



Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène urinaire en tant qu'indicateur biologique de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques

Damien Barbeau

► To cite this version:

Damien Barbeau. Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène urinaire en tant qu'indicateur biologique de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. $\langle$ NNT : 2013GRENS026 $\rangle$. $\langle$ tel-01061819 $\rangle$

HAL Id: tel-01061819

<https://theses.hal.science/tel-01061819v1>

Submitted on 8 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Damien BARBEAU

Thèse dirigée par **Anne MAITRE**

Préparée au sein du **Laboratoire TIMC IMAG UMR CNRS 5525**
Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations (EPSP)
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène urinaire en tant qu'indicateur biologique de l'exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Thèse soutenue publiquement le **27 novembre 2013**,
devant le jury composé de :

Pr Françoise STANKE-LABESQUE

Responsable de l'UM Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble, Président de jury

Pr Michèle BOUCHARD

Professeure agrégée, Université de Montréal, Rapporteur

Pr Gérard LASFARGUES

Directeur adjoint de l'ANSES, Rapporteur

Pr Anne MAITRE

Responsable de l'équipe EPSP et de l'UM Toxicologie Professionnelle du CHU de Grenoble, Directeur

Pr Christophe RIBUOT

Directeur de l'UFR de Pharmacie de Grenoble, Invité

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Anne Maitre pour avoir accepté de diriger ce travail de longue haleine. Je remercie également chaque membre du jury pour avoir accepté de juger mes recherches. Michèle Bouchard, que j'apprécie tant pour ses qualités scientifiques qu'humaines, qui a accepté d'être rapporteur de ce travail et de traverser l'Atlantique pour la soutenance. Gérard Lasfargues, qui œuvre continuellement pour la Médecine du travail en France et qui malgré ses responsabilités à l'ANSES a fait le déplacement. Françoise Stanke-Labesque, dont j'ai pu mesurer les qualités managériales lors de mes gardes en Pharmacologie pendant mon internat de Pharmacie. Christophe Ribuot, qui en tant que doyen l'UFR de Pharmacie de Grenoble, me témoigne sa confiance pour assurer les cours de Pharmacocinétique.

J'adresse mes sincères remerciements aux nombreux médecins du travail avec qui j'ai pu collaborer et sans qui ce travail n'aurait jamais abouti. Je tiens également à remercier l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, pour ses financements.

Un grand merci à toute l'équipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations et particulièrement à Aurore Fontaine, Franck Balducci, Sylvette Liaudy et aux petits doctorants... Une mention très spéciale pour l'unité médicale de Toxicologie Professionnelle et Environnementale du CHU de Grenoble. Big up pour Aurélie Augier, Marie Marques, Claire Hervé, Sarah Montlevier et Renaud Persoons !

A ma famille et mes amis, car toutes les occasions sont bonnes pour vous témoigner mon amour et mon amitié. A Paul, toujours. A Alice, enfin. A l'avenir, avec vous !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	10
LEGENDES DES FIGURES	14
LEGENDES DES TABLEAUX	16
 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIF DU TRAVAIL.....	 18
I. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	20
I.1. GENERALITES	20
I.2. NOMENCLATURE.....	23
I.3. SOURCES D'EMISSION	24
II. TOXICITE DES HAP	26
II.1. TOXICITE AIGUË	26
II.2. TOXICITE CHRONIQUE	26
III. EXPOSITION DES POPULATIONS	30
III.1. EXPOSITION DE LA POPULATION GENERALE	30
III.2. EXPOSITION PROFESSIONNELLE	33
IV. SURVEILLANCE DE L'EXPOSITION DES POPULATIONS AUX HAP	35
IV.1. MONITORAGE ATMOSPHERIQUE DES HAP	35
IV.2. SURVEILLANCE BIOLOGIQUE	38
IV.2.1. Généralités.....	38

IV.2.2.	<i>Surveillance biologique des expositions professionnelles.....</i>	<i>40</i>
IV.2.3.	<i>Surveillance biologique de l'exposition aux HAP</i>	<i>43</i>
IV.2.3.1.	Suivi de l'exposition au pyrène.....	44
IV.2.3.2.	Suivi de l'exposition au naphthalène.....	49
IV.2.3.3.	Suivi de l'exposition au phénanthrène	50
IV.2.3.4.	Suivi de l'exposition au chrysène	51
IV.2.3.5.	Suivi de l'exposition au benzo(a)anthracène	52
IV.2.3.6.	Suivi de l'exposition au benzo(a)pyrène.....	52
V.	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	53
	CHAPITRE 2 : LE BENZO(A)PYRENE : TOXICOCINETIQUE, TOXICODYNAMIE ET CANCEROGENESE	56
I.	TOXICOCINETIQUE ET TOXICODYNAMIE DU BAP	58
I.1.	ABSORPTION	58
I.1.1.	<i>Voie respiratoire</i>	<i>59</i>
I.1.2.	<i>Voie cutanée</i>	<i>62</i>
I.1.3.	<i>Voie digestive.....</i>	<i>65</i>
I.2.	DISTRIBUTION	66
I.3.	METABOLISATION	68
I.3.1.	<i>Phase I : fonctionnalisation du BaP</i>	<i>70</i>
I.3.2.	<i>Toxicité des métabolites activés</i>	<i>78</i>
I.3.2.1.	Voie toxique du radical cation	79
I.3.2.2.	Voie toxique de l'ortho-quinone du BaP	81
I.3.2.3.	Voie toxique du BPDE	82
I.3.3.	<i>Phase II et III : conjugaison et efflux des métabolites.....</i>	<i>83</i>

I.4.	ELIMINATION	87
II.	CANCEROGENESE CHIMIQUE	92
II.1.	MUTAGENESE	93
II.1.1.	<i>Mécanismes de réparation de l'ADN</i>	93
II.1.2.	<i>Mutations induites par le BaP</i>	94
II.2.	ROLE DE L'ARYL HYDROCARBON RECEPTOR	95
II.3.	PROMOTION DE LA CANCEROGENESE	98
III.	POLYMORPHISME ENZYMATIQUE	99
III.1.	POLYMORPHISME DES CYTOCHROMES P450	100
III.2.	POLYMORPHISME DE L'EPOXYDE HYDROLASE	101
III.3.	POLYMORPHISME DE LA GLUTATHION-S-TRANSFERASE	101
III.4.	POLYMORPHISME DE LA SULFOTRANSFERASE	102
III.5.	POLYMORPHISME DE L'UDP-GLUCURONYL-TRANSFERASE	102
III.6.	POLYMORPHISME DE L'ALDO-KETO REDUCTASE	103
III.7.	POLYMORPHISME DE LA NADPH QUINONE OXYDOREDUCTASE	103
III.8.	CONCLUSION SUR L'IMPACT DU POLYMORPHISME	104
IV.	SYNTHESE DU CHAPITRE 2	105
 CHAPITRE 3 : LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DES EXPOSITIONS ET DES EFFETS DU BENZO(A)PYRENE		108
I.	BIOMARQUEURS DE DOSE INTERNE DU BAP	110
I.1.	BIOMARQUEURS DES VOIES D'ACTIVATION	112
I.1.1.	<i>Voie du BPDE</i>	112
I.1.1.1.	BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire	112

I.1.1.2.	Acides mercapturiques urinaires.....	119
I.1.2.	<i>Biomarqueurs des autres voies d'activation métabolique</i>	<i>121</i>
I.2.	BIOMARQUEURS DE LA VOIE D'INACTIVATION DU BAP.....	121
I.3.	LE 3-OHBAP URINAIRE.....	123
II.	BIOMARQUEURS DE DOSE EFFICACE DU BAP.....	128
II.1.	ADDUITS A L'ADN	128
II.2.	ADDUITS AUX PROTEINES.....	134
II.3.	CONCLUSION SUR LES BIOMARQUEURS DE DOSE EFFICACE DU BAP	136
III.	BIOMARQUEURS D'EFFETS GENOTOXIQUES	137
III.1.	LESIONS OXYDATIVES	137
III.2.	CASSURES DE L'ADN	141
III.3.	EFFETS CYTOGENETIQUES	143
III.4.	CONCLUSION SUR LES BIOMARQUEURS D'EFFET DU BAP	145
IV.	SYNTHESE DU CHAPITRE 3.....	145
 CHAPITRE 4 : DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE D'UNE METHODE DE DOSAGE DU 3-HYDROXYBENZO(A)PYRENE		
	URINAIRE UTILISABLE EN ROUTINE POUR LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DES EXPOSITIONS.....	148
I.	CONTEXTE SCIENTIFIQUE	150
II.	MATERIEL ET METHODE.....	151
II.1.	MISE AU POINT ET VALIDATION ANALYTIQUE DU DOSAGE DU 3-OHBAP.....	151
II.1.1.	<i>Pré-analytique</i>	<i>151</i>
II.1.2.	<i>Conditions analytiques</i>	<i>153</i>
II.1.3.	<i>Validation analytique</i>	<i>155</i>

II.2.	ANALYSES URINAIRES.....	156
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	157
III.1.	OPTIMISATION DE LA METHODE D'EXTRACTION	157
III.2.	CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	158
III.3.	PERFORMANCES DE LA METHODE	159
III.4.	ANALYSES URINAIRES CHEZ DES SUJETS FUMEURS ET NON-FUMEURS.....	161
IV.	ARTICLE PUBLIE	163
 CHAPITRE 5 : VALIDATION DU 3-HYDROXYBENZO(A)PYRENE URINAIRE EN POPULATION		
	PROFESSIONNELLEMENT EXPOSEE	174
I.	CONTEXTE SCIENTIFIQUE	176
II.	MATERIEL ET METHODE.....	178
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	179
IV.	ARTICLE SOUMIS.....	189
 CHAPITRE 6 : CONCLUSION DU TRAVAIL ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....		
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	220

LISTE DES ABREVIATIONS

1-OHP	1-hydroxypyrene
3-OHBaP	3-hydroxybenzo(a)pyrene
³²P	Post-marquage au phosphore 32
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AIP	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein
AKR	Aldo-kéto réductase
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Arnt	Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BaA	Benzo(a)anthracène
BaP	Benzo(a)pyrène
BaP-7,8,9,10-tétraol	7,8,9,10-tetrahydroxy-tetrahydrobenzo(a)pyrène
BaP-7-NAc	Tétrahydro-trihydroxy-BaP-7-S-N-acetylcystéine
BaP-10-NAc	Tétrahydro-trihydroxy-BaP-10-S-N-acetylcystéine
BaP-o-quinone	Benzo(a)pyrène-7,8-dione
BbF	Benzo(b)fluoranthène
BghiP	Benzo(ghi)pérylène
BkF	Benzo(k)fluoranthène
BPDE	Benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde
BPDE-N2-dGuo	10-(guanine-2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrène
BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
Chr	Chrysène

CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CYP	Mono-oxygénase à cytochrome P 450
DBahA	Dibenzo(ah)anthracène
DSDP	Début de semaine début de poste
EH	Epoxyde hydrolase
EPA	Environmental Protection Agency
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
Flua	Fluoranthène
FSFP	Fin de semaine fin de poste
FSFP16	Fin de semaine fin de poste + 16 heures
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la détection en spectrométrie de masse
GC-MS/MS	Chromatographie gazeuse couplée à la détection en spectrométrie de masse en mode tandem
GC-NICI-MS/MS	Chromatographie gazeuse couplée à l'ionisation chimique négative et à la détection en spectrométrie de masse en mode tandem
GEH	Groupe homogène d'exposition
GSH	Glutathion
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPLC-FLD	Chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique
Hsp90	Heat shock protein 90
IBE	Indicateur biologique d'exposition
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IP	Indénopyrène

IP	Intrapéritonéale
ISO	International organization for standardization
IV	Intraveineuse
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
MicroLC-Qtof/MS	Micro-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol
Mol/mol	Mole par mole de creatinine urinaire
Naph	Naphtalène
NQO1	NADPH quinone oxydoréductase 1
Phe	Phénanthrène
Pyr	Pyrène
Rev-BPDE	BaP-9,10-diol-7,8-époxyde
SBE	Surveillance biologique de l'exposition
SPE	Extraction en phase solide
t_{MAX}	Temps au maximum d'excrétion urinaire
UE	Union Européenne
UGT	UDP-glucuronyltransférase
UPLC-MS/MS	Chromatographie liquide ultra-performante couplée à la détection en spectrométrie de masse en mode tandem
VBR	Valeur biologique de référence
VLB	Valeur limite biologique
VME	Valeur moyenne d'exposition
WHO	World Health Organisation

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Numérotation des carbones du benzo(a)pyrène	23
Figure 2 : Illustration des régions chimiques des HAP	24
Figure 3 : Apport relatif de différents types d'aliments dans l'absorption humaine des HAP	32
Figure 4 : Représentation schématique du continuum des biomarqueurs des HAP jusqu'au diagnostic clinique du cancer.....	39
Figure 5 : Schéma des bronchioles et des alvéoles	60
Figure 6 : Accumulation du BaP dans l'épithélium pulmonaire après sa désorption des particules....	61
Figure 7 : Schéma de l'absorption respiratoire du BaP	62
Figure 8 : Schéma de l'absorption cutanée des xénobiotiques	64
Figure 9 : Exemples de métabolites primaires et secondaires du BaP	69
Figure 10 : Fonctionnalisation du BaP via le radical cation.....	71
Figure 11 : Structure chimique du 3-OHBaP	72
Figure 12 : Fonctionnalisation du BaP en métabolites hydroxylés	73
Figure 13 : Fonctionnalisation du BaP en BaP-7,8-dione (BaP-o-quinone).....	73
Figure 14 : Fonctionnalisation du BaP en diol-époxydes (BPDE et rev-BPDE)	74
Figure 15 : Diastéréoisomères du BPDE.....	77
Figure 16 : Voies principales d'activation métabolique du BaP	79
Figure 17 : Adduits de l'ADN majoritaires issus du radical cation du BaP	80
Figure 18 : Structure chimique du BPDE-N2-dGuo	83
Figure 19 : Exemples de métabolites conjugués du BaP.....	85
Figure 20 : Synthèse du métabolisme du BaP	87
Figure 21 : Cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP chez un salarié exposé.....	91

Figure 22 : Schéma simplifié de l'interaction du BaP avec l'Aryl hydrocarbon Receptor	96
Figure 23 : Origine des énantiomères du <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol.....	113
Figure 24 : Structures chimiques du BaP-7-NAC et du BaP-10-NAC	120
Figure 25 : Structure chimique de la 8-oxodGuo	138
Figure 26 : Test des comètes sur des cellules de vessie.....	142
Figure 27 : Phases composant la SPE	152
Figure 28 : Schéma du système chromatographique.....	154
Figure 29 : Chromatogrammes urinaires	160
Figure 30 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP dans les différents GEH de l'industrie de la production d'anodes.	182
Figure 31 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP dans les différents GEH de l'industrie de la production de cathodes.	183
Figure 32 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP dans les différents GEH de l'industrie de la production de silicium.....	184
Figure 33 : Ratios des concentrations urinaires de 1-OHP en FSFP divisées par celles de 3-OHBaP en FSFP16.....	185
Figure 34 : Corrélations entre les valeurs logarithmiques des concentrations de 1-OHP et de 3-OHBaP mesurées dans le même échantillon urinaire prélevé en FSFP.....	187

LEGENDES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des seize HAP considérés comme prioritaires par l'EPA.....	22
Tableau 2 : Classification des HAP quant à leur cancérogénicité	29
Tableau 3 : Résumé des caractéristiques techniques des méthodes de dosage du BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire	115
Tableau 4 : Niveaux de ($\pm$) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol urinaire.....	117
Tableau 5 : Niveaux de 3-OHBaP urinaire.....	125
Tableau 6 : Niveaux d'adduits à l'ADN lymphocytaires du BPDE.....	131
Tableau 7 : Niveaux urinaires de 8-oxodGuo	140
Tableau 8 : Paramètres de l'extraction en phase solide automatisée.....	152
Tableau 9 : Résumé des paramètres de l'analyse chromatographique.....	155
Tableau 10 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP chez des sujets fumeurs et non- fumeurs.....	162
Tableau 11 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP aux différents temps de prélèvement dans les secteurs de la production d'anodes, d'électrodes et de silicium.	180

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIF DU TRAVAIL

I. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

I.1. Généralités

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des molécules constituées de carbone et d'hydrogène issus de la dégradation de la matière organique. Leur structure comporte au moins 2 cycles aromatiques condensés. L'agencement de ces cycles aromatiques est linéaire, angulaire ou groupé. Certains HAP peuvent contenir des cycles saturés et d'autres peuvent être substitués (nitro-HAP, amino-HAP, alkyl-HAP, etc.). La grande diversité des arrangements chimiques possibles est à l'origine du nombre important de molécules (plus d'une centaine) appartenant à cette famille chimique.

Ce sont des composés ubiquitaires de l'environnement général et domestique (tabagisme, alimentation grillée, chauffage, émissions moteurs) mais également de certains environnements de travail, notamment ceux utilisant des dérivés de houille tel que l'électrometallurgie dans notre région [Bostrom 2002].

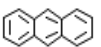
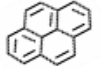
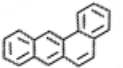
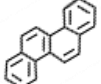
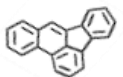
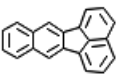
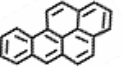
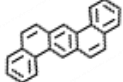
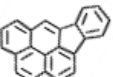
Les HAP sont des molécules lipophiles qui pénètrent facilement dans les organismes vivants par passage à travers les membranes cellulaires. Ainsi, l'absorption humaine de ces composés peut se faire par voie respiratoire, digestive mais également cutanée. Une fois absorbés, les HAP sont métabolisés en composés plus hydrophiles, sans quoi leur élimination de l'organisme ne serait pas possible. Pendant cette métabolisation, qui débute par une oxydation enzymatique, certains HAP vont acquérir leur pouvoir toxique.

Sept HAP sont classés dans le groupe des substances devant être assimilées à des agents cancérogènes pour l'homme par l'Union Européenne (UE). Les cancers du poumon, de

la peau et de la vessie sont reconnus comme maladies professionnelles liées à l'exposition aux HAP, principalement lors de l'utilisation de produits dérivant de la houille et plus rarement du pétrole.

L'Environmental Protection Agency (EPA) a inscrit seize HAP sur la liste des polluants prioritaires dès 1976 de par leur prépondérance dans l'environnement (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des seize HAP considérés comme prioritaires par l'EPA

	N° CAS	Formule brute	Structure chimique	Masse molaire (g/mole)
Naphtalène (Naph)	91-20-3	C ₁₀ H ₈		128
Acénaphthylène	208-96-8	C ₁₂ H ₈		152
Acénaphtène	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀		154
Fluorène	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀		166
Phénanthrène (Phe)	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀		178
Anthracène	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀		178
Fluoranthène (Flua)	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀		202
Pyrène (Pyr)	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀		202
Benzo(a)anthracène (BaA)	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂		228
Chrysène (Chr)	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂		228
Benzo(b)fluoranthène (BbF)	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂		252
Benzo(k)fluoranthène (BkF)	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂		252
Benzo(a)pyrène (BaP)	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂		252
Dibenzo(ah)anthracène (DBahA)	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄		278
Benzo(ghi)pérylène (BghiP)	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂		276
Indéno(1,2,3-cd)pyrène (IP)	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂		276

I.2. Nomenclature

Les structures chimiques des HAP sont positionnées en orientant sur une base horizontale l'alignement de cycles le plus grand possible, avec le reste de la molécule disposé en majorité dans le quadrant supérieur droit. Les atomes de carbone extérieurs des structures sont numérotés dans le sens antitrigonométrique (sens des aiguilles d'une montre), avec l'origine sur le sommet libre le plus à gauche du cycle supérieur le plus à droite (Figure 1).

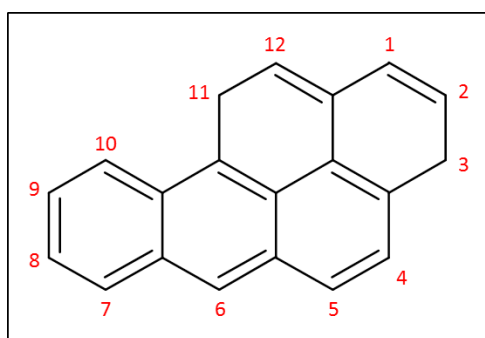


Figure 1 : Numérotation des carbones du benzo(a)pyrène

Les structures des HAP complexes sont exprimées comme des dérivés des structures de base, par accollement d'autres systèmes élémentaires aussi simples que possible. Certaines régions chimiques de ces composés sont désignées telles que :

- La région K est une liaison formée par fusion angulaire de deux noyaux aromatiques sur un noyau benzénique.
- La région L est située au milieu de l'enchaînement des cycles.
- La région M est un site moléculaire où les réactions d'oxydation se produisent préférentiellement.

- La région de baie est une structure placée entre trois cycles aromatiques condensés de façon angulaire alors que la région de fjord est placée entre quatre cycles.

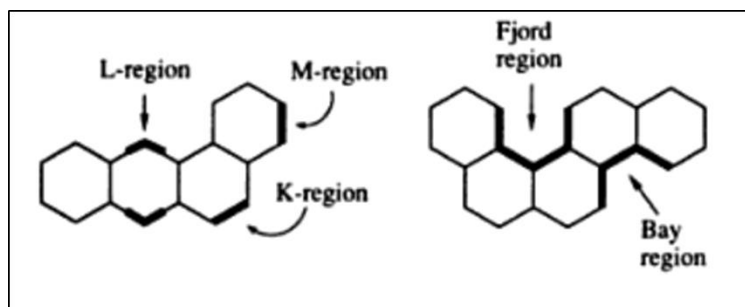


Figure 2 : Illustration des régions chimiques des HAP

I.3. Sources d'émission

Les HAP peuvent avoir une origine pyrolytique, par combustion incomplète de la matière organique, ou pétrogénique, lors des procédés industriels de distillation de la houille et du pétrole. Leur production conduit toujours à l'émission de mélanges complexes dont la composition relative varie considérablement selon la source [Jongeneelen 1997].

Les sources d'émission d'HAP peuvent être naturelles : éruptions volcaniques, incendies. Elles sont néanmoins majoritairement anthropiques : émissions industrielles, échappements moteurs, chauffage au bois, secteur industriel extractif ; avec l'émission estimée en Europe dans les années 1990, de plus de 8600 tonnes/an de la somme des BaP, BbF, BghiP, BkF, Flua et IP [Bostrom 2002]. Les émissions liées au trafic routier constituent une source d'HAP dans l'atmosphère, en augmentation en Europe depuis les années 1975

[Gabrieli 2010]. En 2003, elles représentaient environ 10 % des émissions atmosphériques totales d'HAP [Ravindra 2008].

La tension de vapeur des HAP définit leur distribution entre la phase gazeuse et particulaire. Elle diminue fortement avec l'augmentation de leur masse moléculaire [Lohmann and Lammel 2004]. Les HAP possédant un poids moléculaire de 128 à 178 g/mole, comprenant jusqu'à quatre cycles aromatiques, sont sous forme gazeuse. Le Pyr et le Flua, composés de quatre cycles, avec un poids moléculaire de 202 g/mole, sont retrouvés à la fois sous forme gazeuse et sous forme particulaire. Enfin, les HAP possédant un poids moléculaire de 228 g/mole minimum, à partir de quatre cycles aromatiques, sont émis sous forme particulaire, adsorbés pour plus de la moitié d'entre eux sur des particules fines de diamètre inférieur à 0,5 μm [Rehwagen 2005].

