and Hill, 2000; Van der Berg *et al.*, 2003). Glucuronidation and sulfation are considered detoxification pathways since only the parent material and not the metabolite binds to the estrogen receptor (Van der Berg *et al.*, 2003). Extensive enterohepatic circulation of OP was reported in female DA/Han rats (Upmeier *et al.*, 1999).

Data on the toxicokinetics of OP are still scarce and these data are critical to a better understanding of bioavailability, fate and metabolism of OP in animals for risk assessment purposes. To our knowledge, the oral, subcutaneous (SC) and intravenous (IV) toxicokinetics of OP in both male and female Sprague-Dawley rats has not yet been investigated. Therefore, the aims of this study were to: (i) characterize the route-specific toxicokinetics of OP in rats, (ii) determine the rate of OP metabolism *in vitro* and (iii) evaluate the impact of a repeated exposure on blood and tissue OP concentrations in male and female rats.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

*p*-*tert*-Octylphenol (97%), 4-*tert*-butylphenol (99%), methyl-*tert*-butyl ether (99%), acetic anhydride (98%), pyridine (98%), propylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO), hydrochloric acid (HCl; 37%), potassium phosphate (monobasic and dibasic), Trizma base, Trizma HCl, potassium chloride (99%), sucrose, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) (99%), glucose-6-phosphate (G-6-P), G-6-P dehydrogenase and  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\beta$ -NADP) and Dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Oakville, Ontario, Canada). Isoflurane was purchased from CDMV (Saint-Hyacinthe, Québec, Canada).

### **Animals**

Male (240-260 g) and female (170-190 g) Sprague-Dawley rats were housed in a humidity- and temperature- (20-22°C) controlled room with a 12 hr light/dark cycle. Animals had free access to food and tap water until the beginning of the experiment. All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by the ethics committee of the Université de Montréal for use of lab animals.

### **Animal treatment**

#### Single dose experiments

Groups of male (n=5) and female (n=5) rats were administered a single dose of OP by oral gavage (50, 125 or 250 mg/kg), IV injection (jugular vein; 2, 4 or 8 mg/kg) or SC injection (125 mg/kg). Propylene glycol (oral), alkamuls (IV) and DMSO (SC) were used

as vehicle. Blood samples were collected from the tail vein for up to 4 hr (IV) or 24 hr (oral and SC) post-dosing and analyzed for OP content. Groups of animals receiving the same treatment were sacrificed after 1 and 3 hr (IV) or 4 and 24 hr (oral) post-dosing and tissues (muscle, brain, fat, liver, kidneys, testes, epididymis, uterus and ovaries) analyzed for OP content.

#### Repeated dosing experiments

Groups of male (n=5) and female (n=5) rats were given a dose of OP (oral) daily (25, 50 or 125 mg/kg) for 35 days (female) or 60 days (male). The duration for the repeated dosing experiments was designed such that the exposure of rats occurred through enough number of estrus or spermatogenic cycles to facilitate the evaluation of the estrogenic effects. Blood samples were collected from the tail vein 1 hr post-exposure on the first day of treatment as well as 1 and 4 hr post-exposure on the 33<sup>rd</sup> day (female) or 57<sup>th</sup> day (male) of exposure and analyzed for OP content. Animals were sacrificed by exsanguination and tissues (fat, liver, testes, epididymis, uterus and ovaries) were collected 24 hr after the last dose and analyzed for OP content. Blood samples were stored in the refrigerator and analyzed within 24 hr. Tissues were kept frozen (-80°C) until analysis.

#### **Microsomes**

Male and female Sprague-Dawley rats, weighing 240-260 g, were sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxiation. Livers were excised, weighed and cut in pieces. Tris-KCl buffer (1:4, v/v) was added and the mixture then homogenized. Microsomes were obtained by differential centrifugation (10000 x g and 105000 x g twice at 4°C) and were suspended in a buffer (pH 7.4) containing 0.25 M sucrose, 0.05 M Tris and 5.4 mM EDTA (St-Pierre et al., 2005).

Microsomes were kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the day of the experiment. The concentration of proteins was measured using the method developed by Lowry et al. (1951).

### **Metabolism Analysis**

NADP<sup>+</sup> and phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing EDTA (0.1mM), G-6-P (0.8mM), G-6-P dehydrogenase (1 U/ml) and MgCl<sub>2</sub> (15mM) were introduced into glass vials. Different concentrations of OP were added (71, 213 or 533 ng OP/mg of protein) along with 1 mg of microsomal protein. The mixture was incubated for up to 3 hr at various intervals (2 to 60 min) and reactions were stopped with the addition of 16  $\mu\text{l}$  HCl. At each time point, 400  $\mu\text{l}$  of the solution was drawn for OP analysis. Vials containing boiled microsomes were used as controls. All samples were analyzed in duplicate.

### **Measurement of OP in blood and tissues**

The blood and tissue content of OP were quantified according to Hamelin *et al.* (2008). Briefly, blood (100  $\mu\text{l}$ ), tissue homogenate (400  $\mu\text{l}$ ) and microsomal (400  $\mu\text{l}$ ) samples were extracted with methyl *tert*-butyl ether, whereas *p-tert*-butylphenol (BP) was used as internal standard. Hydrochloric acid was added in order to adjust the pH to around 2. After extraction, OP and BP were derivatized with an acetylation reaction involving acetic anhydride and catalyzed by pyridine. OP concentrations were determined by a gas chromatograph equipped with a mass spectrometer (single ion monitoring) and a Varian VF-5ms capillary column (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ). The oven temperature was maintained at 100  $^{\circ}\text{C}$  for 1.5 min and then increased at a rate of 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to 280 $^{\circ}\text{C}$ . The analytical system used was a Varian 3900 gas chromatograph coupled with a Saturn 2100 T (ion trap) mass spectrometer and a CP 4800 auto sampler. The quantitation was based on the ratio of the major fragment (135) of BP and OP at their respective retention time. The

retention time for BP was approximately 5 min while the retention time of OP was approximately 6.5 min.

### **Data analysis**

The terminal decline in blood concentration after oral, IV and SC dosing was used to calculate the half-life ( $T_{1/2}$ ) of OP. The areas under the blood concentration *versus* time curves (AUC) were calculated according to trapezoidal rule, using experimental data collected in treated animals i.e., 4 hr (IV) or 24 hr (oral and SC). The bioavailability (F) was calculated as:  $F = \text{AUC}_{\text{p.o.}}/\text{Dose}_{\text{p.o.}}$  (or  $\text{AUC}_{\text{SC}}/\text{Dose}_{\text{SC}}$ )  $\times \text{Dose}_{\text{IV}}/\text{AUC}_{\text{IV}} \times 100\%$ . Differences in the blood and tissue OP concentrations between genders were tested with Student's unpaired t-test. Differences between the first and last blood sample for the subchronic experiment were tested with Student's paired t-test ( $P < 0.05$ ).

## **RESULTS**

### **Kinetics of unchanged OP in blood**

The blood OP concentrations measured in female and male Sprague-Dawley rats for up to 24 hr after a single oral dose of 50, 125 or 250 mg OP/kg are shown in Figure 7-1 (A-B). The blood OP concentrations measured 1 hr after dosing were  $112 \pm 66$ ,  $238 \pm 109$  and  $386 \pm 96$  ng/ml in male rats compared to  $86 \pm 29$ ,  $290 \pm 171$  and  $272 \pm 154$  ng/ml in female rats for the doses of 50, 125 and 250 mg/kg, respectively. The terminal  $T_{1/2}$  after oral exposure to OP ranged from 5 to 16.6 hr in males and 8.3 to 37.9 hr in females (Table 7-I). The mean maximal blood concentrations ( $C_{\text{max}}$ ), measured 2 hr (50 mg/kg) or 1 hr (125 and 250 mg/kg) after oral administration, are shown in Table 7-I. The results also show that there was a difference in blood OP concentration between male and female rats following

oral exposure but this difference was significant only at 24 hr post-exposure when blood OP concentrations were higher (mean 2.73-fold) in female than male rats.

The profiles of blood concentrations measured in female and male Sprague-Dawley rats after a single IV injection of 2, 4 or 8 mg OP/kg are depicted in Figure 7-2. The values of  $C_{max}$  (ng/ml, mean  $\pm$  SD) observed 10 min after IV administration were  $160 \pm 37$ ,  $323 \pm 27$  and  $947 \pm 110$  ng/ml in males and  $119 \pm 16$ ,  $296 \pm 109$  and  $841 \pm 261$  ng/ml in females for the doses of 2, 4 and 8 mg/kg, respectively. The decline in blood OP concentrations after IV administration appeared to be bi-exponential. The terminal  $T_{1/2}$  of OP following IV administration ranged from 1.1 to 2.1 hr in male and from 1.6 to 2.4 hr in female rats (Table 7-I). Blood OP concentrations were similar between male and female rats following IV injections except for the last sampling time following the 8 mg/kg dose at which females had significantly higher concentrations (1.5-fold).

The time-course of blood OP concentrations following a single SC injection of 125 mg OP/kg is shown in Figure 7-3. The blood OP concentrations measured 1 hr after SC administration (125 mg OP/kg) were 39 ng/ml (male) and 22 ng/ml (female). The  $C_{max}$  was observed at 8 hr (male) or 6 hr (female) post-dosing. The terminal  $T_{1/2}$  after SC administration was 9.8 hr in male and 29.6 hr in female rats (Table 7-I). The results show that there was a significant difference in blood OP concentration between male and female rats (2.3-fold higher in female) following SC injection only at 24 hr post-dosing.

Table 7-I presents the AUC of blood OP concentrations following either oral, SC or IV doses. The comparison of AUC of OP indicated that there was a nonlinear relationship between dose and AUC in male rats after oral dosing as well as in male and female rats

after IV administration. AUC were higher in female than male rats following oral and SC doses but were similar following IV administration. Finally, AUC following IV exposure were lower than following oral or SC dosing while AUC following oral and SC dosing were similar. The bioavailability (i.e., AUC/Dose) observed in animals treated with single oral dose of 50, 125 and 250 mg/kg and single SC dose of 125 mg/kg are also presented in Table 7-I. Oral bioavailability ranged from 26 to 36% in male rats and from 46 to 55% in female rats whereas average SC bioavailability was 29% (male) and 44% (female).

The blood OP concentrations measured in female and male Sprague-Dawley rats 1 hr after a single dose or 1 and 4 hr after 33 (female) or 57 (male) daily oral doses of 25, 50 and 125 mg OP/kg are shown in Figure 7-4 (A-B). After repeated doses, blood OP concentrations were higher at the end of exposure in female (33 days) (mean 2.26-fold, not significant) and male (57 days) (mean 3.47-fold, significant) rats than after a single exposure. Blood OP concentrations appeared higher in male than in female rats 1 hr after the end of exposure on the first day of exposure (mean 1.69-fold, not significant) which is in accordance with the observations of the single dose experiment.

### **Kinetics of unchanged OP in tissues**

The tissue OP concentrations measured in male and female Sprague-Dawley rats after a single oral dose of OP (125 or 250 mg/kg) are shown in Figures 7-5 and 7-6. These results show that OP was detected in all tissues except muscle at the lowest dose. The highest concentrations of OP were found in the liver followed by fat, kidneys (data not shown) and ovaries whereas the lowest concentrations were measured in muscles. Data also show that tissue OP concentrations were higher in female than male rats (mean for the 2 dose levels: fat: 4.73-fold; liver: 5.7-fold; brain: 1.58-fold; kidneys: 3.77-fold).

The tissue OP concentrations measured in male and female Sprague-Dawley rats 1 and 3 hr after a single IV dose of OP (4 or 8 mg/kg) are shown in Figures 7-7 and 7-8. The highest concentrations of OP were found in fat followed by ovaries and testes while the lowest concentrations were measured in muscles and uterus. These results also demonstrate that tissue OP concentrations were similar between male and female rats following IV injections except for liver 3 hr after dosing where OP concentrations were higher in females.

Figures 7-9 and 7-10 present the concentration of OP in liver, fat and reproductive organs in male and female Sprague-Dawley rats 24 hr after repeated oral doses of OP (25, 50 or 125 mg/kg). The concentrations measured after repeated doses of 125 mg/kg OP are also compared with similar data collected after a single dose. No significant differences were observed between the tissue concentrations from single and repeated treatment.

### **Metabolism analysis in microsomes**

The mean concentrations ( $\pm$  SD) of unchanged OP in liver microsomes from male and female Sprague-Dawley rats incubated for 2 to 60 min with various concentrations of OP (71, 213 or 533 ng OP/mg protein) are shown in Figure 7-11 (A-B). The *in vitro* experiments showed clearly that microsomes from male metabolize OP faster (on average 4.6-fold) than female rats. For example, after an incubation time of 15 min, there was a decrease of 98% (71 ng/mg), 91% (213 ng/mg) and 94% (533 ng/mg) in liver microsomes from male rats compared to initial concentrations whereas in female rats, the reduction was of 50% (71 ng/mg), 26% (213 ng/mg) and 21% (533 ng/mg), respectively.

## DISCUSSION

Studies on the toxicokinetics of OP are scarce (Certa *et al.*, 1996, Upmeier *et al.*, 1999) and the present study is the first one to our knowledge to characterize the oral, IV and SC toxicokinetics of OP in both male and female rats. OP is metabolized mainly to phase I or phase II metabolites and excreted following conjugation reactions with glucuronic acid or sulfate in rats (Certa *et al.*, 1996; Hanioka *et al.*, 2000a, 2000b; Pedersen and Hill, 2000; Van der Berg *et al.*, 2003). Because the major metabolites of OP do not show estrogenic activity (Van der Berg *et al.*, 2003), it is important to understand the toxicokinetics of unchanged OP in animals and humans.

Blood OP concentrations measured in Sprague-Dawley rats in the present study were higher than those measured in Wistar rats (Certa *et al.*, 1996) and Fischer rats (data not shown), which indicate strain differences in OP toxicokinetics. Similarly, in this study, the terminal  $T_{1/2}$  of OP in Sprague-Dawley rats after IV dosing ranged from 1.1 to 2.1 hr in male rats and from 1.6 to 2.4 hr in female rats. Certa *et al.* (1996) reported a half-life of 310 min (5.2 hr) in male Wistar rats and Upmeier *et al.* (1999) reported a half-life of 36.1 hr in female DA/Han rats both after IV administration (5 mg/kg). In contrast, the terminal  $T_{1/2}$  after oral dosing ranged from 5 hr to 16.6 hr in male and from 8.3 to 37.9 hr in female rats whereas the terminal  $T_{1/2}$  after SC administration (125 mg/kg) was 9.8 in male and 29.6 hr in female rats. This suggests that metabolism may be saturated at these higher doses and that OP elimination is dose-dependent. It should be noted that because blood OP concentrations remained high until the end of exposure, uncertainty remains around the values of the terminal  $T_{1/2}$  and bioavailability in females for the SC and oral routes, especially at the highest dose.



Oral bioavailability calculated in this study ranged from 26 to 36% in male rats and from 46 to 55% in female rats whereas the average SC bioavailability was 29% (male) and 44% (female). These values are higher than those reported by Certa *et al.* (1996) for male Wistar rats given an oral dose of 50 mg/kg (2%) or 200 mg/kg (10%) and an IV dose of 5 mg/kg as well as those of Upmeier *et al.* (1999) for female DA/Han rats given an oral dose of 50 mg/kg (12.3%) or 200 mg/kg (8.4%) and an IV dose of 5 mg/kg.

The comparison of AUC of OP indicated that there was a nonlinear relationship between dose and AUC in both male and female rats. The increase in dose resulted in a greater than proportional rise in the AUC for IV doses of 2 to 8 mg/kg, indicating that there was saturation of OP metabolism or of protein binding at these exposure levels. On the other hand, the increase in dose resulted in a less than proportional rise in AUC following oral exposure from 50 to 250 mg/kg, indicating that the absorption of OP might be capacity- and rate-limiting by this route. For both IV and oral exposures, evidence of saturation was more pronounced in female than male rats, in the range of doses used in this study.

Blood OP concentrations following IV administration were higher than blood OP concentrations resulting from oral or SC exposure. Furthermore, AUC were noticeably higher following IV exposure while they were much lower following oral exposure, indicating low bioavailability of orally administered OP. Data suggest that OP undergoes extensive first-pass metabolism, as previously reported by Certa *et al.* (1996) in male Wistar rats. However, enterohepatic circulation would not appear to be a major feature for OP kinetics in Sprague-Dawley rats. This is in agreement with Certa *et al.* (1996) who found no evidence of enterohepatic circulation in male rats and Upmeier *et al.* (1999) who found little evidence of enterohepatic circulation in female rats. Enterohepatic circulation

has often been associated with compounds metabolized by glucuronidation or sulfation, exhibiting long half-life and low protein binding; however OP has a short half-life and is reported to bind highly to proteins (Nagel *et al.*, 1999).

OP was detected in all tissues. The highest OP concentrations were found in the liver following oral exposure and fat following IV dose while the lowest concentrations were measured in muscles. There was a more than proportional increase in the fat OP concentration, indicating that OP is likely stored in this tissue at high doses. OP was detected in all reproductive tissues which suggests that exposure of these tissues to OP may play a role in the toxicity to the reproductive system.

A marked gender difference was seen in the blood OP concentrations, specifically at 24 hr following oral (single and repeated dose studies) and SC administration but not following IV administration. Gender differences in tissue OP concentrations were also observed in several tissues after oral exposure but only in liver after IV dosing. The capacity of female rats to metabolize and excrete OP was similar at low doses but significantly lower than that of males at higher doses. Oral bioavailability of OP was higher in female than male rats. This increased bioavailability might be due to metabolic saturation being more pronounced in female rats even though storage in adipose tissues might also have contributed. Marked gender differences were also observed for a closely related compound, nonylphenol (Green *et al.*, 2003). These gender differences are most likely related to metabolism. According to Hanioka *et al.* (2000a, 2000b), OP changes male-specific cytochrome P-450 isoform in rat liver. There is a limited amount of information on the metabolic pathway of OP and it is unclear if the enzymes that metabolize OP are gender-specific (Pedersen and Hill, 2000) but OP metabolism has not been fully characterized in female rats. In order to test the hypothesis that gender differences observed

*in vivo* in this study are related to OP metabolism, *in vitro* studies were conducted using liver microsomes. These experiments showed that OP is rapidly metabolized in both male and female rat liver microsomes but males metabolize OP more quickly than female rats (on average 4.6-fold) for oxidation reactions. This confirmed that gender differences in OP toxicokinetics and toxicity are at least partly due to differences in rates of metabolism.

The results of the repeated dose study indicate that blood OP concentrations were higher at the end of exposure (33 days for female (not significant) and 57 days for male (significant)) than on the first day of exposure, 1 hr after the onset of exposure. There was however no change in tissue OP concentrations (liver, fat, testes, epididymis, uterus and ovaries) 24 hr after the end of the last day of exposure. These results, coupled with the fact that blood OP concentrations decreased rapidly in the single exposure study, indicate that there was no bioaccumulation at these exposure levels.

## CONCLUSION

Overall, this study showed that OP does not bioaccumulate in Sprague-Dawley rats. The results of the present study along with the literature data suggest strain differences in the toxicokinetics of OP and there is uncertainty concerning which strain would be a good model for an adequate risk analysis of OP in humans. There is a need to incorporate these strain differences as well as gender differences observed in this study into risk assessment of OP in humans, especially since toxicity of OP was reported to be predominantly on the reproductive system. However, it should be noted that there was a high variability found both in blood and tissue OP concentrations. The fact that OP was found in all reproductive tissues suggests that exposure of these tissues to OP may play a role in the toxicity on the reproductive system. Further studies are required to elucidate the mechanism underlying the gender differences observed in this study and to obtain additional data on the metabolism of OP in rats and humans.

**Acknowledgements** The authors wish to thank Mylène Beaudoin and Johanne Couture for their excellent technical assistance. Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is gratefully acknowledged. G. H. is a recipient of a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

## REFERENCES

- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K.J., Walker, M., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P., Sharpe, R.M. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141:3898-3907.
- Blake, C.A. and Ashiru, O.A. 1997. Disruption of rat estrous cyclicity by the environmental estrogen 4-*tert*-octylphenol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216:446–451.
- Blake, C.A., Boockfor, F.R. 1997. Chronic administration of the environmental pollutant 4-*tert*-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone. *Biol. Reprod.* 57:255-266.
- Blake, C.A., Boockfor, F.R., Nair-Menon, J.U., Millette, C.F., Raychoudhury, S.S., McCoy, G.L. 2004. Effects of 4-*tert*-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats. *Reprod. Toxicol.* 18:43-51.

- Boockfor, F.R., Blake, C.A. 1997, Chronic administration of 4-*tert*-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biol. Reprod.* 57:267-277.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A. and Needham, L. L. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-*tert*-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Persp.* 116:39-44.
- Certa, H., Fedtke, N., Wiegand, H.J., Muller, A.M., Bolt, H.M. 1996. Toxicokinetics of *p*-*tert*-octylphenol in male Wistar rats. *Arch. Toxicol.* 71:112-122.
- Green, T., Swain, C., Van Miller, J.P., Joiner, R.L. 2003. Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 38:43-51.
- Hamelin, G., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., Cyr, D.G., Charbonneau, M., Devine, P.J., Haddad, S., Cooke, G.M., Schrader, T., Tardif, R. 2008. Determination of *p*-*tert*-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 32:303-307.

- Hanioka, N., Jinno, H., Chung, Y.S., Nishimura, T., Tanaka-Kagawa, T., Ando, M. 2000a. Effect of 4-*tert*-octylphenol on cytochrome P450 enzymes in rat liver. *Arch. Toxicol.* 73:625-631.
- Hanioka, N., Tanaka-Kagawa, T., Chung, Y.S., Nishimura, T., Jinno, H., Ando, M. 2000b. Changes in hepatic cytochrome P450 enzymes by biodegradation products of 4-*tert*-octylphenol polyethoxylate in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64:804-810.
- Herath, C.B., Watanabe, G., Katsuda, S., Yoshida, M., Suzuki, A.K., Taya, K. 2001. Exposure of neonatal female rats to *p-tert*-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood. *Biol. Reprod.* 64:1216-1224.
- Inoue, K., Yoshimura, Y., Makino, T., Nakazawa, H. 2000. Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. *Analyst.* 125:1959-1961.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Sakui, N., Ito, R., Izumi, S., Makino, T., Okanouchi, N., Nakazawa, H. 2004. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol in human biological samples. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 799:119-125.

Kwack, S.J., Kwon, O., Kim, H.S., Kim, S.S., Kim, S.H., Sohn, K.H., Lee, R.D., Park, C.H., Jeung, E.B., An, B.S., Park, K.L. 2002. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65:419-431.

Laws, S.C., Carey, S.A., Ferrell, J.M., Bodman, G.J., Cooper, R.L. 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol. Sci.* 54:154-167.

Laws, S.C., Yavanhxay, S., Cooper, R.L., Eldridge, J.C. 2006. Nature of the binding interaction for 50 structurally diverse chemicals with rat estrogen receptors. *Toxicol. Sci.* 94:46-56.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.

Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Welshons, W.V. 1999. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an *in vitro* assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:343-357.



- Nomura, S., Daidoji, T., Inoue, H., Yokota, H. 2008. Differential metabolism of 4-n- and 4-tert-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sci.* 83:223-8.
- Pedersen, R.T., Hill, E.M. 2000. Identification of novel metabolites of the xenoestrogen 4-tert-octylphenol in primary rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 128:189-209.
- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S., Sumpter, J.P. 1995. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Persp.* 103:1136-1143.
- St-Pierre, A., Krishnan, K., Tardif, R. 2005. Characterization of the metabolic interaction between trihalomethanes and chloroacetic acids using rat liver microsomes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 68:287-298.
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Brine, D.R., Fail, P.A., Seely, J.C., Van Miller, J.P. 1999. Two-generation reproduction study with *para-tert*-octylphenol in rats. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 30:81-95.
- Upmeier, A., Degen, G.H., Schuhmacher, U.S., Certa, H., Bolt, H.M. 1999. Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. *Arch. Toxicol.* 73:217-222.

Van den Berg, M., Sanderson, T., Kurihara, N., Katayama, A. 2003. Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. *Pure Appl. Chem.* 75:1917-1932.

Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environ. Int.* 28:215-226.

**Table 7-I:** Mean maximal blood concentration (C<sub>max</sub>), area under the blood concentration versus time curve (AUC; ng/ml\*h), ratio of AUC to OP dose (AUC/Dose), bioavailability (F) calculated with the 4 mg/kg IV dose and terminal half-life (T<sub>1/2</sub>) in male (m) and female (f) rats. Data are expressed as mean ± SD (n=5).

Treatment	Dose (mg/kg)	Sex	OP in blood				
			C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC <sup>1</sup> (ng/ml*hr)	AUC/Dose	F (%)	T <sub>1/2</sub> (hr)
Oral	50	m	133.1 ± 112.9	1235.0 ± 539.2	24.7 ± 21.8	38	5.0
		f	105.7 ± 76.2	1503.1 ± 590.2	30.1 ± 19.6	46	8.3
	125	m	238.3 ± 108.6	2300.2 ± 372.0	18.4 ± 20.2	28	8.5
		f	290.3 ± 171.0	4501.1 ± 800.0	36.0 ± 22.2	55	10.6
	250	m	385.5 ± 95.8	4264.4 ± 548.3	17.1 ± 32.1	26	16.6
		f	271.9 ± 153.9	7838.5 ± 652.1	31.4 ± 20.8	48	37.9
IV	2	m	159.7 ± 36.9	106.3 ± 17.5	53.1 ± 0.3	-	2.1
		f	119.2 ± 16.0	99.9 ± 28.8	49.9 ± 0.6	-	2.4
	4	m	323.1 ± 26.8	261.6 ± 33.7	65.4 ± 0.5	-	1.1
		f	295.9 ± 108.6	263.3 ± 68.4	65.8 ± 1.0	-	1.7
	8	m	947.0 ± 110.2	661.6 ± 75.6	82.7 ± 0.9	-	1.2
		f	840.6 ± 260.5	755.7 ± 139.3	94.5 ± 1.5	-	1.6
SC	125	m	181.5 ± 124.0	2375.1 ± 472.3	19.0 ± 24.9	29	9.8
		f	206.3 ± 103.4	3654.5 ± 1075.9	29.2 ± 36.8	44	29.6

1: Calculated for the sampling period of 0.5 – 24 hr for both SC and oral exposures and 0.17 – 4 hr for IV dosing.

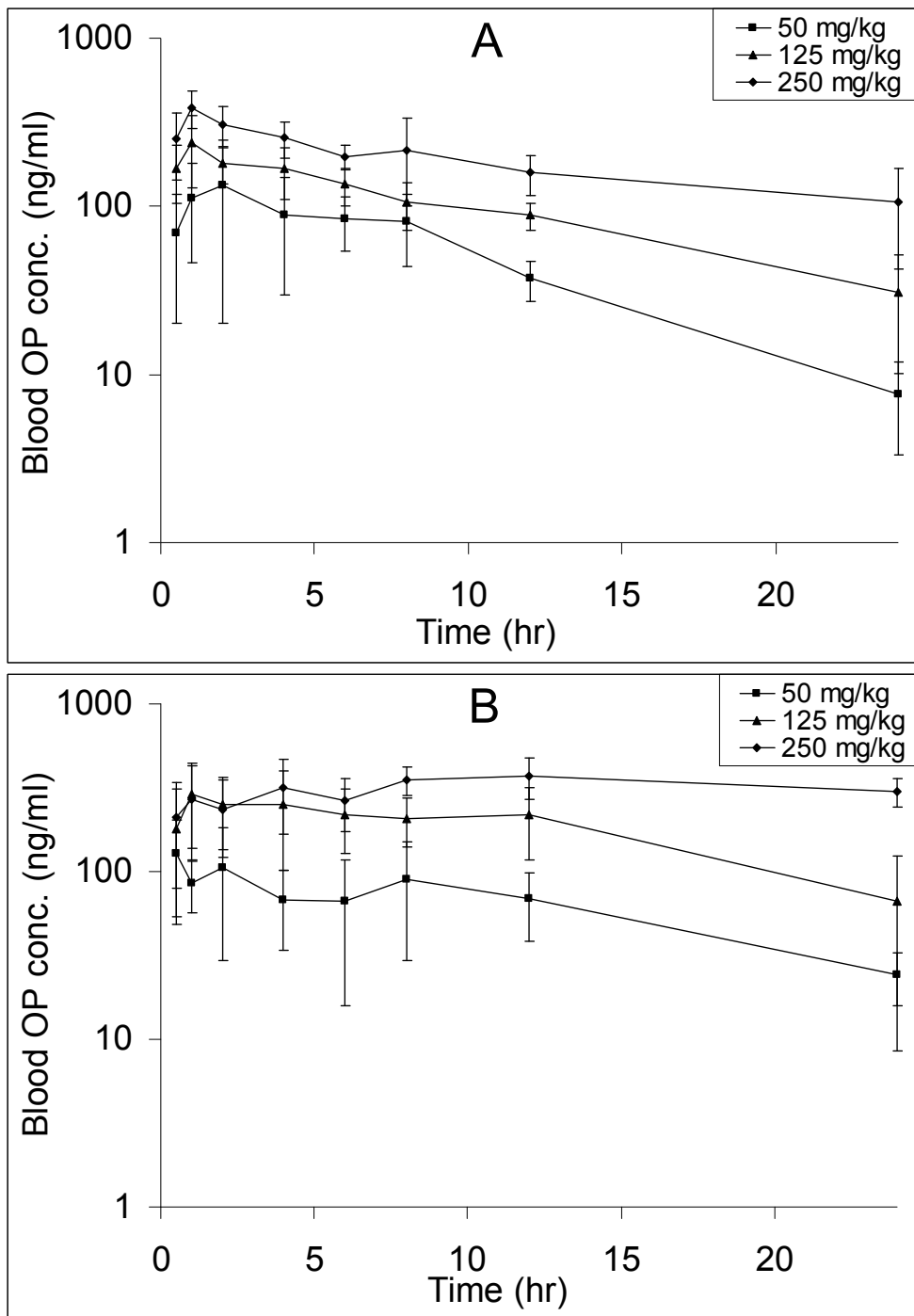


Figure 7-1: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in male (A) and female (B) Sprague-Dawley rats after a single oral dose of 50, 125 or 250 mg OP/ kg.

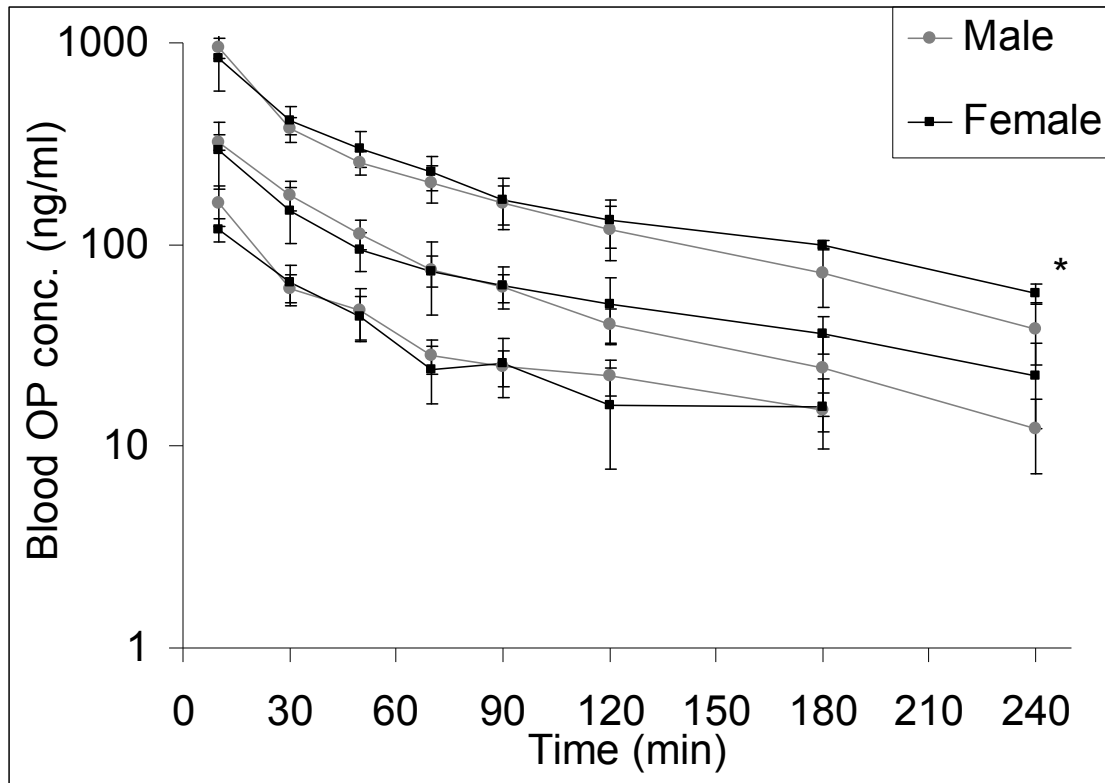


Figure 7-2: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in male and female Sprague-Dawley rats after a single IV dose of 2, 4 or 8 mg OP/kg.

\* Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ).

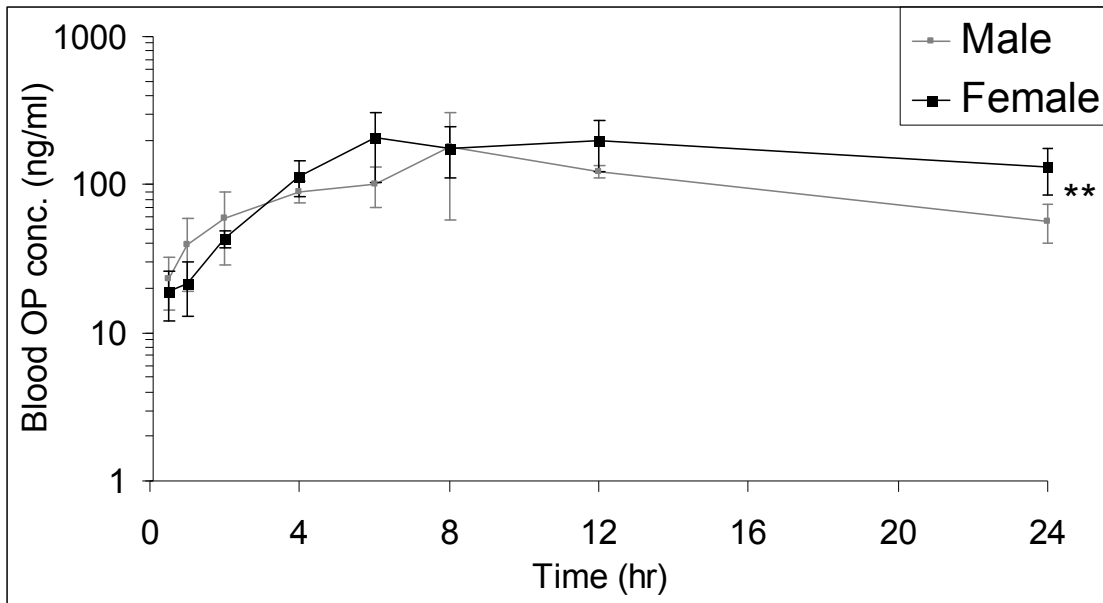


Figure 7-3: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  SD, n=5) in male and female Sprague-Dawley rats after a single SC injection of 125 mg OP/kg).

\*\*Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ).

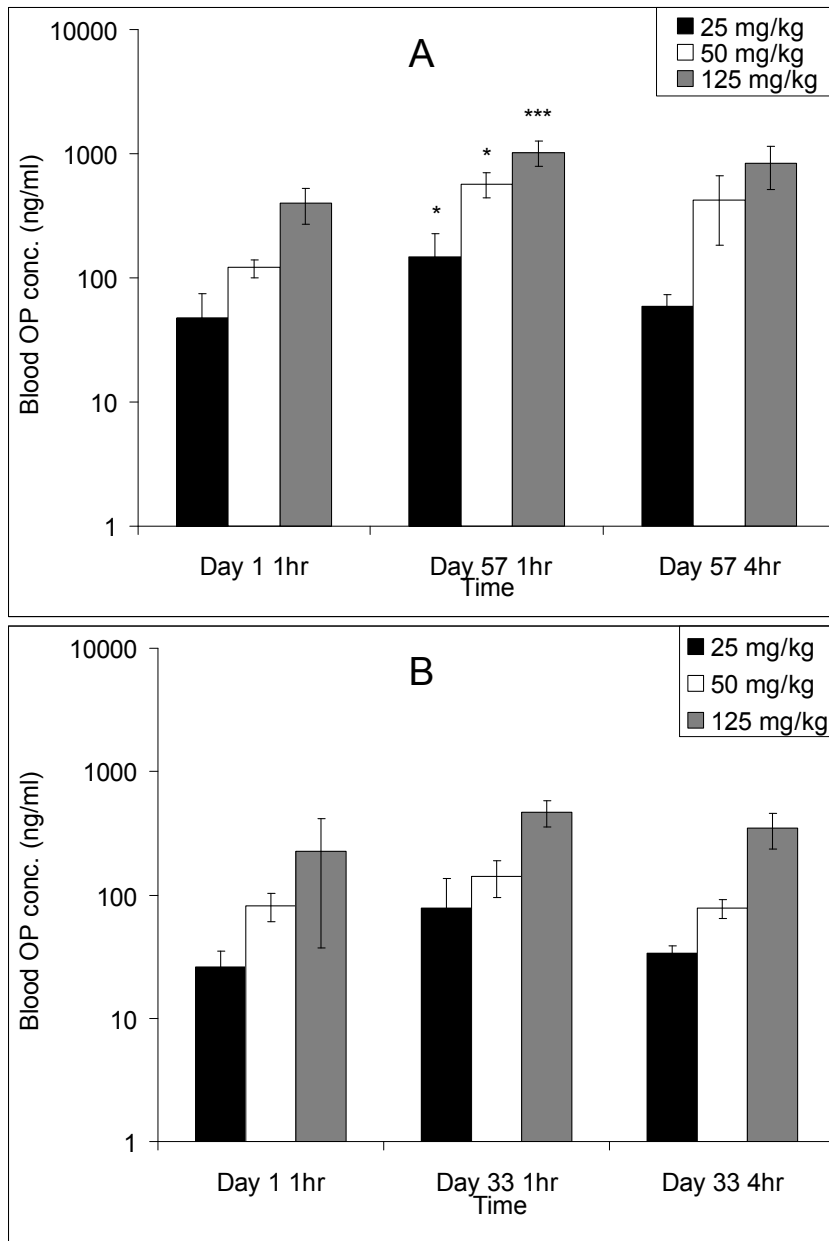


Figure 7-4: Blood OP concentrations (mean  $\pm$  SD, n=5) in male (A) Sprague-Dawley rats 1 hr after a single oral dose or 1 and 4 hr after 57 daily doses and in female (B) rats 1 hr after a single oral dose or 1 and 4 hr after 33 daily doses of 25, 50 or 125 mg OP/kg.

\* Significant ( $p \leq 0.05$ ) differences between day 1 and day 57, 1 hr post-exposure.

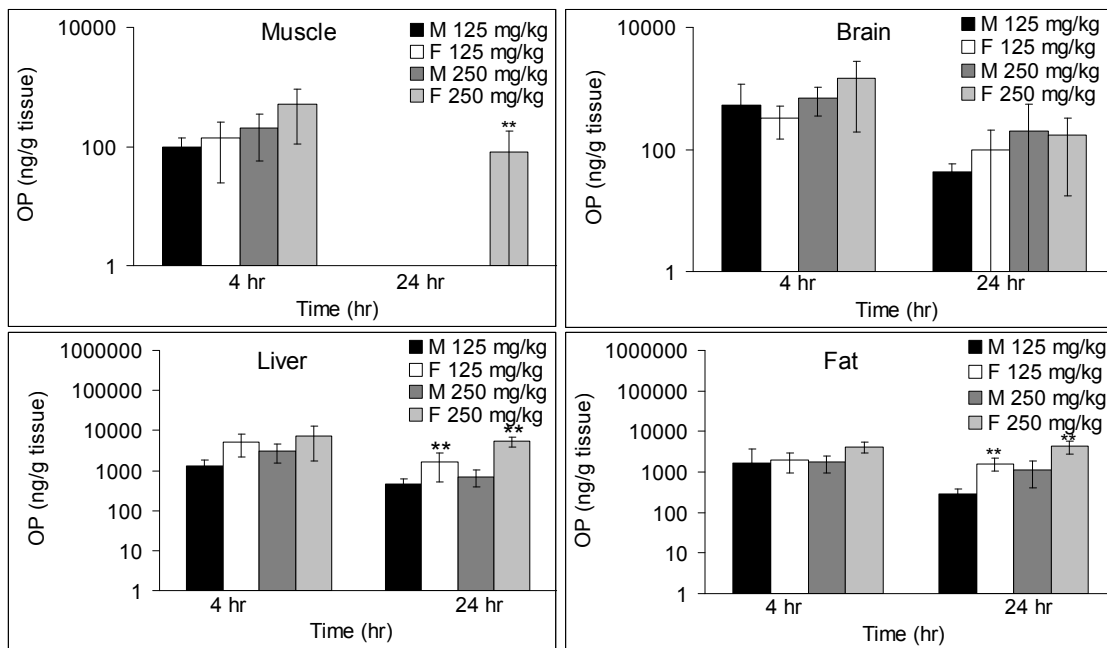


Figure 7-5: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 4 and 24 hr after a single oral dose of 125 or 250 mg OP/kg.

\*\* Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ).



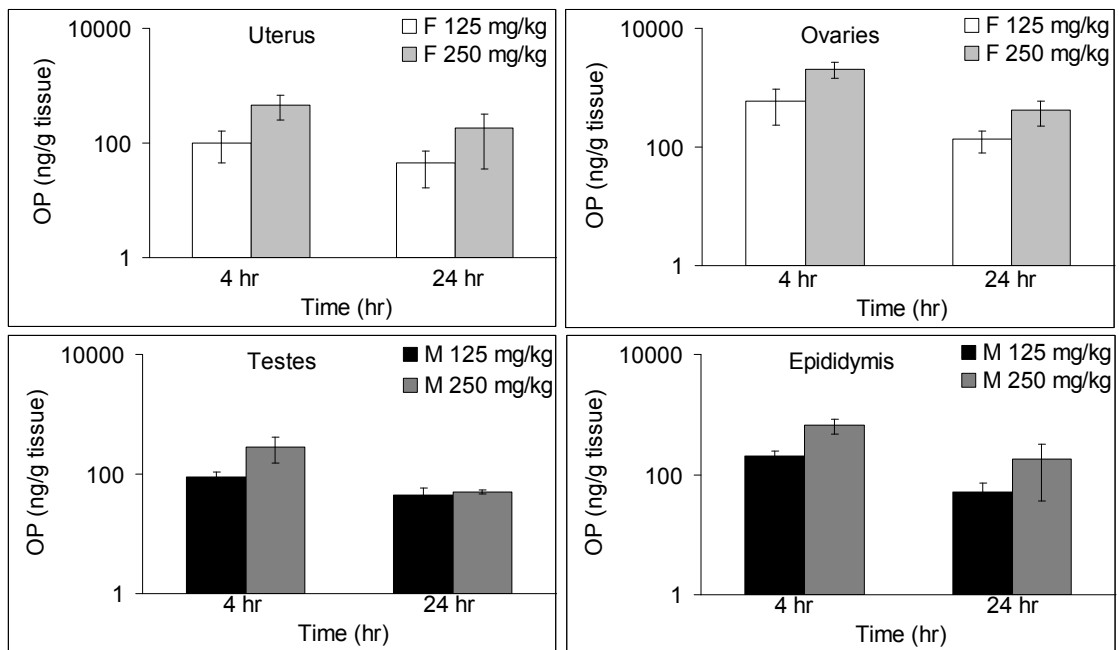


Figure 7-6: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in sex organs from male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 4 and 24 hr after a single oral dose of 125 or 250 mg OP/kg.

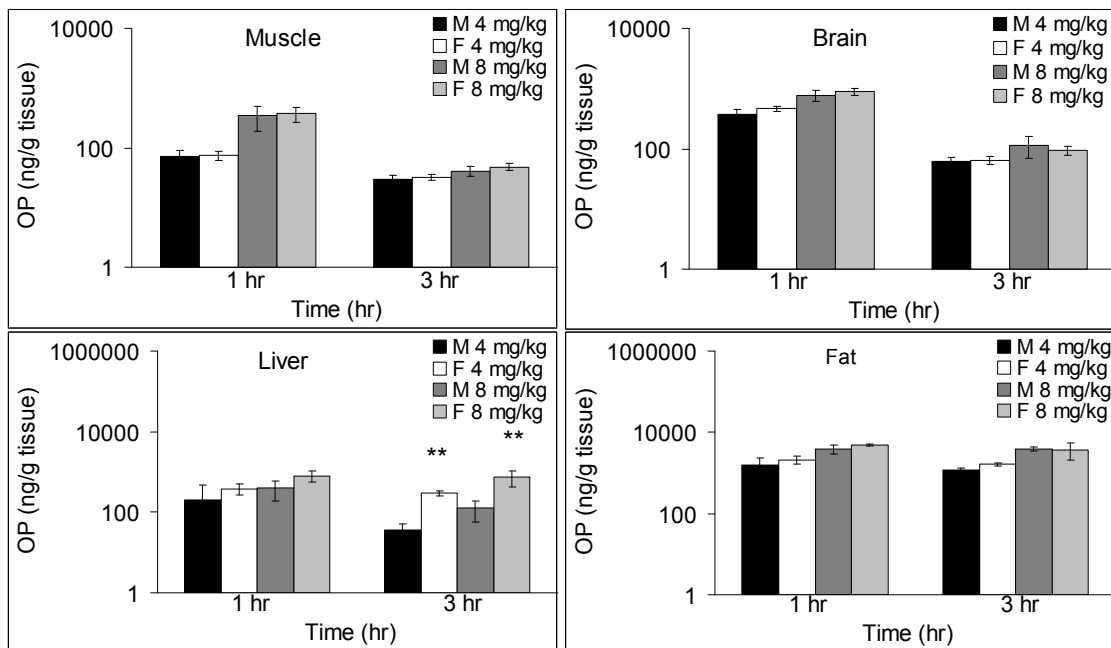


Figure 7-7: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 1 and 3 hr after a single IV dose of 4 or 8 mg OP/kg. \*\* Significant difference between male and female rats ( $p \leq 0.05$ ).

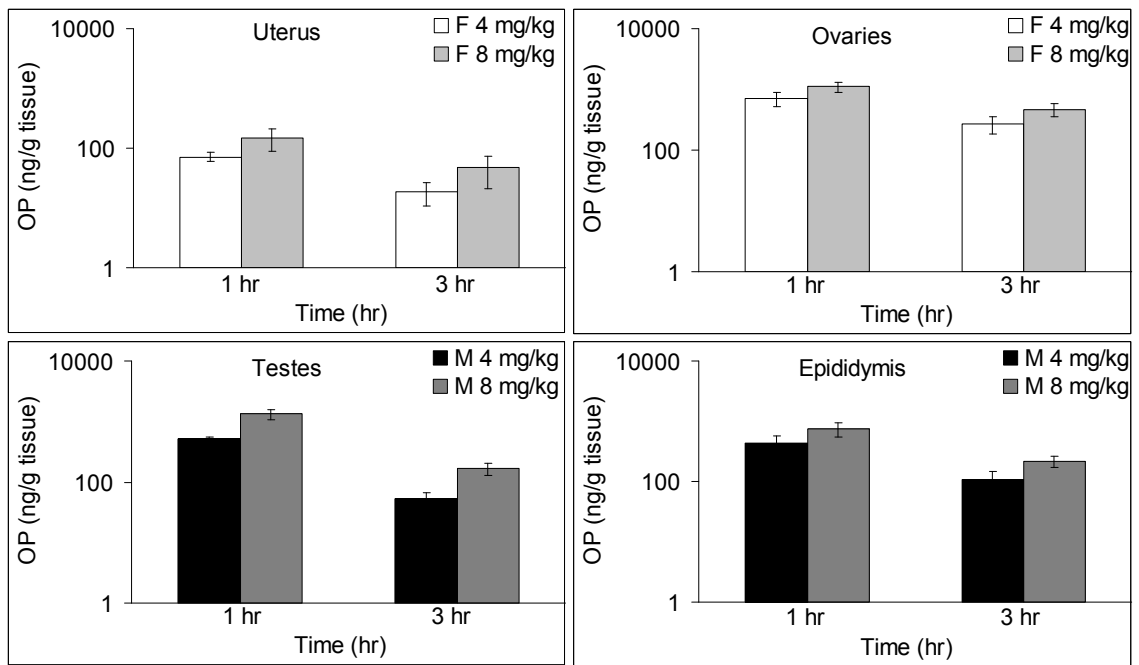


Figure 7-8: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in reproductive tissues from male (M) and female (F) Sprague-Dawley rats 1 and 3 hr after a single IV dose of 4 or 8 mg OP/kg.

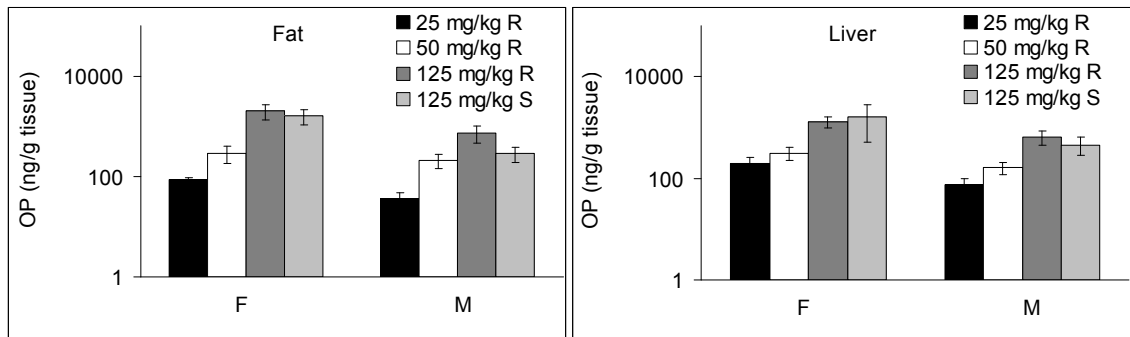


Figure 7-9: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) after a daily oral dose of 25, 50 or 125 mg OP/kg in female (F; 35 days) and male (M; 60 days) Sprague-Dawley rats compared with OP tissue concentrations 24 hr after a single oral dose of 125 mg OP/kg). R = repeated exposure, S = single exposure.

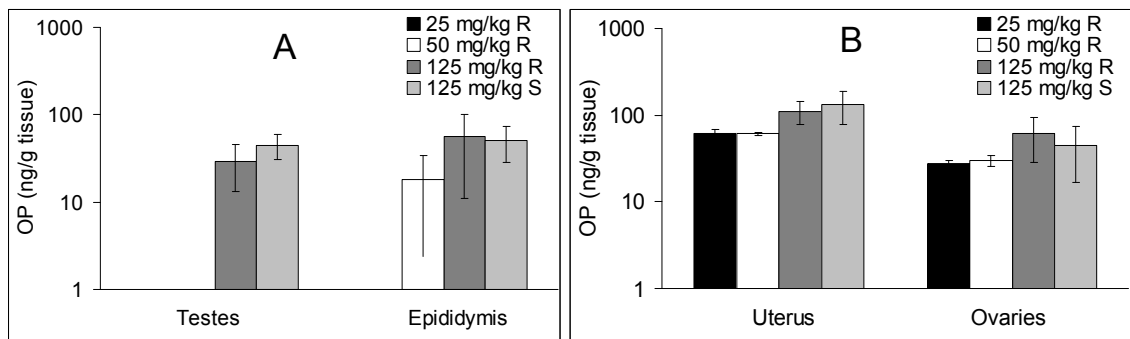


Figure 7-10: OP tissue concentrations (mean  $\pm$  S.D., n=5) in reproductive tissues from Sprague-Dawley rats after 60 (A; male) and 35 (B; female) daily oral doses of 25, 50 or 125 mg OP/kg compared with OP tissue concentrations 24 hr after a single oral dose of 125 mg OP/kg. R = repeated exposure, S = single exposure.