Dans le milieu aquatique, on les retrouve liés à de la matière organique sédimentaire, ou à des particules en suspension, puisque ce sont des composés hydrophobes. Les HAP peuvent être dispersés à très longue distance de leur point d'émission. Ils finissent par retomber au sol ou dans l'eau avec les précipitations. Ils sont capables de s'accumuler dans les organismes possédant peu de moyens de biotransformation, comme les invertébrés.

II. TOXICITE DES HAP

II.1. Toxicité aiguë

Les HAP ne possèdent pas une toxicité aiguë ou subaiguë très importante. Aucun effet toxique n'a ainsi été observé après administration par voie nasale d'un aérosol contenant 7,7 mg/m³ de BaP, 2 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines, à des rats [Wolff 1989]. Un potentiel neurotoxique, une toxicité hématologique, rénale et hépatique et une immunotoxicité ont toutefois étaient observés dans différentes études animales utilisant de très fortes doses [Ramesh 2001a, Ramesh 2004].

Chez l'homme, l'ingestion de Naph peut provoquer des troubles digestifs, l'inhalation peut engendrer des céphalées, une agitation et une confusion et l'intoxication aiguë se caractérise par une anémie hémolytique. La dose létale est estimée entre 5 et 15 g pour un adulte.

Au niveau local, les HAP sont phototoxiques, à l'origine d'une dermite en association avec les rayonnements UV et ils peuvent provoquer un eczéma et des irritations pulmonaires.

II.2. Toxicité chronique

L'exposition chronique aux HAP peut provoquer une diminution des immunoglobulines sériques G et A [Szczeklik 1994]. Récemment, ils ont été associés à une diminution de l'autonomie de la fréquence cardiaque qui est un des facteurs de maladies

cardiovasculaires [Li 2012a]. La reprotoxicité de ces composés est également suspectée [IARC 2010].

Cependant, la toxicité chronique principale des HAP est leur cancérogénicité. Le premier constat de cancer humain associé à une exposition aux HAP a été décrit par Pott en 1775 à travers l'identification d'un risque supplémentaire de cancers du scrotum dans une population de ramoneurs. Aujourd'hui, les cancers du poumon sont les plus fréquents. Les cas de cancers de la peau sont restreints aux expositions professionnelles impliquant un important contact cutané avec les HAP, tandis que l'apparition de cancers de la vessie, moins fréquente, semble liée à des expositions particulièrement élevées [Boffetta 1997].

L'UE a été amenée à classer les différents HAP en fonction de leur cancérogénicité. La directive 67/548/CEE, concernant la classification et l'étiquetage des substances dangereuses, fixe les critères de classification des substances cancérogènes sur la base des éléments scientifiques disponibles. Cette directive est reprise dans la réglementation française dans le décret n°2004-725 du 22 juillet 2004. Trois classes de cancérogénicité sont définies :

- Catégorie 1A : substances que l'on sait être cancérogènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à de telles substances et l'apparition d'un cancer.
- Catégorie 1B : substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption de causalité entre l'exposition de l'homme à de telles substances et la survenue d'un cancer. Cette présomption est généralement fondée sur des études appropriées à long terme sur l'animal et/ou d'autres informations.

- Catégorie 2 : substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles.

Alors que certains HAP particuliers sont dans le groupe des agents devant être assimilés à des substances cancérogènes pour l'homme, aucun HAP gazeux ne fait partie de ce groupe.

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) évalue également les agents susceptibles d'accroître le risque de cancer chez l'homme. Il peut s'agir de produits chimiques, de mélanges complexes ou de circonstances d'exposition professionnelle. Sa classification, composée de quatre catégories, n'a toutefois aucune valeur réglementaire :

- Groupe 1 : agent cancérogène pour l'homme (cancérogène avéré ou certain).
- Groupe 2A : agent probablement cancérogène pour l'homme (cancérogène probable).
- Groupe 2B : agent peut être cancérogène pour l'homme (cancérogène possible).
- Groupe 3 : agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme.
- Groupe 4 : agent probablement non cancérogène pour l'homme.

Au sein des HAP, seul le BaP est classé cancérogène certain pour l'homme (groupe 1) par le CIRC, tandis que les autres composés sont classés cancérogènes probables (groupe 2A), possibles (groupe 2B), ou non classables (groupe 3) [IARC 2010]. Le Tableau 2 résume les classifications de l'UE et du CIRC des seize HAP prioritaires.

Tableau 2 : Classification des HAP quant à leur cancérogénicité

Etat dans l'atmosphère	HAP	Nombre de cycles aromatiques	Classification UE	Classification CIRC
Gazeux	Naphtalène (Naph)	2	2	
	Acénaphtylène	3		3
	Acénaphène	3		3
	Fluorène	3		3
	Phénanthrène (Phe)	3		3
	Anthracène	3		3
Gazeux et particulaires	Fluoranthène (Flua)	4		3
	Pyrène (Pyr)	4		3
Particulaires	Benzo(a)anthracène (BaA)	4	1B	2B
	Chrysène (Chr)	4	1B	2B
	Benzo(b)fluoranthène (BbF)	5	1B	2B
	Benzo(k)fluoranthène (BkF)	5	1B	2B
	Benzo(a)pyrène (BaP)	5	1B	1
	Dibenzo(ah)anthracène (DBahA)	5	1B	2A
	Benzo(ghi)pérylène (BghiP)	6		3
	Indéno(1,2,3-cd)pyrène (IP)	6		2B

Le CIRC a également classé cancérogènes certains pour l'homme, les expositions professionnelles aux HAP dans les secteurs de la gazéification du charbon, de la production de coke, de la distillation du goudron de houille, du ramonage et de la production d'aluminium. Les expositions lors de la fabrication d'électrodes de carbone et l'utilisation de créosote ont été classées cancérogènes probables [IARC 2010].

Les tableaux de maladies professionnelles 16 bis et 36 bis du régime général français reconnaissent les carcinomes de la peau, le cancer broncho-pulmonaire, et les tumeurs des voies urinaires comme possiblement en lien avec des expositions aux goudrons, huiles et brais de houille, aux suies de combustion du charbon et aux huiles minérales dérivant du pétrole.

III. EXPOSITION DES POPULATIONS

III.1. Exposition de la population générale

L'exposition des populations peut se faire via l'air, l'eau, le sol, la nourriture et même les produits pharmaceutiques (via le traitement local du psoriasis qui se faisait ces dernières décennies avec des produits à base de goudron de houille).

Les concentrations atmosphériques en HAP varient en fonction de la saison, avec des niveaux plus élevés en hiver qu'en été [Mastral 2003, Rossi 1995]. Ainsi en milieu urbain, les concentrations de BaP peuvent être 5 fois plus élevées en hiver [Prevedouros 2004]. Ceci s'explique principalement par :

- un nombre de sources d'émission plus important à cette période, avec notamment la présence d'émissions dues au chauffage domestique [Papageorgopoulou 1999],
- une modification de la répartition entre la phase gazeuse et la phase particulaire due à des différences de température ambiante, de pression de vapeur, et de concentration en particules [Baek 1991],

- des phénomènes de dégradation des HAP moins importants en hiver, particulièrement la photodégradation et l'oxydation par l'ozone,
- des phénomènes de dispersion atmosphérique plus limités, avec de possibles inversions thermiques à cette période [Marchand 2005]. Ce phénomène est caractéristique de notre région car Grenoble est situé en fond de vallée, ce qui ne permet pas la dispersion des polluants et favorise les phénomènes d'inversion thermique.

La consommation de tabac est également une source majeure d'exposition non-professionnelle de la population. Les quantités d'HAP totaux dans la fumée d'une cigarette varient de 1 à 1,6 µg [Ding 2005]. La fumée secondaire est une source intérieure importante d'HAP avec des quantités de BaP jusqu'à trois fois supérieures à celles de la fumée primaire [IARC 2010].

L'alimentation est également une source importante d'exposition qui est majoritaire chez les sujets non-fumeurs [Ramesh 2004]. La préparation des aliments, par le fumage, le séchage, la torréfaction, la cuisson au four, les grillades ou les fritures, est connue pour être à l'origine de la contamination alimentaire. La contamination des végétaux comestibles par une atmosphère ou un sol pollué est également à considérer. La Figure 3 3 représente la part de différents aliments dans l'absorption humaine du BaP via l'alimentation.

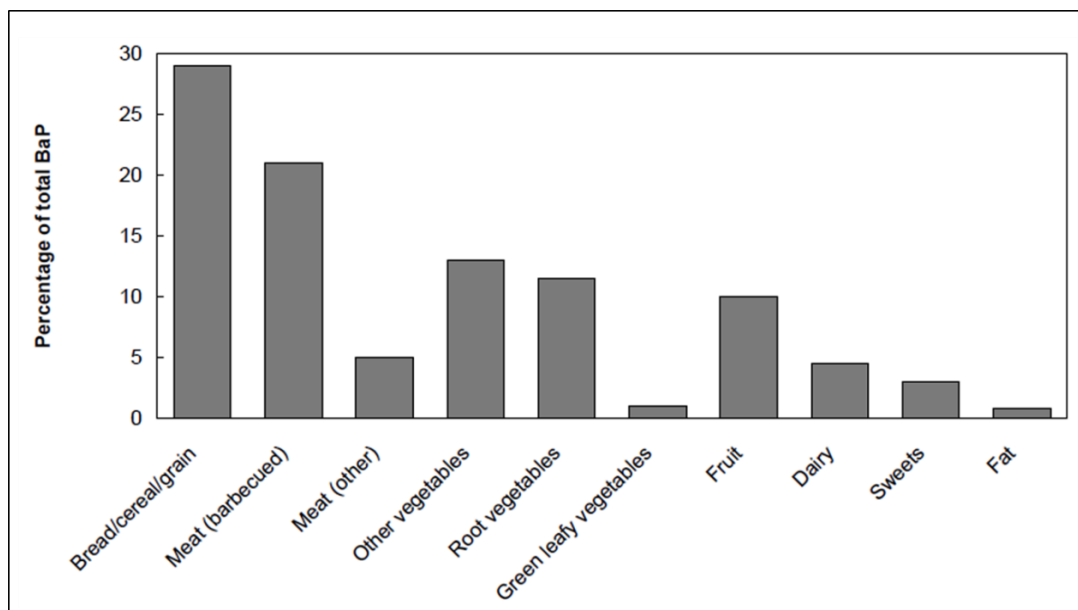


Figure 3 : Apport relatif de différents types d'aliments dans l'absorption humaine des HAP [IARC 2010]

Les principaux contributeurs à l'ingestion des HAP sont les céréales et les produits à base de céréales, en raison de leur forte consommation dans les régimes alimentaires.

Les concentrations d'HAP dans l'eau de surface sont faibles de par leur hydrophobicité et sont généralement comprises entre 1 et 50 ng/l. Dans l'eau de consommation, les niveaux sont encore plus faibles [WHO 1998].

Au total, pour un homme non-fumeur âgé de 19 à 50 ans, l'apport total d'HAP a été estimé à 3,12 µg/jour dont 96,2 % provenaient de l'alimentation, 1,6 % de l'air ambiant, 1,9 % du sol et 0,2 % de l'eau [Menzie 1992].

III.2. **Exposition professionnelle**

Des expositions nettement plus élevées qu'en environnement général sont retrouvées dans le milieu professionnel. L'étude SUMER, réalisée par le ministère français du travail, estime à plus de 1 400 000 le nombre de salariés professionnellement exposés aux HAP en France en 2010 [Cavet and Léonard 2013].

La majorité des travailleurs, environ 800 000, sont exposés aux HAP via les gaz d'échappement diesel, comme les mécaniciens, pour lesquels les concentrations atmosphériques en HAP totaux varient de 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dans le cas de véhicule légers à 0,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les garages de bus et de poids lourds [Hemon-Delsaux 2004].

Plus de 500 000 salariés sont exposés lors de l'emploi des huiles minérales, issus de la distillation et du raffinage du pétrole. Ces huiles sont utilisées comme agent de lubrification ou de refroidissement, notamment dans les secteurs de l'usinage des métaux ou de l'industrie automobile. Les niveaux d'exposition sont proches des précédents, mais peuvent augmenter avec l'enrichissement en HAP de ces huiles au cours de leur utilisation.

Les industries utilisant des goudrons de houille ou produisant des fumées de métallurgie représentent un effectif de sujets moins important, près de 200 000, mais sont beaucoup plus préoccupantes en termes de niveaux d'exposition. La production de coke est un secteur où les niveaux d'HAP totaux pouvaient dépasser 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ au sommet des fours mais le nombre de salariés de ce secteur est en déclin et la rénovation des installations a permis la diminution des concentrations [Levin 1995]. Le secteur industriel de l'électrométallurgie est également particulièrement concerné par l'exposition aux HAP. Cette dernière est liée à la consommation des électrodes de carbone, produites à partir de brai de houille, lors des

procédés d'électrolyse de l'aluminium. Au sein de cette industrie, les niveaux d'HAP totaux les plus élevés atteignaient $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans les usines utilisant le procédé Söderberg. Cette technologie consistait à réaliser la cuisson de l'anode de carbone directement dans la cuve d'électrolyse. De nos jours, ce procédé n'est plus utilisé en France où il a été remplacé par l'utilisation d'anodes précuites, avec des niveaux d'HAP totaux atmosphériques généralement inférieurs à $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Les concentrations retrouvées dans les usines de fabrication de ces électrodes précuites sont du même ordre de grandeur.

L'application de revêtements routiers était responsable d'une exposition importante aux HAP, supérieure à $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, lorsque le goudron issu de la distillation de la houille était utilisé. Depuis les années cinquante, ce produit a été remplacé par le bitume, issu de la distillation du pétrole, contenant jusqu'à mille fois moins d'HAP et responsable d'émissions d'HAP totaux bien inférieures à $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$. En revanche, l'enlèvement et le recyclage d'anciens revêtements contenant du goudron reste une situation potentiellement dangereuse.

L'absorption cutanée est une voie majeure de pénétration des HAP dans l'organisme en milieu industriel. Le contact direct avec les produits, ou indirect avec les vêtements, les équipements de protection individuelle et le matériel de travail souillés, peut être très important. Ainsi dans l'industrie de l'aluminium ou des fours à coke, l'absorption cutanée peut constituer la voie principale de pénétration [Van Rooij 1992, Van Rooij 1993b].

IV. SURVEILLANCE DE L'EXPOSITION DES POPULATIONS AUX HAP

En raison de leur cancérogénicité, il apparaît indispensable de suivre l'exposition des populations aux HAP. Deux approches complémentaires coexistent qui se distinguent par les modalités de mise en œuvre et les informations qu'elles apportent.

La première s'attache à évaluer la dose externe d'HAP à laquelle un individu est exposé. Cela peut passer par le prélèvement et le dosage des HAP présents dans l'atmosphère. Cette méthodologie est nommée surveillance atmosphérique. Afin d'évaluer l'exposition cutanée, l'apposition de compresses ou de patchs sur la peau des individus a également été utilisée en milieu professionnel [Dor 2000, Vaananen 2005]. Mais cette méthode ne semble pas adaptée à une évaluation quantitative de l'exposition, car la quantité d'HAP au contact de la peau est sous-estimée et car la variabilité intra- et interindividuelle est trop importante [Van Rooij 1994]. Enfin, l'évaluation de l'exposition environnementale aux HAP peut également passer par leur dosage dans l'eau de boisson et les aliments.

La deuxième approche, nommée surveillance biologique humaine, évalue la dose interne ayant réellement pénétrée à l'intérieur de l'organisme. Cette méthode prend en compte toutes les sources et voies d'exposition et est plus proche du risque sanitaire, car elle renseigne sur la quantité de toxique au contact des tissus biologiques.

IV.1. Monitoring atmosphérique des HAP

Le dosage des HAP atmosphériques nécessite de réaliser des prélèvements d'air dans des conditions standardisées selon la norme NF X 43-294. Un filtre en fibres de quartz

piégeant les HAP particuliers est monté en série avec un support type XAD2 piégeant les HAP gazeux. Ces supports sont reliés à une pompe dont le débit d'aspiration d'air est réglé à 1 l/min. Pendant l'activité de travail, ce matériel est placé soit directement sur le salarié : prélèvement individuel ; soit proche d'une source d'émission : prélèvement d'ambiance. Après prélèvement, les HAP seront extraits des supports par du dichlorométhane. Leur dosage est réalisé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la détection par fluorescence (HPLC-FLD) ou la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

La métrologie atmosphérique quantifie les niveaux d'HAP particuliers et gazeux présents dans l'atmosphère en milieu environnemental ou industriel. Elle détermine également la proportion relative de chacun d'entre eux. A partir des concentrations obtenues, le calcul des ratios des concentrations HAP gazeux/HAP particuliers, BaP/Pyr, mais également du pourcentage que représente chaque HAP au sein du mélange, permet de caractériser les sources d'émissions. Si la composition chimique du mélange est relativement constante pour une même source, elle peut varier considérablement pour des sources différentes. De manière générale, la phase gazeuse est émise en plus grande quantité, de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{m}^3$, que la phase particulière, de l'ordre du ng/m^3 . Au sein de cette phase gazeuse, le Naph est généralement l'HAP majoritaire. Le Pyr se distribue entre les deux phases en fonction des conditions environnementales, et de par sa stabilité thermodynamique élevée, est également un composé très présent dans les mélanges [Boogaard 2008]. Au sein de la phase particulière, la proportion d'HAP cancérogènes peut varier de 10 % dans un mélange issu d'une combustion de la matière organique, à 80 % dans le cas d'émissions liées au chauffage de goudron de houille. Le calcul du ratio des concentrations BaP/Pyr, permet de comparer le potentiel cancérogène des différents mélanges. La recherche de ratios de concentrations

d'autres HAP qui seraient spécifiques d'un type de source d'émission ne semble pas adéquate, notamment car les différents HAP ne possèdent pas la même stabilité chimique, ce qui induit une variation de la valeur de ces ratios indépendante de la source [Katsoyiannis 2011].

En milieu industriel, les concentrations atmosphériques en HAP vont dépendre du nombre de sources d'émission, du type d'activité professionnelle (produit, procédé), de l'éloignement par rapport à la source et de l'existence d'un système d'aspiration ou de filtration des émissions. Les émissions de HAP seront également plus importantes lorsque les procédés industriels seront réalisés à température élevée. La surveillance atmosphérique est donc essentielle en hygiène industrielle pour identifier les activités devant faire l'objet d'améliorations techniques. En France, la caisse nationale d'assurance maladie recommande comme objectif provisoire de valeur moyenne d'exposition (VME) le maintien de la concentration atmosphérique de BaP à un niveau inférieur à 150 ng/m^3 . Pour le Naph, la VME indicative est fixée à 50 mg/m^3 .

La métrologie atmosphérique permet donc d'évaluer l'exposition atmosphérique des populations et le potentiel cancérigène des mélanges. Elle peut également être utilisée afin d'identifier la source de contamination de l'environnement et permet de suivre les pics d'exposition. Cependant, elle n'évalue pas la dose réellement absorbée par l'organisme puisqu'elle ne quantifie que la quantité d'HAP potentiellement absorbée par voie respiratoire, sans intégrer l'efficacité des équipements de protection individuelle, ni l'absorption des HAP par voie cutanée.

En revanche, la surveillance biologique de l'exposition présente l'avantage de prendre en compte la dose interne d'HAP ce qui la rend plus proche du risque sanitaire.

IV.2. Surveillance biologique

IV.2.1. Généralités

La surveillance biologique humaine est une méthodologie visant à évaluer l'exposition humaine à des agents de l'environnement capables d'induire des effets délétères sur la santé des sujets exposés. Elle passe par le dosage dans l'organisme des agents toxiques, de leurs métabolites ou des produits de réaction. La surveillance biologique humaine ne doit pas être confondue avec la biosurveillance environnementale (ou écosurveillance) qui désigne l'observation des organismes vivants, effectuée dans le but de surveiller la qualité écologique des milieux naturels [Salines 2012].

Les indicateurs utilisés pour la surveillance biologique sont appelés biomarqueurs. Ils peuvent être classés en trois catégories et apportent des informations différentes [Angerer 2007].

- **Les biomarqueurs d'exposition** : ils sont spécifiques de la substance dont on souhaite connaître l'exposition. On distingue les biomarqueurs de dose interne, qui sont les substances elles-mêmes, ou leurs métabolites, retrouvés dans l'organisme et les biomarqueurs de dose efficace, qui correspondent à la dose de toxique présente au niveau du site d'action (adduits à l'ADN ou aux protéines). Ce sont les biomarqueurs utilisés pour la surveillance biologique de l'exposition (SBE) en milieu professionnel.
- **Les biomarqueurs d'effets** : ce sont des altérations biochimiques ou physiologiques, mesurables au sein d'un organisme, qui en fonction de leur intensité peuvent être associées à une détérioration établie ou possible de la santé. Contrairement aux précédents, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'une substance. Certains sont dits précoces car ils

traduisent un effet cellulaire en amont de la pathologie. Ils correspondent aux lésions génotoxiques (cassures de l'ADN), oxydatives (bases oxydées), ou aux effets cytogénétiques (échanges de chromatides sœurs, aberrations chromosomiques et micronoyaux). D'autres sont qualifiés de tardifs car plus proches de l'effet physiologique : l'augmentation des transaminases plasmatiques dans le cas d'une hépatotoxicité ou l'apparition d'une β 2-microglobulinurie dans le cas d'une néphrotoxicité. Ces indicateurs sont utilisés dans la compréhension des mécanismes toxiques, le diagnostic clinique et la surveillance thérapeutique.

- **Les biomarqueurs de susceptibilité individuelle :** ce sont des indicateurs de la capacité inhérente, ou acquise, d'un organisme, à répondre à l'agression induite par une exposition à un xénobiotique (génotype, genre, âge, ...).

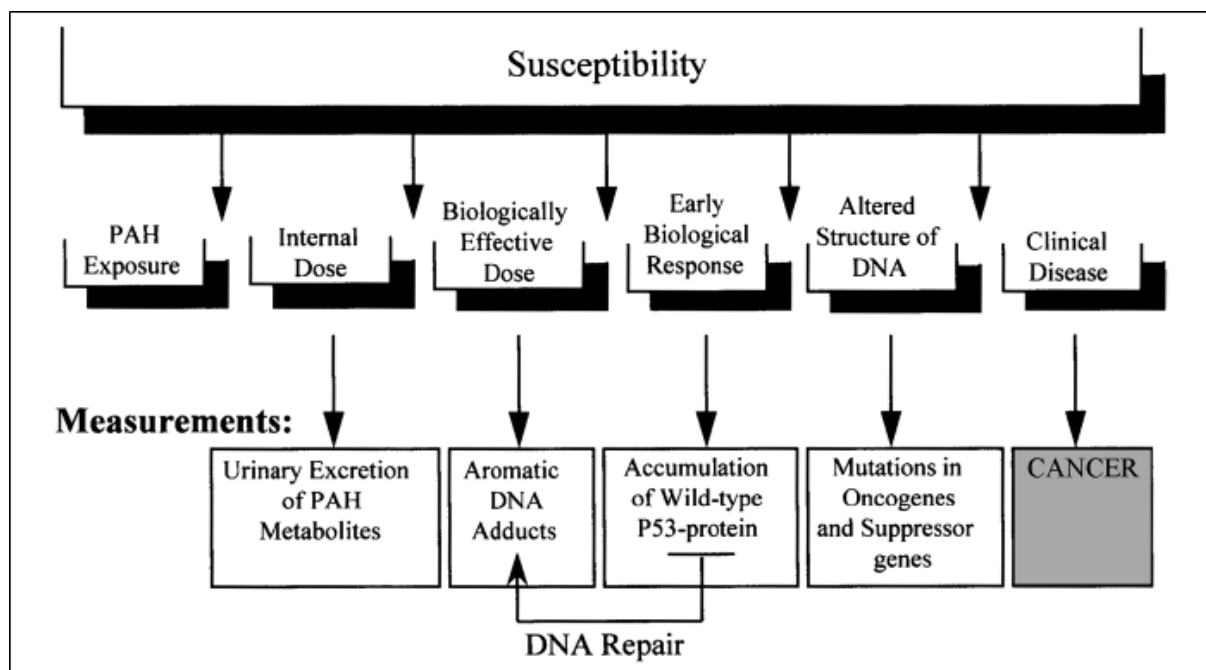


Figure 4 : Représentation schématique du continuum des biomarqueurs des HAP jusqu'au diagnostic clinique du cancer [Godschalk 2003]

IV.2.2. Surveillance biologique des expositions professionnelles

La surveillance biologique des expositions professionnelles consiste à mesurer, dans les matrices biologiques (tissus, excréments, sécrétions ou air expiré) de travailleurs exposés à des substances chimiques, des indicateurs biologiques d'exposition (IBE) qui sont les substances elles-mêmes ou leurs métabolites [ANSES 2013].

La SBE permet de situer le degré d'imprégnation toxique d'individus par rapport à un niveau à partir duquel il existe un risque de survenue d'effets sanitaires. Ainsi, il est possible d'identifier les groupes d'exposition homogène (GEH) pour lesquels le risque est anormalement élevé. Mais la présence d'une substance chimique dans l'organisme, même à un niveau plus élevé que celui de 90 % des individus qui composent la population de référence, ne signifie pas nécessairement qu'il y ait un risque pour la santé. Inversement, dans le cas de substances cancérogènes, il n'existe pas de seuil de protection des populations. Afin de préciser l'impact sanitaire d'une imprégnation toxique, il est donc nécessaire d'étudier les liens entre les biomarqueurs de dose interne, les biomarqueurs de dose efficace et les biomarqueurs d'effet, ce qui est du ressort de l'épidémiologie moléculaire [Perera and Weinstein 2000]. Le développement de modèles toxicocinétiques concernant le devenir des composés d'intérêts et de leurs métabolites dans l'organisme, est également un axe de recherche fondamental pour la compréhension des liens entre exposition externe et exposition interne, mais également entre exposition et effet des xénobiotiques [Bouchard 2010].

La SBE est particulièrement intéressante en Toxicologie Professionnelle car c'est un élément important de prévention primaire totalement intégré dans la démarche d'évaluation

des risques sanitaires. Elle présente l'avantage de prendre en compte toutes les voies d'entrée des substances dans l'organisme (respiratoire, cutanée, orale) mais aussi l'efficacité des équipements de protection individuelle (masques, gants), toutes les sources d'exposition (activités professionnelle, tabac, alimentation, pollution) et les facteurs de susceptibilité individuelle, physiologiques ou pathologiques (capacité respiratoire, métabolisme). En revanche, elle reste moins utilisée que la métrologie atmosphérique par les hygiénistes industriels, car elle ne permet pas d'identifier les sources d'émission et les pics d'exposition.

Plusieurs conditions sont nécessaires à la mise en place d'une stratégie de SBE en milieu professionnel :

- **Le respect du secret individuel.** La prescription et le rendu individuel des résultats relève exclusivement du médecin du travail, qui discute avec l'opérateur des propositions d'amélioration des conditions de travail et des moyens de protection individuelle.
- **L'accord et l'information des salariés.** Ceci permet à l'opérateur de comprendre l'importance du moment du prélèvement et de la collecte des informations techniques pendant l'activité de travail.
- **L'existence d'IBE validés.** Le choix d'un biomarqueur spécifique et de l'horaire de prélèvement, dépend des connaissances de toxicocinétique et de toxicodynamie de la substance chimique suivie. Les prélèvements biologiques non invasifs sont privilégiés et l'urine est le milieu biologique le plus utilisé. Les prélèvements sanguins sont plus rares car plus difficiles à réaliser en milieu industriel.
- **La fiabilité de la méthode analytique.** Les paramètres de validation analytique (sensibilité, linéarité, fidélité,...) doivent être connus et correspondre aux exigences de qualité.

- **La maîtrise du coût analytique.** Le coût du développement analytique et de l'utilisation du dosage devra correspondre autant que possible à une utilisation en routine, tout en répondant aux besoins de la SBE.
- **La possibilité de l'interprétation des résultats.** L'interprétation collective anonyme permet d'identifier les GEH à risques et de discuter avec l'ensemble des acteurs de prévention. Les niveaux sont comparés aux valeurs limites biologiques (VLB) à ne pas dépasser, ou aux valeurs biologiques de référence (VBR), issues de la population générale non exposée professionnellement. En France, seul le dosage de la plombémie possède une VLB contraignante, fixée à 400 µg/l chez l'homme et 300 µg/l chez la femme, les autres VLB ne sont qu'indicatives. Mais de nombreuses VLB sont en cours d'élaboration au sein du comité d'experts spécialisés de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) et répondent à une méthodologie très précise [ANSES 2013]. Si le corpus de données scientifiques est suffisant pour quantifier avec certitude une relation dose-réponse, les VLB seront construites sur la base des données sanitaires (absence d'effet pour les substances à seuil ou niveaux de risque pour les substances cancérogènes sans seuil). En l'absence de telles données, pour les substances à seuil d'effet, la VLB sera calculée sur la base de la concentration attendue de l'IBE lorsque le travailleur est exposé à la valeur limite d'exposition professionnelle atmosphérique. Pour les substances cancérogènes sans seuil, en l'absence de données quantitatives suffisantes, c'est sur la base d'un autre effet qu'une VLB sera construite (VLB pragmatique). Cette valeur pragmatique n'a pas pour objectif de recommander une valeur de l'IBE en dessous de laquelle il n'y a pas de risque sanitaire, mais vise à limiter les expositions à ces substances sur les lieux de travail.

IV.2.3. Surveillance biologique de l'exposition aux HAP

La SBE est indispensable dans le cas des expositions aux HAP car ce sont des composés cancérogènes ubiquitaires qui pénètrent dans l'organisme par voie respiratoire, cutanée et orale [Rossbach 2007]. Il est important de préciser que la consommation tabagique est le facteur confondant le plus important dans l'interprétation des résultats de la SBE aux HAP et qu'il est nécessaire d'en tenir compte en milieu professionnel.

Généralement, les individus sont exposés à de grandes quantités d'HAP non cancérogènes : Naph, Phe, Pyr,... ; et à de faibles quantités d'HAP considérés comme cancérogènes : BaP, Chr, BaA, ... La difficulté réside donc dans le choix d'un IBE unique, représentatif de l'exposition cancérogène et le plus proche possible du risque sanitaire.

Pour réaliser cette SBE, le dosage des HAP eux-mêmes peut être effectué dans les fluides de l'organisme. Récemment, une méthode d'analyse associant la microextraction en phase solide à la GC-MS a été développée pour analyser dix HAP dans les urines [Campo 2011]. Mais cette approche souffre d'un risque important de contamination directe des échantillons biologiques par la pollution présente sur le site de prélèvement, d'une sous-estimation des HAP gazeux et surtout d'un manque de sensibilité pour les HAP particuliers.

Pour éviter toute contamination, le dosage des métabolites des HAP a largement été privilégié, d'autant qu'ils sont considérés comme de bons biomarqueurs de l'exposition humaine [Viau 1995a]. Pour des raisons de faisabilité, ils sont dosés dans les urines et non pas dans les fèces, même si les HAP sont majoritairement éliminés par voie biliaire.

Leurs niveaux urinaires peuvent cependant être influencés par des effets de dilution ou de concentration des urines. L'approche la plus commune pour corriger cet effet est la mesure

conjointe de la concentration urinaire en créatinine et l'expression des niveaux de métabolites sous forme de ratio, en mole/mole de créatinine (mol/mol). Il est souvent recommandé d'exclure les échantillons urinaires dont la concentration en créatinine est inférieure à 0,3 g/l ou supérieure à 3 g/l [Cocker 2011]. En effet, les prélèvements avec de trop faibles valeurs sont très dilués, ce qui pourrait empêcher la détection de faibles niveaux de métabolites. Les échantillons présentant des valeurs trop hautes indiquent, quant à eux, une déshydratation qui peut jouer sur la sécrétion, l'excrétion ou la réabsorption rénale du métabolite [Barr 2005]. Il est important de noter que la concentration urinaire de créatinine est liée à la masse musculaire, à l'âge, à l'indice de masse corporelle et à l'origine ethnique des sujets, ce qui peut perturber l'interprétation des résultats [Bader 2013].

Différents critères entrent en considération dans le choix d'un métabolite en tant que biomarqueur de dose interne : la cancérogénicité de l'HAP dont il est issu, son abondance dans les urines, la facilité de son analyse et le caractère discriminatif exposé/non exposé.

Les métabolites les plus couramment utilisés comme biomarqueurs de doses internes dans la SBE aux HAP sont présentés dans les paragraphes suivants.

IV.2.3.1. Suivi de l'exposition au pyrène

Le Pyr, composé de 4 cycles aromatiques, est émis sous forme gazeuse et particulaire et est prépondérant dans les mélanges d'HAP. C'est un HAP symétrique ne possédant pas de région de baie qui est classé non cancérogène par l'UE et appartient au groupe 3 du CIRC [IARC 2010].

Le Pyr a un métabolisme simple, conduisant à la formation majoritaire de 1-hydroxypyrrène (1-OHP). L'élimination essentiellement urinaire de ce métabolite facilite sa détection [Jongeneelen 1997]. Chez l'humain, sa demi-vie d'élimination urinaire varie entre 4 et 48 h en fonction des études. Ce large intervalle s'explique par la variabilité des conditions d'exposition influençant la voie de pénétration du Pyr, ce qui a pour conséquence une modification de sa cinétique d'élimination. En effet, la pénétration cutanée ralentit l'élimination du 1-OHP de l'organisme par rapport à l'absorption respiratoire. Certains auteurs proposent de collecter les urines de 24 heures pour avoir une évaluation la plus juste possible de la dose de Pyr ayant pénétré l'organisme [Brandt and Watson 2003]. Néanmoins, lors des campagnes de SBE, la stratégie la plus adaptée au milieu industriel, consiste à prélever les mictions de début de semaine début de poste (DSDP) pour évaluer l'imprégnation environnementale du salarié, et de fin de semaine fin de poste (FSFP) en cas d'exposition essentiellement respiratoire, ou de fin de semaine début de poste, soit 16 heures après la fin de poste de la veille (FSFP16), en cas d'exposition majoritairement cutanée [Bouchard and Viau 1999]. Ce schéma de prélèvements présente l'intérêt de prendre en compte les expositions répétées tout au long de la semaine de travail.

Le dosage du 1-OHP urinaire se réalise par HPLC-FLD. La méthode d'analyse est considérée comme très robuste ce qui est essentiel pour son utilisation comme IBE [Levin 1995]. Il existe des circuits de contrôle de qualité externe tant pour les niveaux professionnels qu'environnementaux [Angerer 2007].

Les travaux de Jongeneelen *et al.* ont proposé dès les années 1980 l'utilisation de ce métabolite en tant qu'IBE aux HAP [Jongeneelen 1985]. Depuis ces trente dernières années, la dose interne de l'organisme en HAP, lors de diverses conditions d'exposition

professionnelle et environnementale, a ainsi été principalement évaluée par son dosage urinaire. Aujourd'hui, il est donc le biomarqueur d'exposition aux HAP le mieux validé et considéré comme le « gold standard » [Ciarrocca 2013]. L'utilisation de cet IBE a permis de hiérarchiser les risques en fonction des postes de travail au sein des secteurs industriels, mais aussi d'évaluer l'efficacité du port de protections respiratoires [Bentsen 1998].

Les niveaux de 1-OHP urinaire retrouvés chez les salariés du secteur de l'électrometallurgie, rassemblant les usines de production d'aluminium et d'électrodes carbone et graphite, sont de 10 $\mu\text{mol/mol}$ en moyenne [Hansen 2008]. Les études retrouvent régulièrement des niveaux supérieurs à 20 $\mu\text{mol/mol}$ et le maximum a été obtenu dans un site de production d'électrodes avec une concentration urinaire de 125 $\mu\text{mol/mol}$. Au sein des cokeries, les niveaux sont de l'ordre de 5 $\mu\text{mol/mol}$. Les travaux rapportent néanmoins de nombreuses concentrations supérieures à 10 $\mu\text{mol/mol}$ et une concentration maximum de près de 1700 $\mu\text{mol/mol}$ [Hansen 2008]. Des valeurs de 1-OHP urinaire plus faibles, d'environ 1 $\mu\text{mol/mol}$, ont été retrouvées dans les secteurs de la dépollution des sols et lors du travail au contact de l'asphalte. Enfin, bien que systématiquement inférieurs à 1 $\mu\text{mol/mol}$, les niveaux de ce métabolite issus de l'exposition à des gaz d'échappement sont également quantifiables [Hansen 2008]. Les conducteurs d'engins [Chuang and Chang 2007], les travailleurs urbains [Burgaz 2002, Ruchirawat 2002] ou les mécaniciens [Karahalil 1998, Kuusimäki 2004, Nielsen 1996] ont ainsi des concentrations urinaires supérieures à celles de témoins non-professionnellement exposés, lorsque la consommation tabagique est prise en compte.

A côté des expositions professionnelles, les expositions environnementales peuvent également être évaluées par le dosage du 1-OHP urinaire. Les sujets fumeurs, consommant en moyenne 20 cigarettes par jour, présentent ainsi une concentration urinaire de 1-OHP de

l'ordre de 0,1 $\mu\text{mol/mol}$, soit le double de celle des sujets non-fumeurs, inférieure à 0,05 $\mu\text{mol/mol}$ [Barbeau 2011]. La consommation d'aliments contaminés par les HAP peut également induire une augmentation de ce métabolite urinaire [Hansen 2008].

L'influence du polymorphisme génétique des enzymes de la métabolisation sur les niveaux urinaires de 1-OHP semble faible [Hopf 2009]. Le faible nombre d'enzymes engagées dans le métabolisme simple du Pyr, limite en effet les conséquences de la diversité des patrimoines génétiques.

Différentes valeurs guides pour les concentrations urinaires de 1-OHP ont été proposées. La première, égale à 0,24 $\mu\text{mol/mol}$, est fondée sur le principe que les HAP sont cancérogènes et que l'exposition des populations à ces toxiques doit être la plus faible possible. Elle correspond ainsi à la valeur du plus faible 95^{ème} percentile publié dans la littérature pour une population de sujets non-fumeurs non-exposés professionnellement [Jongeneelen 2001]. La deuxième valeur vise à prévenir la génotoxicité induite par une exposition aux HAP, bien que les liens entre ces effets précoces et le cancer ne soient pas encore bien établis. Les valeurs de 1,4 $\mu\text{mol/mol}$ [Buchet 1995], puis plus récemment de 1 $\mu\text{mol/mol}$ [Siwińska 2004], ont été proposées. Ces dernières correspondent à la concentration en dessous de laquelle il n'existe pas d'augmentation de la probabilité d'apparition d'un effet génotoxique chez les salariés exposés. En France, aucune valeur guide réglementaire n'existe encore pour cet IBE, mais la protection de la santé des travailleurs inciterait le choix de la plus petite valeur sans effet observé, soit 1 $\mu\text{mol/mol}$.

Toutefois, il est important de noter que les corrélations entre les niveaux urinaires de 1-OHP chez les personnes exposées et le BaP atmosphérique, ou les HAP cancérogènes, sont faibles [Campo 2012, Unwin 2006] ou non significatives [Aquilina 2010]. Les ratios BaP/Pyr

varient considérablement selon les sources d'émission et la concentration urinaire de 1-OHP ne reflète donc pas l'exposition interne aux HAP cancérogènes, ni au BaP seul, lorsque la composition des mélanges varie [Gendre 2004, Lafontaine 2004]. Certains auteurs proposent de pondérer la concentration de 1-OHP par le ratio des concentrations atmosphériques BaP/Pyr afin de mieux apprécier le risque sanitaire [Bouchard and Viau 1999]. Mais cette approche nécessite le dosage des HAP atmosphériques en plus de celui du 1-OHP et admet que les facteurs individuels influencent de la même façon le métabolisme de ces deux HAP.

A côté du 1-OHP, le dosage urinaire des 1,6- et 1,8-diones du Pyr par chromatographie ultra performante couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol a été utilisé pour évaluer l'exposition d'une population vivant à proximité d'industries de l'aluminium [Bouchard 2009]. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour évaluer la pertinence de ces nouveaux métabolites.

En conclusion, la détection du 1-OHP dans les urines est aisée car ses niveaux sont relativement élevés et qu'il existe des méthodes analytiques robustes. Son dosage dans les urines de FSFP a permis de différencier les fortes expositions issues des différents secteurs industriels, mais également les plus faibles provenant de l'exposition environnementale. Ce biomarqueur, considéré comme le « gold standard » dans la SBE aux HAP, est pourtant éloigné du risque sanitaire puisqu'il est issu du métabolisme d'un HAP non cancérogène. Afin de disposer d'un biomarqueur plus adapté, l'utilisation de différents métabolites issus d'HAP gazeux, très présents dans les mélanges, ou d'HAP particuliers considérés comme cancérogènes, ont été également proposés.

IV.2.3.2. Suivi de l'exposition au naphthalène

Le Naph, qui possède deux cycles aromatiques, est un des HAP le plus abondant de la phase gazeuse pour de nombreuses sources d'émission. Il n'est pas considéré comme cancérigène par l'UE mais est classé dans le groupe 2B du CIRC [IARC 2002].

Il est majoritairement éliminé dans les urines sous forme de 1- et 2-monohydroxy-Naph (1- et 2-naphtols). Chez le rat, 1,97 % et 1,13 % de la dose de Naph administrée par voie intraveineuse (IV) sont retrouvés dans l'urine sous forme de 1- et 2-naphtols [Elovaara 2003]. Cette élimination est biphasique avec une première demi-vie d'élimination urinaire d'environ 2 heures [Heikkilä 1997]. L'utilisation de ces métabolites comme IBE permet donc de suivre uniquement les expositions récentes et la collecte de l'urine doit se faire dès la fin de l'exposition. Généralement, cette analyse est réalisée en GC-MS [Shin and Lim 2011].

Les niveaux élevés de Naph émis par les sources d'émissions industrielles ou environnementales sont responsables de niveaux également élevés de naphtols urinaires. Dans l'industrie de la distillation du goudron de houille, les médianes des concentrations urinaires varient de 20,2 à 29,1 $\mu\text{mol/mol}$. En population non exposée professionnellement, les niveaux urinaires des 1- et 2-naphtols sont significativement plus élevés chez les sujets fumeurs que chez les non-fumeurs (supérieurs à 10 $\mu\text{mol/mol}$ versus 3 $\mu\text{mol/mol}$) [Preuss 2005].

Il est important de noter que le 1-naphtol est également issu du métabolisme du carbaryl, insecticide très largement utilisé [Li 2012b]. Le 2-naphtol, qui est spécifiquement produit lors du métabolisme du Naph, semble donc plus adapté à la SBE au Naph que son isomère.

Les concentrations urinaires élevées de ces métabolites, la facilité de leur analyse et l'absorption principalement respiratoire du Naph, font du 2-naphtol un bon biomarqueur d'exposition dans un contexte de surveillance d'une exposition environnementale à de faibles niveaux d'HAP [Li 2010]. En revanche, l'évaluation du risque cancérigène ne peut pas passer par la seule mesure de ce biomarqueur en milieu professionnel, du fait d'un manque de corrélation entre ses niveaux urinaires et les niveaux d'exposition au BaP ou aux HAP cancérigènes [Aquilina 2010].

IV.2.3.3. Suivi de l'exposition au phénanthrène

Le Phe est un HAP composé de trois cycles, émis sous forme gazeuse en quantité relativement importante par les sources industrielles. Il est classé non cancérigène par l'UE et appartient au groupe 3 du CIRC [IARC 2010]. C'est l'HAP possédant une région de baie dont la masse moléculaire est la plus faible.

Du fait d'un métabolisme plus complexe que celui du naphthalène, le Phe possède de nombreux métabolites : des monohydroxy-Phe (1-, 2-, 3-, 4- et 9-hydroxy-Phe), des dihydroxy-Phe (1,2-, 3,4- et 9,10-dihydroxy-Phe) et un tétrahydroxy-Phe (1,2,3,4-tétrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-Phe). L'analyse de ces métabolites est réalisée en HPLC-FLD ou en GC-MS.

Le 1- et le 3-monohydroxy-Phe (1- et 3-OHPhe) sont éliminés dans les urines en quantités similaires et sont majoritaires devant les autres phénols du Phe [Campo 2010]. Dans l'industrie de la production d'électrodes graphite, la médiane des concentrations urinaire des salariés est respectivement de 1,3 et de 3,3 $\mu\text{mol/mol}$ pour le 1-OHPhe et le 3-OHPhe. Le

métabolite tétrahydroxylé du Phe, issu de l'oxydation des atomes de carbone proche de sa région de baie, semble également intéressant, car le même processus métabolique est en partie responsable de la cancérogénicité du BaP. Cependant, Hecht *et al.*, ont démontré récemment que la stéréochimie de la voie d'oxydation de la région de baie du Phe, différerait de celle du BaP. Le 1,2,3,4-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-Phe ne reflète donc pas cette voie d'activation métabolique toxique [Hecht 2010].

Au total, par son abondance dans les mélanges d'HAP, le dosage des métabolites du Phe pourrait être utile dans l'évaluation de l'exposition aux HAP au même titre que ceux du Naph, mais là encore ils ne reflètent pas l'exposition cancérogène.

IV.2.3.4. Suivi de l'exposition au chrysène

Le Chr est un HAP à 4 cycles aromatiques possédant deux régions de baie et émis sous forme particulière en faible quantité dans les mélanges. Il est classé cancérogène par l'UE et cancérogène possible par le CIRC [IARC 2010].

Son métabolisme complexe conduit également à la production de nombreux métabolites. Dans les urines de rats exposés au HAP par voie respiratoire, on retrouve le 3- et 4-hydroxy-Chr, le 1,2- et le 3,4-dihydroxy-Chr. Ce dernier est le métabolite majoritaire [Grimmer 1997]. Dans les urines de salariés de cokerie exposés aux HAP, le 6-hydroxy-Chr n'est jamais quantifiable [Campo 2010].

Des études complémentaires sont aujourd'hui nécessaires pour correctement évaluer l'intérêt du dosage des métabolites urinaires du Chr en tant que biomarqueur de dose interne. Les méthodes analytiques nécessitent notamment une amélioration de leur sensibilité.

IV.2.3.5. Suivi de l'exposition au benzo(a)anthracène

Le BaA, HAP à 4 cycles aromatiques possédant une région de baie, est émis sous forme particulaire en faible quantité dans les mélanges atmosphériques. Il est classé cancérogène par l'UE et cancérogène probable par le CIRC [IARC 2010].