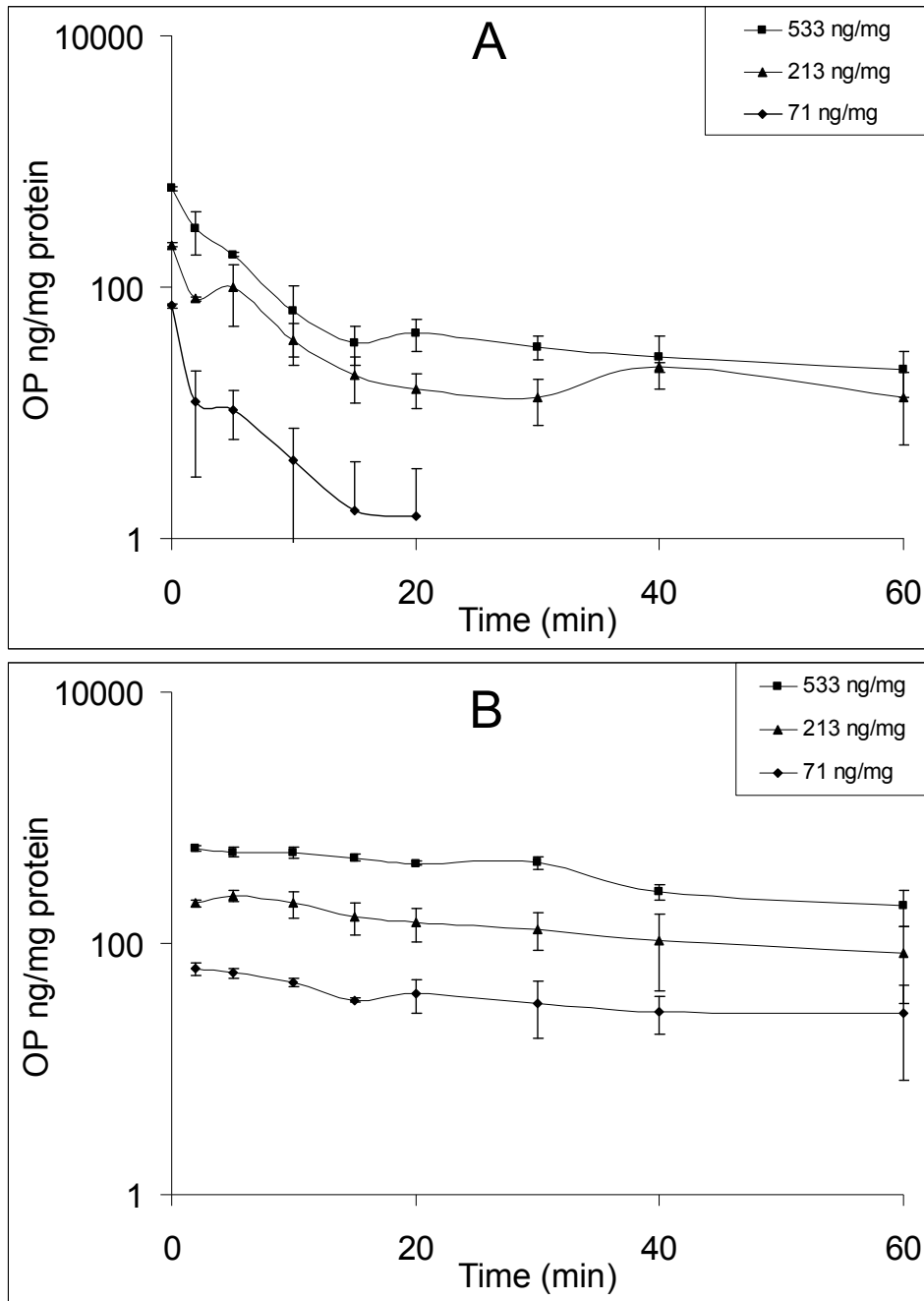


Figure 7-11: *In vitro* metabolism of OP with liver microsomes from male (A) and female (B) Sprague-Dawley rats incubated for 2 to 60 min with various concentrations of OP (71, 213 or 533 ng OP/mg protein).

## **CHAPITRE HUITIÈME:**

**Physiologically-based modeling of *p-tert*-octylphenol kinetics following intravenous, oral or subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats**

## **8. Chapitre huitième: Physiologically-based modeling of *p-tert*-octylphenol kinetics following intravenous, oral or subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats**

G. Hamelin<sup>1</sup>, S. Haddad<sup>2</sup>, K. Krishnan<sup>1</sup> and R. Tardif<sup>1</sup>

1) Département de santé environnementale et santé au travail. Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2) Département des sciences biologiques. Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Please address correspondence to:

Robert Tardif, Ph. D.

Département de santé environnementale et santé au travail

Université de Montréal

2375, Chemin de la Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada

H3T 1A8

Tel.: (514) 343-6111 ext. 1515

Fax: (514) 343-2200

E-mail: [robert.tardif@umontreal.ca](mailto:robert.tardif@umontreal.ca)



## ABSTRACT

The objective of this study was to develop a physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model for *p-tert*-octylphenol (OP) to simulate unchanged blood and tissue OP concentrations in rats. Compartments of the PBPK model included the liver, richly perfused tissues, poorly perfused tissues, reproductive tissues, adipose tissue and subcutaneous space, in which OP uptake was described as a blood flow- or a membrane diffusion- limited process. The PBPK model successfully simulated previously published data on blood and tissue OP concentrations in Sprague-Dawley rats following oral, intravenous (IV) or subcutaneous (SC) routes. The model predicted that OP concentrations would reach 6.8, 13.8 and 27.9 ng/ml (male) and 7.2, 14.7 and 31.4 ng/ml (female), 4 hours after a single IV dose of 2, 4 and 8 mg/kg, respectively. The model also predicted that OP concentrations would reach 53.3, 134.8 and 271.2 ng/ml (male) and 87.4, 221.4 and 449.7 ng/ml (female) 4 hours after a single oral dose (50, 125 and 250 mg/kg) and that, 4 hours after a single SC dose (125 mg/kg), OP concentrations would reach 111.3 ng/ml (male) and 121.6 ng/ml. A marked sex-difference was seen in blood and tissue OP concentrations. This was reflected in the model by a gender-specific maximal velocity of metabolism ( $V_{max}$ ) that was higher (1.77x) in male than in female rats. Further studies are required to elucidate the mechanism underlying the gender differences and to evaluate whether that is also observed in humans.

Key words: *p-tert*-octylphenol, toxicokinetic modeling, Sprague-Dawley rats, gender differences, endocrine disruptor

## INTRODUCTION

*p-tert*-Octylphenol [OP; p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol] is a degradation product of alkylphenol ethoxylate and is a non-ionic surfactant that can be found in waste water and ground water (Kolpin et al., 2002; Barnes et al., 2008). OP has been reported to act as a weak estrogenic compound (*in vivo* and *in vitro*) by binding to the estrogen receptor (Laws *et al.* 2000, 2006; Kwack *et al.* 2002).

Few studies have examined the toxicokinetics of OP (Certa *et al.*, 1996; Upmeier *et al.*, 1999). These studies have shown that OP is highly lipophilic and is rapidly metabolized in rats and excreted following conjugation with glucuronic acid or sulphate. These metabolites are not considered to be estrogenic (Van der Berg *et al.*, 2003). OP has also been shown to bind to protein but uncertainty remains about the degree of affinity (Nagel et al., 1999; Teeguarden and Barton, 2004) and this can have a tremendous influence on its toxicokinetics.

In a recent study (Hamelin et al., 2009), groups of male and female Sprague-Dawley rats were exposed to OP by the oral, intravenous (IV) or subcutaneous (SC) routes. The results of this study showed that male rats metabolize OP much faster than female rats. Additionally, repeated oral exposure over 35 days (female) or 60 days (male) showed that there was no bioaccumulation of OP at the dose evaluated but OP was found in all reproductive tissues, indicating the possibility that exposure to these tissues might lead to potential endocrine effects.

Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models are increasingly developed and evaluated for use in risk assessment for a better characterization of the relationship between administered dose and internal dose of several products. Thus, they have become an integral part of systematic efforts to establish if exposure might lead to accumulation and/or toxic effects in humans. These models can be used to conduct high dose to low dose, route-to-route or interspecies extrapolations (Krishnan and Andersen, 1994). To our knowledge, a PBPK model has not been developed for OP and such a model could facilitate a better understanding of the toxicokinetics of OP.

The objective of the present study was to construct a PBPK model for simulating unchanged blood and tissue OP concentrations, on the basis of data measured experimentally in a previous study where female and male Sprague-Dawley rats were administered OP by oral, subcutaneous (SC) and intravenous (IV) routes (Hamelin et al., 2009).

## METHODOLOGY

The information pertaining to animal treatment and methods has been reported in more detail in two previous papers (Hamelin et al, 2008, 2009). Briefly, groups of 5 male and 5 female Sprague-Dawley rats were given a single dose of OP by oral (50, 125 or 250 mg/kg), IV (2, 4 or 8 mg/kg) or SC (125 mg/kg) routes. Blood samples were collected for up to 4 h (IV) and 24 h (oral and SC) post-administration. A satellite group of animals receiving the same treatment was sacrificed after 1 and 3 h (IV) or 4 and 24 h (oral) post-administration and tissues (fat, liver, testes and uterus) were analysed for OP content. In a repeated dosing experiment, rats were given OP (oral) daily (25, 50 or 125 mg/kg) for 35 days (female) or 60 days (male). Blood samples were collected 1 hr post-exposure on the first day of treatment as well as 1 and 4 hr post-exposure on the 33<sup>rd</sup> day (female) or 57<sup>th</sup> day (male) of exposure. Blood and tissues (fat, liver, testes and uterus) were analyzed for OP content. OP concentrations were determined by a Varian 3900 gas chromatograph equipped with a Saturn 2100 T (ion trap) mass spectrometer (single ion monitoring), a CP 4800 auto sampler and a Varian VF-5ms capillary column. The quantitation was based on the ratio of the major fragment (135) of OP.

### PBPK modeling of OP

A PBPK model was developed for unchanged OP using the software package ACSLXtreme (Advanced Continuous Simulation Language) (Aegis Technologies Group Inc., Huntsville, AL) in order to simulate the kinetics of OP in male and female Sprague-Dawley rats exposed to OP. The PBPK model simulates the absorption, distribution, biotransformation and excretion of OP during oral, IV or SC exposure. The compartments of the PBPK model included the liver, richly perfused tissues, poorly perfused tissues, fat and reproductive organs (testes or uterus), as shown in Figure 8-1. A subcutaneous space compartment was added in order to accurately describe subcutaneous exposure. The

physiological parameters (Table 8-I) were obtained from Corley et al. (1990), Haddad et al. (1998) and Plowchalk and Teeguarden (2002). Metabolism was described to occur primarily in the liver.

The tissue: plasma partition coefficients (Table 8-II) were calculated with the formula developed by Poulin and Theil (2002) assuming a free fraction of 0.1 for plasma protein binding. The richly perfused and poorly perfused tissue:plasma partition coefficient corresponded to the mean of the tissue: plasma partition coefficients of different tissues (skin, bone, muscles for poorly perfused tissues and brain, gut, kidney, spleen and heart for richly perfused tissues). The testes: plasma partition coefficient and the uterus:plasma partition coefficients were optimized using the data from the IV administration. The physiological parameters of the subcutaneous space in the model correspond to 1% of the slowly perfused tissues and the value of the subcutaneous compartment:plasma partition coefficient was optimized based on a starting value corresponding to 30% of the fat:plasma partition coefficient and 70% of the poorly perfused tissues:plasma partition coefficient. Plasma:tissue partition coefficients were assumed to be equal to whole blood: tissue partition coefficients.

The values of several input parameters were estimated based on model fit to experimental data. A sequential approach was used so that the most pertinent data were used at step of the process as depicted in Figure 8-2. The PBPK model was initially developed with blood and tissue OP concentrations following IV administration. With these initial parameters, the PBPK model (with perfusion-limited description of tissue uptake in all tissues) was not able to adequately describe experimental data (Figure 8-3A). When diffusion-limited processes were introduced in poorly perfused tissues, adipose tissues, liver and reproductive tissues, the model simulations reproduced more adequately the

experimental data (Figure 8-3 B). Once the parameters were refined for IV data, the oral and SC exposure data were used to estimate the route-specific absorption parameters. For the female rat PBPK model, the parameters of the male model were used with the exception of the uterus: blood partition coefficient and the maximal velocity of metabolism ( $V_{max}$ ).

Table 8-III summarizes metabolic, diffusion, bioavailability and absorption constants that were incorporated in the model. For simplicity, only one set of metabolic parameters (maximal velocity of metabolism ( $V_{max}$ ) and Michaelis constant ( $K_m$ )) were described. The  $V_{max}$  for male rats and the  $K_m$  for both male and female rats were obtained from Nomura et al. (2008) while the  $V_{max}$  for female rats was optimized with data from the IV administration. Because of the gender differences in OP kinetics, a different  $V_{max}$  value was used for male and female rats.

The transfer of OP from blood to adipose tissues, poorly perfused tissues, liver and reproductive tissues is described as a diffusion-limited process and diffusion constants are presented in Table 8-III. Absorption by the oral ( $0.1 \text{ h}^{-1}$ ) or SC ( $0.05 \text{ h}^{-1}$ ) routes were described as first order constants. The model assumed that 45% of OP was bioavailable following oral exposure and 15% following SC administration. The physiological parameters and the  $V_{max}$  used in the model were scaled to the mean body weight of the rats exposed in a previous study (Hamelin et al., 2009).

### **Sensitivity analysis**

A sensitivity analysis was also performed by increasing the value of each parameter of the PBPK model by 10%, according to the method of Evans and Andersen (1995) in

order to identify which parameters of the PBPK model exerting the greatest influence on the area under the blood OP concentration *versus* time curve (AUC) over 24 h following a single oral or IV dose of 5 mg/kg.

## RESULTS

### PBPK modeling of unchanged OP in blood

Figure 8-4 depicts the blood concentration of unchanged OP (mean  $\pm$  SD) measured in female and male Sprague-Dawley rats after a single IV, oral or SC dose of OP and the corresponding PBPK model simulations. The PBPK model allowed a reasonable description of blood kinetics of OP and the results indicate that blood OP concentrations decrease rapidly for all exposure routes. The best fit of experimental data was achieved with bioavailability constants of 0.45 (oral) and 0.15 (SC) as well as absorption constant of  $0.1 \text{ h}^{-1}$  (oral) and  $0.05 \text{ h}^{-1}$  (SC). Consistent with the experimental data, the model predicted that OP concentrations would reach 6.8, 13.8 and 27.9 ng/ml (male) and 7.2, 14.7 and 31.4 ng/ml (female), 4 hours after a single IV dosing (2, 4 and 8 mg/kg). The model also predicted that OP concentrations would reach 53.3, 134.8 and 271.2 ng/ml (male) and 87.4, 221.4 and 449.7 ng/ml (female) 4 hours after a single oral dosing (50, 125 and 250 mg/kg). Finally, the model simulations indicated that, 4 hours after dosing, OP concentrations would reach 111.3 ng/ml (male) and 121.6 ng/ml (female) following a single SC dose of 125 mg/kg.

Figure 8-5 depicts the blood concentration (mean  $\pm$  SD) of unchanged OP measured in male and female rats 1 h after a single dose or 1 h and 4 h after 33 (female) or 57 (male) daily oral doses of 25, 50 and 125 mg/kg and the corresponding model simulations. The model predicted that OP concentrations would reach 59.8 and 150.6 ng/ml (male) and 98.2 and 248.5 ng/ml (female) 4 hours after 33 (female) or 57 (male) consecutive oral dosing (50 and 125 mg/kg). The PBPK model allowed a better description of blood kinetics of OP in female than in male rats following repeated dosing.



### **PBPK modeling of unchanged OP in tissues**

Liver OP concentrations (mean  $\pm$  SD) measured in rats after a single oral or IV dose of OP and the corresponding model simulations are depicted in Figure 8-6 while liver OP concentrations (mean  $\pm$  SD) measured in rats after 35 (female) and 60 (male) daily oral exposure and the corresponding model simulations are shown in Figure 8-7. The model predicted that liver OP concentrations would reach 937 and 1885 ng/mg liver (male) and 1531 and 3108 ng/mg liver (female) 4 h after a single oral dose of 125 and 250 mg/kg. The model also predicted that 1h after a single IV dose, liver OP concentrations would correspond to 222 and 486 ng/mg liver (male) and 356 and 807 (female) (4 and 8 mg/kg).

Fat OP concentrations (mean  $\pm$  SD) measured in rats after a single oral or IV dose of OP and the corresponding model simulations are shown in figure 8-8 while the data and simulations for the subchronic oral exposure are depicted in Figure 8-9. The model predicted that fat OP concentrations would reach 1360 and 2761 ng/mg fat (male) and 2420 and 4949 ng/mg fat (female) 4 h after a single oral dose of 125 and 250 mg/kg while the model predicted that fat OP concentrations would reach 1749 and 3605 ng/mg fat (male) and 1993 and 4171 ng/mg fat (female), 1 h after a single IV dose of 4 and 8 mg/kg.

Testes and uterus OP concentrations (mean  $\pm$  SD) measured in rats after a single oral or IV dose of OP and the corresponding model simulations are depicted in Figure 8-10 while the corresponding data for repeated oral exposure are shown in Figure 8-11. The model predicted that testes OP concentrations would reach 369 and 744 ng/mg testes 4 h after a single oral dose of 125 and 250 mg/kg and 597 and 1210 ng/mg testes 1 h after a single IV dose of 4 and 8 mg/kg. The model also predicted that uterus OP concentrations

would reach 163 and 331 ng/mg uterus 4 h after a single oral dose of OP (125 and 250 mg/kg) and 69 and 146 ng/mg uterus 1 h after a single IV dose (4 and 8 mg/kg).

### **Sensitivity analysis**

The results of the sensitivity analysis are depicted in Figures 8-12 (male) and 8-13 (female) and show that the model parameters that have the greatest influence on the AUC of blood OP concentration over 24 h following oral exposure are 1) the fraction of cardiac output to the richly perfused tissues (male and female), 2) the fraction of cardiac output to the liver (male and female) and 3) the oral bioavailability constant (male and female). In the case of IV administration: 1) the fraction of cardiac output to the richly perfused tissues (male and female), 2) the fraction of cardiac output to the poorly perfused tissues (male and female) and 3) the cardiac output (male) or the fraction of cardiac output to the liver (female) are the most sensitive parameters. Finally, in the case of SC exposure, these are 1) the fraction of cardiac output to the richly perfused tissues (male and female), 2) the dermal bioavailability constant (male and female) and 3) the fraction of cardiac output to the poorly perfused tissues (male and female).

## DISCUSSION

Little is known about the toxicokinetics of OP and, to our knowledge, no PBPK model has been previously developed for this compound. Even though toxicokinetics data were previously collected in male and female Sprague-Dawley rats following single or multiple oral, SC or IV administration (Hamelin et al. 2009), these data have not been interpreted using a PBPK model.

The development of the PBPK model for OP required the estimation of plasma and tissue partition coefficients as well as metabolic constants for OP. Plasma and tissue partition coefficients were not obtained experimentally but calculated using the formula developed by Poulin and Theil (2002) assuming a free fraction of 0.1 for plasma protein binding (Table 8-II). The same set of partition coefficients were used in both male and female models. Experiments were conducted to measure the specific binding of OP in order to calculate the free fraction of OP using equilibrium dialysis (not shown). However, reliable and reproducible results could not be obtained from these experiments because of the high percentage of non-specific binding. High affinity (Teeguarden and Barton, 2004) and low affinity (Nagel et al., 1999) binding to protein has been reported for OP. The bioactive fraction of 0.003 has been reported for OP in human serum (Nagel et al., 1999) but this value clearly underestimated circulating level of OP in Sprague-Dawley rats. Therefore, the value of 0.1 was used in the present PBPK model. The fraction of free "circulating" OP has a direct impact on its uptake into target tissues, particularly those with low metabolic capacity for which binding reduces OP availability and access across biological membranes (Teeguarden et al., 2005; Lipscomb and Poet, 2008). The tissue:plasma partition coefficients for subcutaneous space and reproductive tissues were optimized based on *in vivo* data, and therefore uncertainty remains regarding their exact values.

*In vitro* experiments with microsomes and cytosol obtained from male Wistar rats reported a  $V_{max}$  of 11.24 nmol/(min\*mg microsomal protein) and a  $K_m$  of 8.77  $\mu$ mol/l for enzyme catalyzed OP glucuronidation reaction and a  $V_{max}$  of 2.85 nmol/(min\*mg protein) and a  $K_m$  of 11.35  $\mu$ mol/l for the sulphatation reaction (Certa et al., 1996). In another experiment with microsomes obtained from male Sprague-Dawley rats, Nomura et al. (2008) reported a  $V_{max}$  of  $3.21 \pm 1.22$  nmol/min/mg microsomal protein and a  $K_m$  of 79  $\mu$ M for OP glucuronidation in the rat liver. This discrepancy between  $V_{max}$  and  $K_m$  values could at least partly be caused by strain differences between Wistar and Sprague-Dawley rats and for this reason, the values of Nomura et al. (2008) were used in the present model for Sprague-Dawley rats. It should be noted that there could be differences in metabolism rate between *in vivo* and *in vitro* systems. The feasibility to incorporate *in vitro* metabolic parameters to PBPK model is of interest and it would be important to identify the mechanism behind these differences to determine if the values used in the present model are appropriate. Nomura et al. (2008) also reported a  $V_{max}$  of  $0.12 \pm 0.02$  nmol/min/mg microsomal protein and a  $K_m$  of 306  $\mu$ M (kidney), a  $V_{max}$  of  $4.13 \pm 0.91$  nmol/min/mg microsomal protein and a  $K_m$  of 1241  $\mu$ M (intestine) and a  $V_{max}$  of  $0.05 \pm 0.01$  nmol/min/mg microsomal protein and a  $K_m$  of 57  $\mu$ M (testis). For simplicity, the metabolism of OP was described in the PBPK model as a single saturable, rate-limiting step and only one set of metabolic parameters was used. This simplification was justified based on the lack of data to validate the individual steps in the metabolism of OP and the smaller capacity of the extrahepatic tissues. Furthermore, because unchanged OP is considered estrogenic but not OP metabolites, a model detailing OP metabolism through multiple steps was not considered necessary. Similarly, the renal and biliary excretions of OP metabolites were not described in the model because of the lack of experimental data supporting these parameters.

Although the  $K_m$  reported by Nomura *et al.* (2008) was used for both male and female rats in this PBPK model, the  $V_{max}$  reported was too high to accurately describe the results obtained experimentally in female rats and a value 133 mg/h/kg was used in the model for female rats. The best fit of experimental data was achieved when a different  $V_{max}$  value was set for male and female. Marked sex differences were also observed for a closely related compound, nonylphenol (Green *et al.*, 2003) and these gender differences are most likely related to metabolism. The effect of modifying the absorption parameters was also considered to explain the observed gender differences but changing these parameters would not account for the differences observed following IV administration (Figure 8-4).

OP was found to be absorbed quite rapidly from the GI tract (time to the maximal concentration ( $T_{max}$ ) of 1h) in Sprague Dawley rats. Nevertheless, it is unclear how extensively OP is absorbed from the GI tract as published data on the oral bioavailability or absorption of OP orally are limited. We reported that oral bioavailability ranged from 28 to 36% in male and from 46 to 55% in female rats (Hamelin *et al.*, 2009). These values were higher than those reported by Certa *et al.* (1996) for male Wistar rats (2 – 10%) as well as those reported by Upmeier *et al.* (1999) for female DA/Han rats given OP orally (8.4 – 12.3 %). Similarly, relatively little information has been reported regarding the toxicokinetics of OP following SC administration. In the case of OP, the SC bioavailability was 29% (male) and 44% (female) in experimental animals based on the area under the blood concentration versus time curves (Hamelin *et al.*, 2009). Consequently, in the present PBPK model, a subcutaneous space compartment was added in order to account for the slow absorption rate of OP following subcutaneous administration and oral and SC bioavailability and absorption constants were fitted in the PBPK model with the experimental data. Satisfactory model fit to the SC data were obtained with the use of a bioavailability

constant of 0.15. This value probably reflects a high degree of OP storage in tissues that do not reach the blood.

The tissue uptake of OP was initially determined in the PBPK model by blood flow to tissues and tissue:plasma partition coefficients. This perfusion-limited uptake description, which is conventional in PBPK modeling, was not consistent with the observed kinetic profile of OP in certain tissues. Therefore, the uptake was described as a diffusion-limited process in poorly perfused tissues, fat, liver and reproductive tissues while richly perfused tissues and subcutaneous space were described as perfusion-limited processes. The PBPK model accurately simulated the tissue concentration profile observed in rats receiving OP by IV and oral routes. The diffusion-limited uptake of OP is possible considering the fact that OP is a relatively large molecule whose transport across tissues could be rate-limiting.

The PBPK model developed in this study accurately described the toxicokinetics of OP in male and female Sprague-Dawley rats following a single oral, IV or SC exposure. The model predicted that OP is rapidly metabolized and that blood OP concentrations would reach 6.8, 13.8 and 27.9 ng/ml (male) and 7.2, 14.7 and 31.4 ng/ml (female), 4 hours after a single IV dosing (2, 4 and 8 mg/kg) (Figure 8-4). These are quite similar (19% difference between experimental results and model simulations) to the measured values of  $12.2 \pm 4.9$  and  $38.2 \pm 13.0$  in male rats but overestimate (40 % difference) the values of  $22.5 \pm 10.2$  and  $57.3 \pm 6.7$  in female rats measured 4 h after a single IV dosing (4 and 8 mg/kg) (Hamelin et al., 2009). Additionally, the model also predicted that OP concentrations would reach 53.3, 134.8 and 271.2 ng/ml (male) and 87.4, 221.4 and 449.7 ng/ml (female) 4 hours after a single oral dosing (50, 125 and 250 mg/kg). This agrees well (22% difference) with the values of  $88.8 \pm 59.0$ ,  $166.7 \pm 55.9$  and  $256.2 \pm 62.9$  (male) and

the values of  $68.1 \pm 34.3$ ,  $270.8 \pm 126.2$  and  $317.6 \pm 149.0$  (female) measured 4 h after a single oral dose (50, 125 and 250 mg/kg) (Hamelin et al. 2009). Finally, the model predicted that, 4 hours after dosing, OP concentrations would reach 111.3 ng/ml (male) and 121.6 ng/ml (female) following a single SC dose of 125 mg/kg while the values of  $90.0 \pm 14.6$  (male; 19% difference) and  $113.2 \pm 30.1$  (female; 7% difference) were measured (Hamelin et al., 2009).