Son métabolisme conduit à la formation de 1- et 3-hydroxy-BaA principalement. Gündel *et al.*, ont développé une technique analytique pour le dosage du 3-hydroxy-BaA en HPLC-FLD [Gündel and Angerer 2000]. Les niveaux urinaires de ce métabolite chez des salariés d'une usine de fabrication de pierres réfractaires est d'environ 0,2 µmol/mol [Gündel 2000].

Le 3-hydroxy-BaA pourrait être un bon IBE aux HAP, mais malheureusement, il n'est pas présent dans toutes les sources d'émissions industrielles, notamment dans les émissions diesel ou celles de fonderie.

IV.2.3.6. Suivi de l'exposition au benzo(a)pyrène

Le BaP, HAP à 5 cycles aromatiques et possédant une région de baie, est émis dans l'atmosphère sous forme particulaire. Il est systématiquement présent dans les mélanges, en quantité assez faible et surtout variable en fonction des sources d'émission. Il est classé cancérogène par l'UE et est le seul HAP classé cancérogène certain par le CIRC (groupe 1) [IARC 2010]. La toxicité relative des autres HAP est évaluée en référence à celle du BaP. Le suivi de son exposition est donc pertinent pour l'évaluation du risque cancérogène.

Le métabolisme du BaP est complexe et conduit à la production de nombreux métabolites primaires et secondaires. Certains sont responsables de sa toxicité et d'autres sont des candidats en tant que biomarqueurs de dose interne.

Dans ce travail le choix a été fait de sélectionner un biomarqueur permettant de suivre l'exposition au BaP. Les nombreuses connaissances acquises sur sa toxicocinétique et sa toxicodynamie font donc l'objet du chapitre suivant.

V. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Ce travail a pour objectif de développer l'utilisation d'un biomarqueur permettant d'estimer au mieux l'exposition cancérigène aux HAP en milieu professionnel afin d'être le plus proche possible du risque sanitaire.

La surveillance biologique est préférée au monitoring atmosphérique, puisqu'elle évalue la dose réellement absorbée par l'organisme, en tenant compte de toutes les sources d'exposition aux HAP et également de toutes les voies d'absorption tant respiratoire que cutanée. Le dosage du 1-OHP urinaire n'étant pas lié au risque cancérigène, le suivi de la dose interne de BaP semble plus pertinent, ce dernier étant le seul HAP classé cancérigène certain pour l'homme par le CIRC.

La première partie du travail de thèse a consisté à réaliser une synthèse bibliographique sur le devenir du BaP dans l'organisme et les mécanismes de cancérogenèse dont il est responsable, afin d'évaluer les possibilités de surveillance biologique de son

exposition et de sélectionner un biomarqueur pertinent. Le choix s'est ainsi porté sur le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHBaP), composé majoritaire du métabolisme du BaP.

La deuxième partie de ce travail (publication n°1) a été la mise au point d'une méthode de dosage du 3-OHBaP urinaire. En effet, les techniques de dosage précédemment publiées nécessitaient des modifications pré-analytiques et analytiques, pour pouvoir être suffisamment sensibles tout en étant utilisables en routine par un laboratoire de biologie médicale. L'objectif était d'obtenir une limite de détection (LD) inférieure à 0,1 ng/l afin de pouvoir évaluer les expositions professionnelles des salariés mais également celles de sujets fumeurs en population générale.

La troisième partie de la thèse (publication n°2) a consisté à valider l'utilisation de ce métabolite en tant qu'indicateur biologique d'exposition en milieu industriel et à déterminer précisément le moment de prélèvement de l'échantillon urinaire. L'évaluation des niveaux urinaires de 3-OHBaP chez les salariés engagés dans diverses situations d'exposition au sein de plusieurs secteurs industriels a été réalisée et a été comparée aux concentrations de 1-OHP à différents moments de prélèvement.

Ce travail devrait permettre de faciliter l'utilisation du 3-OHBaP urinaire en tant que biomarqueur d'exposition aux HAP, afin d'améliorer les connaissances relatives au risque sanitaire dont ils sont responsables, ainsi que les moyens de protection de la santé des populations.

CHAPITRE 2 :

LE BENZO(A)PYRENE :

TOXICOCINETIQUE, TOXICODYNAMIE ET CANCEROGENESE

Pour réaliser la SBE des populations au BaP, il est nécessaire de connaître les modalités de son absorption, les mécanismes de sa diffusion dans l'organisme, les voies de sa métabolisation et la cinétique de son élimination. Afin d'évaluer les risques sanitaires, la connaissance de ses mécanismes d'action toxique est également indispensable. Ce chapitre synthétise donc les connaissances scientifiques disponibles sur la toxicocinétique du BaP, sa toxicodynamie et la cancérogénèse chimique dont il est responsable. A la fin de ce chapitre, l'impact du polymorphisme enzymatique sur sa toxicité est également passé en revue.

I. TOXICOCINETIQUE ET TOXICODYNAMIE DU BAP

I.1. Absorption

Les HAP sont des molécules lipophiles. Cette propriété leur permet d'être facilement dissous dans la bicouche lipidique et de traverser les membranes cellulaires par diffusion passive. Ainsi, le BaP est absorbé par les voies respiratoire, digestive et cutanée. Néanmoins, son hydrophobicité ralentit sa diffusion à travers les épithéliums, du fait de la présence d'espaces inter-membranaires aqueux. Ce phénomène a pour conséquence une concentration en BaP plus élevée au niveau du site d'entrée que dans le compartiment sanguin et les tissus éloignés [Gerde 1993c].

I.1.1. Voie respiratoire

Dans l'atmosphère, le BaP est adsorbé sur des particules. Le type de particules est déterminant dans le mécanisme d'absorption respiratoire, puisque leur diamètre aérodynamique définit leur région de dépôt dans les poumons. Les plus grosses ($> 5 \mu\text{m}$) sont facilement impactées au niveau des voies aériennes supérieures alors que les plus fines ($< 1 \mu\text{m}$) peuvent pénétrer jusqu'au poumon profond. Ce dépôt au niveau du poumon profond est prépondérant car plus de la moitié des HAP particuliers retrouvés dans l'atmosphère, est adsorbée sur des particules fines de diamètre inférieur à $0,5 \mu\text{m}$ [Rehwagen 2005].

Après le dépôt des particules au niveau de l'arbre trachéo-bronchique, une partie est éliminée via la clairance muco-ciliaire (d'environ 30 ml de mucus par jour) vers le tube digestif. Les HAP présents à la surface des particules non éliminées, sont absorbés par l'épithélium après leur désorption particulaire. Cette phase de dissolution des HAP dans le parenchyme pulmonaire est une étape préalable à leur absorption et est considérée comme une étape limitante de leur biodisponibilité. L'environnement acide et oxydatif provenant de l'activité macrophagique dans les nodules lymphatiques, semble responsable d'une meilleure désorption du BaP. Près de 6 mois après une déposition de particules dans les poumons de chiens, 40 % et 65 % de la dose de BaP sont toujours présents sous forme particulaire, respectivement dans les nodules lymphatiques trachéo-bronchiques et le poumon périphérique [Gerde 2001].

Après sa désorption des particules, l'absorption du BaP dépendra de la zone de dépôt, car l'anatomie de l'épithélium pulmonaire n'est pas constante des voies aériennes supérieures aux alvéoles (Figure 5). Comme nous l'avons vu, la majorité du BaP est déposée dans le poumon profond et pénétrera donc dans l'organisme au niveau des alvéoles.

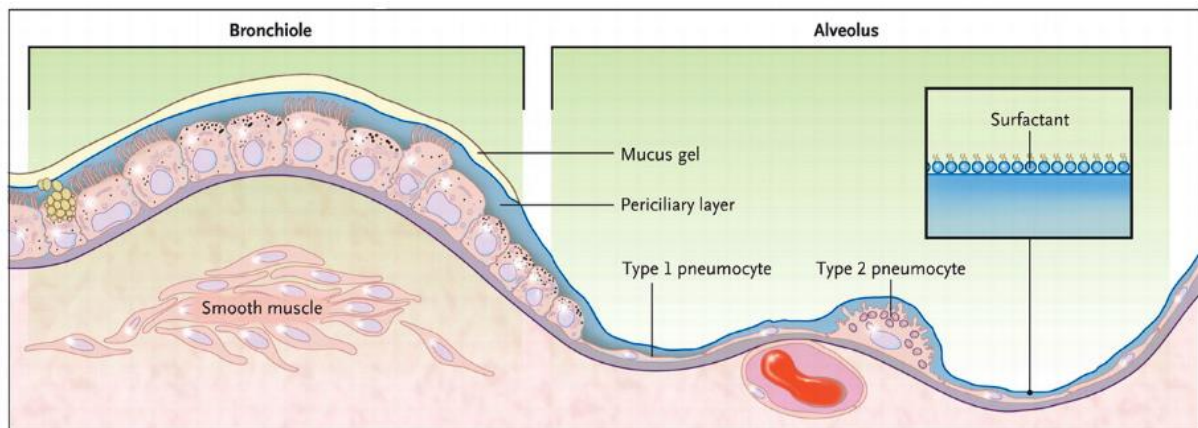


Figure 5 : Schéma des bronchioles et des alvéoles [Fahy and Dickey 2010].

Le BaP traverse facilement la paroi alvéolaire pour rejoindre la circulation générale, alors que l'épaisseur plus importante de l'épithélium des bronches et bronchioles ralentit sa diffusion [Gerde 1993b]. Le BaP est en effet peu mobile dans l'épithélium cellulaire du fait de la présence d'espaces inter-membranaires aqueux, ce qui a comme conséquences sa rétention et l'augmentation de ses concentrations intracellulaires au niveau du site d'entrée (Figure 6). Un phénomène de saturation a été décrit lors de l'augmentation des doses déposées dans le poumon de rats [Ewing 2006].

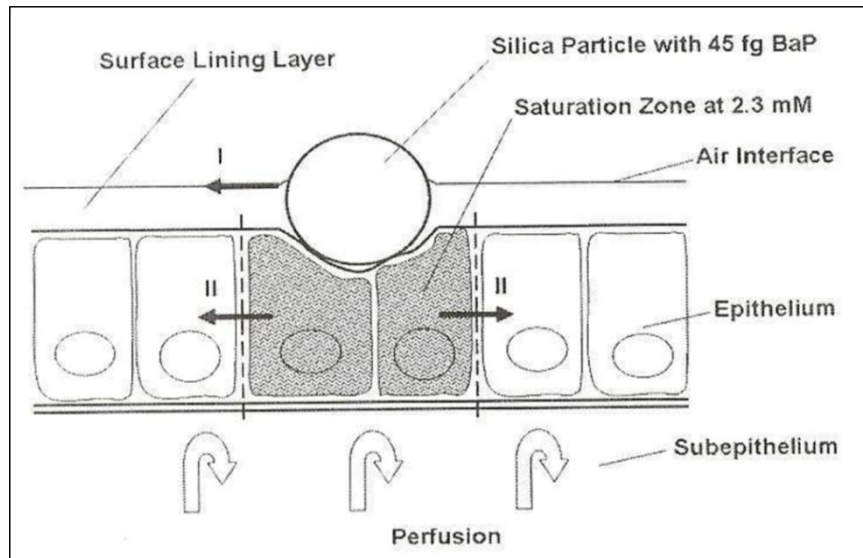


Figure 6 : Accumulation du BaP dans l'épithélium pulmonaire après sa désorption des particules [Ewing 2006]

Ce phénomène de rétention cellulaire est responsable d'une plus grande exposition au BaP des cellules des bronches et bronchioles, où il exercera de façon privilégiée son action toxique [Gerde 1993a] (Figure 7).

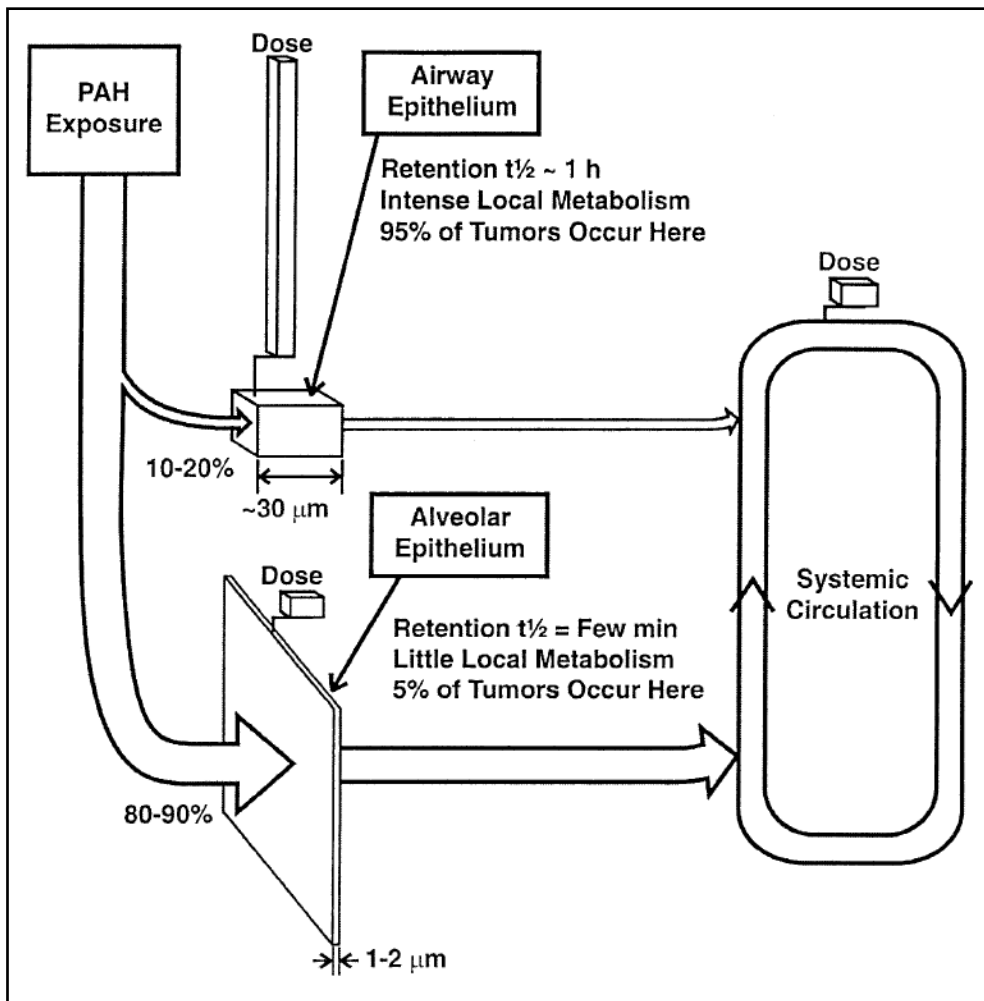


Figure 7 : Schéma de l'absorption respiratoire du BaP [Gerde 2001]

La concentration plasmatique maximum de BaP est atteinte 1 heure après l'exposition de rats à un aérosol de particules de noir de carbone [Ramesh 2001b].

I.1.2. Voie cutanée

L'existence de l'absorption cutanée du BaP a été démontrée dans plusieurs études animales [ATSDR 1995] et celle-ci est facilitée par sa métabolisation *in-situ* [Ng 1992]. Des

différences inter-espèces existent, avec pénétration de moins de 0,5 % de la dose appliquée, après 24 heures pour le tissu cutané de cochon, contre 10 % chez la souris [WHO 1998].

Chez l'homme, il a été estimé que près de 22 % de la dose de BaP déposée chaque jour sur la peau des salariés étaient absorbés [Van Rooij 1994]. Le transport du BaP à travers le tissu cutané humain a également été mis en évidence lors de l'application d'onguents à base de goudrons de houille, pour le traitement local du psoriasis [Godschalk 1998].

Lors de cette absorption, les lipides intracellulaires entourant les kératinocytes de la couche cornée agissent comme un compartiment de stockage du BaP (Figure 8).

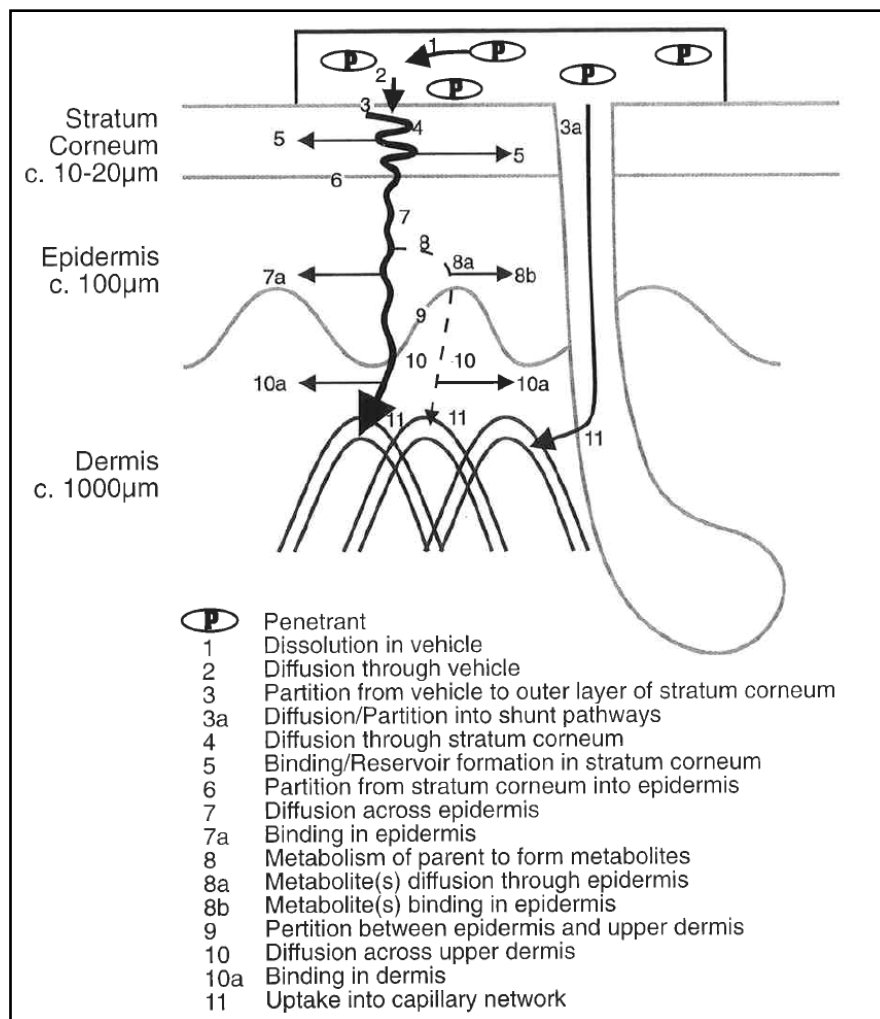


Figure 8 : Schéma de l'absorption cutanée des xénobiotiques
[ECETOC 1993]

Ce phénomène de rétention est observé par l'augmentation des concentrations intra-cutanée de ^{14}C -BaP pendant les 5 premières heures suivant son application sur la peau de rat. Puis, les concentrations restent constantes pendant 24 heures, indiquant un équilibre entre cette pénétration dans le tissu cutané et le flux d'absorption dans l'organisme [Payan 2009]. Chez l'homme, l'absorption cutanée des HAP est également retardée dans le temps par rapport à la voie orale [Viau 1995b].

Mais l'efficacité de cette absorption dépend des sites anatomiques et de l'épaisseur de la couche cornée. Alors que cette dernière limite l'absorption des HAP au niveau des chevilles et des mains, elle est plus perméable au niveau de l'épaule, du front, des avant bras et de l'aîne [Van Rooij 1993a].

I.1.3. Voie digestive

La preuve de l'absorption du BaP par le système digestif humain a été apportée dès 1979 avec la constatation de son absence dans les fèces d'individus ayant consommé de la viande contaminée [Hecht 1979]. Plus tard, il a été montré que la consommation régulière d'aliments riches en HAP était fortement corrélée à l'augmentation de biomarqueurs plasmatiques d'exposition au BaP chez l'Homme [Pavanello 2006].

Cette absorption a lieu dans l'ensemble de l'intestin grêle [Ramesh 2004]. Environ 30 % de la dose ingérée sont absorbés par l'intestin de cochon [Cavret 2003] et c'est également 30 % de la dose qui sont retrouvés dans le sang et la bile après dépôt de BaP dans le duodénum de rats [Foth 1988].

La pénétration du BaP au sein des entérocytes se fait par diffusion passive et est influencée par la sécrétion de bile et par la composition de l'alimentation [Rahman 1986]. En effet, son transport du pôle apical au pôle baso-latéral de ces cellules suit le flux des lipides digérés [Vasiluk 2008] et la consommation d'huile de maïs augmente, chez le rat, sa concentration biliaire [Stavric and Klassen 1994]. Ainsi, la concentration plasmatique maximum de BaP apparaît 6h après la consommation de lait, ce qui correspond à la période d'absorption maximum des lipides [Laurent 2001].

Une fois absorbé, le BaP est distribué dans l'organisme via deux mécanismes distincts [Kim 2012]. Premièrement, rapidement pris en charge par les lipoprotéines, il rejoint directement la circulation générale via le canal thoracique. Ainsi, après instillation de BaP dans l'estomac de brebis, sa concentration plasmatique n'est observable qu'une fois la circulation lymphatique rétablie [Busbee 1990]. Deuxièmement, le BaP est distribué via la veine porte et transite par le foie avant d'être distribué dans tout l'organisme. Le tiers de la dose contenue dans le lait ingéré par le cochon est ainsi retrouvé dans le sang du système porte après 3 à 6 heures [Laurent 2002].

Puisque le rôle des lipides dans l'absorption du BaP est important, l'étude de l'influence de leurs concentrations plasmatiques sur la mesure d'une exposition au BaP par voie alimentaire dans la population générale, apparaît essentielle.

I.2. Distribution

Après leur absorption, la distribution des HAP dans l'organisme est rapide. Le volume de distribution du BaP, calculé après IV chez le rat, atteint 250 ml pour un volume sanguin moyen physiologique de 18 ml [Marie 2010]. Les lipoprotéines, de faible et de haute densité, semblent jouer un rôle important lors de son transport plasmatique et de son internalisation tissulaire [Busbee 1990].

Chez la ratte gravide, le BaP traverse la barrière placentaire et sa concentration dans le sang de cordon atteint 10 % à 50 % de la concentration plasmatique maternelle [Withey 1993].

La distribution du BaP est très importante dans tout l'organisme et l'équilibre entre les concentrations sanguines, hépatiques, dermiques et rénales est atteint dans les 2 heures suivant l'exposition [Marie 2010]. Durant cette période, le poumon va concentrer une quantité importante du BaP de l'organisme. A partir d'un modèle toxicocinétique, Heredia-Ortiz *et al.* ont calculé que les poumons de rats renfermaient 17 % de la dose administrée contre 2,5 % pour le tissu adipeux, 2 heures après une injection IV. De la même façon, Withey *et al.* ont montré que 95 minutes après une exposition de rats par voie respiratoire, les concentrations de BaP dans les différents compartiments s'ordonnaient ainsi : poumon > sang > foie > rein > tissu adipeux. Cette affinité du BaP pour le poumon après injection IV, peut être expliquée par le fait que cet organe est le premier après le cœur à recevoir la totalité du débit cardiaque, ce qui l'expose à l'intégralité de la dose de BaP circulante [Moir 1998]. Il est également admis qu'après une exposition unique, cette dose circulante peut passer de façon répétée à travers le tissu pulmonaire [Foth 1995]. Un phénomène de liaison à des protéines pulmonaires a également été avancé [Heredia-Ortiz 2011]. *In fine*, la demi-vie d'élimination pulmonaire du BaP atteint 31,5 heures après injection IV chez le rat [Marie 2010].

Du fait de sa lipophilie, le BaP a tendance à se stocker dans les adipocytes, mais la faible perfusion sanguine du tissu adipeux retarde ce stockage. Ce n'est que 6 heures après une exposition par voie respiratoire, que le tissu adipeux de rats renferme la majorité du BaP de l'organisme, suivi des poumons, des reins, du foie et du tissu sanguin [Withey 1993].

Des niveaux élevés de BaP ont également été retrouvés dans l'intestin après injection IV, expliqués par l'excrétion hépatobiliaire du BaP et l'existence d'un cycle entéro-hépatique [IARC 2010,WHO 1998].

Malgré cette importante distribution du BaP dans les différents compartiments de l'organisme, la diminution de ses concentrations plasmatiques pendant les premières heures suivant l'exposition est principalement due à son métabolisme hépatique lors d'une injection IV chez le rat [Heredia-Ortiz 2011].

I.3. Métabolisation

Le BaP possède un métabolisme complexe qui prend place au sein de la plupart des tissus de l'organisme.

Dans le poumon, les cellules de Clara et les pneumocytes de type 2 sont responsables de ce métabolisme (effet de premier passage pulmonaire) [Cohen 1990, Foth 1995]. Ce phénomène est particulièrement important dans le cas d'une exposition par voie respiratoire, du fait de la rétention du BaP dans les cellules épithéliales pulmonaires après sa désorption particulaire.

Au niveau cutané, la métabolisation du BaP facilite son absorption (effet de premier passage cutané). *In-vitro*, il est plus intensément métabolisé par le tissu humain que par celui de rats [Payan 2009]. La génération de métabolite du BaP par un modèle *ex-vivo* de peau de cochon après application de ^{14}C -BaP est importante mais plus faible que pour les microsomes hépatiques [Jacques 2010b].

Dans le cas d'une exposition par voie digestive, le foie joue un rôle métabolique important, puisqu'après avoir traversé la membrane intestinale, une partie du BaP est transportée jusqu'aux hépatocytes par la veine porte (effet de premier passage hépatique). Les

cellules intestinales et la microflore bactérienne participent également à ce métabolisme digestif [Ramesh 2004].

Cette étape de métabolisation du BaP aboutit à la production d'un très grand nombre de métabolites. De façon schématique, le BaP est oxydé une première fois pour former des métabolites dits primaires, qui sont oxydés à leur tour pour former des métabolites dits secondaires (Figure 9).

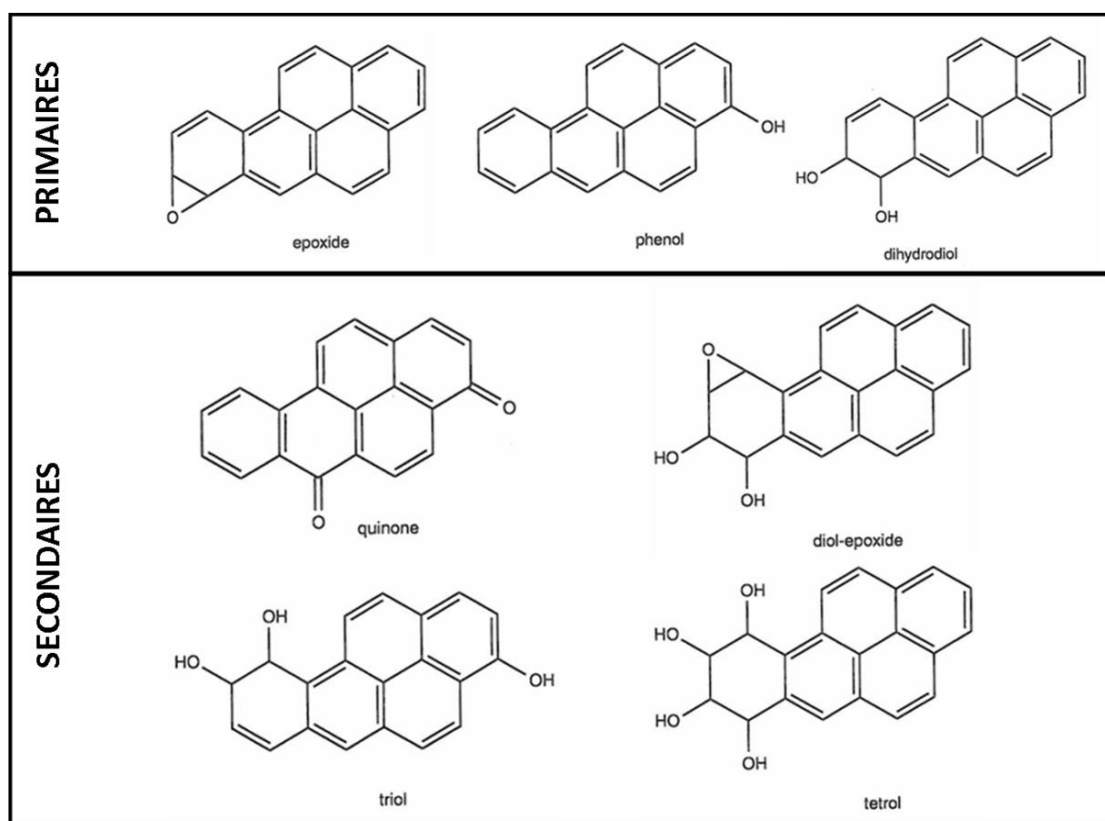


Figure 9 : Exemples de métabolites primaires et secondaires du BaP

Ces métabolites primaires et secondaires, issus de la phase de fonctionnalisation (phase I), sont moins lipophiles que le BaP. Ils traversent donc plus difficilement la

membrane lipidique, ce qui peut être un danger pour la cellule. En effet, leur formation produit des d'intermédiaires métaboliques très réactifs, à l'origine de la toxicité du BaP [Xue and Warshawsky 2005]. La phase de conjugaison (phase II) bloque cette toxicité et permet ainsi aux métabolites d'être activement éliminés de la cellule (phase III) et de l'organisme. En revanche, lorsque sa métabolisation s'opère au niveau du site d'entrée du BaP, elle lui permet de diffuser plus facilement à travers les membranes cellulaires des épithéliums et facilite donc son absorption et sa distribution.

I.3.1. Phase I : fonctionnalisation du BaP

Le BaP est initialement oxydé par les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP) du réticulum endoplasmique. Les isoformes 1A1 et 1B1 sont les plus efficaces pour catalyser cette réaction [IARC 2010]. Les isoformes 3A4 et 1A2 sont également capables de métaboliser le BaP et dans une moindre mesure, les isoformes 2C8 et 2E1 [Bauer 1995, Yun 1992]. Ces enzymes sont présentes dans de très nombreux tissus de l'organisme : foie, rein, poumon, intestin, cerveau, rate, cœur, placenta, testicule, ovaire, glande mammaire,... Certaines peroxydases, comme la prostaglandine H synthase, sont aussi capables d'oxyder le BaP [IARC 2012].

La fonctionnalisation du BaP peut être organisée en quatre voies plus ou moins distinctes aboutissant à la formation d'un radical cation, de différents métabolites hydroxylés, d'une ortho-quinone et de plusieurs diol-époxydes.

- **Voie du radical cation (Figure 10)**

La première réaction enzymatique sur le squelette carboné du BaP, peut être une peroxydation conduisant à la production d'un radical cation. Son hydrolyse spontanée aboutit à la formation du 6-OHBaP. Ce dernier peut être spontanément oxydé, ou bien métabolisé par les CYP ou la prostaglandine H synthase, en quinones : BaP-1,6-, 3,6-, et 6,12-diones. Ces métabolites subissent ensuite l'action de la NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO1) pour former des hydroquinones. Un dérivé dicarboxylique est également produit de façon importante après l'ouverture d'un des cycles aromatiques de la 1,6-dione ou de la 3,6-dione, lors d'une exposition intrapéritonéale (IP) de rats au ^{14}C -BaP [Yang 2000].

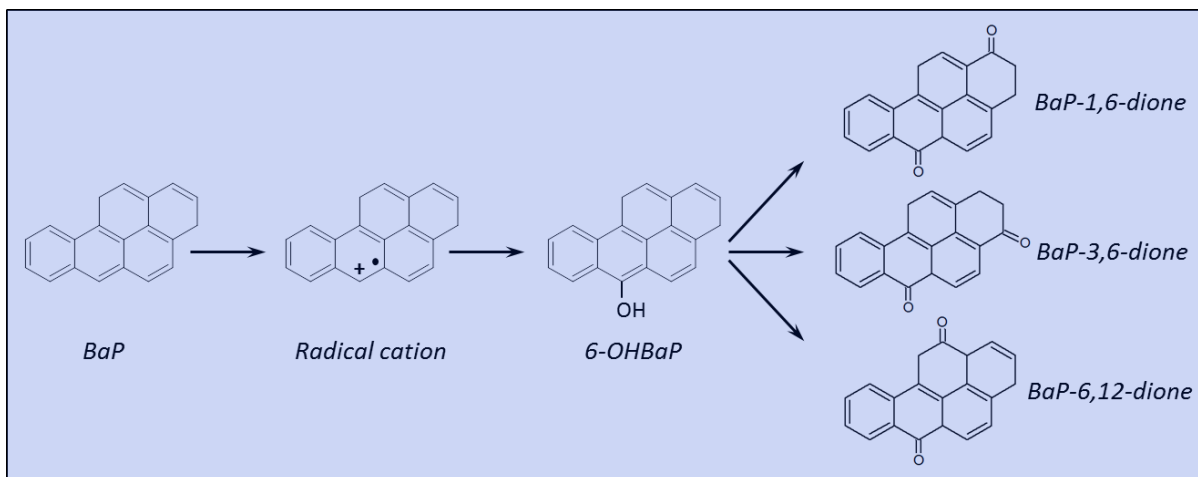


Figure 10 : Fonctionnalisation du BaP via le radical cation

- **Voie des métabolites hydroxylés (Figure 12)**

Le BaP peut également subir une mono-oxygénation produisant des arènes oxydes (ou époxydes). Cette dernière réaction est régiosélective, elle ne peut prendre place qu'entre les carbones numérotés 1,2- ; 2,3- ; 4,5- ; 7,8- et 9,10-du BaP [Harvey 1981].

Le devenir de ces époxydes dépend de leur stabilité. Ceux formés au niveau de la « région M » du BaP sont les plus instables et sont spontanément hydrolysés en phénols. C'est le cas du BaP-1,2-époxyde qui se réarrange en 1-hydroxybenzo(a)pyrène et du BaP-2,3-époxyde qui s'hydrolyse en 3-OHBaP (Figure 11).

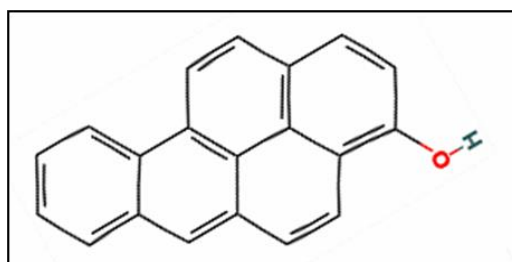


Figure 11 : Structure chimique du 3-OHBaP

Les époxydes ayant une stabilité suffisante peuvent être pris en charge par les époxydes hydrolases microsomiales (EH) pour subir une réaction d'hydratation qui aboutit à la formation de trans-dihydrodiols. C'est le cas des époxydes proches de la région de baie du BaP. Ainsi, le BaP-7,8-époxyde est spontanément hydrolysé en 7-OHBaP mais également hydraté en BaP-7,8-dihydrodiol. De la même façon, une partie du BaP-9,10-époxyde est hydrolysé en 9-OHBaP et une autre partie est hydratée en BaP-9,10-dihydrodiol. Le BaP-4,5-époxyde (région K du BaP) est encore plus stable et ne forme aucun métabolite mono-

hydroxylé. Il est intégralement pris en charge par les époxydes hydrolases et métabolisé en BaP-4,5-dihydrodiol.

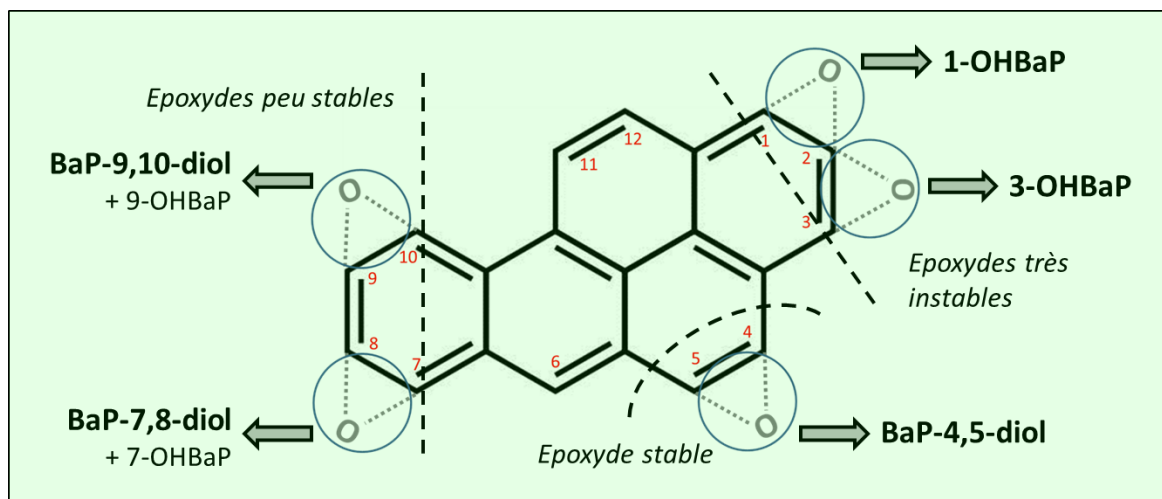


Figure 12 : Fonctionnalisation du BaP en métabolites hydroxylés

- **Voie de l'o-quinone (Figure 13)**

Par l'action de la dihydrodiol déshydrogénase, enzyme appartenant à la superfamille des aldo-kéto réductases (AKR), les trans-dihydrodiols proches de la région de baie du BaP peuvent donner un catéchol puis une ortho-quinone : la BaP-7,8-dione (BaP-o-quinone).

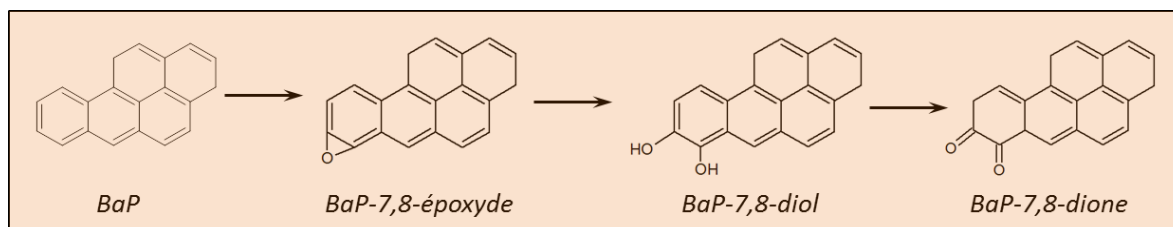


Figure 13 : Fonctionnalisation du BaP en BaP-7,8-dione (BaP-o-quinone)

- **Voie des diol-époxydes (Figure 14)**

Les trans-dihydrodiols proches de la région de baie peuvent également être une nouvelle fois oxydés par les CYP, ou les radicaux peroxydes générés par l'activité peroxydase de la prostaglandine H synthase. Comme précédemment, les arènes oxydes les moins stables issus de cette réaction sont spontanément hydrolysés en phénols, aboutissant à la formation de monohydroxy-dihydrodiols (triols). Quant aux plus stables, ils ne sont pas hydrolysés et forment les dihydrodiols-époxydes (diol-époxydes). Ainsi, le BaP-9,10-dihydrodiol est majoritairement transformé en BaP-1-hydroxy-9,10-dihydrodiol et dans une moindre mesure en BaP-9,10-diol-7,8-époxyde (rev-BPDE), tandis que le BaP-7,8-dihydrodiol est principalement métabolisé en BaP-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE).

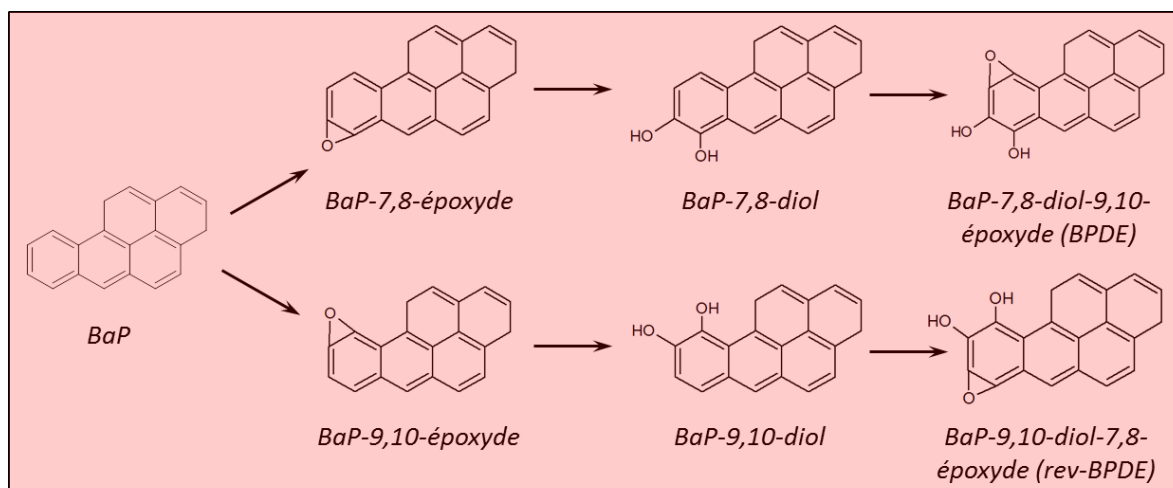


Figure 14 : Fonctionnalisation du BaP en diol-époxydes (BPDE et rev-BPDE)

Pour finir, la majorité du BPDE et du rev-BPDE est hydrolysée pour former le 7,8,9,10-tetrahydroxy-tetrahydrobenzo(a)pyrène (BaP-7,8,9,10-tétraol) [Simpson 2000]. Cette réaction n'est pas nécessairement médiée par une enzyme et peut être spontanée, à partir de l'attaque de l'eau présente dans la média [Yang 1976].

- **Bilan de la fonctionnalisation**

Cette première étape du métabolisme complexe du BaP aboutit à la formation prédominante de quinones indifférenciées et de 3-OHBaP, dans les microsomes humains de foie, de reins et de poumons en culture [Prough 1979]. Le métabolite majoritairement produit *in-vitro* par les cellules pulmonaires H358 humaines est également le 3-OHBaP [Jiang 2007].

Chez le rat, le 3-OHBaP contenu dans le sang, les tissus et les excréta correspond à 19 % de la dose de BaP administrée par voie IV [Marie 2010]. La concentration urinaire de ce métabolite est supérieure à celle du 9-OHBaP, du BaP-4,5-diol et du BaP-9,10-diol [Bouchard and Viau 1997]. Par contre, le BaP-7,8-diol est le métabolite majoritairement retrouvé dans les fèces de singes exposés au BaP par voie IP [Likhachev 1992]. Les dihydrodiols sont également les métabolites majoritairement retrouvés dans le plasma et les poumons de rats exposés par voie respiratoire [Ramesh 2001b]. L'exposition à des mélanges complexes d'HAP peut modifier la proportion de ces différents métabolites, notamment par des effets d'induction enzymatique mais également d'inhibition ou de compétition.

- **Problématique des énantiomères**

Au sein du métabolisme du BaP, du fait de la création de carbones chiraux durant les réactions enzymatiques, les métabolites ont de multiples formes énantiomériques. Concernant les arènes oxydes, pour chaque isomère formé, l'énantiomère dextrogyre (+) est majoritaire devant le lévogyre (-) [Shimada 2006].

De plus, l'activité des époxydes hydrolases est stéréospécifique conduisant à la formation de différents stéréo-isomères [Gelboin 1980]. A partir du BaP-7,8-époxyde de configuration absolue 7R,8S (énantiomère dextrogyre) seul le BaP-7,8-dihydrodiol de configuration absolue 7R,8R (énantiomère lévogyre) est produit. *In fine*, plus de 90 % des BaP-4,5-, 7,8- et 9,10-dihydrodiols formés dans les microsomes de foie de rats sont les énantiomères R,R.

A partir du mélange racémique de BaP-7,8-dihydrodiol, deux diastéréoisomères du BPDE sont produits : anti-BPDE et syn-BPDE. Chacun des deux diastéréoisomères du BPDE peuvent être sous la forme de deux énantiomères optiquement actifs (+) ou (-). Néanmoins, la formation des diol-époxydes est stéréosélective [Conney 1982]. Ainsi, ce sont les diastéréoisomères (+)-anti-BPDE (BaP-7R,8S-diol-9S,10R-époxyde) et (+)-syn-BPDE (BaP-7S,8R-diol-9S,10R-époxyde) qui sont principalement formés dans les microsomes de foie de rats [Peltonen and Dipple 1995] (Figure 15).

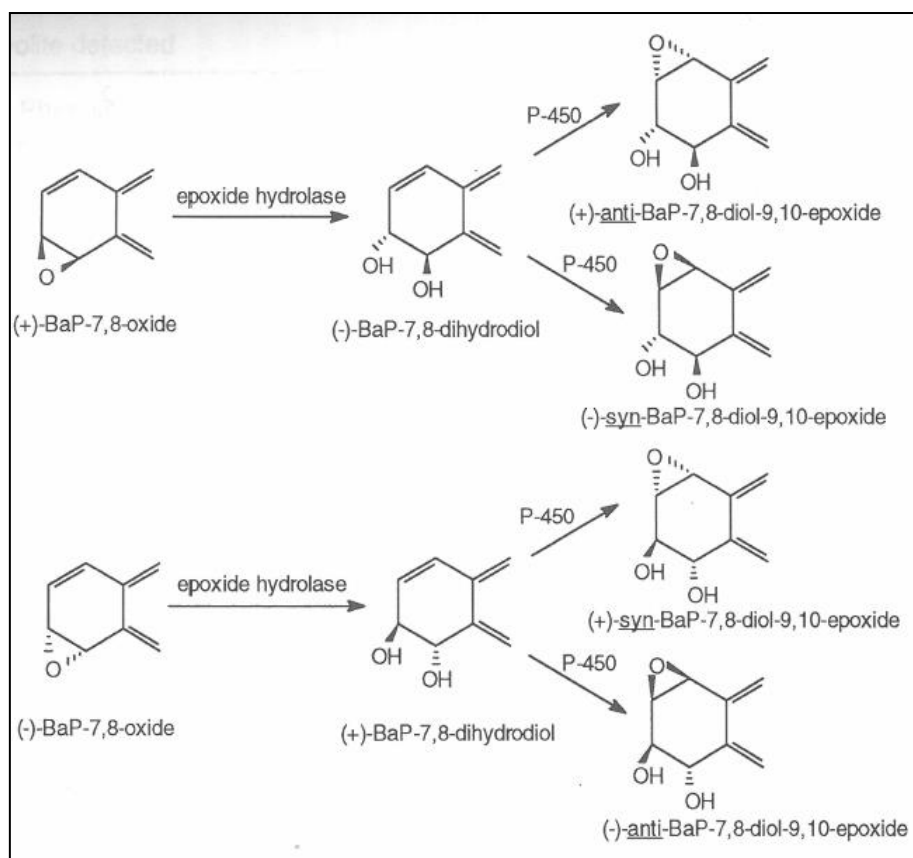


Figure 15 : Diastéréoisomères du BPDE [WHO 1998]

Enfin, l'hydrolyse des diols-époxydes n'est pas stéréospécifique et l'ouverture de la liaison époxyde peut se faire en *trans* ou en *cis*. Du fait des différentes possibilités de rupture du pont époxy et de l'existence de différents isomères du BPDE et du rev-BPDE, ce sont 12 énantiomères du BaP-7,8,9,10-tétraol qui pourront être produits à partir des ($\pm$)BaP-7,8-dihydrodiol et ($\pm$)BaP-9,10-dihydrodiol.