The model predicted that, 4 hours after 33 (female) or 57 (male) consecutive oral dosing, blood OP concentrations would reach 59.8 and 150.6 ng/ml (male) and 98.2 and 248.5 ng/ml (female) (50 and 125 mg/kg) while the values of  $422.9 \pm 238.9$  and  $831.6 \pm 316.5$  (male) and  $78.3 \pm 13.7$  and  $345.8 \pm 112.0$  (female) were measured (Hamelin et al., 2009) (Figure 8-5). The PBPK model allowed a better description of female (24% difference) than male (84% difference) kinetics following subchronic exposure since blood OP concentrations increased relatively more in male than female rats following repeated exposure while tissue OP concentrations remained similar after single or repeated exposure. The reason for this is unclear but could be related to differences in metabolism and enzymatic induction between male and female rats. The experimental results and model simulation both indicate that no substantial bioaccumulation will occur following oral exposure at the exposure level used in this study. The major characteristic favouring bioaccumulation is likely poor body clearance, rather than high lipophilicity (Andersen et al. 2008). The results of this modeling study indicate that low oral dose of OP are efficiently removed by the liver in rats and it would be important to evaluate how this translates to humans given the species differences in the urinary and biliary routes of excretion for OP (Certa et al., 1996).

The PBPK model simulations and experimental data in male Sprague-Dawley rats (Hamelin et al., 2009) for the blood OP concentrations following a single IV dose of 5 mg/kg OP were lower than those reported in male Wistar rats (Certa et al., 1996). However, the blood OP concentrations reported by these authors for a single oral dose of 50 or 200 mg/kg OP were actually lower in male Wistar rats than experimental results in male Sprague-Dawley rats (Hamelin et al., 2009) and PBPK model simulations. Blood OP concentrations following a single IV administration to 5 mg/kg OP were higher in female DA/Han rats than experimental results in Sprague-Dawley rats (Hamelin et al., 2009) and model simulations. Blood OP concentrations were similar following a single oral gavage exposure to 50 mg/kg or 200 mg/kg in female DA/Han rats (Upmeier et al., 1999) than experimental results in Sprague-Dawley rats (Hamelin et al., 2009) and model simulations. Discrepancies between these studies might partly be explained by differences by the analytical method and/or by strain differences in maximal velocity and/or affinity for OP metabolism. Because of these strain differences, caution should be exercised in using the PBPK model for interpretation of toxicity data obtained in strains other than Sprague-Dawley rats.

Yoshida et al. (2000) reported blood OP concentrations in female Donryu and F344 rats, 24 after the last of 7 and 28 consecutive daily OP SC injections. Blood OP concentrations in this study were identical in both strains and were similar after 7 or 28 daily exposures. These values were higher than those measured in our previous study (Hamelin et al., 2009). Serum OP concentrations were also reported by Katsuda et al. (2000) in female Donryu rats, 24 h after the last of 2 and 14 consecutive daily OP SC injections. These values were similar than those measured in our previous study (Hamelin et al., 2009) for the 2 days exposure scenario but higher than what we measured in the case of the 14 days exposure scenario. These two studies indicated a potential route dependency in the toxicokinetics of OP that could also be linked to a route dependency for the



elicitation of estrogenic effects. Katsuda et al. (2000) reported higher blood OP concentrations after 14 consecutive daily OP exposures, indicating that OP bioaccumulation might be possible following SC exposure while Yoshida et al. (2000) reported that the oral route was less effective than the SC route for eliciting estrogenic effects. Rapid elimination of OP is more probable following oral administration because of the first passage through the liver. This route dependency has also been reported in the closely related compound bisphenol A (Pottenger et al., 2000). However, experimental results and model simulations do not show a route dependency in the toxicokinetics of OP in Sprague-Dawley rats. Blood OP concentrations, 24 h after the last sampling, following SC administration were higher than those measured following oral exposure to the same dose but the areas under the blood concentration *versus* time (AUC) were similar under oral and SC exposure, indicating that OP toxicokinetics is similar under both exposure conditions. Overall, the PBPK model developed in this study successfully integrated and simulated a variety of data on the blood and tissue OP toxicokinetics measured in male and female Sprague-Dawley rats following single and repeated exposures.

## CONCLUSION

In summary, a PBPK model was developed to describe the blood and tissue concentrations of unchanged OP in Sprague-Dawley rats following administration by several routes. This model represents the first step towards prediction of the internal dose of OP following different doses and exposure scenarios in humans. A marked sex-difference was seen in blood and tissue kinetics of OP which, at least in part, is due to differences in metabolism. This was reflected in the model by a gender-specific  $V_{max}$ . Further studies are required to elucidate the mechanism underlying the gender differences observed and to evaluate whether that is applicable to humans.

**Acknowledgements** The authors wish to thank Ginette Charest-Tardif for her excellent technical assistance. Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is gratefully acknowledged. G. Hamelin is a recipient of a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

## REFERENCES

- Andersen, M.E., Reddy, M.B., Plotzke, K.P. 2008. Are highly lipophilic volatile compounds expected to bioaccumulate with repeated exposures? *Toxicol. Lett.* 179(2), 85-92.
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B. 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Sci. Total Environ.* 402(2-3), 192-200.
- Certa, H., Fedtke, N., Wiegand, H.J., Muller, A.M., Bolt, H.M. 1996. Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in male Wistar rats. *Arch. Toxicol.* 71(1-2), 112-122.
- Clarke, D.O., Elswick, B.A., Welsch, F., Conolly, R.B. 1993. Pharmacokinetics of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid in the pregnant mouse: a physiologically based mathematical model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121(2), 239-252.
- Corley, R.A., Bartels, M.J., Carney, E.W., Weitz, K.K., Soelberg, J.J., Gies, R.A., Thrall, K.D. 2005. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for ethylene glycol and its metabolite, glycolic Acid, in rats and humans. *Toxicol. Sci.* 85(1), 476-490.

Corley, R.A., Mendrala, A.L., Smith, F.A., Staats, D.A., Gargas, M.L., Conolly, R.B., Andersen, M.E., Reitz, R.H. 1990. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for chloroform. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103(3), 512-527.

Evans, M.V., Andersen, M.E. 1995. Sensitivity analysis and the design of gas uptake inhalation studies. *Inhalation toxicol.* 7, 1075-1094.

Green, T., Swain, C., Van Miller, J.P., Joiner, R.L. 2003. Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 38(1), 43-51.

Hamelin, G., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., Cyr, D.G., Charbonneau, M., Devine, P.J., Haddad, S., Cooke, G.M., Schrader, T., Tardif, R. 2008. Determination of *p-tert*-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 32(4), 303-307.

Hamelin, G., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., Cyr, D.G., Charbonneau, M., Devine, P.J., Haddad, S., Cooke, G.M., Schrader, T., Tardif, R. 2009. Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral and subcutaneous exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 72(8), 541-550.

- Katsuda, S., Yoshida, M., Isagawa, S., Asagawa, Y., Kuroda, H., Watanabe, T., Ando, J., Takahashi, M., Maekawa, A. 2000. Dose- and treatment duration-related effects of *p-tert*-octylphenol on female rats. *Reprod. Toxicol.* 14(2), 119-126.
- Kim, C.S., Sandberg, J.A., Slikker, W., Binienda, Z., Schlosser, P.M., Patterson, T.A. 2001. Quantitative exposure assessment: application of physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling of low-dose, long-term exposures of organic acid toxicant in the brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9(4), 153-160.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36(6), 1202-1211.
- Krishnan, K., Andersen, M.E. 2001. Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology, in: Hayes, A.W. (Ed), *Principles and Methods of Toxicology*. 4th ed. Taylor and Francis, Philadelphia, pp. 193-241.
- Kwack, S.J., Kwon, O., Kim, H.S., Kim, S.S., Kim, S.H., Sohn, K.H., Lee, R.D., Park, C.H., Jeung, E.B., An, B.S., Park, K.L. 2002. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65(5-6), 419-431.

- Laws, S.C., Carey, S.A., Ferrell, J.M., Bodman, G.J., Cooper, R.L. 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol. Sci.* 54(1), 154-167.
- Laws, S.C., Yavanxay, S., Cooper, R.L., Eldridge, J.C. 2006. Nature of the binding interaction for 50 structurally diverse chemicals with rat estrogen receptors. *Toxicol. Sci.* 94(1), 46-56.
- Lipscomb, J.C., Poet, T.S. 2008. In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. *Pharmacol. Ther.* 118(1), 82-103.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Welshons, W.V. 1999. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69(1-6), 343-357.
- Nomura, S., Daidoji, T., Inoue, H., Yokota, H. 2008. Differential metabolism of 4-n- and 4-*tert*-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sci.* 83(5-6), 223-228.
- Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z., Waechter, J.M. Jr. 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci.* 54(1), 3-18.

- Poulin, P., Theil, F.P. 2002. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *J. Pharm. Sci.* 91(5), 1358-1370.
- Sasongko, L., Williams, K.M., Day, R.O., McLachlan, A.J. 2003. Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56(5), 551-561.
- Teegarden, J.G., Barton, H.A. 2004. Computational modeling of serum-binding proteins and clearance in extrapolations across life stages and species for endocrine active compounds. *Risk Anal.* 24(3), 751-770.
- Upmeier, A., Degen, G.H., Schuhmacher, U.S., Certa, H., Bolt, H.M. 1999. Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. *Arch. Toxicol.* 73(4-5), 217-222.
- Van den Berg, M., Sanderson, T., Kurihara, N., Katayama, A. 2003. Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. *Pure Appl. Chem.* 75(11-12), 1917-1932.
- Yoshida, M., Katsuda, S., Ando, J., Kuroda, H., Takahashi, M., Maekawa, A. 2000. Subcutaneous treatment of *p-tert*-octylphenol exerts estrogenic activity on the female



reproductive tract in normal cycling rats of two different strains. *Toxicol. Lett.* 116(1-2), 89-101.

**Table 8-I:** Physiological parameters used in the rat PBPK model for OP.

Parameters	Male	Female
Body weight (kg) <sup>A</sup>	0.22-29	0.18-0.25
<u>Physiological constants</u> <sup>B</sup>		
Cardiac output (L/h/kg) (scalable by (BW) <sup>0.7</sup> )		15
<u>Fraction of cardiac output</u>		
Liver <sup>C</sup>		0.2500
Fat <sup>C</sup>		0.0900
Richly perfused tissues <sup>C</sup>	0.5022	0.5095
Poorly perfused tissues <sup>c</sup>		0.1485
Subcutaneous space <sup>D</sup>		0.0015
Reproductive tissues (Testes / Uterus) <sup>E</sup>	0.0078	0.0005
<u>Tissue volumes</u> (fraction of BW) <sup>A</sup>		
Liver <sup>C</sup>		0.0400
Cellular matrix		0.0356
Blood		0.0044
Fat <sup>C</sup>		0.0900
Cellular matrix		0.0894
Blood		0.0006
Richly perfused tissues <sup>C</sup>	0.0380	0.0480
Cellular matrix	0.0255	0.0322
Blood	0.0125	0.0158
Poorly perfused tissues <sup>C</sup>		0.6633
Cellular matrix		0.6567

Blood	0.0066	
Subcutaneous space <sup>D</sup>	0.0067	
Cellular matrix	0.0066	
Blood	0.0001	
Reproductive tissues (Testes / Uterus) <sup>E</sup>	0.0120	0.0003
Cellular matrix	0.0080	0.0002
Blood	0.0040	0.0001
Whole blood <sup>B</sup>	0.0662	

---

A. Hamelin et al., 2009

B. Corley et al., 1990

C. Haddad et al., 1998

D. Optimized in this study

E. Plowchalk and Teeguarden, 2002.

**Table 8-II:** Partition coefficients used in the PBPK model

Parameters	Male	Female
<u>Partition coefficient</u>		
Blood: air <sup>A</sup>		1.00
Liver: plasma <sup>A</sup>		7.30
Fat: plasma <sup>A</sup>		48.86
Richly perfused: plasma <sup>A</sup>		8.85
Poorly perfused: plasma <sup>A</sup>		3.00
Subcutaneous space: plasma <sup>B</sup>		17.00
Reproductive tissues (Testes / Uterus): plasma <sup>B</sup>	3.50	0.60

A Calculated according to the formula developed by Poulin and Theil (2002)

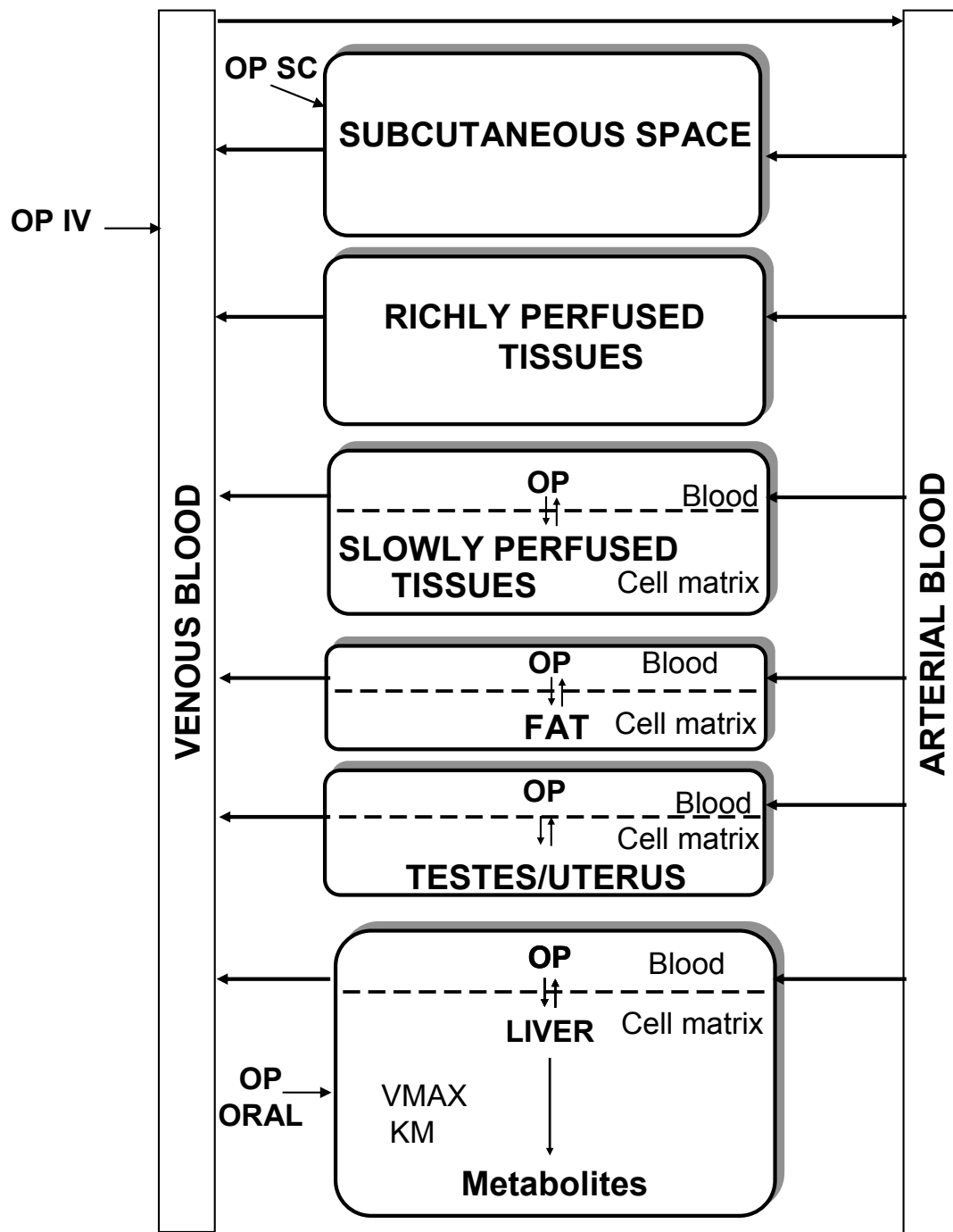
B Optimized in this study

**Table 8-III:** Metabolic constants, diffusion constants, bioavailability constants and absorption constants used in the PBPK model

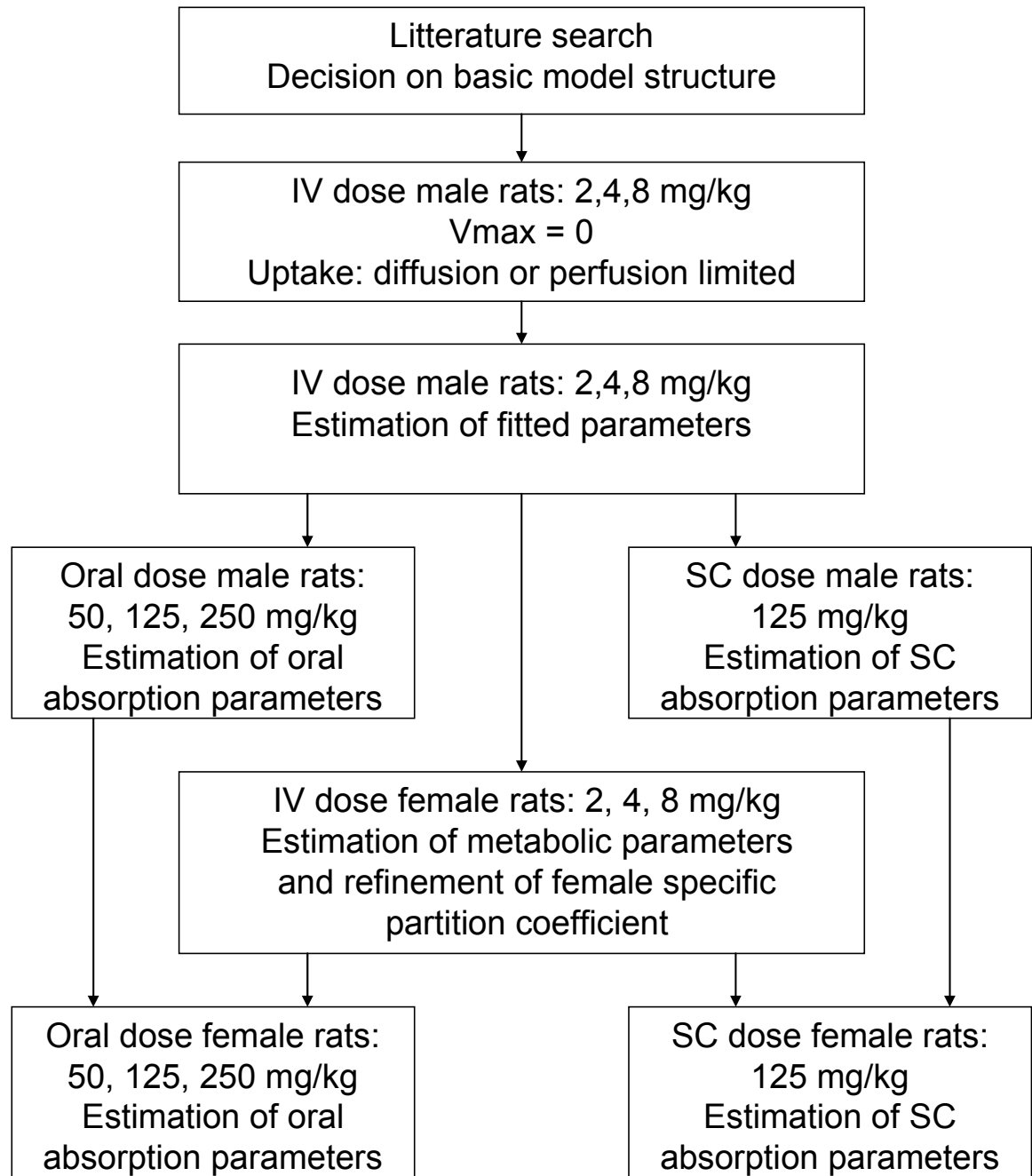
Parameters	Male	Female
<u>Metabolic constants</u>		
Vmax Liver (mg/h/kg) (scalable by (BW) <sup>0.75</sup> ) <sup>A</sup>	236	133
Km (mg/L) <sup>B</sup>		12
<u>Diffusion constants</u> <sup>B</sup>		
Richly perfused		1000
Poorly perfused		1
Fat		0.13
Liver		0.15
Subcutaneous space		1000
Reproductive tissues (Testes / Uterus)		0.7
<u>Bioavailability constants (fraction of dose)</u> <sup>B</sup>		
Oral		0.45
Dermal		0.15
<u>Absorption constants</u> <sup>B</sup>		
Oral (h <sup>-1</sup> )		0.1
Dermal (h <sup>-1</sup> )		0.05

A. Nomura et al., 2008 except for the female Vmax which was optimized in this study

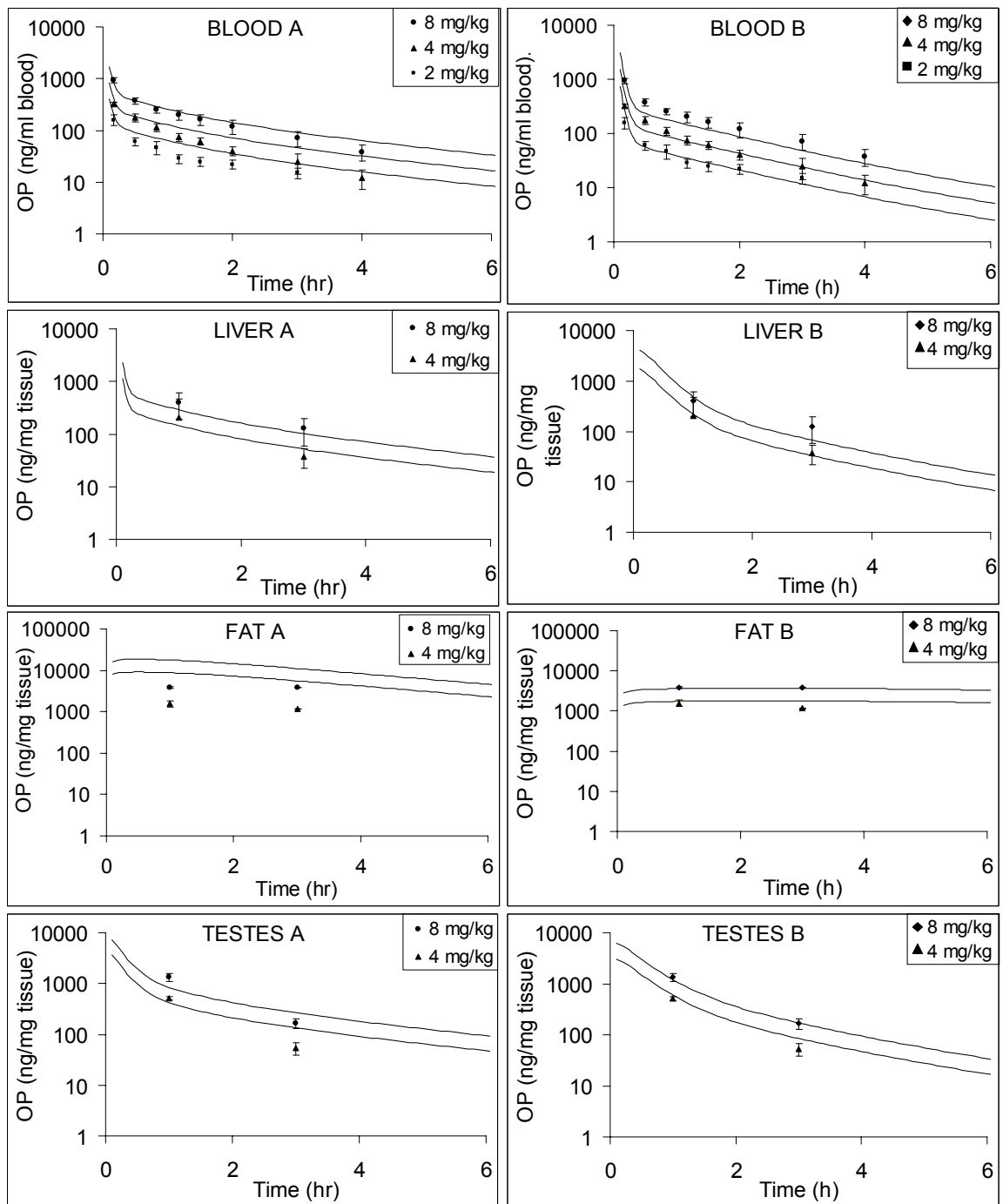
B. Optimized in this study



**Figure 8-1:** Conceptual representation of the PBPK model for OP. VMAX and Km refer to the maximal velocity of metabolism and Michaelis constant.



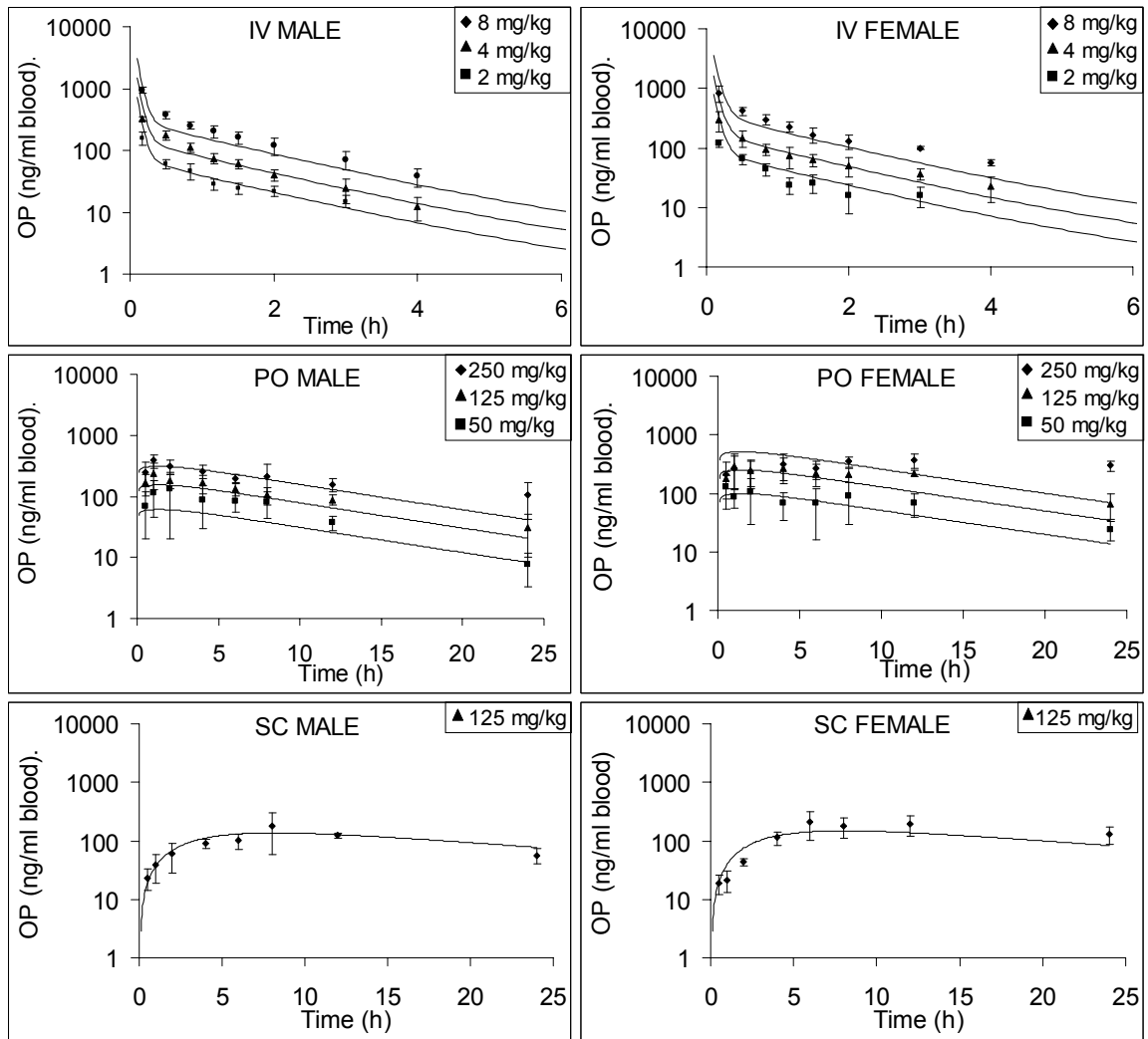
**Figure 8-2:** Schematic of the process of PBPK model development and validation for OP in male and female rats.