I.3.2. Toxicité des métabolites actifs

Les HAP possèdent une structure aromatique plane nécessitant une transformation chimique pour exercer leur toxicité [Xue and Warshawsky 2005]. Les réactions d'oxydation enzymatique, prenant place lors du métabolisme du BaP décrit précédemment, produisent différents composés électrophiles. Leur génération dans le milieu intracellulaire leur confère un fort pouvoir toxique [Melikian 1987]. En effet, si ces intermédiaires réactifs ne sont pas spontanément hydrolysés ou conjugués, ils peuvent réagir avec les macromolécules cellulaires et plus particulièrement former des liaisons covalentes avec l'ADN. Ils sont également générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) génotoxiques. Cette agression chimique de l'ADN est à la base du processus de cancérogénèse du BaP. On parle d'activation métabolique, les métabolites produits étant plus toxiques que le composé parent dont ils sont issus. Le BaP est donc considéré comme un pro-cancérogène. Trois voies principales d'activation métabolique coexistent pour expliquer sa génotoxicité : la production du BPDE, du radical cation et de la BaP-o-quinone (Figure 16).

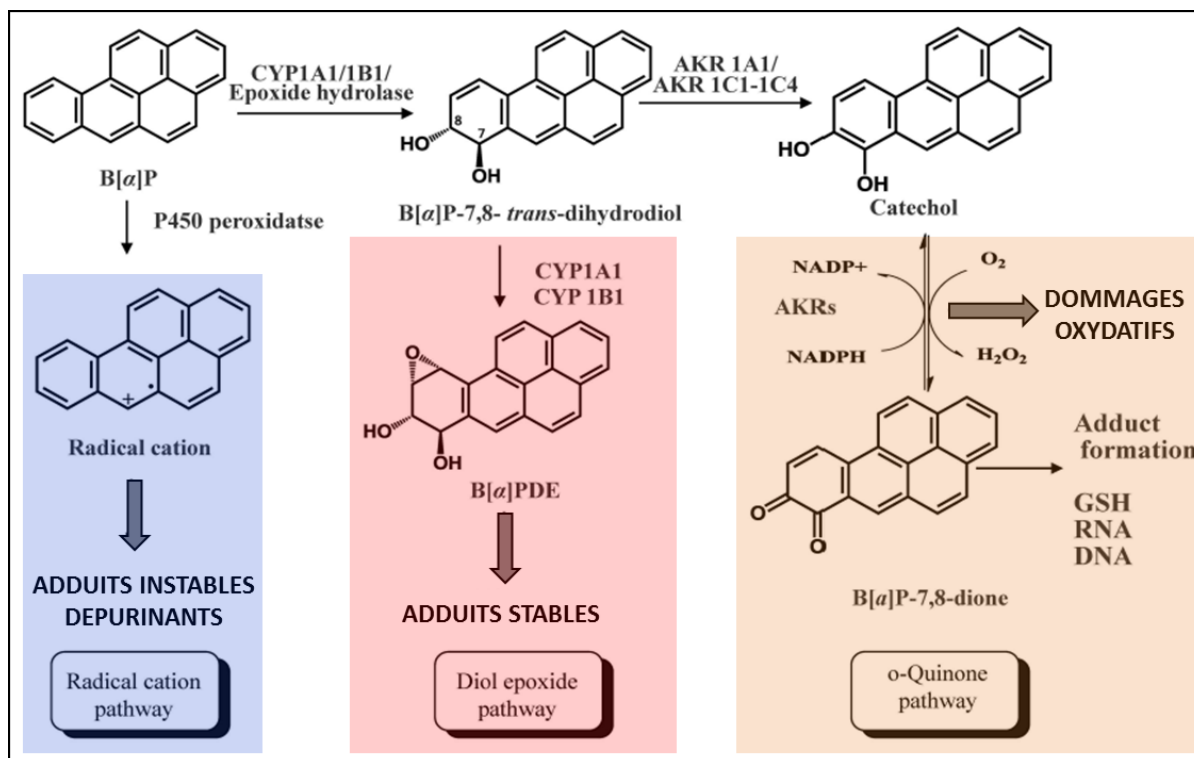


Figure 16 : Voies principales d'activation métabolique du BaP [Zhang 2012b]

In-vitro, ces trois voies toxiques contribuent de façon égale à l'activation métabolique du BaP au niveau des cellules broncho-alvéolaires humaines [Lu 2011].

I.3.2.1. Voie toxique du radical cation

Le mécanisme chimique de cette voie est basé sur l'arrachement d'un électron au système de liaisons π du BaP via une oxydation mono-électronique par les activités peroxydases des CYP. Elle conduit à la formation de radicaux cations électrophiles en C6 permettant là aussi la formation d'adduits à l'ADN. Contrairement au BPDE, le radical cation du BaP est une espèce chimique très instable, il ne pourra exercer sa toxicité que s'il est produit dans le noyau cellulaire, à proximité de l'ADN [IARC 2010].

Les liaisons covalentes issues de cette voie sont majoritairement des adduits instables de la guanine et de l'adénine générant des sites apuriques : BaP-C8-Gua, BaP-N7-Gua et BaP-N7-Ade (Figure 17).

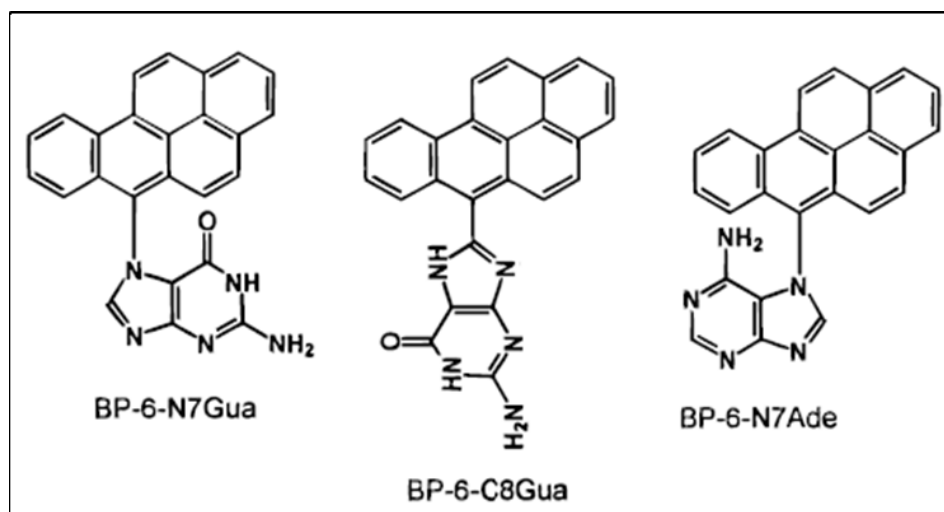


Figure 17 : Adduits de l'ADN majoritaires issus du radical cation du BaP
[Chen 1996]

La formation de ces adduits dépurinants semble être une voie majeure de l'action génotoxique du BaP. En effet, ce type de lésion à l'ADN est majoritaire devant les adduits stables, lors d'une exposition *in-vitro* de microsomes de foie de rats [Devanesan 1992], mais également lors de l'application *in-vivo* de BaP sur la peau de souris [Chen 1996].

I.3.2.2. Voie toxique de l'ortho-quinone du BaP

In-vitro, le C10 de la BaP-o-quinone se lie à l'ADN pour former un adduit instable à l'atome N7 de la guanine, produisant un site apurinique [McCoull 1999]. Ce métabolite est également capable de former des adduits stables à la guanine et à l'adénine dans les cellules pulmonaires humaines [Huang 2013].

Néanmoins, l'action toxique majeure de cette voie est essentiellement de type oxydatif, par le biais de la génération d'ERO lors de l'oxydation du catéchol du BaP en BaP-o-quinone [Park 2008]. Les enzymes AKR catalysent cette réaction dans les deux sens entraînant un cycle pathogène de production d'ERO [Zhang 2012b]. Cette toxicité redox est supérieure à celles de la BaP-1,6-dione et de la BaP-3,6-dione produites également lors du métabolisme du BaP [Sen 2012]. La première oxydation crée un anion o-semi-quinone et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) suivi par une deuxième oxydation qui forme la BaP-o-quinone et un anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).

Vis-à-vis de l'ADN, ces espèces réactives conduisent à la formation de bases oxydées. Les ERO peuvent également réagir avec le 2'-désoxyribose et entraîner des cassures de brins d'ADN. *In-vitro*, la BaP-o-quinone est responsable de l'apparition de sites abasiques provenant de lésions de l'ADN de type oxydatif, et d'une augmentation de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires.

I.3.2.3. Voie toxique du BPDE

La formation d'adduits entre l'ADN et le BPDE, via sa fonction époxyde, est la voie d'activation métabolique du BaP la plus connue. La proximité entre la région de baie et la fonction époxyde permet sa stabilité chimique et crée une gêne stérique empêchant sa conjugaison au GSH, ou son hydrolyse par les EH. En revanche, le rev-BPDE dont la fonction époxyde est opposée à la région de baie, est hydrolysé rapidement avant qu'il ne puisse interagir avec les macromolécules cellulaires.

La fonction époxyde du BPDE se lie principalement avec les groupes amino exocycliques des bases puriques de l'ADN : 2'-désoxyguanosine et 2'-désoxyadénosine [Dipple 1994], pour former des adduits stables. La liaison covalente peut se faire en *trans* ou en *cis*, en fonction de l'ouverture de la fonction époxyde. Pour chaque adduit, il existe donc 8 configurations possibles (4 paires d'énantiomères) à partir des 4 diastéréoisomères du BPDE. Néanmoins, le (+)-anti-BPDE est le plus apte à former des adduits à l'ADN devant son énantiomère (-)-anti-BPDE et ses diastéréoisomères (±)-syn-BPDE [Harvey 1981]. *In-vivo*, le (+)-anti-BPDE est également le plus tumorigène pour les poumons de souris nouveau-nés [Conney 1982]. De plus, la formation des adduits se fait majoritairement par *trans*-addition [Peltonen and Dipple 1995]. Au final, l'adduit stable majoritaire issu du BPDE est le 10-(guanine-2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrène (BPDE-N2-dGuo) (Figure 18).

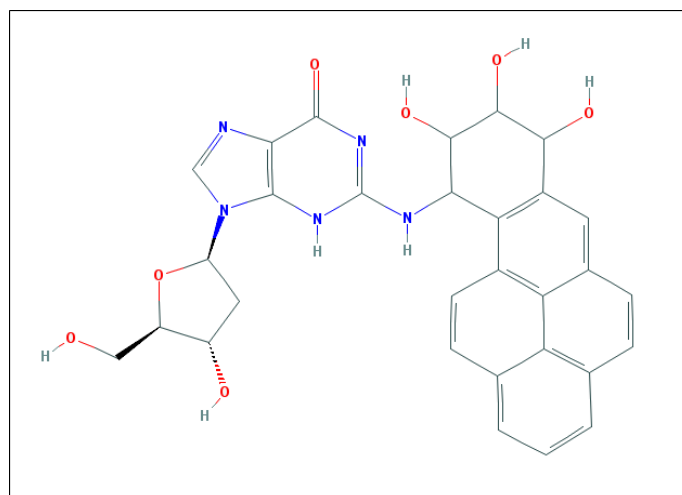


Figure 18 : Structure chimique du BPDE-N2-dGuo

Ces adduits ont une stabilité chimique élevée mais celle-ci dépend de leur lieu de formation et du type d'exposition. Après une unique injection IP de BaP à des rats, leur demi-vie est de 22 jours dans le poumon, 17 jours dans les lymphocytes périphériques et 15 jours dans le foie [Ross 1990]. Après des injections IP répétées, leur demi-vie atteint 127 jours dans les lymphocytes périphériques, 106 jours dans le poumon et 31 jours dans le foie [Qu and Stacey 1996].

Dans une moindre mesure, des adduits instables sont également formés entre le BPDE et la guanine, débouchant à la création d'un site abasique par la coupure de la liaison N-glycosidique et la perte de la base purique.

I.3.3. Phase II et III : conjugaison et efflux des métabolites

Les mécanismes d'activation métabolique décrits précédemment constituent la voie toxique du BaP. Ils sont minoritaires devant les mécanismes de détoxification comprenant la

conjugaison et l'efflux des métabolites. Ainsi, moins de 20 % des métabolites du BaP sont éliminés sans conjugaison dans les urines de rat, après exposition IP au composé parent [Yang 1994].

Les métabolites les plus électrophiles, produits pendant la phase de fonctionnalisation du BaP, sont rapidement conjugués au glutathion (GSH), soit spontanément, soit par l'intermédiaire des glutathion-S-transférases de type GSTM1, GSTA1 et GSTP1, puis dégradés en acides mercapturiques [ATSDR 1995]. C'est le cas des arènes oxydes et des diols-époxydes stables du BaP. Le dérivé tetrahydro-trihydroxy-BaP-7-S-N-acétylcystéine (BaP-7-NAc) est l'acide mercapturique majoritaire retrouvé chez le rat après une injection IP [Yang 1998]. Il est intéressant de noter que dans les hépatocytes humains, le rev-BPDE est conjugué au GSH contrairement au BPDE, indiquant que la stéréochimie des métabolites a une importance majeure dans cette réaction enzymatique [Upadhyaya 2010]. Les quinones du BaP sont également concernées par cette voie de détoxification. Ainsi, *in-vitro*, l'exposition de différentes lignées de cellules pulmonaires humaines à la BaP-o-quinone conduit à la formation de conjugués au GSH et d'acides mercapturiques [Huang 2012b] et une déplétion intracellulaire en GSH peut être observée lors de ce traitement [Park 2008].

Les phénols, trans-dihydrodiols et quinones issus du métabolisme du BaP sont également conjugués à l'acide glucuronique par l'action des UDP-glucuronyltransférases (UGT) de type 2B7, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10 [IARC 2010]. *Ex-vivo*, la glucuronidation des 3-, 7-, 9-OHBaP et du BaP-7,8-diol a lieu dans le tissu humain des voies aérodigestives, qui sont physiologiquement un des sites d'entrée du BaP dans l'organisme [Zheng 2002].

Les sulfotransférases de type 1A1, 1A2, 1A3 et 1E1 sont également capables de conjuguer les métabolites du BaP à un groupement sulfate [Gelboin 1980]. L'isoforme 1A1

est le plus important pour la conjugaison du 7,8-catéchol du BaP, dans les cellules pulmonaires humaines [Zhang 2012a].

Enfin, des métabolites éliminés après une double conjugaison di-glucuronique, di-sulfate ou glucurono-sulfate, ont été observés dans les urines de rats exposés au ^{14}C -BaP par voie IP [Yang 1999].

Environ 50 % de la dose de ^{14}C -BaP appliqué *ex-vivo* sur la peau de cochon sont conjugués à l'acide glucuronique contre 5 % au groupement sulfate [Jacques 2010a].

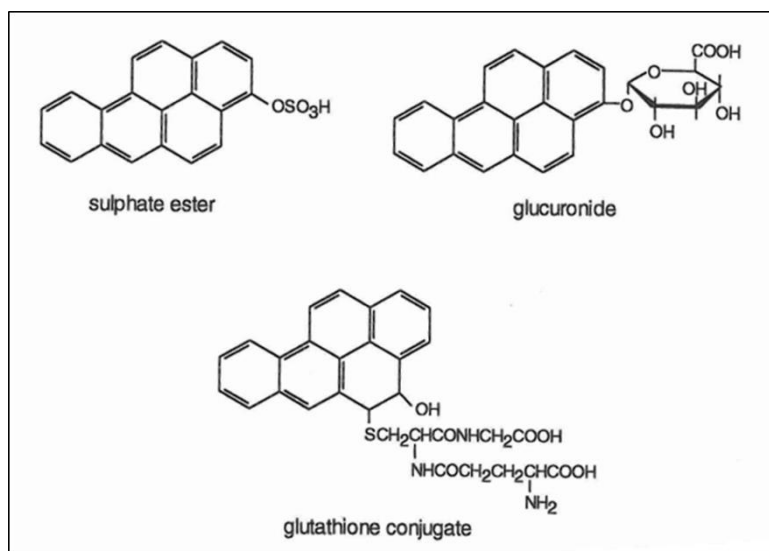


Figure 19 : Exemples de métabolites conjugués du BaP [WHO 1998]

Ces métabolites conjugués sont trop hydrophiles pour traverser passivement les membranes cellulaires. Ils nécessitent d'être activement transportés dans le milieu extracellulaire, sans quoi leur accumulation serait néfaste pour la cellule. Ce transport est assuré par les protéines transmembranaires ATP Binding Cassette (transporteurs ABC) via

l'utilisation d'ATP. *In-vitro*, la protéine ABCG2 (ou BCRP) transporte le BaP-3-glucuronide et le BaP-3-sulfate à travers le pôle apical de la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2, contrairement aux protéines ABCB1 (ou P-gp) et ABCC2 (ou MRP2) [Ebert 2005]. En revanche, la protéine MRP2 est capable d'extraire le conjugué du BPDE au GSH des cellules épithéliales de rein canines [Srivastava 2002]. La protéine ABCC4 (ou MRP4) présente dans la membrane des cellules broncho-alvéolaires H358 est quant à elle capable de transporter hors de la cellule le métabolite non conjugué (-)BaP-7,8-dihydrodiol, avant son oxydation éventuelle en BPDE ou en o-quinone [Gelhaus 2012].

Bien que complexe, la cascade de réactions enzymatiques commençant par la fonctionnalisation du BaP jusqu'à l'élimination de ses métabolites conjugués du milieu intracellulaire se déroule très rapidement. En effet, chez le rat, la cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP et du BaP-4,5-diol est la même lors de l'injection IV de BaP ou de ces métabolites [Bouchard and Viau 1996]. Chez l'homme, les métabolites du Phe, HAP dont le métabolisme est très proche de celui du BaP, sont observés dans le plasma 15 à 30 minutes après consommation d'une cigarette [Zhong 2011b].

Après être sortis du milieu intracellulaire, ces métabolites sont à nouveau distribués dans tout l'organisme, notamment dans les bronches, le poumon profond, le colon, le foie, les lymphocytes et la peau [WHO 1998]. Ramesh *et al.* observent une distribution importante de ces métabolites dans les organes reproductifs du rat après absorption digestive [Ramesh 2001a]. Lors d'une injection IV de BaP à des rats, le 3-OHBaP a un temps de résidence moyen dans l'organisme de 17,2 heures contre 10,2 heures pour le composé parent [Marie 2010].

Un schéma résumant les étapes du métabolisme du BaP est présenté en Figure 20.

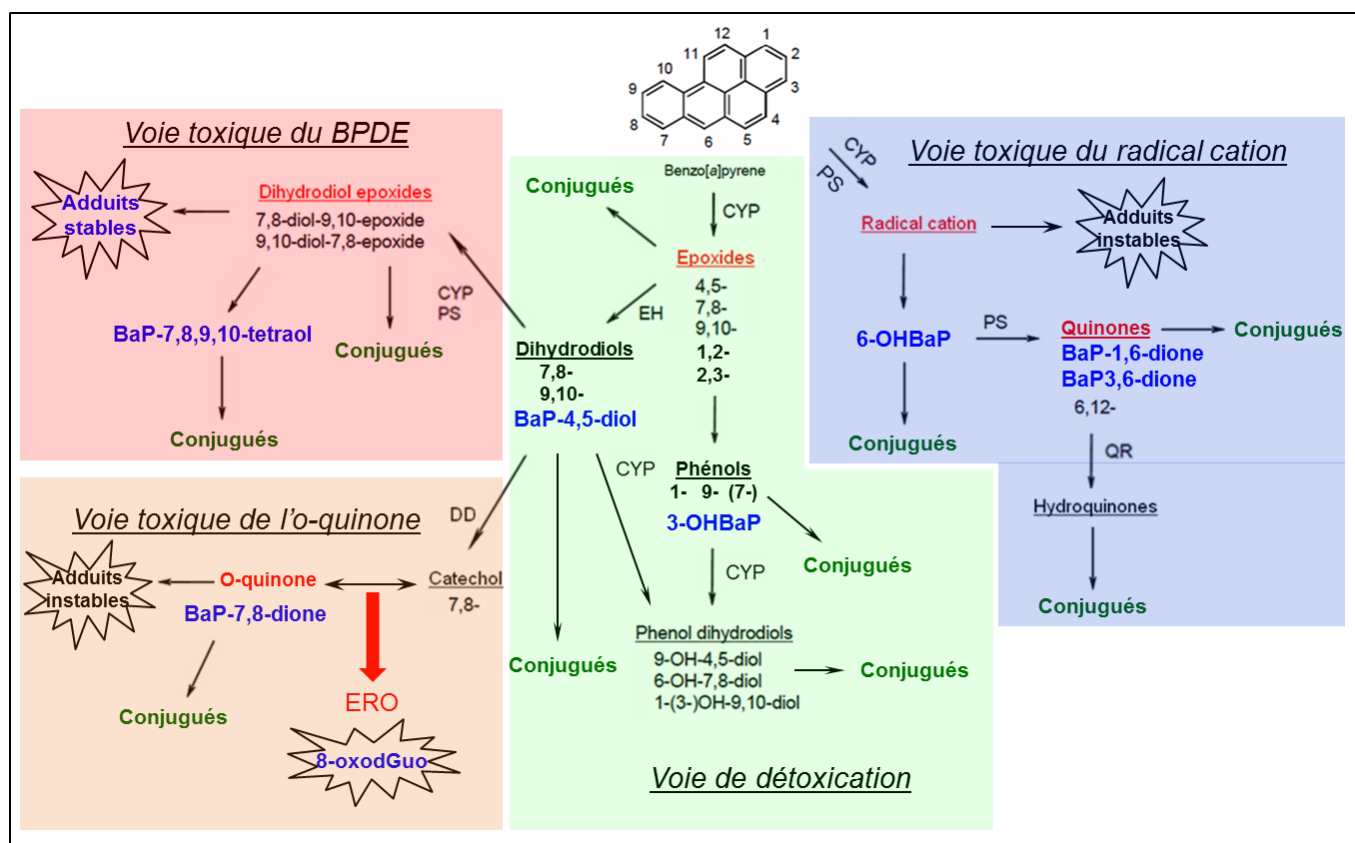


Figure 20 : Synthèse du métabolisme du BaP (en rouge les intermédiaires réactifs, en vert les métabolites conjugués et en bleu les marqueurs potentiels des différentes voies de métabolisation). CYP : cytochrome P 450 ; PS : prostaglandine synthase ; EH : époxyde hydrolase ; DD : dihydrodiol déshydrogénase ; QR : quinone réductase ; ERO : espèces réactives de l'oxygène

I.4. Elimination

L'élimination fécale du BaP et de ses métabolites est plus importante que leur excrétion urinaire, quelle que soit la voie d'exposition, même si ces composés ont tendance à persister dans le tube digestif du fait du cycle entéro-hépatique [WHO 1998]. En effet, les études animales montrent que 24 % de la dose de BaP radiomarké sont présents dans la bile

8 heures après une administration IP [Kim 2012] et que plus de 50 % sont retrouvés dans les fèces, 32 heures après une injection IV [Moir 1998]. La radioactivité cumulée éliminée en 7 jours dans les fèces atteint 80 % [Yang 1994] contre 9 % dans les urines, après administration IP de ^{14}C -BaP à des rats [Yang 1999]. Après inhalation, 96 % de la dose de ^{14}C -BaP sont également retrouvés dans les fèces de rats exposés [ATSDR 1995]. A partir d'une modélisation toxicocinétique, Heredia-Ortiz *et al.* ont estimé que l'élimination du 3-OHBaP par le tractus gastro-intestinal correspondait à 63 % de sa clairance plasmatique [Heredia-Ortiz 2011].

La très grande majorité du BaP est éliminée de l'organisme après métabolisation et conjugaison. Seulement 0,4 % de la dose de BaP administrée en IV à des rats sont éliminés en 72 heures dans les fèces sous forme inchangée [Marie 2010] contre 13 % pour le 3-OHBaP [Heredia-Ortiz 2011]. Des valeurs très proches sont obtenues par voie IP, avec 3 à 14 % du BaP éliminés dans les fèces sous forme de 3-OHBaP [Tzekova 2004]. L'élimination de 45 % du BaP sous sa forme parente, 24 heures après son ingestion par des rats, rapportée dans une étude, pourrait s'expliquer par les très fortes doses utilisées responsables d'une saturation de l'absorption intestinale du BaP [Ramesh 2001a].

Dans les urines, plus de 80 % de la radioactivité urinaire retrouvée après administration IP de ^{14}C -BaP à des rats correspondent là encore aux métabolites conjugués [Yang 1994]. Environ 50 % de cette radioactivité sont issus de la somme des glucurono-conjugués et des acides mercapturiques, et 17 % aux métabolites sulfo-conjugués du BaP [Yang 1999]. Dans une autre étude, il est montré que les métabolites majoritaires étaient les dérivés glucurono-conjugués, devant les sulfo-conjugués et les dérivés du GSH [Ramesh 2001a].

Quelle que soit la voie d'absorption, le 3-OHBaP est un métabolite urinaire majoritaire. Sa concentration atteint 0,1 % de la dose de BaP, devant le BaP-4,5-diol (0,09 %), le 9-OHBaP (0,002 %) et le BaP-9,10-diol (0,0001 %), 96 heures après administration IV chez le rat [Bouchard and Viau 1996]. Après une exposition orale ou cutanée, sa concentration urinaire est également plus importante que celles du BaP-4,5-diol ou du 9-OHBaP [Bouchard and Viau 1997].

La voie d'absorption du BaP peut influencer la proportion de 3-OHBaP retrouvée dans l'urine. Alors que celle-ci représente 0,5 % de la dose de BaP administrée en IP [Tzekova 2004] et 0,44 % du BaP ayant pénétré dans l'organisme de rat par voie cutanée [Payan 2009], elle est quatre fois plus faible après une injection IV [Bouchard and Viau 1995]. Cette différence pourrait provenir en partie de l'activité métabolique présente au sein du tissu cutané et du péritoine.

Chez l'homme, 0,06 % de la dose estimée de BaP inhalé lors de la consommation de cigarettes est retrouvé sous forme de 3-OHBaP dans les urines collectées pendant 24 heures [Lafontaine 2006]. Pourtant, seulement de 0,001 à 0,006 % de la dose de BaP ingérée sont retrouvés sous forme de 3-OHBaP dans les urines 12 heures après consommation de viandes grillées [Chien and Yeh 2012]. Cette diminution d'un facteur 10 peut être expliquée par le faible laps de temps durant lequel l'urine a été collectée, dans cette dernière étude.

L'élimination urinaire du BaP et de ses métabolites est biphasique. La première phase correspond à l'élimination biliaire et urinaire du BaP ayant été rapidement distribué dans l'organisme et métabolisé. La deuxième phase, plus lente, correspond à l'élimination des quantités lentement relarguées par les tissus pulmonaires et adipeux. Cette deuxième phase gouverne la cinétique d'élimination du BaP [Heredia-Ortiz 2011]. Ainsi, 10 % de la

radioactivité n'a toujours pas été éliminé 7 jours après une administration IP de ^{14}C -BaP chez le rat [Yang 1994] alors que le maximum d'excrétion est observé 48 heures après l'injection [Yang 1999]. Dans le cas d'une administration répétée, l'élimination du 3-OHBaP est encore observée après l'arrêt de l'exposition, du fait d'un phénomène d'accumulation du BaP dans l'organisme [Bouchard and Viau 1995].

Cependant, d'importantes différences existent entre les cinétiques d'élimination des métabolites du BaP. Chez le rat, les concentrations urinaires maximum de BaP-4,5-diol apparaissent immédiatement après administration IV. Ce métabolite est totalement éliminé de l'organisme en 24 heures, avec une demi-vie d'élimination urinaire de 3,1 heures. En revanche, le pic d'excrétion urinaire du 3-OHBaP n'apparaît que 10 heures après l'exposition IV. De plus, 5 % de ce métabolite n'est toujours pas éliminé après 48 heures et sa demi-vie d'élimination urinaire est de 8,1 heures [Bouchard and Viau 1996]. Une valeur similaire égale à 8,9 heures est retrouvée après administration cutanée de BaP à des rats [Payan 2009].

Chez l'homme, la demi-vie moyenne d'élimination du 3-OHBaP après son maximum d'excrétion est très proche, égale à 8,8 heures [Lafontaine 2004]. Le retard dans l'élimination urinaire du 3-OHBaP est également constatée, chez les salariés exposés au BaP, le pic d'excrétion urinaire du 3-OHBaP n'apparaît que 10 à 20 heures après la fin de la journée de travail (Figure 21) [Gendre 2002].

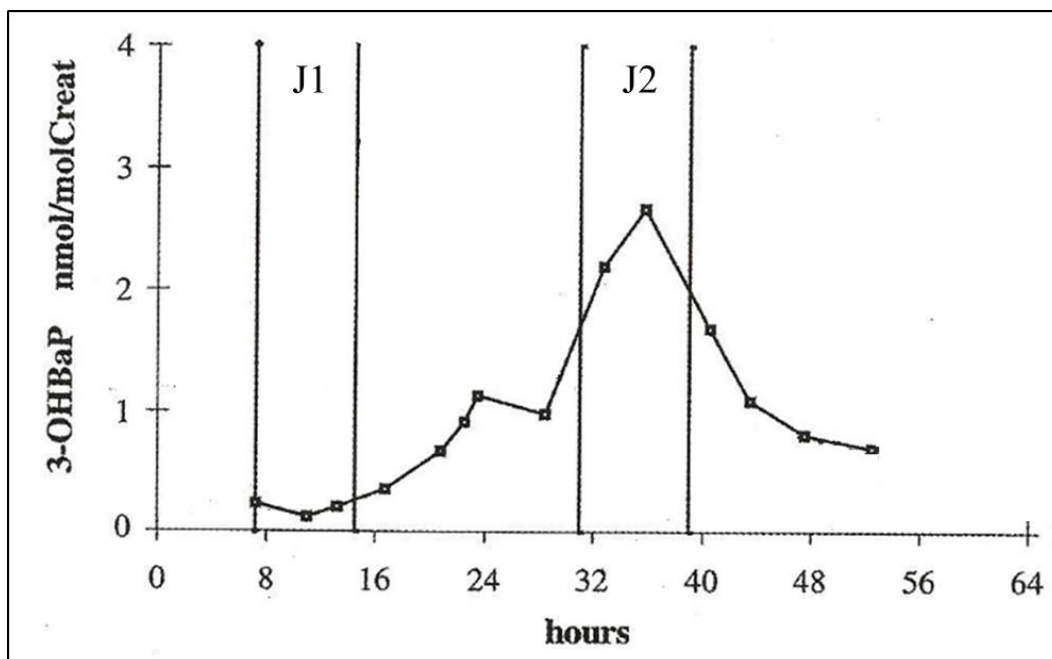


Figure 21 : Cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP chez un salarié exposé. J1 : jour d'exposition au HAP ; J2 : lendemain de la journée de travail (adaptée de [Gendre 2004])

L'accumulation de ce métabolite dans le rein est à l'origine de ce retard. En effet, sa demi-vie de distribution dans le tissu rénal est calculée à 27,8 minutes alors que celle de son passage des cellules tubulaires dans l'urine atteint 4,5 heures [Heredia-Ortiz 2011]. Ce phénomène peut s'expliquer par une plus grande efficacité des transporteurs anioniques responsables de son transfert du compartiment sanguin vers les cellules tubulaires que de ceux responsables de son transfert vers le lumen des tubules rénaux, induisant une accumulation intracellulaire. Une autre hypothèse, est la réabsorption tubulaire du 3-OHBaP après sa filtration glomérulaire. Ainsi, 8 heures après administration IV de BaP chez le rat, le 3-OHBaP dans le rein représente 0,65 % de la dose administrée, contre 0,09 % dans le sang, 0,01 % dans les urines et 0,06 % dans le tissu adipeux [Marie 2010].

II. CANCEROGENESE CHIMIQUE

Trois étapes distinctes successives sont nécessaires pour qu'un cancer puisse être cliniquement diagnostiqué : l'initiation, la promotion et la progression.

L'initiation débute par une lésion génotoxique. Les intermédiaires réactifs produits lors de l'activation métabolique du BaP sont capables de former des lésions de l'ADN pouvant conduire à l'apparition d'une mutation génétique. Cette mutation peut alors être transmise aux cellules filles lors de la division cellulaire. La plupart des mutations touchent des régions non codantes de l'ADN et n'entraînent aucune conséquence biologique pour l'individu. En revanche, certains gènes mutés sont impliqués dans le processus de cancérogénèse :

- Les proto-oncogènes qui sont suractivés après mutation. Ils codent pour des facteurs de croissance, des protéines de transduction ou des récepteurs membranaires (ex : *Ras*, *Erb*, *Myc*).
- Les gènes suppresseurs de tumeurs qui sont inactivés après mutation. Ils codent pour des protéines responsables de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de la réparation de l'ADN (ex : *p53*)

Suit la phase de promotion des cellules mutées. Durant cette étape qui ne peut avoir lieu qu'en présence d'un agent promoteur, les clones cellulaires vont accumuler d'autres mutations.

Enfin, la progression est caractérisée par le passage de l'état pré-néoplasique de la lésion cellulaire à l'état néoplasique du tissu. Les mécanismes d'invasion tumorale, de capacité métastatique et d'angiogénèse peuvent apparaître.

II.1. Mutagénèse

Les lésions génotoxiques induites par les HAP (adduits, bases oxydées, sites apuriniques et cassures de l'ADN) sont prises en charge par des mécanismes de réparation cellulaire. Les mutations génétiques apparaissent lorsque ces mécanismes commettent des erreurs dans la séquence d'ADN néo-synthétisée.

II.1.1. Mécanismes de réparation de l'ADN

Le premier mécanisme consiste en une excision de nucléotides. Il est plutôt spécifique des lésions de grandes tailles qui entraînent une distorsion de la double hélice, tels que les adduits stables du BaP. La reconnaissance du dommage se réalise lors du blocage de l'ARN polymérase II ou passe par un complexe protéique dédié. Le double brin d'ADN est ensuite séparé, puis un fragment de 25 à 30 paires de bases est excisé. La dernière étape consiste en la synthèse d'un nouveau brin d'ADN à partir du brin complémentaire, puis en sa ligature par une ligase.

Le deuxième mécanisme de réparation de l'ADN passe par l'excision de bases. Il prend en charge des petites liaisons qui entraînent une modification chimique de l'ADN sans modification morphologique, comme les bases oxydées ou les sites apuriniques. Une ADN glycosylase hydrolyse la liaison N-glycosidique de la base oxydée générant un site abasique. L'ADN est ensuite clivé par une endonucléase avant néo-synthèse. Cette dernière étape peut suivre deux voies différentes :

- une voie de néo-synthèse courte conduisant à l'incorporation d'un ou deux nucléotides,

- une voie de néo-synthèse longue conduisant à l'incorporation de 5 à 7 nucléotides.

Les cassures de l'ADN sont également prises en charge par deux autres mécanismes. Le premier est constitué de la recombinaison homologe. Les protéines issues des gènes *RAD52* rapprochent le brin cassé à une séquence homologue, via un filament nucléo-protéique. L'ADN polymérase et la ligase synthétisent alors une nouvelle séquence d'ADN. Ce système de réparation, qui ne passe pas par une perte de matériel génétique, est fidèle. En revanche, le deuxième mécanisme de recombinaison non-homologue permet de joindre des brins d'ADN n'ayant pas d'homologie de séquence. Il est donc peu fidèle puisqu'il nécessite une ligature de l'ADN et peut être à l'origine de réparations fautives, conduisant à l'apparition de mutations transmissibles aux cellules filles.

II.1.2. Mutations induites par le BaP

In-vivo des transversions G→T et des transitions G→A ont été observées au sein du codon 12 de l'oncogène *Ki-Ras*, dans les tumeurs pulmonaires de souris traitées au BaP par voie IP, en cohérence avec la présence majoritaire d'adduits du BPDE à la guanine [Mass 1993]. Les mêmes mutations de ce gène ont été observées dans les tumeurs pulmonaires de salariés non-fumeurs exposés aux fumées de combustion de charbon riches en BaP [IARC 2010].

Les papillomes obtenus par traitement de la peau de souris au BaP renferment des mutations dans les codons 12, 13 et 61 de l'oncogène *Ha-Ras* [Wei 1999]. La peau préneoplasique de souris traitée au BaP renferment également des transversions G→T au sein

du codon 13 mais également A→T au sein du codon 61 de ce même gène *Ha-Ras* [Chakravarti 2008].

Le séquençage du gène suppresseur de tumeurs *p53*, réalisé dans la peau de souris traitées au BaP, révèle que 70 % des mutations observées au niveau de points chauds sont des transversions G→T [Ruggeri 1993]. Cette observation a également été faite *in-vitro* sur des lignées cellulaires humaines. La formation importante et sélective d'adduits aux guanines des codons 157, 248, et 273 du gène *p53* a été observée dans les cellules bronchiales traitées au BPDE. Ces mêmes positions sont les principaux points chauds de mutations observés dans les cancers pulmonaires humains induits par le tabac, soulignant le rôle du BaP dans l'étiologie de cette pathologie [Denissenko 1996].

La production d'ERO peut également être responsable de mutations. La mutagénèse du gène *p53* par l'action de la BaP-o-quinone est totalement inhibée par la présence de superoxyde dismutase et de catalase, indiquant que la production de radicaux hydroxyles et d'anions superoxydes est à l'origine de cet effet [Yu 2002]. La mutagénèse de ce même gène est même plus importante via les radicaux oxygénés issus de l'o-quinone, et dans une moindre mesure des BaP-1,6-dione et BaP-3,6-dione, que par l'action du radical cation [Sen 2012]. Enfin, les mutations induites *in-vitro* par la présence de bases oxydées au sein du gène *p53* sont similaires à celles provenant des tumeurs pulmonaires humaines [Shen 2006].

II.2. Rôle de l'Aryl hydrocarbon Receptor

L'Aryl hydrocarbon receptor (AhR) est un facteur de transcription activé par un ligand et médiant la réponse cellulaire à de nombreux toxiques, notamment aux HAP. Aucun ligand

endogène de ce récepteur n'a été identifié à ce jour. Il est essentiel aux mécanismes du développement et entre en jeu dans la régulation du cycle cellulaire notamment en amont de la cascade de réactions menant à l'apoptose. Il est également responsable de la voie de réponse adaptative aux xénobiotiques, via l'activation de leur métabolisme.

Dans le cytoplasme des cellules, l'AhR est lié à la Heat shock protein 90 (Hsp90) et à la AhR interacting protein (AIP). Cette association lui confère une reconnaissance spécifique et optimale vis-à-vis de composés exogènes, notamment le BaP. Ainsi, une partie du BaP ayant pénétré dans la cellule se lie spécifiquement à l'AhR. Après relargage de la protéine Hsp90, ce complexe migre dans le noyau. Dans l'espace intranucléaire, le complexe AhR-BaP se lie spécifiquement à une protéine nucléaire, l'Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) pour constituer un hétérodimère qui est un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes (Figure 22).

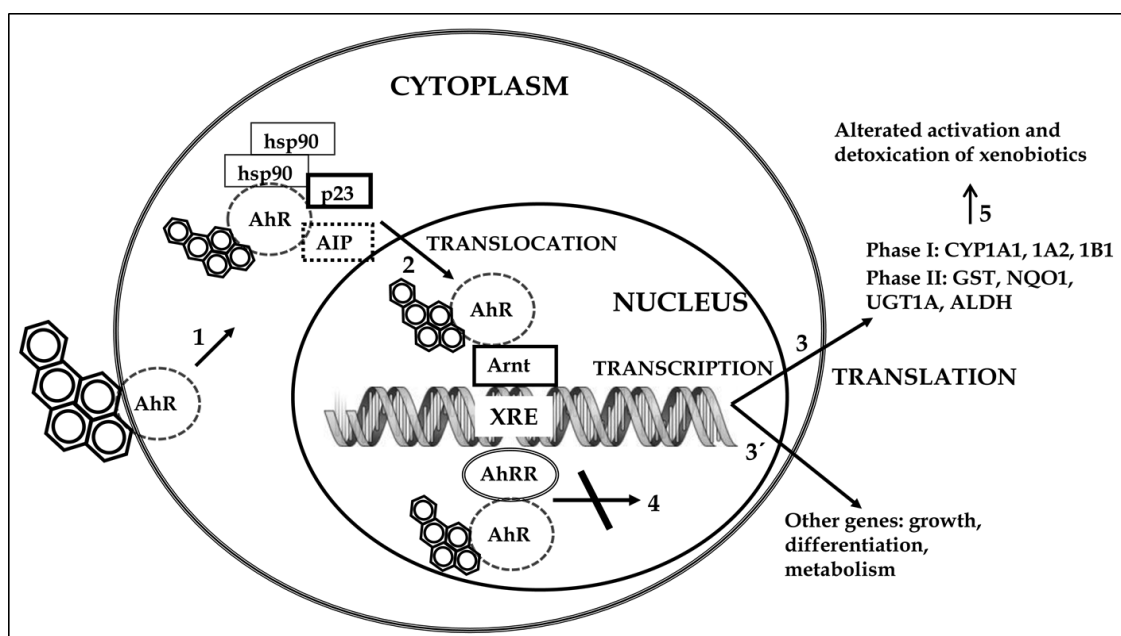


Figure 22 : Schéma simplifié de l'interaction du BaP avec l'Aryl hydrocarbon Receptor
[Arenas-Huertero 2011]

Le récepteur AhR est fondamental dans la cancérogénèse chimique du BaP. Les souris dont les gènes codant l'AhR ont été désactivés sont réfractaires à l'apparition de tumeur cutanée lors de l'application de BaP, contrairement à celles exprimant le récepteur [Shimizu 2000].

Un des rôles de l'AhR dans le mécanisme d'action toxique du BaP est sa capacité d'induire la transcription des gènes des enzymes du métabolisme. Il régule notamment les gènes codant pour le CYP1A1, le CYP1A2, le CYP1B1, l'UGT1A ou la GSTA1 [IARC 2012]. Le niveau d'expression cellulaire de ces enzymes est particulièrement important puisqu'elles vont pouvoir catalyser les réactions d'activation métabolique du BaP à l'origine de sa toxicité. La présence de BaP dans le cytoplasme des cellules entraîne une augmentation de l'expression de ces enzymes du métabolisme [Whitlock 1999] mais cette induction enzymatique n'existe pas chez les souris dont les gènes codant l'AhR ont été désactivés [IARC 2010]. *In-vitro*, la BaP-o-quinone produit moins de cassures de brins d'ADN et de bases oxydées dans les cellules bronchiques humaines H358 pour lesquelles l'expression de la protéine AhR a été inhibée [Park 2009].

Néanmoins, l'AhR est également capable d'induire l'expression des protéines d'efflux des métabolites toxiques du BaP [Ebert 2005]. La balance entre détoxification et activation métabolique induites par ce récepteur n'est pas encore complètement élucidée.

II.3. Promotion de la cancérogénèse

En plus d'être un initiateur puissant, le BaP est également un promoteur de la cancérogénèse, ce qui en fait un cancérogène complet. Des mécanismes génotoxiques et épigénétiques coexistent lors de cette étape.

L'immunotoxicité induite par le BaP est associée à ce mécanisme de promotion. En effet, il est bien établi que le système immunitaire protège l'organisme contre l'apparition de cancer, par la détection et la suppression des cellules dérégulées. Le métabolisme du BaP peut avoir lieu au sein des tissus lymphoïdes périphériques, mais les cellules de ces tissus expriment faiblement les enzymes de phase II, ce qui les rend particulièrement vulnérables aux métabolites électrophiles. De plus, les mutations du gène *p53* qui découlent de la génotoxicité du BaP seraient spécifiquement responsables d'une immunosuppression. Le BaP est aussi capable de provoquer une augmentation du calcium intracellulaire au sein des lymphocytes (B et T) et des monocytes humains, ce qui pourrait perturber les voies de signalisation du récepteur aux antigènes. La concentration de calcium libre intracellulaire est également liée à l'activation de la protéine kinase C qui est associée à la promotion de la cancérogénèse [IARC 2010]. Récemment, la méthylation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, ayant comme conséquence une baisse des fonctions des lymphocytes T régulateurs, a été reliée à une exposition aux HAP atmosphériques chez l'enfant [Walker 2013].

L'exposition aux HAP peut également créer un environnement inflammatoire favorable à la croissance tumorale. En effet, elle potentialise la réponse immunitaire, avec une augmentation de la production des immunoglobulines E, des cytokines et une activation macrophagique responsable de la production d'ERO [Burchiel and Luster 2001].

Le BaP peut aussi augmenter l'apoptose, perturber le cycle cellulaire, inhiber la communication intracellulaire via les jonctions gap et réduire *in-vitro* l'attachement des cellules de l'endomètre humain [IARC 2010].

Enfin, l'action promotrice du BaP peut également passer par l'expression de proto-oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs via l'activité de l'Ahr [Sjögren 1996].

Il est intéressant de noter que les autres HAP possédant une forte affinité pour l'Ahr, comme le BbF, le DBahA ou l'IP, pourraient également avoir un effet inducteur et/ou promoteur et augmenter ainsi la cancérogénicité des mélanges contenant du BaP [Tarantini 2011b].