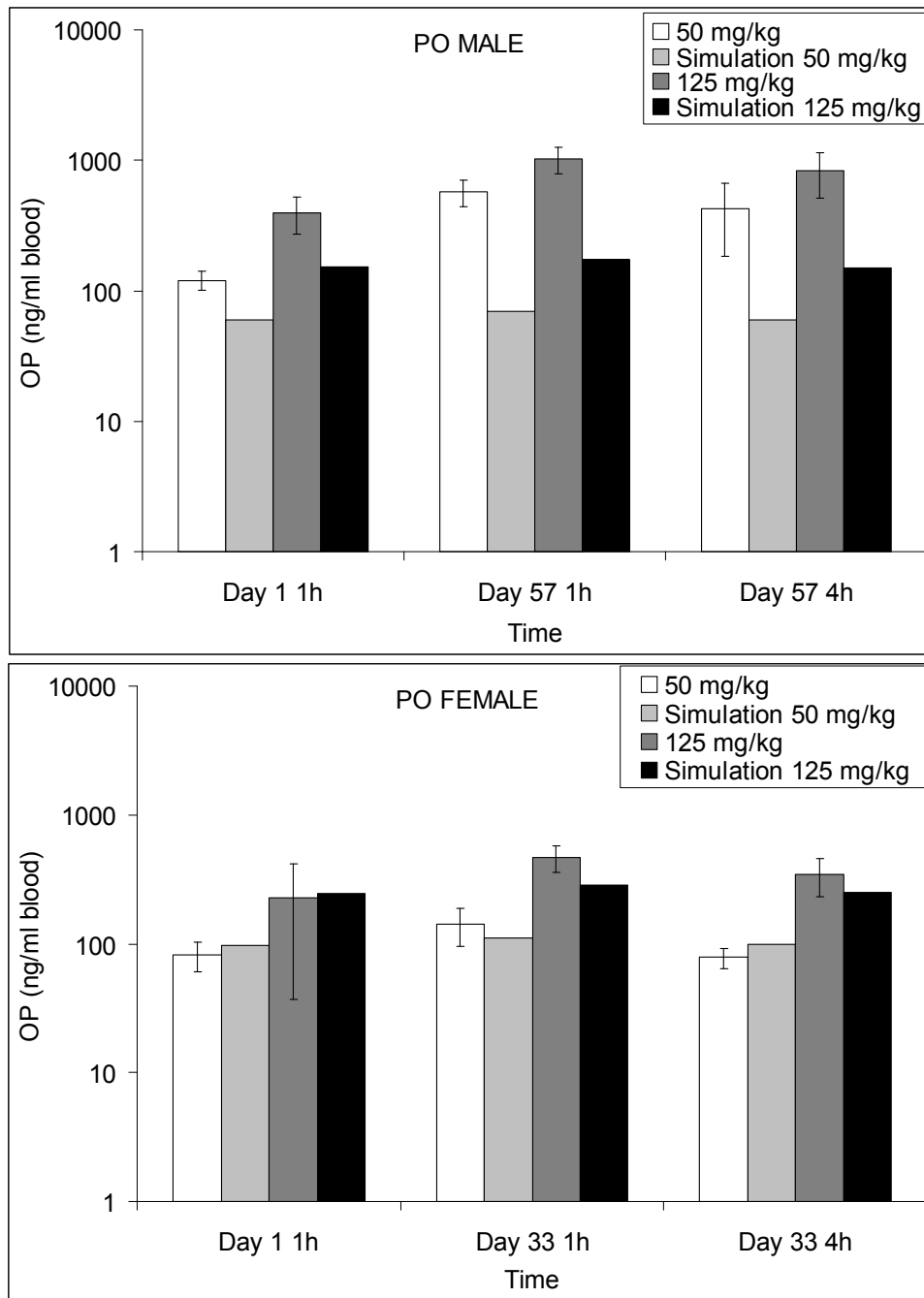
**Figure 8-3:** Comparison of PBPK model simulation (lines) with blood and tissues OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in male Sprague-Dawley rats up to 4h after a single



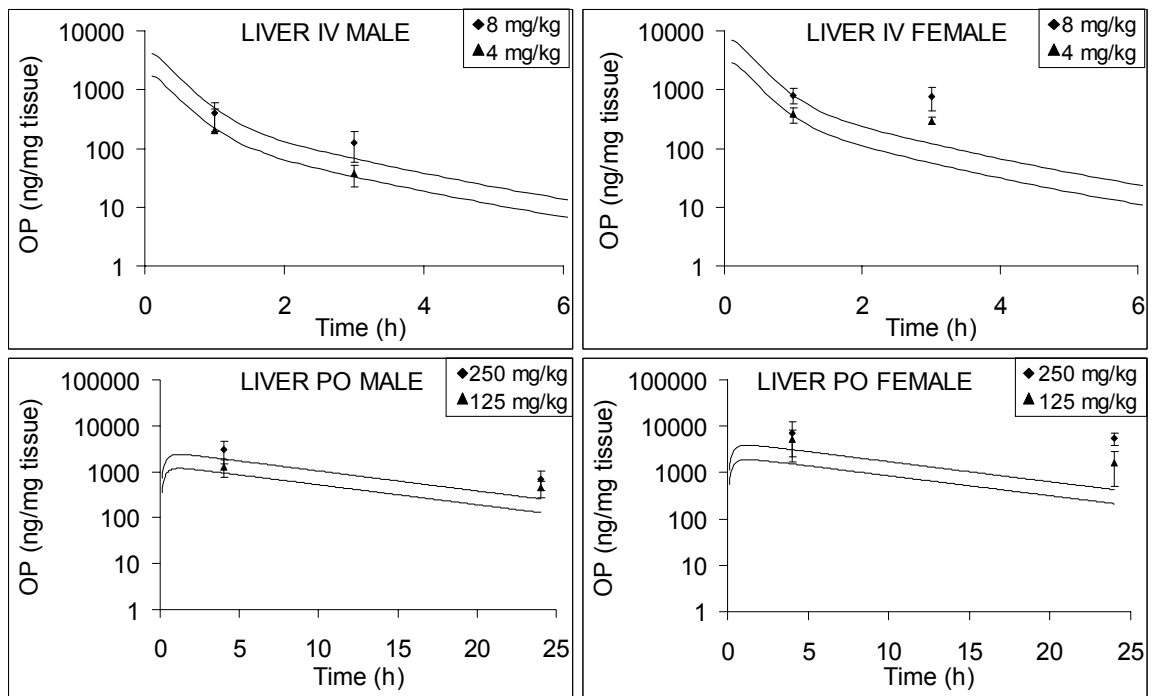
IV dose of OP (2, 4, 8 mg/kg) (n=5). The model simulations were obtained following the description of OP uptake as a perfusion-limited process in all tissues (A) or as a diffusion-limited process in poorly perfused tissues, adipose tissues, liver and reproductive tissues (B)



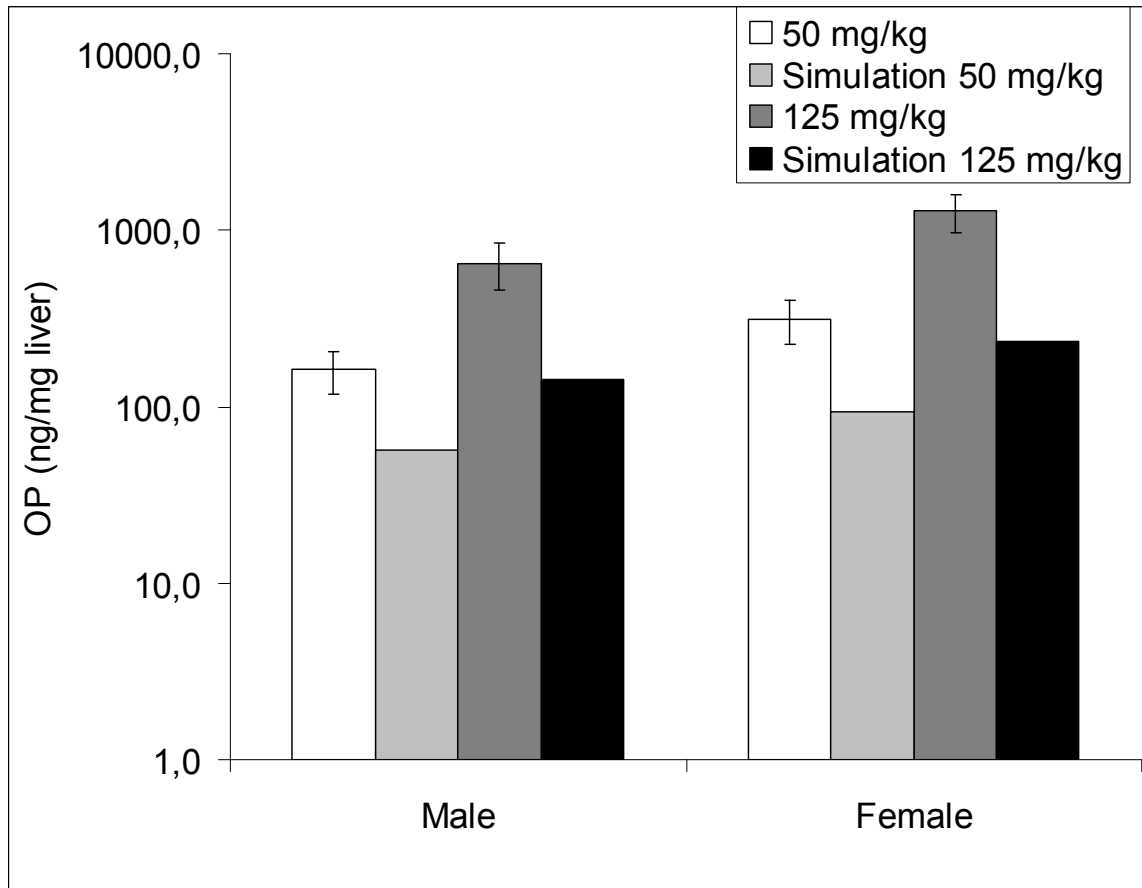
**Figure 8-4:** Comparison of model simulations (lines) with blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in male and female Sprague-Dawley rats up to 4 h after a single IV dose of OP (2, 4, 8 mg/kg) (n=5), up to 24 h after a single oral dose of OP (50, 125, 250 mg/kg) (n=5) or up to 24 h after a single SC dose of OP (125 mg/kg) (n=5).



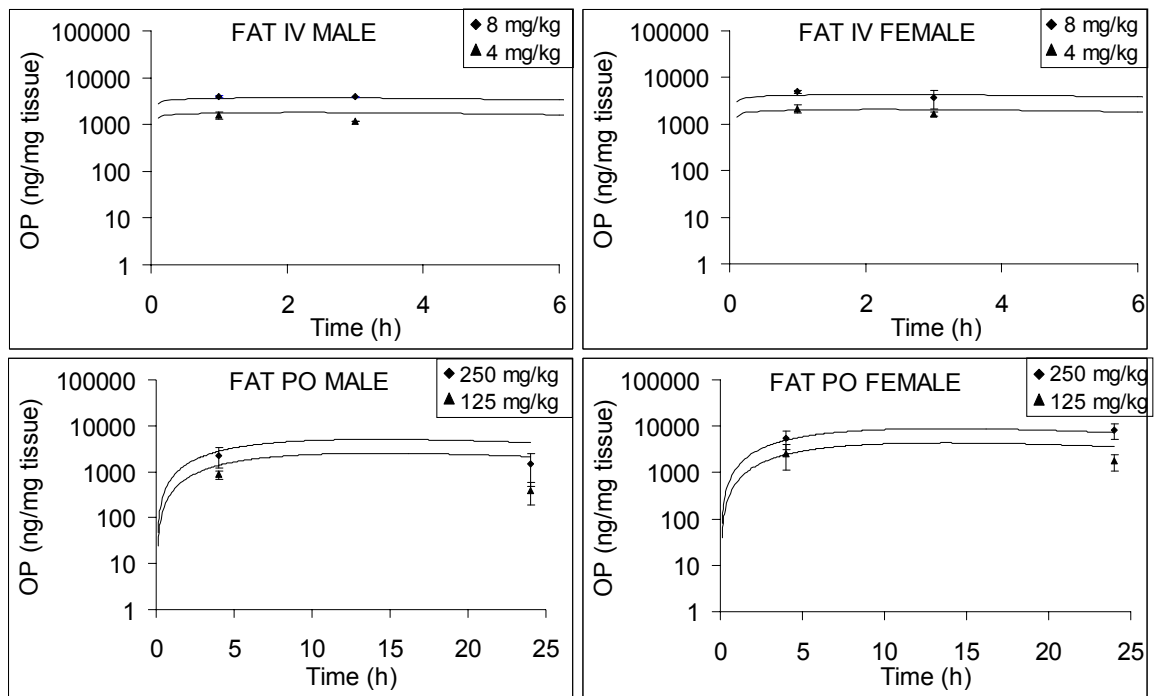
**Figure 8-5:** Comparison of model simulations with blood OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats 1 h after a single oral dose or 1h and 4h after 33 (female) or 57 (male) daily doses of OP (50, 125 mg/kg) (n=5).



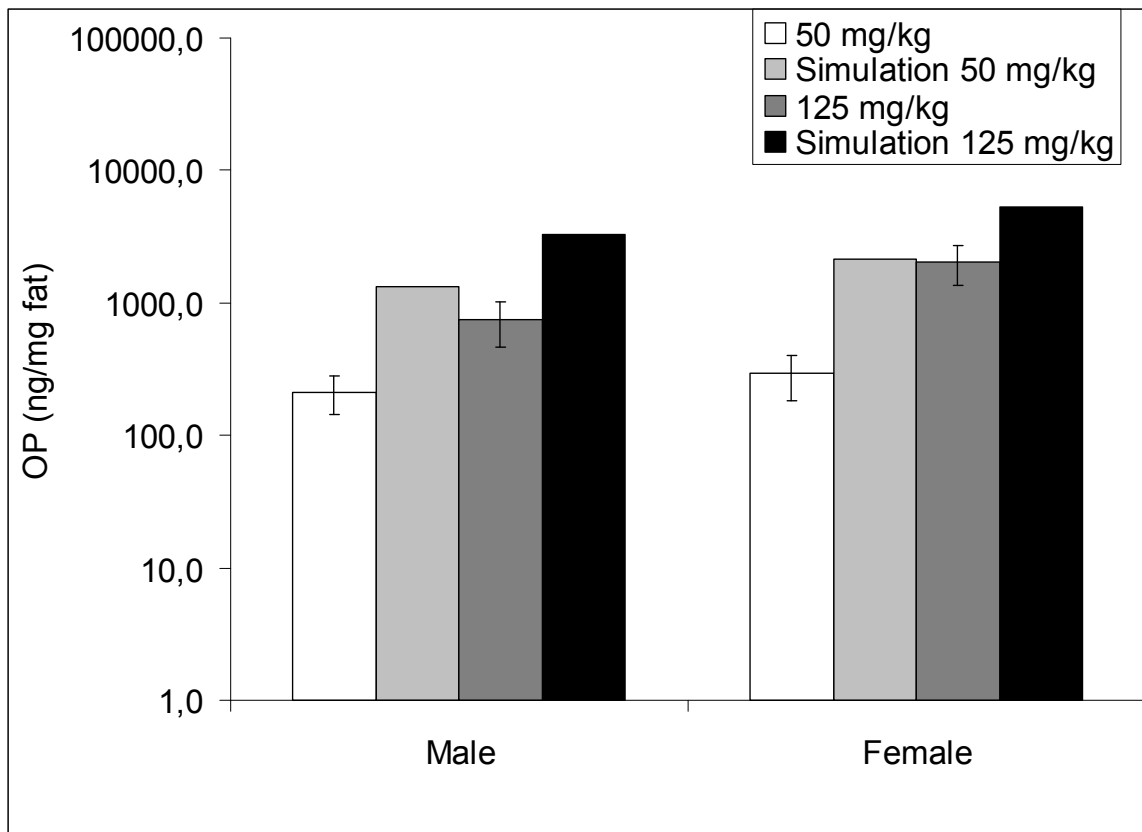
**Figure 8-6:** Comparison of model simulations (lines) with liver OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in male and female Sprague-Dawley rats 1 and 3 h after a single IV dose of OP (4, 8 mg/kg) (n=5) or 4 and 24 h after a single oral dose of OP (125, 250 mg/kg) (n=5).



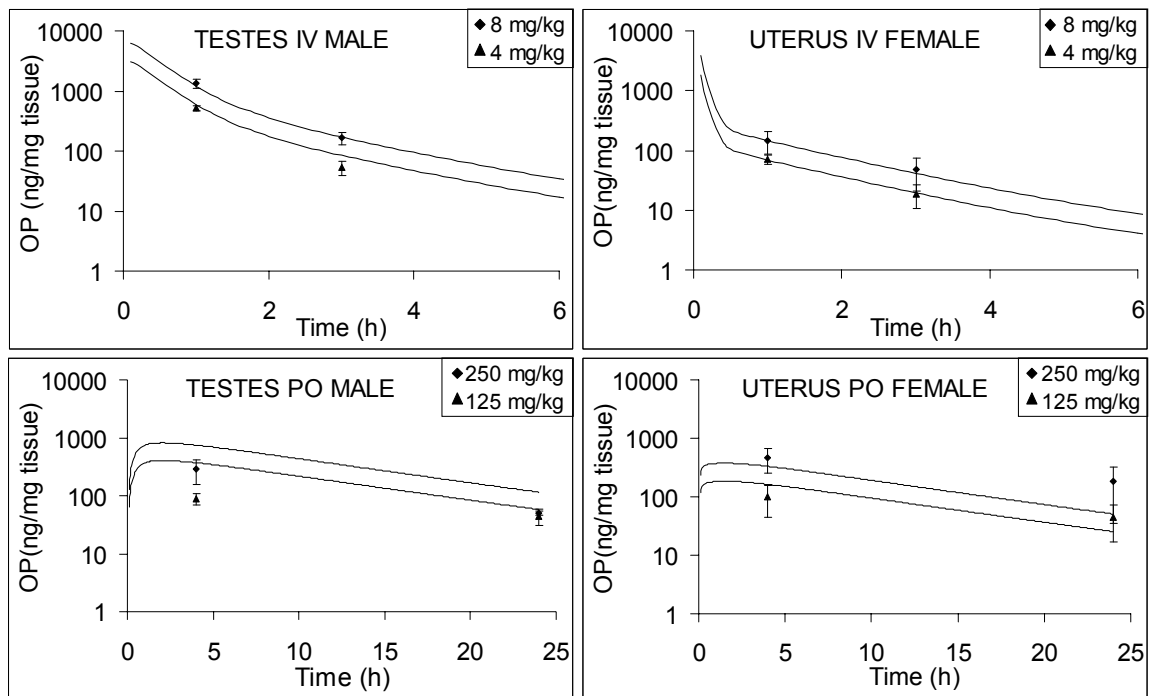
**Figure 8-7:** Comparison of model simulations with liver OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats 24 h after 33 (female) and 57 (male) days of daily oral dose of OP (50, 125 mg/kg) (n=5).



**Figure 8-8:** Comparison of model simulations (lines) with fat OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in male and female Sprague-Dawley rats 1 and 3 h after a single IV dose of OP (4, 8 mg/kg) (n=5) or 4 and 24 h after a single oral dose of OP (125, 250 mg/kg) (n=5).

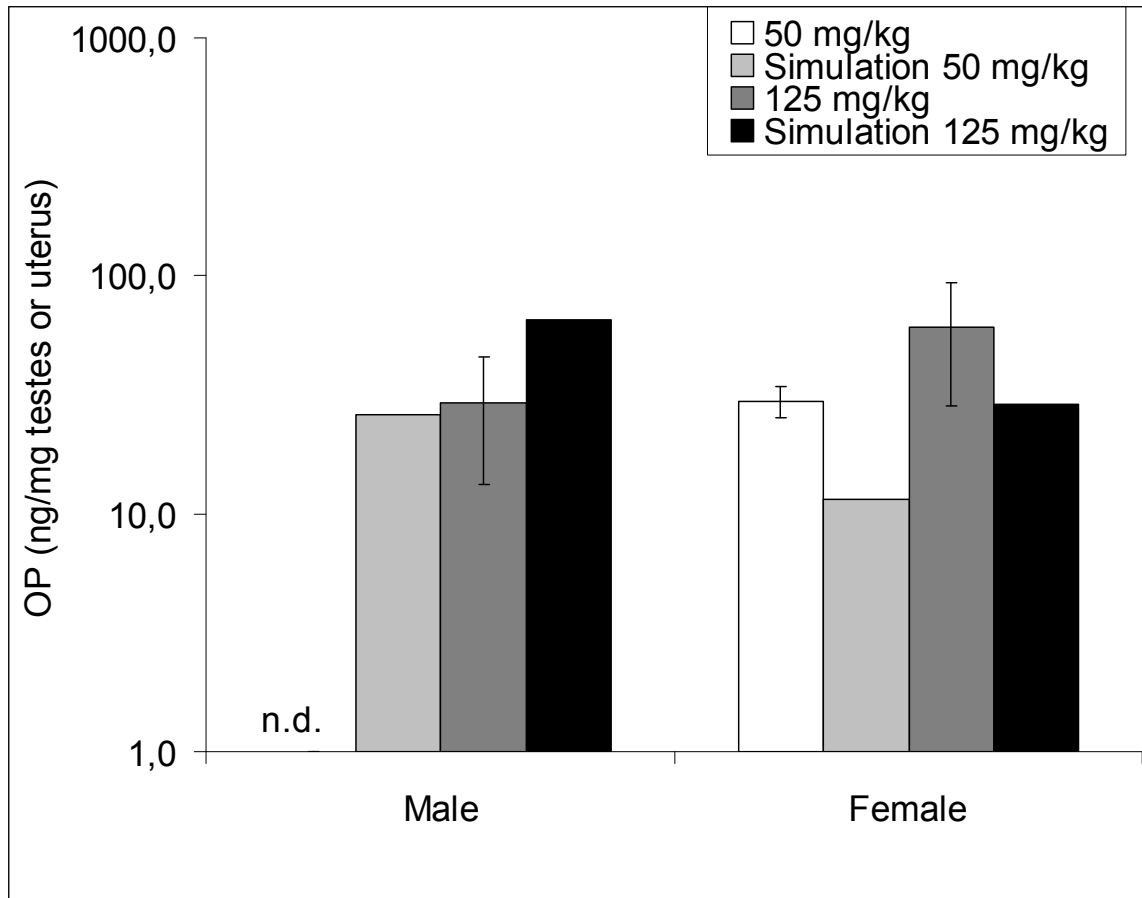


**Figure 8-9:** Comparison of model simulations with fat OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats 24 h after 33 (female) and 57 (male) days of daily oral dosing of OP (50, 125 mg/kg) (n=5).

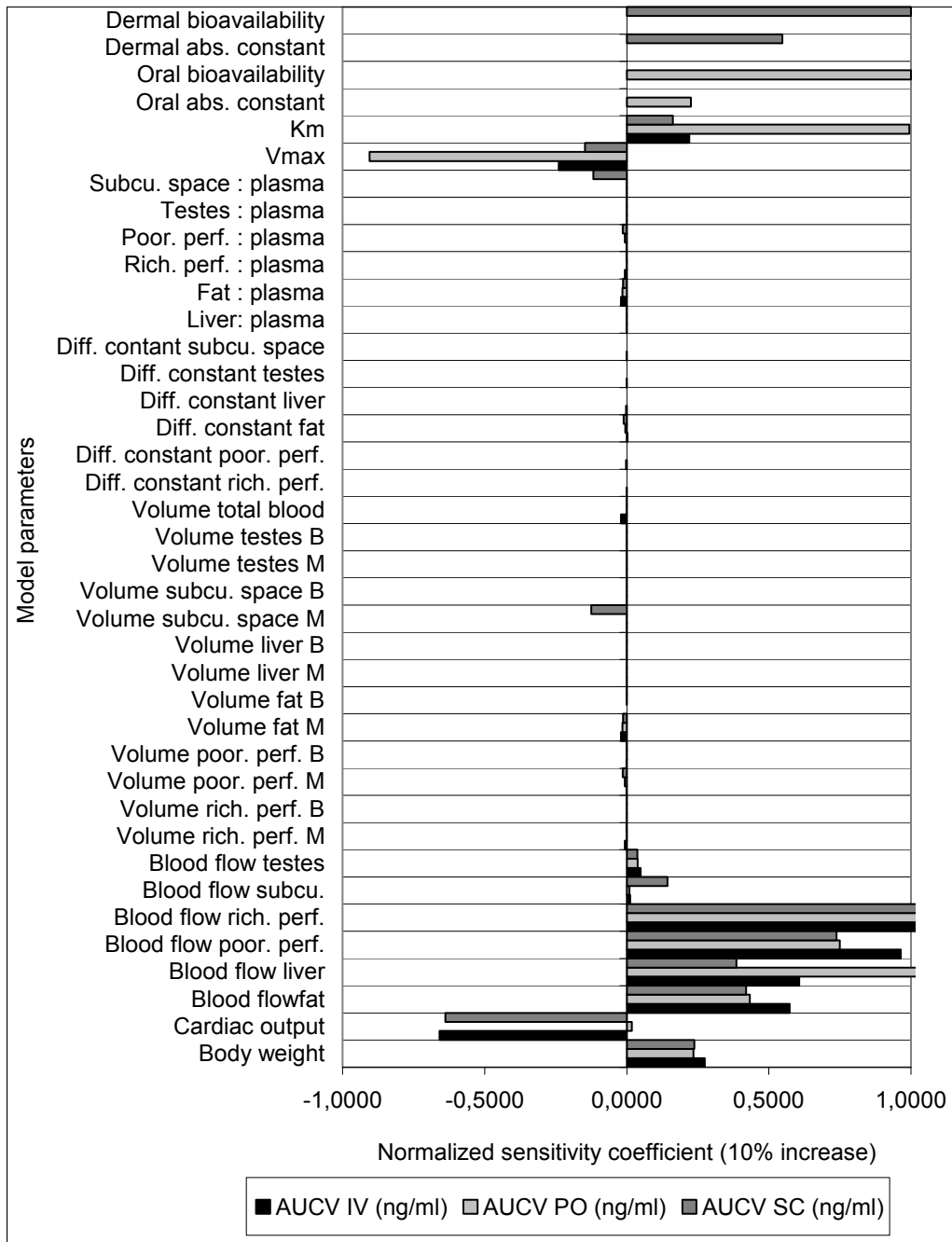


**Figure 8-10:** Comparison of model simulations (lines) with testes and uterus OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) in Sprague-Dawley rats 1 and 3 h after a single IV dose of OP (4, 8 mg/kg) (n=5) or 4 and 24 h after a single oral dose of OP (125, 250 mg/kg) (n=5).