III. POLYMORPHISME ENZYMATIQUE

Le polymorphisme d'un gène existe si dans une même population, une portion codante ou non codante d'ADN présente une variation de séquence, correspondant à plusieurs formes alléliques, dont la plus fréquente ne représente pas plus d'une certaine fraction de la population totale, fixée à 95 ou 99 %. Les différences de séquence se situent dans la région promotrice des gènes ou au niveau des exons, ou encore au niveau des introns. L'effet de ces modifications est une modulation de la transcription du gène, du recrutement de l'ARN messenger et dans une moindre mesure de l'activité fonctionnelle de l'enzyme ou de sa stabilité.

La totalité des gènes codant pour les protéines du métabolisme du BaP sont génétiquement polymorphes. Nous présentons ici les variants alléliques de ces enzymes et la modulation du risque de cancer auquel ils sont associés.

III.1. Polymorphisme des cytochromes P450

Ces enzymes sont à la base du métabolisme du BaP. Elles sont à la fois responsables de son activation métabolique par la création d'époxydes instables et de sa détoxification par la formation des métabolites hydroxylés.

Le polymorphisme *MspI* du *CYP1A1* a été relié à un risque accru de développer un cancer du poumon chez les fumeurs homozygotes, mais uniquement au sein des populations Japonaises et Asiatiques [Shimada 2006]. Parmi la trentaine de polymorphismes existants pour le *CYP1A2*, aucune augmentation du risque de cancer n'a été mise en évidence.

L'allèle *CYP1B1**2 semble responsable d'une susceptibilité génétique aux cancers du sein et du poumon dans la population Japonaise [Watanabe 2000]. Pourtant, *in-vitro*, des activités catalytiques similaires sont obtenues avec quatre variants de ce gène lorsque le BaP ou le BaP-7,8-diol sont utilisés comme substrats [Shimada 2001].

Les allèles *CYP2C9**2, *3, *4 et *5 présentent une activité catalytique plus faible que l'allèle sauvage. Cependant, la relation entre ces polymorphismes et la susceptibilité au cancer chez l'Homme n'est pas connue. Les mêmes constatations sont faites pour les variants du *CYP3A4* [IARC 2010].

Une étude cas-témoins a calculé un odds ratio de cancer de poumon en relation avec le polymorphisme du *CYP2D6*, dix fois plus élevé chez les sujets « métaboliseurs rapides » par rapport aux « métaboliseurs lents ». Néanmoins, cette interaction est non significative et le *CYP2D6* n'est pas connu pour son rôle dans le métabolisme du BaP [Inserm 2001].

III.2. Polymorphisme de l'époxyde hydrolase

Cette enzyme est responsable de la détoxification des époxydes du BaP mais également de la production des trans-dihydrodiols pro-cancérogènes.

Deux variants alléliques ont été identifiés, l'un au niveau de l'exon 3 associé à une diminution de l'activité de l'enzyme, l'autre sur l'exon 4 associé à une augmentation de l'activité enzymatique. Les différences structurales induites par ces polymorphismes ne semblent avoir qu'un impact modeste sur l'hydrolyse du BaP-4,5-époxyde [IARC 2010]. Certaines études ont trouvé une association entre le polymorphisme de l'exon 3 et la susceptibilité de développer un cancer du poumon tandis que d'autres ont conclu à l'absence de lien [Shimada 2006].

III.3. Polymorphisme de la glutathion-S-transférase

Cette enzyme participe à la détoxification des métabolites réactifs du BaP. Le rôle de son polymorphisme dans la susceptibilité au cancer est complexe.

Les gènes *GSTM1* et *GSTT1* sont polymorphes à la suite d'une délétion importante dans leur structure. Ces délétions homozygotes semblent être associées à un risque accru de

cancer du poumon [Hengstler 1998] et de la vessie [Dalhoff 2005]. Le polymorphisme de *GSTM1* augmente également la susceptibilité de développer un cancer lors d'une exposition aux fumées de combustion du charbon [Lan 2000].

De façon étonnante, les individus possédant le variant *GSTP1*B* présentent un risque plus important de développer un cancer lors d'une exposition aux HAP alors que l'enzyme qu'il code entraîne une meilleure conjugaison des diol-époxydes au GSH [Sundberg 1998]. L'isoforme citée ne semble donc pas impliqué dans les mécanismes de défense contre l'action génotoxique du BaP.

III.4. Polymorphisme de la sulfotransférase

Cette enzyme est engagée dans la conjugaison des métabolites du BaP.

L'allèle *SULT1A1*2* est associé à une diminution de l'activité enzymatique par rapport à l'allèle *SULT1A1*1*. Certaines études épidémiologiques révèlent que le polymorphisme de *SULT1A1* est un facteur de risque pour les cancers du sein, du poumon et de la vessie, tandis que d'autres études ne confirment pas ce résultat [Shimada 2006].

III.5. Polymorphisme de l'UDP-glucuronyl-transférase

La famille des UGT1A est fortement impliquée dans la formation des métabolites conjugués du BaP à l'acide glucuronique. Les variants alléliques de cette famille enzymatique sont situés dans la boîte TATA, qui est un lieu de reconnaissance de l'ARN polymérase, et provoquent l'inactivation du gène. La conséquence d'un tel polymorphisme est la réduction

importante de la production de métabolites du BaP glucuronoconjugués et l'augmentation des niveaux d'adduits à l'ADN chez le rat [Tukey and Strassburg 2000]. Cette diminution de la production de conjugués à l'acide glucuronique par les microsomes de foie humains lors de l'exposition *ex-vivo* au BaP-7,8-diol est également significative chez les sujets homozygotes pour l'allèle *UGT1A1*28* par rapport à ceux possédant l'allèle sauvage (*UGT1A1*1*) [Fang and Lazarus 2004]. L'augmentation du risque de cancer, liée à l'exposition au BaP dans les populations possédant cet allèle, est donc suspectée, bien qu'aucun lien épidémiologique ne soit établi.

III.6. Polymorphisme de l'aldo-kéto réductase

La superfamille des AKR est responsable de la voie de l'o-quinone lors de l'activation métabolique du BaP. De nombreux polymorphismes existent pour les différentes isoformes de cette enzyme.

Le génotype *AKR1C3*Gln* homozygote est associé à une augmentation du risque de cancer du poumon au sein de populations utilisant des procédés de fumage au charbon [Lan 2004].

III.7. Polymorphisme de la NADPH quinone oxydoréductase

Cette enzyme prend en charge les BaP-1,6-, -3,6- ou -6,12-quinones pour les transformer en hydroquinones non électrophiles.

Le polymorphisme le plus fréquent est l'allèle *NQO1*2*, responsable d'une quasi-abolition de l'activité enzymatique dans sa forme homozygote [Saldivar 2005]. Un excès de risque significatif de cancer du poumon de plus de 10 fois, est retrouvé chez les patients fumeurs portant cet allèle, par rapport au phénotype sauvage [Lewis 2001]. Cette enzyme est donc essentielle dans les mécanismes de détoxification des cancérrogènes responsables de ce type de tumeurs, dont le BaP.

III.8. Conclusion sur l'impact du polymorphisme

Les individus qui possèdent un polymorphisme génétique codant pour des enzymes moins performantes dans l'activation métabolique, présentent en théorie un risque plus faible de développer un cancer, lors d'une exposition aux HAP. En revanche, des enzymes moins performantes dans la détoxification des métabolites réactifs induiraient un risque plus important.

De nombreux variants des enzymes du métabolisme ont été observés dans la population humaine. Une partie des études montrent des corrélations entre certains polymorphismes et l'occurrence de cancer chez l'homme. D'autres au contraire ne trouvent aucun lien. L'influence de l'ethnie, de l'âge, du sexe, des situations physiologiques et pathologiques peut être à l'origine de ces discordances. De plus, chaque individu a une combinaison unique d'allèles, ce qui rend difficile l'interprétation des études se focalisant sur les variations nucléotidiques d'un ou de quelques gènes.

D'autres voies métaboliques pourraient également avoir un impact aujourd'hui méconnu, par exemple, le polymorphisme des complexes protéiques impliqués dans les

mécanismes de réparation de l'ADN ou les protéines d'efflux. De même, le manque de travaux sur le rôle de la variabilité génétique du complexe de l'Ahr vis-à-vis de l'affinité au BaP tend à conclure à une absence d'effet [IARC 2010].

In fine, l'absence de données concordantes ne permet pas de conclure quant au rôle des polymorphismes génétiques dans la survenue d'un cancer lié à l'exposition aux HAP [Inserm 2001].

IV. SYNTHÈSE DU CHAPITRE 2

Le BaP est un HAP très bien absorbé par voies respiratoire, cutanée et digestive. Sa lipophilie est responsable de son stockage au niveau de la porte d'entrée dans l'organisme, où il peut alors exercer son action toxique. Par la suite, le BaP est très bien distribué dans les différents tissus, avec un premier équilibre des concentrations dans les différents compartiments, établi 2 heures après sa pénétration. Le poumon est l'organe qui concentre la plus grande quantité de BaP quelle que soit la voie d'absorption.

Le métabolisme de ce toxique est particulièrement complexe. Sa fonctionnalisation par les CYP450 et les EH va donner naissance à des métabolites hydroxylés non toxiques. Le plus abondant est le 3-OHBaP. Après conjugaison, les métabolites sont éliminés principalement dans les fèces mais également dans les urines. Un stockage rénal spécifique du 3-OHBaP retarde son pic d'excrétion urinaire, qui n'apparaît que 10 à 20 heures après l'exposition. Les réactions enzymatiques sont également responsables de l'activation métabolique du BaP, conduisant à la production de métabolites génotoxiques via trois voies toxiques : la production

d'un radical cation, de la BaP-o-quinone et du BPDE. Ces derniers sont capables de former des adduits à l'ADN et d'oxyder les bases nucléotidiques via la production d'ERO. Les liaisons génotoxiques induites par les métabolites du BaP peuvent être à l'origine de mutations des oncogènes *Ki-Ras* et *Ha-Ras* et du gène suppresseur de tumeurs *p53*. Le BaP est également un promoteur de la cancérogenèse via sa liaison à l'Ahr. C'est donc un cancérogène complet, initiateur et promoteur. L'impact du polymorphisme des enzymes du métabolisme du BaP sur le risque d'apparition de cancer n'est pas complètement élucidé, car de nombreux gènes sont concernés.

CHAPITRE 3 :

LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DES EXPOSITIONS

ET DES EFFETS DU BENZO(A)PYRENE

Afin de réaliser une SBE au BaP la plus proche du risque sanitaire, il est nécessaire de choisir le biomarqueur le plus pertinent. Ce dernier doit être en lien avec le risque cancérogène, son analyse ne doit pas nécessiter une méthode trop complexe, ses niveaux urinaires doivent être suffisants pour être quantifiés dans diverses conditions d'exposition et permettre de discriminer les sujets exposés des non-exposés. Dans ce chapitre, les connaissances scientifiques sur les différents biomarqueurs de dose interne, de dose efficace et d'effets du BaP sont synthétisées.

I. BIOMARQUEURS DE DOSE INTERNE DU BAP

Le dosage du BaP inchangé dans les urines n'est pas possible car les concentrations sont trop faibles pour évaluer l'exposition de salariés [Campo 2007]. De plus, il reflète la quantité de toxique n'ayant pas réagi avec l'organisme, donc éloignée du risque sanitaire, et la présence de BaP au niveau du site de prélèvement peut induire une contamination des échantillons biologiques. La réduction chimique des différents métabolites urinaires en BaP, utilisée dans la technique du « métabolisme inversé », présente quant à elle un rendement trop faible pour être mise en œuvre [Buckley 1995].

Une autre approche consiste à utiliser la mesure de la mutagénicité de l'urine par le test d'Ames en tant que biomarqueur d'exposition. Le principe de ce test est d'ensemencer une gélose avec des bactéries de type *Salmonella*, incapables de se développer dans un milieu pauvre en histidine, puis d'ajouter un composé chimique à tester. Si ce dernier est mutagène, des colonies de mutants réverses, c'est-à-dire capables de croître sur un milieu appauvri en histidine, apparaissent en plus grand nombre que les mutants spontanés [Binet 2001]. Dans le

cadre de la surveillance biologique des expositions au BaP, ce sont les urines des salariés qui sont ensemencées avec les bactéries pour évaluer la présence de métabolites urinaires génotoxiques. Mais les résultats de ce test sont variables. Certaines études rapportent une augmentation de la mutagénicité des urines entre les salariés de cokerie exposés aux HAP et un groupe de salariés non exposés [Siwińska 2004] ou chez des sujets fumeurs par rapport aux non-fumeurs [Pélissier 1996], tandis que d'autres ne retrouvent aucune différence [Kuljucka-Rabb 2002]. De plus, les résultats de ce test ne sont pas corrélés à la concentration atmosphérique de BaP [Mielyńska 1997].

La meilleure approche consiste donc à analyser les métabolites du BaP. Les métabolites réactifs, comme le BPDE ou le radical cation, ne sont pas directement mesurés dans les fluides biologiques car leur très grande réactivité empêche leur isolement [Xue and Warshawsky 2005]. Le dosage des métabolites non réactifs du BaP est donc privilégié. Lorsque ces derniers sont issus des voies d'activation du BaP, ils correspondent aux métabolites ayant été rapidement pris en charge par les mécanismes de conjugaison. Ce sont le BaP-7,8,9,10-tétraol et l'acide mercapturique issu de la conjugaison du BPDE au GSH. Lorsqu'ils sont issus de la détoxification du BaP, ce sont les BaP-diols et les métabolites monohydroxylés éliminés dans l'urine. L'utilisation de chacun d'entre eux dans la SBE humaine au BaP est détaillée dans les chapitres suivants.

I.1. Biomarqueurs des voies d'activation

I.1.1. Voie du BPDE

I.1.1.1. BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire

Le BaP-7,8,9,10-tétraol est majoritairement produit par l'hydrolyse spontanée du BPDE et du rev-BPDE et dans une moindre des adduits à l'ADN et aux protéines. Il est susceptible d'être éliminé sous forme de 6 paires d'énantiomères, puisque l'hydrolyse du pont époxyde n'est pas stéréospécifique. Ces énantiomères diffèrent par l'agencement tridimensionnel des atomes liés aux carbones chiraux du squelette carboné (C₇, C₈, C₉ et C₁₀).

Lors de l'incubation d'hépatocytes primaires humains avec le BaP-7,8-diol, précurseur du BPDE, quatre paires d'énantiomères sont produites : le (±)*trans-anti*-BaP-tétraol (18 % de la dose), le (±)*cis-anti*-BaP-tétraol (1,2 % de la dose), le (±)*cis-syn*-BaP-tétraol (0,8 % de la dose) et le (±)*trans-syn*-BaP-tétraol (0,4 % de la dose). Lors de l'incubation avec le BaP-9,10-diol, précurseur du rev-BPDE, seuls 2 isomères sont produits : le (±) *trans-anti*-BaP-tétraol (7 % de la dose) et le (±) *trans-syn*-BaP-tétraol (5,6 % de la dose) [Zhong 2011a]. Le diastéréoisomère *trans-anti*-BaP-tétraol est donc le métabolite majoritaire. Son énantiomère dextrogyre (+) provient du BPDE, alors que l'énantiomère lévogyre (-) provient du rev-BPDE (Figure 23).

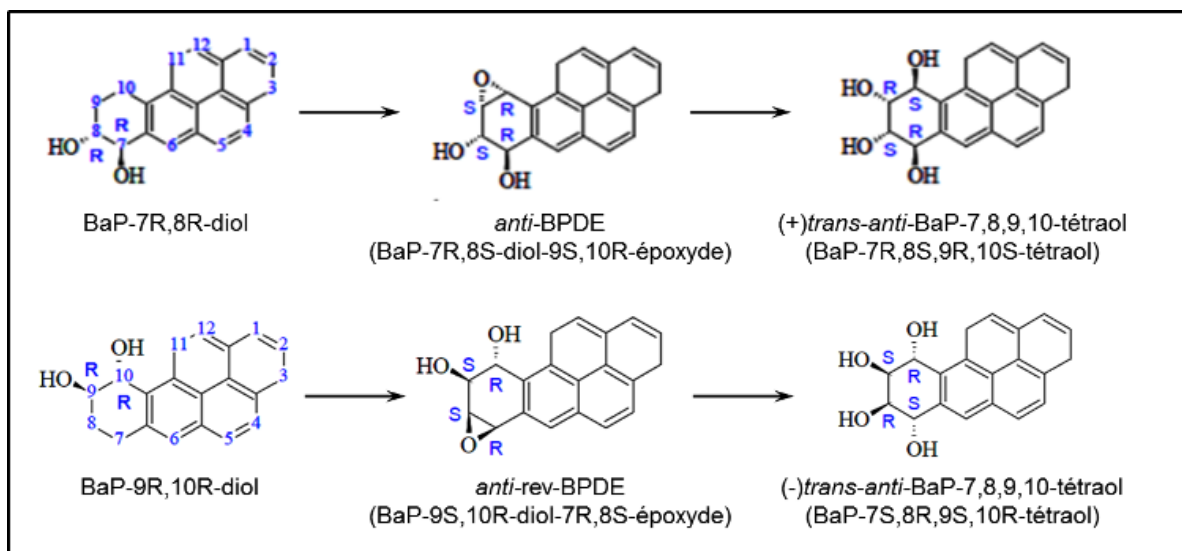


Figure 23 : Origine des énantiomères du *trans-anti*-BaP-tétraol

La séparation chirale des énantiomères n'est cependant pas nécessaire pour étudier la voie d'activation métabolique du BaP, car près de 80 % du *trans-anti*-BaP-tétraol analysé dans les urines humaines proviennent du BPDE [Hecht 2010].

- **Evolution des méthodes analytiques**

L'analyse du BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire nécessite toutefois des méthodes complexes de dosage utilisant des équipements de laboratoire récents, associés à de lourdes étapes pré-analytiques de purification et de dérivation. En effet, ses niveaux urinaires, environ 10 000 plus faibles que ceux du 1-OHP, compliquent son dosage [Wu 2002].

Les premières méthodes utilisant une SPE C18 simple, suivie d'une séparation en HPLC deux dimensions et d'une détection par fluorescence, atteignaient une LD de 0,6 ng/l [Bentsen-Farmen 1999, Bowman 1997]. Grâce à l'association de deux étapes de SPE avec

une détection par GC-MS, la sensibilité a été abaissée jusqu'à 0,2 ng/l [Simpson 2000, Wu 2002]. Puis récemment, ces deux étapes de SPE ont été associées à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (GC-MS/MS) afin d'améliorer la limite de quantification (LQ) jusqu'à 0,01 ng/l [Zhong 2011a]. Le Tableau 3 résume les caractéristiques techniques des méthodes de dosage publiées dans la littérature.

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques techniques des méthodes de dosage du BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire

Référence	Analytes	Etapes pré-analytique	Etapes analytique	Sensibilité (ng/l)
[Zhong 2011a]	(±) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol	Double SPE : - polymère Strata-X - acide phénylboronique Dérivatisation (BSTFA)	GC-NICI-MS/MS	LQ = 0,01
[Hecht 2010]	(-) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol (RSRS)	Double SPE : - polymère Strata-X - acide phénylboronique	GC-NICI-MS/MS	
	(+) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol (SRSR)	Séparation chirale par HPLC Dérivatisation (BSTFA)		
[Wang 2003a, Wang 2003b]	(±) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol	SPE cartouches EnvirElut PAH	MicroLC-Qtof/MS	LD = 3
[Wu 2002]	(±) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol	Double SPE : - tC18 - acide phénylboronique Perméthylation Extraction liquide	GC-NICI-MS	LD = 0,2
[Simpson 2000]	(±) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol	Double SPE : - tC18	GC-NICI-MS	LQ = 0,96
	(±) <i>cis-anti</i> -BaP- tétraol	- acide phénylboronique Perméthylation		LD = 0,32
	(±) <i>cis-syn</i> -BaP- tétraol	Extraction liquide Séparation des isomères par HPLC		
[Bentsen-Farmen 1999]	(±) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol	SPE cartouches C18	Double HPLC : - immuno-affinité - phase inverse FLD	LD = 0,64
[Bowman 1997]	(±) <i>trans-anti</i> -BaP-tétraol	SPE cartouches C18	Double HPLC : - immuno-affinité - phase inverse SFS	LD = 0,8

SPE : extraction en phase solide ; BSTFA : N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide ; GC-NICI-MS/MS : chromatographie gazeuse à ionisation chimique négative couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem ; MicroLC-Qtof/MS : Micro-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol ; SFS : synchronous fluorescence spectroscopy.

- **Dosage du métabolite urinaire en population**

Parmi les formes chimiques possibles du BaP-7,8,9,10-tétraol, seul le ($\pm$)trans-anti-BaP-tétraol a pu être quantifié dans les urines humaines, confirmant l'intérêt de cet isomère [Simpson 2000].

Chez les sujets non-exposés professionnellement, la médiane des concentrations urinaires de ($\pm$)trans-anti-BaP-tétraol est supérieure pour les fumeurs par rapport aux non-fumeurs, bien que cette différence ne soit pas significative [Zhong 2011a]. Des niveaux très élevés ont été retrouvés après consommation de viande grillée, mais ces résultats sont à interpréter avec prudence au regard du faible effectif et de l'année de publication de l'étude [Wu 2002]. Chez les patients utilisant du coal-tar pour traiter un psoriasis, les niveaux mesurés dans les urines de 24h sont significativement plus élevés que ceux des témoins et sont corrélés au nombre de jours de traitement [Bowman 1997]. Simpson *et al.* observent une forte variabilité interindividuelle des niveaux urinaires, expliquée par des différences de dose et de site d'application du coal-tar [Simpson 2000].

Les études en populations professionnellement exposées aux HAP rapportent des concentrations urinaires du ($\pm$)trans-anti-BaP-tétraol supérieures aux groupes témoins, mais uniquement dans le cas de très fortes expositions. C'est le cas des salariés de cokerie comparés à des témoins fumeurs [Simpson 2000] ou non-fumeurs [Wu 2002]. Dans cette dernière étude, l'exposition professionnelle très élevée masque l'effet du tabac et aucune différence n'est retrouvée entre les salariés fumeurs et non-fumeurs [Wu 2002]. Les niveaux de BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire sont également élevés chez les sujets exposés à la créosote [Simpson 2000]. Par contre, ce biomarqueur n'est pas détectable pour la production d'électrodes de carbone qui est pourtant un secteur où les expositions sont également élevées

[Bentsen-Farmen 1999]. Le Tableau 4 résume les niveaux de ($\pm$)*trans-anti*-BaP-tétraol urinaire publiés dans la littérature.

Tableau 4 : Niveaux de ($\pm$)*trans-anti*-BaP-tétraol urinaire (nmol/mol)

Références	Sujets	Prélèvement	N (<LD)	($\pm$) <i>trans-anti</i> BaP-7,8,9,10-tétraol Moyenne $\pm$ ET médiane [min-max]
POPULATION GENERALE				
[Zhong 2011a]	Fumeurs		30	$0,08 \pm 0,07$ 0,06 [0,03-0,41]
	Non-fumeurs		30	$0,04 \pm 0,02$ 0,03 [0,01-0,11]
[Wu 2002]	Témoins	Fin de poste	16 (13)	$0,03 \pm 0,03$ 0,015 [0,005-0,1]
[Simpson 2000]	Fumeurs (27 cigarettes/jour)		21	$0,05 \pm 0,04$ 0,04 [0,02-0,20]
	Patients traités au coal-tar		20 (0)	$4,6 \pm 4,5$ 2,95 [0,7-19]
	