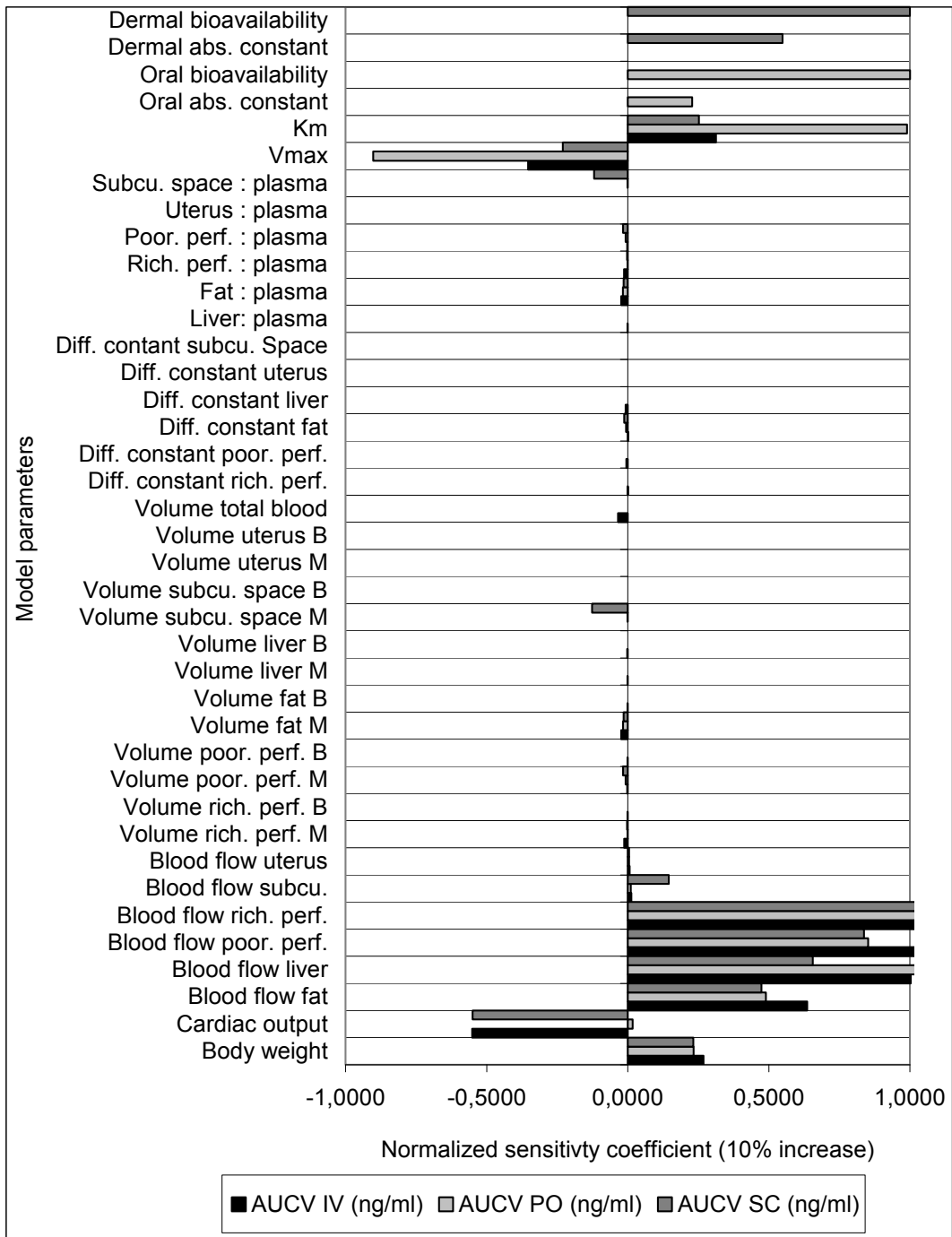




**Figure 8-11:** Comparison of model simulations with testes and uterus OP concentrations (mean  $\pm$  S.D.) measured in Sprague-Dawley rats 24 h after 33 (female) and 57 (male) days of daily oral exposure to 50 and 125 mg/kg (n=5).



**Figure 8-12:** Normalized sensitivity coefficient for various parameters used in the male PBPK model for OP. (M = matrix, B = blood, PO = oral)



**Figure 8-13:** Normalized sensitivity coefficient for various parameters used in the female PBPK model for OP. (M = matrix, B = blood, PO = oral)

**CHAPITRE NEUVIÈME:  
RÉSULTATS NON PUBLIÉS**

## **9. Chapitre neuvième : Résultats non publiés**

### **9.1. Comparaison du profil des concentrations sanguines d'octylphénol chez deux souches de rat**

Une étude préliminaire a été réalisée dans le but de comparer le profil des concentrations sanguines d'octylphénol chez deux souches de rat suite à une exposition orale (100 mg/kg de poids corporel). Ces expériences ont été réalisées chez deux rats Sprague-Dawley mâles et deux rats Fischer 344 mâles. Les résultats sont présentés à la figure 9-1. Ces données montrent qu'il existe une grande différence au niveau de la toxicocinétique entre ces deux souches de rat.

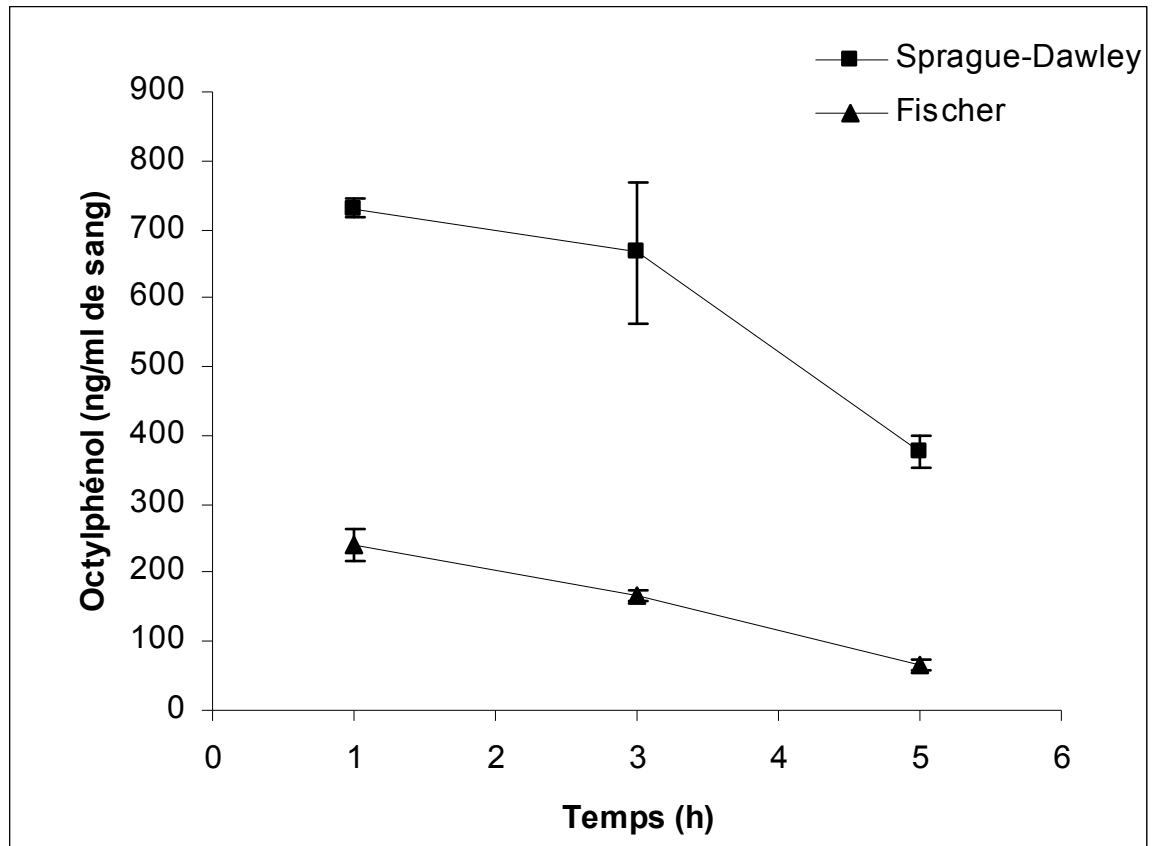


Figure 9-1: Comparaison des concentrations d'octylphénol dans le sang suite à une administration orale d'octylphénol (100 mg/kg de poids corporel) chez des rats mâles Sprague-Dawley et Fischer (n=2)

## 9.2. Glucuronidation de l'octylphénol

Des expériences préliminaires ont été réalisées avec des microsomes dans le but de vérifier le métabolisme de l'octylphénol dans les microsomes en présence d'acide uridine 5'-diphosphate glucuronique (UDPGA) chez les mâles et les femelles et de déterminer si

une différence entre les sexes existaient au niveau de la glucuronidation de l'octylphénol comme celle observée au niveau de l'oxydation de l'octylphénol (cf. chapitre 7).

Pour ce faire, du tampon phosphate 0,1 M contenant du  $MgCl_2$  et de l'UDPGA a été introduit dans des tubes en verre. Les tubes ont été pré-incubés à 37.5°C pour 10 minutes. Différentes concentrations d'octylphénol ont été ajoutées aux tubes ainsi qu'une quantité de 1 mg/ml de protéines microsomiales afin de démarrer la réaction. Après une incubation de 0, 5, 10, 15 et 20 minutes à 37.5°C, la réaction a été arrêtée avec du HCl. La concentration d'octylphénol inchangé a finalement été mesurée par GC-MS en utilisant le *p-tert*-butylphénol comme standard interne (Le Bigot et coll., 1983; Certa et coll., 1996).

Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 9-2. Il n'y a pas de différence majeure au niveau de la glucuronidation de l'octylphénol entre les rats mâles et femelles, contrairement aux résultats obtenus au niveau de l'oxydation de l'octylphénol dans les microsomes (c.f. chapitre 7). Ces résultats ont également montré que les processus d'oxydation de l'octylphénol étaient plus importants chez les rats mâles que les processus de glucuronidation alors que pour les rats femelles, la glucuronidation est plus importante. Cependant, ces résultats ne sont que préliminaires (duplicata) et ne démontrent qu'une tendance.

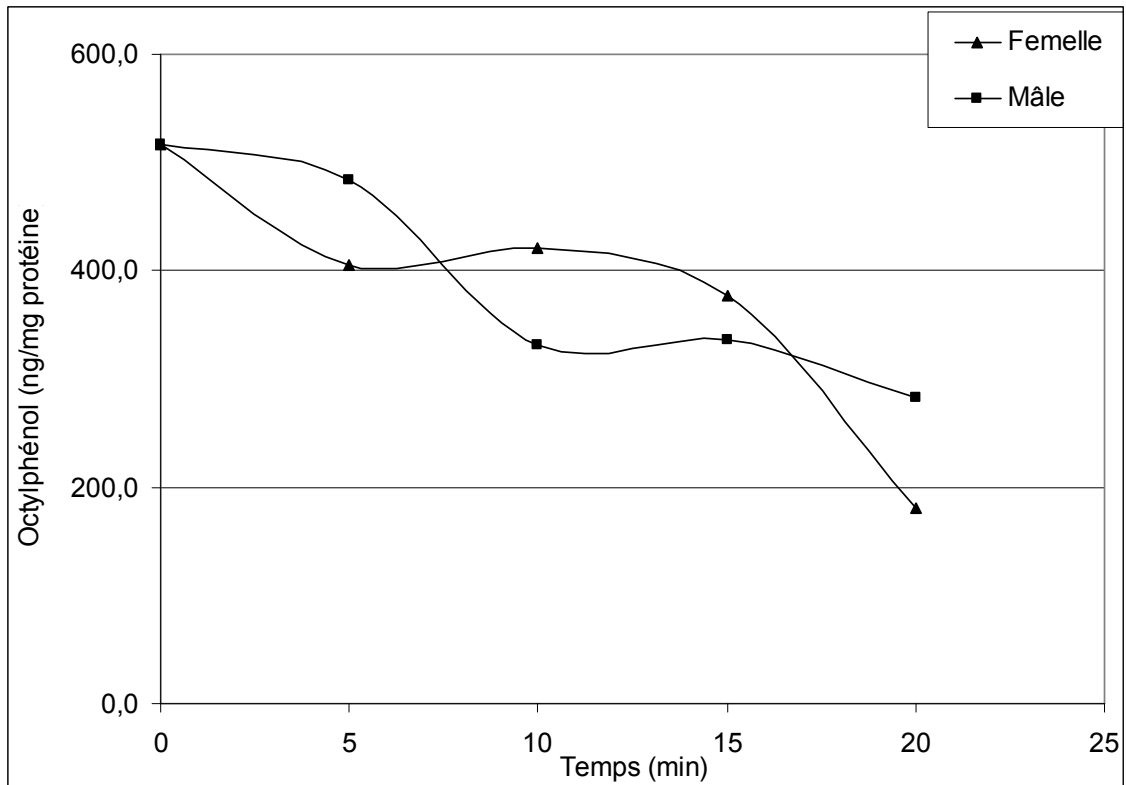


Figure 9-2: Étude du métabolisme microsomial de l'octylphénol en présence d'UDPGA

### 9.3. Caractérisation de la liaison de l'octylphénol aux protéines

Plusieurs tentatives ont été réalisées dans le but de caractériser la liaison de l'octylphénol aux protéines plasmatiques et ce, à l'aide de deux méthodes différentes. Dans un premier temps, des expériences ont été effectuées à l'aide d'un système d'ultrafiltration "Centrifree". Pour ce faire, différentes concentrations d'octylphénol ont été ajoutées à du sang (plasma). Les solutions ont été pipetées dans les tubes d'ultrafiltration et centrifugées à 2000 x g durant 20 min. La concentration d'octylphénol dans le filtrat a été analysée par GC-MS en utilisant le *p-tert*-butylphénol comme standard interne. Cependant, un haut



pourcentage de liaison non-spécifique a été observé avec cette méthode (Teegarden et coll., 2005; Knaak et coll., 1995). Des expériences ont été alors réalisées selon le même protocole mais cette fois à l'aide d'un système de dialyse à l'équilibre DIANORM (Jones et Houston, 2004). Encore une fois, il a été impossible de calculer la fraction libre d'octylphénol en raison du haut pourcentage de liaison non-spécifique.

**CHAPITRE DIXIÈME:**  
**DISCUSSION ET CONCLUSION**

## 10. Chapitre Dixième: Discussion et conclusion

Ce projet de recherche s'inscrit dans un projet global visant à développer un modèle toxicocinétique et toxicodynamique à base physiologique pour les 2 sexes qui intègre les profils d'expression génétique pour l'exposition aux perturbateurs endocriniens dans le but de permettre une meilleure évaluation des risques liés aux perturbateurs endocriniens comme l'octylphénol chez l'humain. L'objectif de notre étude était de caractériser la toxicocinétique sanguine et tissulaire de l'octylphénol chez le rat Sprague-Dawley mâle et femelle. Une revue de la littérature concernant l'octylphénol et les perturbateurs endocriniens présentée dans les chapitres 1 à 3 de cet ouvrage a permis de démontrer que bien que la toxicité de l'octylphénol ait été amplement étudiée, il en est tout autre de la caractérisation de sa toxicocinétique. Or, ces données sont essentielles pour réaliser une meilleure évaluation des risques liés aux perturbateurs endocriniens.

Notre étude apporte des données nouvelles sur la toxicocinétique de l'octylphénol chez le rat. Le premier volet de cette étude a permis de développer une nouvelle méthode analytique permettant de mesurer les concentrations d'octylphénol dans le sang, les microsomes hépatiques et divers tissus (tissus adipeux, muscle, foie, rein, cerveau, utérus, ovaires, testicules, épидидymes). Cette méthode est décrite dans l'article "Determination of *p-tert*-octylphenol in blood and tissues by gas chromatography coupled with mass spectrometry". Elle implique une extraction liquide en milieu acide et la formation d'un dérivé acétylé suivie d'une analyse de l'octylphénol à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse combinée à la spectrométrie de masse. Bien que d'autres méthodes analytiques existaient déjà pour la mesure de l'octylphénol dans les milieux biologiques (Tableau 2-II), une seule (Certa et coll., 1996) permettait la quantification de l'octylphénol dans les tissus. Or, cette méthode impliquait une grande variabilité et ne permettait pas d'obtenir un pourcentage de récupération satisfaisant. Les autres méthodes nécessitaient

l'accès à des appareils qui n'étaient pas disponibles dans nos laboratoires ou nécessitaient un volume d'échantillon trop élevé pour nos besoins. La méthode développée dans nos laboratoires permet de mesurer facilement et de façon précise et peu coûteuse les concentrations d'octylphénol dans divers milieux biologiques.

Les données obtenues dans le deuxième volet de ce projet de recherche sont présentées dans l'article "Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in male and female Sprague-Dawley rats after intravenous, oral or subcutaneous exposure". Des rats mâles et femelles ont été exposés à différentes doses d'octylphénol de façon aiguë par les voies orales, intraveineuses et sous-cutanées et de façon répétée par la voie orale. Ces expériences ont montré que les concentrations d'octylphénol diminuent rapidement après l'administration et qu'il n'y aurait pas de bioaccumulation appréciable à la suite d'expositions répétées par voie orale. Ces expériences ont permis de caractériser simultanément la toxicocinétique de l'octylphénol chez des animaux mâles et femelles, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant. Bien que plusieurs études aient été réalisées sur la toxicité de l'octylphénol (c.f. chapitre 2) seulement deux études, à notre connaissance, ont étudié la toxicocinétique de l'octylphénol, une chez le rat mâle (Certa et coll., 1996) et l'autre chez le rat femelle (Upmeier et coll., 1999).

Les données obtenues chez le rat Sprague-Dawley ainsi que celles obtenues chez le rat Fischer dans une étude préliminaire (Figure 9-1) ont permis d'identifier des différences au niveau de la toxicocinétique de l'octylphénol entre différentes souches, ce qui a été confirmé en comparant nos données à celles de l'étude de Certa et coll. (1996) réalisée chez des rats Wistar et à celles de l'étude de Upmeier et coll. (1999) réalisée avec des rats DA/Han. Puisque des différences ont été observées selon les souches, il existe une

incertitude quant à la souche de rat la plus adéquate à utiliser pour une analyse de risque chez l'humain.

La toxicocinétique de l'octylphénol n'avait jamais, à notre connaissance, été caractérisée par la voie sous-cutanée. Or, une hypothèse avait été émise à l'effet que la toxicité de l'octylphénol pouvait être plus élevée suite à une exposition sous-cutanée que suite à une exposition orale. Nos données ont montré que les aires sous la courbe des concentrations sanguines d'octylphénol suite à des expositions orale et sous-cutanée étaient semblables. Ces résultats suggèrent que la biodisponibilité de l'octylphénol est semblable après des expositions orale et sous-cutanée et qu'il n'y aurait donc pas lieu d'observer des différences au niveau de la toxicité.

Les concentrations sanguines et tissulaires d'octylphénol mesurées dans cette étude étaient en général plus élevées chez les rats femelles que chez les rats mâles. Ainsi, il y aurait des différences au niveau de la toxicocinétique entre les mâles et les femelles. Une hypothèse suggérant que ces différences seraient reliées au métabolisme de l'octylphénol a été proposée. Pour confirmer ou non cette hypothèse, des expériences ont été réalisées avec des microsomes hépatiques de rats Sprague-Dawley mâles et femelles. Ces expériences ont confirmé qu'il existait des différences au niveau du métabolisme oxydatif de l'octylphénol entre les sexes. Il n'y aurait cependant pas de différences au niveau de la glucuronidation de l'octylphénol (Figure 9-2). Notre étude est la première à confirmer expérimentalement ces différences. Ces résultats suggèrent que des différences au niveau de la toxicocinétique et de la toxicité de l'octylphénol entre les mâles et les femelles pourraient être dues à des différences au niveau du métabolisme. Ceci est particulièrement important puisque l'octylphénol agirait en se liant au récepteur œstrogénique et qu'il existe des différences importantes entre les sexes au niveau des quantités d'œstrogènes circulant dans le sang. Il

serait intéressant d'identifier quelles enzymes sont responsables du métabolisme de l'octylphénol chez l'humain afin d'établir s'il existe également des différences au niveau du métabolisme entre les hommes et les femmes.

La dose maximale utilisée pour les injections intraveineuses était de 8 mg/kg puisque des expériences préliminaires ont permis de démontrer qu'une dose intraveineuse de 10 mg/kg pouvait être mortelle pour les rats. Cette dose est beaucoup plus faible que la dose maximale utilisée pour les expositions orales et sous-cutanées. Il serait intéressant d'identifier le mécanisme de toxicité responsable de ces effets aigus puisque, comme il a été montré au chapitre 2, peu de données existent sur les mécanismes de toxicité de l'octylphénol mis à part ceux impliqués dans le système reproducteur.

Il nous a été impossible de caractériser expérimentalement l'excrétion urinaire ou biliaire de l'octylphénol à cause de la présence d'interférences analytiques. Peu de données sont présentement disponibles sur les différents métabolites de l'octylphénol et leur toxicité relative. De plus, il existerait une différence au niveau de l'excrétion urinaire et biliaire de l'octylphénol entre les rats et les humains. Ceci pourrait favoriser une recirculation entérohépatique chez le rat mais non chez l'humain. Une meilleure caractérisation de tous ces processus serait bénéfique pour l'avancement de nos connaissances sur l'octylphénol.

Les données obtenues expérimentalement dans cette étude ont servi à l'élaboration d'un modèle toxicocinétique à base physiologique pour l'octylphénol. Ce modèle a été présenté dans l'article "Physiologically-based modeling of *p-tert*-octylphenol kinetics following intravenous, oral and subcutaneous exposure in male and female Sprague-Dawley rats". Ce modèle est le premier modèle toxicocinétique à base physiologique publié

sur l'octylphénol. Il permet de simuler adéquatement les concentrations sanguines et tissulaires d'octylphénol suite à des expositions intraveineuses, orales et sous-cutanées chez les rats mâles et femelles. Les modèles toxicocinétiques à base physiologique permettent généralement d'identifier différentes lacunes au niveau des connaissances. Ils permettent également de cibler les expériences nécessaires pour combler ces lacunes. Le développement du modèle pour l'octylphénol nous a permis de constater qu'une grande incertitude demeure au niveau des paramètres à utiliser pour le modèle, étant donné le manque de données dans la littérature. Une meilleure caractérisation de ces paramètres serait donc souhaitable dans le futur. Une analyse de sensibilité a également été effectuée pour déterminer les paramètres du modèle qui ont un impact sur les concentrations sanguines d'octylphénol. Ce modèle devrait améliorer nos connaissances sur l'octylphénol et nous permettre éventuellement de relier la dose interne à différents scénarios d'exposition.

En conclusion, cette étude a permis de mettre au point une méthode analytique efficace pour la mesure de l'octylphénol dans différents milieux biologiques. Les expériences réalisées chez des rats Sprague-Dawley nous ont permis de constater qu'il existait une différence importante au niveau de la toxicocinétique de l'octylphénol entre les sexes. Des expériences ont montré que ces différences seraient reliées au métabolisme de l'octylphénol. Cependant des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour identifier les mécanismes pouvant expliquer ces différences et pour établir si ces différences existent également chez l'humain. Finalement, un modèle toxicocinétique à base physiologique a été développé pour l'octylphénol. Ce modèle permet de prédire les concentrations d'octylphénol chez les rats mâles et femelles suite à des expositions intraveineuses, orales et sous-cutanées. Puisque l'un des avantages des modèles toxicocinétique à base physiologique est de permettre une extrapolation pour différentes espèces, des travaux futurs pourraient permettre de modifier le présent modèle pour qu'il

puisse décrire la toxicocinétique de l'octylphénol chez l'homme. Ceci contribuerait à une meilleure évaluation du risque chez l'humain.



## Bibliographie

- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K.J., Walker, M., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P. et Sharpe, R.M. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*. 141:3898-3907.
- Bennett, E.R. et Metcalfe, C.D. 2000. Distribution of degradation products of alkylphenol ethoxylates near sewage treatment plants in the Lower Great Lakes, North America. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 784–792.
- Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E. et Maguire, R.J. 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence river. *Sci. Total Environ.* 193: 263–275.
- Blake, C.A. et Ashiru, O.A. 1997. Disruption of rat estrous cyclicity by the environmental estrogen 4-tert-octylphenol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216:446–451.
- Blake, C.A., et Boockfor, F.R. 1997. Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone. *Biol. Reprod.* 57:255-266.

- Blake, C.A., Boockfor, F.R., Nair-Menon, J.U., Millette, C.F., Raychoudhury, S.S. et McCoy, G.L. 2004. Effects of 4-tert-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats. *Reprod. Toxicol.* 18(1):43-51.
- Boockfor, F.R., et Blake, C.A. 1997. Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biol. Reprod.* 57:267-277.
- Boublik, T., Fried, V. et Hala, E. 1984. *The Vapor Pressures of Pure Substances: Selected Values of the Temperature Dependence of the Vapour Pressures of some Pure Substances in the Normal and Low Pressure Region.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier Sci. Publ. V17.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A. et Needham, L.L. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116:39-44.
- Certa, H., Fedtke, N., Wiegand, H.J., Muller, A.M. et Bolt, H.M. 1996. Toxicokinetics of *p*-tert-octylphenol in male Wistar rats. *Arch Toxicol.* 71(1-2):112-22.
- Cordier, S., Ayotte, P., De Wals, P., Ducot, B., Dodin, S., Saurel-Cubizolles, M-J. et Thonneau, P. 2003. "Reproduction". In : Gérin, M., Gosselin, P., Viau, C., Quénel, P. et Dewailly, E. *Environnement et santé publique.* Edisem (Québec) et Lavoisier Tec et Doc (France), Montréal-Paris, pp. 641-667.

- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R. et Van der Kraak, G. 2002. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO publication no. WHO/PCS/EDC/02.2. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Genève.
- Ecobichon, D.J. 1997. "Reproductive Toxicology". In: The Basis of Toxicity Testing, Second edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 83-112.
- Espejo, R., Valter, K., Simona, M., Janin, Y. et Arrizabalaga, P. 2002. Determination of nineteen 4-alkylphenol endocrine disruptors in Geneva municipal sewage wastewater. J. Chromatogr. A. 976(1-2):335-43.
- Gerhartz, W. (exec ed.). 1999. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th ed. Vol A1: Deerfield Beach, FL: VCH Publishers, 1985 to Present. p. VA19 336.
- Hadley, M.E. 2000. "Hormones and Female Reproductive Physiology". In: Endocrinology, 5<sup>ème</sup> éd. Prentice-Hall, Inc, New Jersey, USA, pp. 445-473.
- Hanioka, N., Jinno, H., Chung, Y.S., Nishimura, T., Tanaka-Kagawa, T. et Ando, M. 2000. Effect of 4-tert-octylphenol on cytochrome P450 enzymes in rat liver. Arch. Toxicol. 73:625-631.
- Herath, C.B., Watanabe, G., Katsuda, S., Yoshida, M., Suzuki, A.K. et Taya, K. 2001. Exposure of neonatal female rats to *p-tert-octylphenol* disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood. Biol. Reprod. 64:1216-1224.

- Heringa, M.B., Hogevoender, C., Busser, F. et Hermens, J.L. 2006. Measurement of the free concentration of octylphenol in biological samples with negligible depletion-solid phase microextraction (nd-SPME): analysis of matrix effects. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 834(1-2):35-41.
- Hoyer, P.B. et Devine, P.J. 2002. "Endocrine toxicology: the female reproductive system". In : Derelanko, M.J., Hollinger, M.A. *CRC Handbook of toxicology*, 2ème éd. CRC Press, Boca Raton, pp 563-584.
- Ikeda, M., Hirayama, T., Watanabe, T. et Hara, I. 1978. GLC analysis of alkylphenols, alkylcatechols and phenylphenols in the urine of workers as a measure to prevent occupational leucoderma. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 41(2):125-38.
- Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS). 2006. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Octylphenols. 15 p.
- Inoue, K., Yoshimura, Y., Makino, T., Nakazawa, H. 2000. Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. *Analyst.* 125:1959-1961.
- Inoue, K., Kawaguchi, M., Okada, F., Takai, N., Yoshimura, Y., Horie, M., Izumi, S-I., Makino, T. et Nakazawa, H. 2003. Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 486: 41-50.
- Inoue, K., Yoshida, S., Nakayama, S., Ito, R., Okanouchi, N. et Nakazawa, H. 2006. Development of stable isotope dilution quantification liquid chromatography-mass

spectrometry method for estimation of exposure levels of bisphenol A, 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol, tetrabromobisphenol A, and pentachlorophenol in indoor air. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51(4):503-8.

Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A. et Takada, H., 2001. Distribution and behaviour of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35:1041–1049.

Jin, X., Jiang, G., Huang, G., Liu, J. et Zhou, Q. 2004. Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *Chemosphere.* 56(11):1113-9.

Jones, H.M. et Houston, J.B. 2004. Substrate depletion approach for determining *in vitro* metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations. *Drug Metab Dispos.* 32(9):973-82.

Kawaguchi, M., Inoue, K., Sakui, N., Ito, R., Izumi, S., Makino, T., Okanouchi, N. et Nakazawa, H. 2004. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 799(1):119-25.

Knaak, J.B., al-Bayati, M.A. et Raabe, O.G. 1995. Development of partition coefficients,  $V_{max}$  and  $K_m$  values, and allometric relationships. *Toxicol. Lett.* 79(1-3):87-98.

- Kuch, H.M. et Ballschmiter, K., 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC–(NCI)–MS in the Picogram per liter Range. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3201–3206
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. et Gustafsson, J.A. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 139(10):4252-63.
- Kuklenyik, Z., Ekong, J., Cutchins, C.D., Needham, L.L. et Calafat, A.M. 2003. Simultaneous measurement of urinary bisphenol A and alkylphenols by automated solid-phase extractive derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75(24):6820-5.
- Kwack, S.J., Kwon, O., Kim, H.S., Kim, S.S., Kim, S.H., Sohn, K.H., Lee, R.D., Park, C.H., Jeung, E.B., An, B.S. et Park, K.L. 2002. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Toxicol Environ. Health A.* 65(5-6):419-31.
- Laws, S.C., Carey, S.A., Ferrell, J.M., Bodman, G.J. et Cooper, R.L. 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol. Sci.* 54(1):154-67.
- Laws SC, Yavanxay S, Cooper RL, Eldridge JC. Nature of the binding interaction for 50 structurally diverse chemicals with rat estrogen receptors. *Toxicol Sci.* 2006 Nov;94(1):46-56.

- Le Bigot, J.F., Cresteil, T., Kiechel, J.R. et Beaune, P. 1983. Metabolism of ketotifen by human liver microsomes. *In vitro* characterization of a tertiary amine glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 11(6):585-9.
- Lee, H.B. et Peart, T.E., 1995. Determination of 4-nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Anal. Chem.* 67: 1976–1980.
- Lee, H.B., Peart, T.E. et Svoboda, M.L. 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1094(1-2):122-9.
- Lipscomb, J.C. et Poet, T.S. 2008. *In vitro* measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. *Pharmacol Ther.* 118(1):82-103.
- Liu, M., Hashi, Y., Pan, F., Yao, J., Song, G. et Lin, J.M. 2006. Automated on-line liquid chromatography-photodiode array-mass spectrometry method with dilution line for the determination of bisphenol A and 4-octylphenol in serum. *J. Chromatogr. A.* 1133(1-2):142-8.
- Lu, F. et Kacew, S. 2002. "Reproductive and Cardiovascular Systems". In: *Lu's Basic Toxicology: fundamentals, target organs and risk assessment*, 4ème éd., Londres-New-York: Taylor & Francis, pp 251-266.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.

- Meylan, W.M. et Howard, P.H. 1995. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Pharm. Sci.* 84: 83-92.
- Monteiro-Riviere, N.A., Van Miller, J.P., Simon, G., Joiner, R.L., Brooks, J.D. et Riviere, J.E. 2000. Comparative *in vitro* percutaneous absorption of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates (NPE-4 and NPE-9) through human, porcine and rat skin. *Toxicol. Ind. Health.* 16 (2):49-57.
- Mueller, S.O. 2004. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (3): 582-587.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M. et Welshons, W.V. 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Perspect.* 105(1):70-6.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S. et Welshons, W.V. 1999. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an *in vitro* assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69(1-6):343-57.
- Nomura, S., Daidoji, T., Inoue, H. et Yokota, H. 2008. Differential metabolism of 4-n- and 4-tert-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sci.* 83(5-6):223-8.
- OCDE (Organisation de cooperation et de développement économiques). 1994. SIDS Initial Assessment Report: PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-. Unep publications. 54 p.



- OSPAR Commission (Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic). 2006. Hazardous Substances Series: Octylphenol. 32 pp.
- Pedersen, R.T. et Hill, E.M. 2000a. Identification of novel metabolites of the xenoestrogen 4-tert-octylphenol in primary rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 128(3):189-209.
- Pedersen, R.T. et Hill, E.M. 2000b. Biotransformation of the xenoestrogen 4-tert-octylphenol in hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica.* 30(9):867-79.
- Pedersen, R.T. et Hill, E.M. 2002. Tissue distribution and depuration of 4-tert-octylphenol residues in the cyprinid fish, *Scardinius erythrophthalmus*. *Environ. Sci. Technol.* 36(15):3275-83.
- Petrovic, M., Lacorte, S., Viana, P. et Barceló, D. 2002. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *J. Chromatogr. A.* 959(1-2):15-23.
- Quednow, K. et Püttmann, W. 2008. Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environ. Pollut.* 152 (2): 476-483
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G. et Sumpter, J.P. 2000. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. *J. Biol. Chem.* 275(46):35986-93.

- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S. et Sumpter, J.P. 1995. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.* 103:1136-1143.
- Sikka, S.C. et Naz, R.K. 2002. Endocrine toxicology: male reproduction. In: Derelanko, M.J., Hollinger, M.A. *Handbook of toxicology*, 2ème éd, Boca Raton: CRC Press.
- St-Pierre, A., Krishnan, K. et Tardif, R. 2005. Characterization of the metabolic interaction between trihalomethanes and chloroacetic acids using rat liver microsomes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 68:287-298.
- Tan, B.L.L. et Mohd, M.A. 2003. Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer. *Talanta.* 61(3): 385-391
- Teeguarden, J.G. et Barton, H.A. 2004. Computational modeling of serum-binding proteins and clearance in extrapolations across life stages and species for endocrine active compounds. *Risk Anal.* 24(3):751-70.
- Teeguarden, J.G., Waechter, J.M. Jr, Clewell, H.J. 3rd, Covington, T.R. et Barton, H.A. 2005. Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol. Sci.* 85(2):823-38.
- Thomas, M.J. et Thomas, J.A. 2001. "Toxic Responses of the Reproductive System". In: Klaassen, C.D. éd. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, 6<sup>ème</sup> éd. McGraw-Hill, New York, pp. 673-709.

- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Brine, D.R., Fail, P.A., Seely, J.C. et Van Miller, J.P. 1999. Two-generation reproduction study with para-tert-octylphenol in rats. Regul. Toxicol. Pharmacol. 30:81-95.
- Upmeier, A., Degen, G.H., Schuhmacher, U.S., Certa, H. et Bolt, H.M. 1999. Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. Arch. Toxicol. 73:217-222.
- Vander, A.J., Sherman, J.H., Luciano, D.S. et Brière, R. 1995. "Mécanismes de régulation hormonale". In : Physiologie humaine, 3<sup>ème</sup> éd. McGraw-Hill, Montréal, pp. 259-286.
- Van den Berg, M., Sanderson, T., Kurihara, N. et Katayama, A. 2003. Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. Pure Appl. Chem. 75(11-12): 1917-1932.
- Yang, L., Lan, C., Liu, H., Dong, J. et Luan, T. 2006. Full automation of solid-phase microextraction/on-fiber derivatization for simultaneous determination of endocrine-disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 386(2):391-7.
- Ye, X., Kuklenyik, Z., Needham, L.L. et Calafat, A.M. 2006. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 831(1-2):110-5.

Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environ. Int.* 28(3):215-26.

## **ANNEXES**



0.0,&  
 0.0,0.0,0.0,0.0,0.0,0.0 ! definir les doses orales (mg/kg)

CONSTANT DOSETIME(0)=

0.0,&  
 0.0,&  
 0.0,&  
 0.0,0.0,0.0,0.0,0.0,1800.0 ! definir les temps de les doses (h)

CONSTANT DOSEDERM(0)=

0.0,&  
 0.0,&  
 0.0,&  
 0.0,0.0,0.0,0.0,0.0,0.0 ! definir les doses dermale (mg/kg)

991: Continue

992: Continue

993: Continue

!Au temps debuter avec une premiere dose nulle, aucune au debut

index = 1 !Initialisation du compteur ( dose )

TOTAL = 0.0 !Dose oral au T=zero

TOTDER = 0.0 !Dose dermale zero a T=0

!Parametres physiologiques Haddad 2000

CONSTANT BW=0.25 !poids corporel du sujet en kg

CONSTANT KQCR=15.0 !const du debit cardiaque au repos (L/hr/kg)

!Parametres Diffusion limitee Volumes et constantes Sami 1998 Pyrene

CONSTANT KVR = 0.038 !Fraction Riche (0.05-0.012)

CONSTANT KVRM = 0.0255 !Fraction Riche matrice cellulaire

CONSTANT KVRS = 0.0125 !Fraction Riche sang

CONSTANT FR = 1000.0 !Constante de diffusion riche (L/hr)

CONSTANT KVMP = 0.6633 !Fraction Pauvre (0.67-0.0067)

CONSTANT KVMPM = 0.6567 !Fraction Pauvre matrice cellulaire

CONSTANT KVMP S = 0.0066 !Fraction Pauvre sang

CONSTANT FMP = 1.0 !Constante de diffusion pauvre (L/hr) (0.01 Pyrene)

CONSTANT KVG = 0.09 !Fraction Gras

CONSTANT KVGM = 0.08937 !Fraction Gras matrice cellulaire

CONSTANT KVGS = 0.00063 !Fraction Gras sang

CONSTANT FG = 0.13 !Constante de diffusion Gras (L/hr) (0.1 Pyrene)

CONSTANT KVF = 0.04 !Fraction Foie

CONSTANT KVFM = 0.0356 !Fraction Foie matrice cellulaire

CONSTANT KVFS = 0.0044 !Fraction Foie sang

CONSTANT FF = 0.15 !Constante de diffusion Foie (L/hr)

CONSTANT KVT = 0.012 !Fraction Testicules (Plowchalk et Teeguardeen 2002)



CONSTANT KVTM = 0.008 !Fraction Testicules matrice cellulaire

CONSTANT KVTS = 0.004 !Fraction Testicules sang

CONSTANT FT = 0.7 !Constante de diffusion Testicules (L/hr)

CONSTANT KVS = 0.0067 !Fraction sous-cut (1% DE MP)

CONSTANT KVSM = 0.0066 !Fraction sous-cut matrice cellulaire

CONSTANT KVSS = 0.0001 !Fraction sous-cut sang

CONSTANT FS = 1000.0 !Constante de diffusion sous-cut (L/hr)

CONSTANT KVB = 0.0662 !FRaction sang total (Corley TAP 103)

! DEBIT Haddad et coll, 2000

CONSTANT KQGR = 0.09 !Fraction debit sanguin au gras((l/hr)/QC)

CONSTANT KQFR = 0.25 !Fraction debit sanguin foie ((l/hr)/QC)

CONSTANT KQMP = 0.1485 !Fraction debit sanguin pauvre ((l/hr)/QC) (0.15-0.0001  
0.1499 OU 0.1455)

CONSTANT KQR = 0.5022 !Fraction debit sanguin riche ((l/hr)/QC) (0.51-0.0078)  
(0.51-0.0025=0.5075 F)

CONSTANT KQS = 0.0015 !Fraction debit sanguin espace sous cut ((l/hr)/QC) (0.1%  
0.0001 ou 3% DE MP:0.0045)

CONSTANT KQT = 0.0078 !Fraction debit sanguin testicules ((l/hr)/QC)

!parametres physico chimiques tissus:plasma Sami fr lib 0.1

CONSTANT PRB = 1.0 !Coefficient de partage Sang/air

CONSTANT PRF = 7.3 !Coefficient de partage Foie/plasma  
 CONSTANT PRG = 48.86 !Coefficient de partage Gras/plasma  
 CONSTANT PRR = 8.85 !Coefficient de partage Rich.perf./plasma  
 CONSTANT PRMP= 3.0 !Coefficient de partage Mod.perf./plasma  
 CONSTANT PRT = 3.5 !Coefficient de partage Testicules/plasma OPTIMISE  
 CONSTANT PRS = 17.00 !Coefficient de partage Espace sous cut/plasma  
  
 CONSTANT PM = 206.33 !Poids moleculaire du OP (g/mol)  
  
 !Constante pour METABOLITES  
 CONSTANT KVMAX = 236.0 !VITESSE METABOLIQUE (MG/HR/KG) RAT  
 CONSTANT KM = 12.00 !MICHAELIS CONSTANT (MG/L) RAT  
  
 !Parametres de simulation  
 CONSTANT IVDOS = 0.0 !Dose intraveineuse (mg/kg)  
 CONSTANT TINF = 0.005 !Temps d!infusion dose IV (hr) 18 secondes  
 CONSTANT TSTOP=24.0 !nombre de heure de simulation  
 CONSTANT CINT= 0.01 !Interv. sauvegarde des result.  
 MAXTERVAL MAXT = 0.01 !pas Maximum d!integration egal a TINF  
 CONSTANT KOR = 0.1 !Const du temps d absorption orale (hr-1)  
 CONSTANT KDER = 0.05 !Const du temps d absorption dermale (hr-1)  
 CONSTANT BIO = 0.45 !CONST DE BIODISPONIBILITE OP ORALE  
 CONSTANT BIOP = 0.15 !CONST DE BIODISPONIBILITE OP DERMALE

!Parametres calcules exposant 0 70 TAP 93 Tardif !

$$QC = KQCR * BW^{0.70} \quad !\text{debit cardiaque (l/hr)}$$

!METABOLIC CONSTANTS exposant 0 75 TAP 93 Tardif et al!

$$VMAX = KVMAX * BW^{0.75} \quad !\text{metabolisme au foie (mg/h)}$$

!VOLUMES!

$$VR = KVR * BW \quad !\text{Volume rich. perf. tissus (l)}$$

$$VMP = KVMP * BW \quad !\text{Volume mod. perf. tissus (l)}$$

$$VG = KVG * BW \quad !\text{Volume gras (l)}$$

$$VF = KVF * BW \quad !\text{Volume foie (l)}$$

$$VT = KVT * BW \quad !\text{volume testicules (l)}$$

$$VS = KVS * BW \quad !\text{Volume Espace sous cut (l)}$$

$$VB = KVB * BW \quad !\text{Volume total du sang (L)}$$

$$VVZ = 0.66 * VB \quad !\text{Volume de sang veineux (L)}$$

$$VVY = 0.34 * VB \quad !\text{Volume de sang arteriel (L)}$$

$$VRM = KVRM * BW \quad !\text{Volume Riche matrice cellulaire (l)}$$

$$VRS = KVRS * BW \quad !\text{Volume Riche sang (l)}$$

$$VMPM = KVMPM * BW \quad !\text{Volume Pauvre matrice cellulaire (l)}$$

$$VMPS = KVMPM * BW \quad !\text{Volume Pauvre sang (l)}$$

$$VGM = KVG * BW \quad !\text{Volume Gras matrice cellulaire (l)}$$

$$VGS = KVGS * BW \quad !\text{Volume Gras sang (l)}$$

$$VFM = KVFM * BW \quad !\text{Volume Foie matrice cellulaire (l)}$$

VFS = KVFS\*BW !Volume Foie sang (l)

VTM = KVTM\*BW !Volume Testicules matrice cellulaire (l)

VTS = KVTS\*BW !Volume Testicules sang (l)

VSM = KVSM\*BW !Volume Espace sous-cut matrice cellulaire (l)

VSS = KVSS\*BW !Volume Espace sous-cut sang (l)

!DEBIT!

QG = KQGR\*QC !Debit sanguin gras (l/hr)

QF = KQFR\*QC !Debit sanguin foie (l/hr)

QR = KQR\*QC !Debit sanguin rich. perf. tissus (l/hr)

QMP= KQMP\*QC !Debit sanguin mod. perf.tissus (l/hr)

QT = KQT\*QC !Debit sanguin testicules (l/hr)

QS = KQS\*QC !Debit sanguin Espace sous cut (l/hr)

!Coefficient de diffusion = Produit de constante de diffusion \* Debit au tissus!

PAR = FR\*QR !Coefficient de diffusion riche (L/hr)

PAMP = FMP\*QMP !Coefficient de diffusion pauvre (L/hr)

PAG = FG\*QG !Coefficient de diffusion Gras (L/hr)

PAF = FF\*QF !Coefficient de diffusion Foie (L/hr)

PAT = FT\*QT !Coefficient de diffusion Testicules (L/hr)

PAS = FS\*QS !Coefficient de diffusion Espace sous-cut (L/hr)

!CONCENTRATION D EXPOSITION (mg/L)!

IVR=(IVDOS\*BW)/TINF !Dose IV OP (mg/hr)

```

ALGORITHM IALG=2      !Methode de calcul de Gear
END                  !Fin de la section INITIAL

DYNAMIC            !Debut: section dynamique de la simulation
DERIVATIVE         !Resolution des equations diff.

!Compartiment Sang Arteriel
TCAb=Qc*(CVb-CA)    !Taux acc OP dans le comp sang arteriel (mg/hr)
AAb=INTEG(TCAb,0)   !Qtee OP dans le comp sang arteriel (mg)
CA=AAb/VVy         !Conc OP dans sang arteriel (mg/L)

!Compartiment Sang Veineux!
IV = IVR*(1-STEP(TINF))      !Qtee de OP intra veineux (mg/hr)
TCVb=((Qc*CV)+IV)-(Qc*CVb)   !Taux acc OP comp sang veineux (mg/hr)
AVb=INTEG(TCVb,0)           !Qtee OP dans comp sang veineux (mg)
CVb=AVb/VVz                 !conc sang veineux sortie comp (mg/L)

CV=(QF*CVF+QG*CVG+QR*CVR+QMP*CVMP+QT*CVT+QS*CVS)/QC      !Conc
OP sang veineux(mg/l)
SSCV=INTEG(CV,0)         ! Surface sous la courbe de la conc veineuse [(mg/l)*hr]
CVN=CV*1000              ! Conc sang veineux OP (ng/ml)

!Compartiment Foie diffusion limitee!
!Quantite absorbee par voie orale!

```

RSTOM = -KOR\*STOM                   !Taux absorption OP gavage (mg/hr)

STOM = INTEG(RSTOM,0) + TOTAL    !Qtee absorbe gavage (mg)

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Foie!

TACFM = PAF\*(CVF-CFMS) !Taux accumulation OP dans la matrice Foie (mg/hr)

AFM = INTEG (TACFM,0) !Qte OP dans la matrice Foie (mg)

CFM = AFM/VFM           !Concentration OP dans la matrice Foie (mg/L)

CFMS = CFM/PRF       !Concentration OP sortie de la matrice Foie (mg/L)

!Taux d'accumulation dans le Foie diffusion limitee!

TACFS = (QF\*CA) - (QF\*CVF) -TACFM -TMET +(-RSTOM) !Taux accumulation OP dans le Foie comp sang (mg/hr)

AFS = INTEG (TACFS,0)       !Qte OP dans le Foie comp sang (mg)

CVF = AFS/VFS           !Concentration OP sortie Foie sang (mg/L)

!Bilan compartiment Foie!

CFF = (AFM+AFS) / (VF) !Concentration finale OP dans Foie (matrice + sang) (mg/L)

CFFN = CFF\*1000       !Concentration finale OP dans Foie (ng/mL)

AF=AFM+AFS           !Quantite acc.: OP foie (mg)

!Metabolisme OP au foie oxidation saturable!

TMET = (VMAX\*CVF)/(KM+CVF) !Taux de transformation metab au foie (mg/h)

MET = INTEG(TMET,0.) !Metabolites oxidation totaux (mg)

!Compartiment espace sous-cut diffusion limitee!

!Quantite absorbee par voie dermale!

RPEAU= -KDER\*PEAU                   !Taux absorption OP dermale (mg/hr)

PEAU = INTEG(RPEAU,0) + TOTDER   !Qtee absorbe dermale (mg)

!Taux d!accumulation dans la matrice cellulaire espace sous-cut!

TACSM = PAS\*(CVS-CSMS) !Taux accumulation OP dans la matrice espace sous-cut (mg/hr)

ASMz = INTEG (TACSM,0) !Qte OP dans la matrice espace sous-cut (mg)

CSM = ASMz/VSM           !Concentration OP dans la matrice espace sous-cut (mg/L)

CSMS = CSM/PRS       !Concentration OP sortie de la matrice espace sous-cut (mg/L)

!Taux d!accumulation dans espace sous-cut diffusion limitee!

TACSS = (QS\*CA)-(QS\*CVS) - TACSM -RPEAU !Taux accumulation OP dans espace sous-cut comp sang (mg/hr)

ASS = INTEG(TACSS,0)   !Qte OP dans espace sous-cut comp sang (mg)

CVS = ASS/VSS           !Concentration OP sortie espace sous-cut sang (mg/L)

!Bilan compartiment espace sous-cut!

CFS = (ASMz+ASS) / (VS)   !Concentration finale OP dans espace sous-cut (matrice + sang) (mg/L)

CFSN = CFS\*1000       !Concentration finale OP dans espace sous-cut (ng/mL)

AS = ASMz+ASS       !Quantite acc.: espace sous-cut (mg)

!Compartiment tissus Richement perfuses diffusion limitee!

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Tissus Riches!

TACRM = PAR\*(CVR-CRMS) !Taux accumulation OP dans la matrice tissus Riches (mg/hr)

ARM = INTEG (TACRM,0) !Qte OP dans la matrice tissus Riches (mg)

CRM = ARM/VRM !Concentration OP dans la matrice tissus Riches (mg/L)

CRMS = CRM/PRR !Concentration OP sortie de la matrice tissus Riches (mg/L)

!Taux d'accumulation dans le tissus Riches diffusion limitee!

TACRS = (QR\*CA)-(QR\*CVR) - TACRM

!Taux accumulation OP dans le tissus Riches comp sang (mg/hr)

ARS = INTEG (TACRS,0) !Qte OP dans le tissus Riches comp sang (mg)

CVR = ARS/VRS !Concentration OP sortie tissus Riches sang (mg/L)

!Bilan compartiment tissus Riches!

CFR = (ARM+ARS) / (VR) !Concentration finale OP dans tissus Riches (matrice + sang) (mg/L)

CFRN = CFR\*1000 !Concentration finale OP dans tissus Riches (ng/mL)

AR = ARM+ARS !Quantite acc.: tissus riches (mg)

!Compartiment gras diffusion limitee!

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Gras!

TACGm = PAG\*(CVG-CGMS) !Taux accumulation OP dans la matrice gras (mg/hr)

AGM = INTEG (TACGm,0) !Qte OP dans la matrice gras (mg)



$CGM = AGM/VGM$  !Concentration OP dans la matrice gras (mg/L)

$CGMS = CGM/PRG$  !Concentration OP sortie de la matrice gras (mg/L)

!Taux d'accumulation dans le gras diffusion limitee!

$TACGS = (QG*CA)-(QG*CVG) - TACGm$  !Taux accumulation OP dans le gras comp sang (mg/hr)

$AGS = INTEG (TACGS,0)$  !Qte OP dans le gras comp sang (mg)

$CVG = AGS/VGS$  !Concentration OP sortie gras sang (mg/L)

!Bilan compartiment Gras!

$CGF = (AGM+AGS) / (VG)$  !Concentration finale OP dans Gras (matrice + sang) (mg/L)

$CGFN = CGF*1000$  !Concentration finale OP dans Gras (ng/mL)

$AG = AGM+AGS$  !Quantite acc.: tissus gras (mg)

!Compartiment tissu Pauvrement perfuses diffusion limitee!

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Tissus Pauvres!

$TACMPM = PAMP*(CVMP-CMPMS)$  !Taux accumulation OP dans la matrice tissus Pauvres (mg/hr)

$AMPM = INTEG (TACMPM,0)$  !Qte OP dans la matrice tissus Pauvres (mg)

$CMPM = AMPM/VMPPM$  !Concentration OP dans la matrice tissus Pauvres (mg/L)

$CMPMS = CMPM/PRMP$  !Concentration OP sortie de la matrice tissus Pauvres (mg/L)

!Taux d'accumulation dans le tissu Pauvres diffusion limitee!

$TACMPS = (QMP*CA)-(QMP*CVMP) - TACMPM$  !Taux accumulation OP dans le tissu Pauvres comp sang (mg/hr)

$AMPS = INTEG (TACMPS,0)$  !Qte OP dans le tissus Pauvres comp sang (mg)

$CVMP = AMPS/VMPS$  !Concentration OP sortie tissus Pauvres sang (mg/L)

!Bilan compartiment tissus Pauvres!

$CFMP = (AMPM+AMPS) / (VMP)$  !Concentration finale OP dans tissus Pauvres (matrice + sang) (mg/L)

$CFMPN = CFMP*1000$  !Concentration finale OP dans tissus Pauvres (ng/mL)

$AMP=AMPM+AMPS$  !Quantite acc. dans les tissus MP (mg)

!Compartiment Testicules diffusion limitee!

!Taux d!accumulation dans la matrice cellulaire Testicules!

$TACTM = PAT*(CVT-CTMS)$  !Taux accumulation OP dans la matrice Testicules (mg/hr)

$ATM = INTEG (TACTm,0)$  !Qte OP dans la matrice Testicules (mg)

$CTM = ATM/VTM$  !Concentration OP dans la matrice Testicules (mg/L)

$CTMS = CTM/PRT$  !Concentration OP sortie de la matrice Testicules (mg/L)

!Taux d!accumulation dans les Testicules diffusion limitee!

$TACTS = (QT*CA)-(QT*CVT) - TACTM$  !Taux accumulation OP dans les Testicules comp sang (mg/hr)

$ATS = INTEG (TACTS,0)$  !Qte OP dans les Testicules comp sang (mg)

$CVT = ATS/VTS$  !Concentration OP sortie Testicules sang (mg/L)

!Bilan compartiment Testicules!

$CFT = (ATM+ATS) / (VT)$  !Concentration finale OP dans Testicules (matrice + sang) (mg/L)

CFTN = CFT\*1000 !Concentration finale OP dans Testicules (ng/mL)

AT=ATM+ATS !Quantite acc. dans les testicules (mg)

!Bilan de masse sur l organisme entier!

DOSET=(IVDOS\*BW)+TOTAL+TOTDER ! DOSE IV + souscutanee + ORALE (mg)

TISS=AAB+AVB+AF+AR+AG+AMP+AT+AS+STOM+PEAU !Qtee dans les comp a tstop (mg)

BILAN=DOSET-TISS-MET !Bilan sur l organisme doit etre zero (mg)

!Conditions necessaires a l arret!

TERMT(T.GE.TSTOP) !Arret de la simulation

END !Fin de la section DERIVATIVE!

IF(t.GE.DoseTime(index)) THEN

ODOS= DOSE (index) ! Nouvelle dose orale (mg/kg)

ODOSE= BIO \* ODOS \* BW ! DOSE orale (mg) OP BIODISPONIBLE

TOTAL = TOTAL + ODOSE ! Ajouter une nouvelle dose a TOTAL

DDOS= DOSEDERM (index) !Nouvelle dose dermale (mg/kg)

DDOSE= BIOP \* DDOS \* BW !Dose dermale (mg) OP

TOTDER = TOTDER + DDOSE ! Ajouter une nouvelle dose a Total dermale

index = index + 1 ! Compteur pour la dose suivante

TERMT(index .GT. INDEXMAX, 'Index Limit') ! Arret lors de la derniere dose

ENDIF

TERMT(t.GE.tstop, 'Time Limit') !Arret de la simulation

END ! Fin de la section DYNAMIC

END !Fin du programme!



0.0,&

0.0,0.0,0.0,0.0,0.0,0.0 ! definir les doses orales (mg/kg)

CONSTANT DOSETIME(0)=

0.0,&

0.0,&

0.0,&

0.0,0.0,0.0,0.0,0.0,1800.0 ! definir les temps de les doses (h)

CONSTANT DOSEDERM(0)=

0.0,&

0.0,&

0.0,&

0.0,0.0,0.0,0.0,0.0,0.0 ! definir les doses dermale (mg/kg)

991: Continue

992: Continue

993: Continue

! Au temps debuter avec une premiere dose nulle, aucune au debut

index = 1 !Initialisation du compteur ( dose )

total = 0.0 !Dose oral au T=zero

TOTDER = 0.0 !Dose dermale zero a T=0

!Parametres physiologiques Haddad 2000

CONSTANT BW=0.25 !poids corporel du sujet en kg

CONSTANT KQCR=15.0 !const du debit cardiaque au repos (L/hr/kg)

!Parametres Diffusion limitee Volumes et constantes Sami 1998 Pyrene

CONSTANT KVR = 0.048 !Fraction Riche (0.05-0.0003)

CONSTANT KVRM = 0.0322 !Fraction Riche matrice cellulaire

CONSTANT KVRS = 0.0158 !Fraction Riche sang

CONSTANT FR = 1000.0 !Constante de diffusion riche (L/hr)

CONSTANT KVMP = 0.6633 !Fraction Pauvre (0.67-0.0067)

CONSTANT KVMPM = 0.6567 !Fraction Pauvre matrice cellulaire

CONSTANT KVMPMPS = 0.0066 !Fraction Pauvre sang

CONSTANT FMP = 1.0 !Constante de diffusion pauvre (L/hr) (0.01 Pyrene)

CONSTANT KVG = 0.09 !Fraction Gras

CONSTANT KVGM = 0.08937 !Fraction Gras matrice cellulaire

CONSTANT KVGS = 0.00063 !Fraction Gras sang

CONSTANT FG = 0.13 !Constante de diffusion Gras (L/hr) (0.1 Pyrene)

CONSTANT KVF = 0.04 !Fraction Foie

CONSTANT KVFM = 0.0356 !Fraction Foie matrice cellulaire

CONSTANT KVFS = 0.0044 !Fraction Foie sang

CONSTANT FF = 0.15 !Constante de diffusion Foie (L/hr)

CONSTANT KVU = 0.0003 !Fraction Uterus sans ovaires (Plowchalk et Teeguardeen 2002)

CONSTANT KVUM = 0.0002 !Fraction Uterus sans ovaires matrice cellulaire

CONSTANT KVUS = 0.0001 !Fraction Uterus sans ovaires sang

CONSTANT FU = 0.7 !Constante de diffusion Uterus (L/hr)

CONSTANT KVS = 0.0067 !Fraction sous-cut (1% DE MP)

CONSTANT KVSM = 0.0066 !Fraction sous-cut matrice cellulaire

CONSTANT KVSS = 0.0001 !Fraction sous-cut sang

CONSTANT FS = 1000.0 !Constante de diffusion sous-cut (L/hr)

CONSTANT KVB = 0.0662 !FRaction sang total (Corley TAP 103)

! DEBIT Haddad et coll, 2000

CONSTANT KQGR = 0.09 !Fraction debit sanguin au gras((l/hr)/QC)

CONSTANT KQFR = 0.25 !Fraction debit sanguin foie ((l/hr)/QC)

CONSTANT KQMP = 0.1485 !Fraction debit sanguin pauvre ((l/hr)/QC) (0.15-0.0001)

CONSTANT KQR = 0.5095 !Fraction debit sanguin riche ((l/hr)/QC) (0.51-0.0005=0.5095 F)

CONSTANT KQS = 0.0015 !Fraction debit sanguin espace sous cut ((l/hr)/QC)

CONSTANT KQU = 0.0005 !Fraction debit sanguin Uterus ((L/hr)/QC)

!parametres physico chimiques tissus:plasma Sami fr lib 1 Rich et mod perf?

CONSTANT PRB = 1.0 !Coefficient de partage Sang/air

CONSTANT PRF = 7.3 !Coefficient de partage Foie/plasma

CONSTANT PRG = 48.86 !Coefficient de partage Gras/plasma



CONSTANT PRR = 8.85 !Coefficient de partage Rich.perf./plasma

CONSTANT PRMP= 3.0 !Coefficient de partage Mod.perf./plasma

CONSTANT PRS = 17.0 !Coefficient de partage Espace sous cut/plasma (35% GRAS  
65% MOD PERF : 180)

Constant PRU = 0.6 !Coefficient de partage Uterus/plasma

CONSTANT PM = 206.33 !Poids moleculaire du OP (g/mol)

!Constante pour METABOLITES

CONSTANT KVMAX = 133.0 !VITESSE METABOLIQUE (MG/HR/KG) RAT

CONSTANT KM = 12.0 !MICHAELIS CONSTANT (MG/L) RAT

!Parametres de simulation

CONSTANT IVDOS = 0.0 !Dose intraveineuse (mg/kg)

CONSTANT TINF = 0.005 !Temps d!infusion dose IV (hr) 18 secondes

CONSTANT TSTOP=24.0 !nombre de heure de simulation

CONSTANT CINT= 0.01 !Interv. sauvegarde des result.

MAXTERVAL MAXT = 0.001 !pas Maximum d!integration egal a TINF

CONSTANT KOR = 0.1 !Const du temps d absorption orale (hr-1)

CONSTANT KDER = 0.05 !Const du temps d absorption dermale (hr-1)

CONSTANT BIO = 0.45 !CONST DE BIODISPONIBILITE OP ORALE

CONSTANT BIOP = 0.15 !CONST DE BIODISPONIBILITE OP DERMALE

!Parametres calcules exposant 0 70 TAP 93 Tardif !

QC = KQCR\*BW\*\*0.70 !debit cardiaque (l/hr)

!METABOLIC CONSTANTS exposant 0 75 TAP 93 Tardif et al!

$$V_{MAX} = K_{VMAX} * BW^{**0.75} \quad ! \text{metabolisme au foie (mg/h)}$$

!VOLUMES!

$$V_R = K_{VR} * BW \quad ! \text{Volume rich. perf. tissus (l)}$$

$$V_{MP} = K_{VMP} * BW \quad ! \text{Volume mod. perf. tissus (l)}$$

$$V_G = K_{VG} * BW \quad ! \text{Volume gras (l)}$$

$$V_F = K_{VF} * BW \quad ! \text{Volume foie (l)}$$

$$V_S = K_{VS} * BW \quad ! \text{Volume Espace sous cut (l)}$$

$$V_B = K_{VB} * BW \quad ! \text{Volume total du sang (L)}$$

$$V_{VZ} = 0.66 * V_B \quad ! \text{Volume de sang veineux (L)}$$

$$V_{VY} = 0.34 * V_B \quad ! \text{Volume de sang arteriel (L)}$$

$$V_U = K_{VU} * BW \quad ! \text{Volume Uterus (L)}$$

$$V_{RM} = K_{VRM} * BW \quad ! \text{Volume Riche matrice cellulaire (l)}$$

$$V_{RS} = K_{VRS} * BW \quad ! \text{Volume Riche sang (l)}$$

$$V_{MPM} = K_{VMPM} * BW \quad ! \text{Volume Pauvre matrice cellulaire (l)}$$

$$V_{MPS} = K_{VMPS} * BW \quad ! \text{Volume Pauvre sang (l)}$$

$$V_{GM} = K_{VGM} * BW \quad ! \text{Volume Gras matrice cellulaire (l)}$$

$$V_{GS} = K_{VGS} * BW \quad ! \text{Volume Gras sang (l)}$$

$$V_{FM} = K_{VFM} * BW \quad ! \text{Volume Foie matrice cellulaire (l)}$$

$$V_{FS} = K_{VFS} * BW \quad ! \text{Volume Foie sang (l)}$$

$$V_{SM} = K_{VSM} * BW \quad ! \text{Volume Espace sous-cut matrice cellulaire (l)}$$

VSS = KVSS\*BW !Volume Espace sous-cut sang (l)

VUM = KVUM\*BW !Volume Uterus matrice cellulaire (l)

VUS = KVUS\*BW !Volume Uterus sang (l)

!DEBIT!

QG = KQGR\*QC !Debit sanguin gras (l/hr)

QF = KQFR\*QC !Debit sanguin foie (l/hr)

QR = KQR\*QC !Debit sanguin rich. perf. tissus (l/hr)

QMP= KQMP\*QC !Debit sanguin mod. perf.tissus (l/hr)

QS = KQS\*QC !Debit sanguin Espace sous cut (l/hr)

QU = KQU\*QC !Debit sanguin Uterus (l/hr)

!Coefficient de diffusion = Produit de constante de diffusion \* Debit au tissu!

PAR = FR\*QR !Coefficient de diffusion riche (L/hr)

PAMP = FMP\*QMP !Coefficient de diffusion pauvre (L/hr)

PAG = FG\*QG !Coefficient de diffusion Gras (L/hr)

PAF = FF\*QF !Coefficient de diffusion Foie (L/hr)

PAS = FS\*QS !Coefficient de diffusion Espace sous-cut (L/hr)

PAU = FU\*QU !Coefficient de diffusion Uterus (L/hr)

!CONCENTRATION D EXPOSITION (mg/L)!

IVR=(IVDOS\*BW)/TINF !Dose IV OP (mg/hr)

ALGORITHM IALG=2 !Methode de calcul de Gear

END                                   !Fin de la section INITIAL

DYNAMIC                    !Debut: section dynamique de la simulation

DERIVATIVE                !Resolution des equations diff.

!Compartiment Sang Arteriel

TCAb=Qc\*(CVb-CA)        !Taux acc OP dans le comp sang arteriel (mg/hr)

AAb=INTEG(TCAb,0)        !Qtee OP dans le comp sang arteriel (mg)

CA=AAb/VVy                !Conc OP dans sang arteriel (mg/L)

!Compartiment Sang Veineux!

IV = IVR\*(1-STEP(TINF))        !Qtee de OP intra veineux (mg/hr)

TCVb=((Qc\*CV)+IV)-(Qc\*CVb)        !Taux acc OP comp sang veineux (mg/hr)

AVb=INTEG(TCVb,0)        !Qtee OP dans comp sang veineux (mg)

CVb=AVb/VVz                !conc sang veineux sortie comp (mg/L)

CV=(QF\*CVF+QG\*CVG+QR\*CVR+QMP\*CVMP+QU\*CVU+QS\*CVS)/QC        !Conc  
OP sang veineux(mg/l)

SSCV=INTEG(CV,0)        ! Surface sous la courbe de la conc veineuse [(mg/l)\*hr]

CVN=CV\*1000                ! Conc sang veingeux OP (ng/ml)

!Compartiment Foie diffusion limitee!

!Quantite absorbee par voie orale!

RSTOM=-KOR\*STOM                !Taux absorption OP gavage (mg/hr)

$$\text{STOM} = \text{INTEG}(\text{RSTOM}, 0) + \text{TOTAL} \quad \text{!Qtee absorbe gavage (mg)}$$

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Foie!

$$\text{TACFM} = \text{PAF} * (\text{CVF} - \text{CFMS}) \quad \text{!Taux accumulation OP dans la matrice Foie (mg/hr)}$$

$$\text{AFM} = \text{INTEG}(\text{TACFM}, 0) \quad \text{!Qte OP dans la matrice Foie (mg)}$$

$$\text{CFM} = \text{AFM} / \text{VFM} \quad \text{!Concentration OP dans la matrice Foie (mg/L)}$$

$$\text{CFMS} = \text{CFM} / \text{PRF} \quad \text{!Concentration OP sortie de la matrice Foie (mg/L)}$$

!Taux d'accumulation dans le Foie diffusion limitee!

$$\text{TACFS} = (\text{QF} * \text{CA}) - (\text{QF} * \text{CVF}) - \text{TACFM} - \text{TMET} + (-\text{RSTOM}) \quad \text{!Taux accumulation OP dans le Foie comp sang (mg/hr)}$$

$$\text{AFS} = \text{INTEG}(\text{TACFS}, 0) \quad \text{!Qte OP dans le Foie comp sang (mg)}$$

$$\text{CVF} = \text{AFS} / \text{VFS} \quad \text{!Concentration OP sortie Foie sang (mg/L)}$$

!Bilan compartiment Foie!

$$\text{CFF} = (\text{AFM} + \text{AFS}) / (\text{VF}) \quad \text{!Concentration finale OP dans Foie (matrice + sang) (mg/L)}$$

$$\text{CFFN} = \text{CFF} * 1000 \quad \text{!Concentration finale OP dans Foie (ng/mL)}$$

$$\text{AF} = \text{AFM} + \text{AFS} \quad \text{!Quantite acc.: OP foie (mg)}$$

!Metabolisme OP au foie oxidation saturable!

$$\text{TMET} = (\text{VMAX} * \text{CVF}) / (\text{KM} + \text{CVF}) \quad \text{!Taux de transformation metab au foie (mg/h)}$$

$$\text{MET} = \text{INTEG}(\text{TMET}, 0.) \quad \text{!Metabolites oxidation totaux (mg)}$$

!Compartiment espace sous-cut diffusion limitee!

!Quantite absorbee par voie dermale!

RPEAU= -KDER\*PEAU                   !Taux absorption OP dermale (mg/hr)

PEAU = INTEG(RPEAU,0) + TOTDER   !Qtee absorbee dermale (mg)

!Taux d!accumulation dans la matrice cellulaire espace sous-cut!

TACSM = PAS\*(CVS-CSMS) !Taux accumulation OP dans la matrice espace sous-cut (mg/hr)

ASMz = INTEG (TACSM,0) !Qte OP dans la matrice espace sous-cut (mg)

CSM = ASMz/VSM           !Concentration OP dans la matrice espace sous-cut (mg/L)

CSMS = CSM/PRS       !Concentration OP sortie de la matrice espace sous-cut (mg/L)

!Taux d!accumulation dans espace sous-cut diffusion limitee!

TACSS = (QS\*CA)-(QS\*CVS) - TACSM -RPEAU !Taux accumulation OP dans espace sous-cut comp sang (mg/hr)

ASS = INTEG(TACSS,0)   !Qte OP dans espace sous-cut comp sang (mg)

CVS = ASS/VSS           !Concentration OP sortie espace sous-cut sang (mg/L)

!Bilan compartiment espace sous-cut!

CFS = (ASMz+ASS) / (VS)   !Concentration finale OP dans espace sous-cut (matrice + sang) (mg/L)

CFSN = CFS\*1000       !Concentration finale OP dans espace sous-cut (ng/mL)

AS = ASMz+ASS       !Quantite acc.: espace sous-cut (mg)

!Compartiment tissus Richement perfuses diffusion limitee!

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Tissus Riches!

$TACRM = PAR*(CVR-CRMS)$  !Taux accumulation OP dans la matrice tissus Riches (mg/hr)

$ARM = INTEG (TACRM,0)$  !Qte OP dans la matrice tissus Riches (mg)

$CRM = ARM/VRM$  !Concentration OP dans la matrice tissus Riches (mg/L)

$CRMS = CRM/PRR$  !Concentration OP sortie de la matrice tissus Riches (mg/L)

!Taux d'accumulation dans le tissus Riches diffusion limitee!

$TACRS = (QR*CA)-(QR*CVR) - TACRm$  !Taux accumulation OP dans le tissus Riches comp sang (mg/hr)

$ARS = INTEG (TACRS,0)$  !Qte OP dans le tissus Riches comp sang (mg)

$CVR = ARS/VRS$  !Concentration OP sortie tissus Riches sang (mg/L)

!Bilan compartiment tissus Riches!

$CFR = (ARM+ARS) / (VR)$  !Concentration finale OP dans tissus Riches (matrice + sang) (mg/L)

$CFRN = CFR*1000$  !Concentration finale OP dans tissus Riches (ng/mL)

$AR = ARM+ARS$  !Quantite acc.: tissus riches (mg)

!Compartiment gras diffusion limitee!

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Gras!

$TACGm = PAG*(CVG-CGMS)$  !Taux accumulation OP dans la matrice gras (mg/hr)

$AGM = INTEG (TACGm,0)$  !Qte OP dans la matrice gras (mg)

$CGM = AGM/VGM$  !Concentration OP dans la matrice gras (mg/L)

$CGMS = CGM/PRG$  !Concentration OP sortie de la matrice gras (mg/L)

!Taux d'accumulation dans le gras diffusion limitée!

$TACGS = (QG*CA)-(QG*CVG) - TACGm$  !Taux accumulation OP dans le gras comp sang (mg/hr)

$AGS = INTEG (TACGS,0)$  !Qte OP dans le gras comp sang (mg)

$CVG = AGS/VGS$  !Concentration OP sortie gras sang (mg/L)

!Bilan compartiment Gras!

$CGF = (AGM+AGS) / (VG)$  !Concentration finale OP dans Gras (matrice + sang) (mg/L)

$CGFN = CGF*1000$  !Concentration finale OP dans Gras (ng/mL)

$AG = AGM+AGS$  !Quantite acc.: tissus gras (mg)

!Compartiment tissus Pauvrement perfuses diffusion limitée!

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Tissus Pauvres!

$TACMPM = PAMP*(CVMP-CMPMS)$  !Taux accumulation OP dans la matrice tissus Pauvres (mg/hr)

$AMPM = INTEG (TACMPM,0)$  !Qte OP dans la matrice tissus Pauvres (mg)

$CMPM = AMPM/VMPPM$  !Concentration OP dans la matrice tissus Pauvres (mg/L)

$CMPMS = CMPM/PRMP$  !Concentration OP sortie de la matrice tissus Pauvres (mg/L)

!Taux d'accumulation dans le tissu Pauvres diffusion limitée!

$TACMPS = (QMP*CA)-(QMP*CVMP) - TACMPM$  !Taux accumulation OP dans le tissu Pauvres comp sang (mg/hr)

$AMPS = INTEG (TACMPS,0)$  !Qte OP dans le tissu Pauvres comp sang (mg)

$CVMP = AMPS/VMPS$  !Concentration OP sortie tissu Pauvres sang (mg/L)



!Bilan compartiment tissus Pauvres!

$CFMP = (AMPM+AMPS) / (VMP)$  !Concentration finale OP dans tissus Pauvres (matrice + sang) (mg/L)

$CFMPN = CFMP*1000$  !Concentration finale OP dans tissus Pauvres (ng/mL)

$AMP=AMPM+AMPS$  !Quantite acc. dans les tissus MP (mg)

!Compartiment Uterus diffusion limitee!

!Taux d'accumulation dans la matrice cellulaire Uterus!

$TACUm = PAU*(CVU-CUMS)$  !Taux accumulation OP dans la matrice Uterus (mg/hr)

$AUM = \text{INTEG}(TACUm,0)$  !Qte OP dans la matrice Uterus (mg)

$CUM = AUM/VUM$  !Concentration OP dans la matrice Uterus (mg/L)

$CUMS = CUM/PRU$  !Concentration OP sortie de la matrice Uterus (mg/L)

!Taux d'accumulation dans l'Uterus diffusion limitee!

$TACUS = (QU*CA)-(QU*CVU) - TACUm$  !Taux accumulation OP dans l Uterus comp sang (mg/hr)

$AUS = \text{INTEG}(TACUS,0)$  !Qte OP dans l Uterus comp sang (mg)

$CVU = AUS/VUS$  !Concentration OP sortie Uterus sang (mg/L)

!Bilan compartiment Uterus!

$CFU = (AUM+AUS) / (VU)$  !Concentration finale OP dans Uterus (matrice + sang) (mg/L)

$CFUN = CFU*1000$  !Concentration finale OP dans uterus (ng/mL)

$AU = AUM+AUS$  !Quantite acc. dans l Uterus (mg)

!Bilan de masse sur l organisme entier!

DOSET=(IVDOS\*BW)+TOTAL+TOTDER ! DOSE IV + souscutanee + ORALE (mg)

TISS=AAB+AVB+AF+AR+AG+AMP+AU+AS+STOM+PEAU !Qtee dans les comp a tstop (mg)

BILAN=DOSET-TISS-MET !Bilan sur l organisme doit etre zero (mg)

!Conditions necessaires a l arret!

TERMT(T.GE.TSTOP) !Arret de la simulation

END !Fin de la section DERIVATIVE!

IF(t.GE.DoseTime(index)) THEN

ODOS= dose (index) ! Nouvelle dose orale (mg/kg)

ODOSE= BIO \* ODOS \* BW ! DOSE orale (mg) OP biodisponible

total = total + ODOSE ! Ajouter une nouvelle dose a TOTAL

DDOS= DOSEDERM (index) !Nouvelle dose dermale (mg/kg)

DDOSE= BIOP \* DDOS \* BW !Dose dermale (mg) OP

TOTDER = TOTDER + DDOSE ! Ajouter une nouvelle dose a Total dermale

index = index + 1 ! Compteur pour la dose suivante

TERMT(index .GT. INDEXMAX, 'Index Limit') ! Arret lors de la derniere dose

ENDIF

TERMT(t.GE.tstop, 'Time Limit') !Arret de la simulation

END ! Fin de la section DYNAMIC

END !Fin du programme!

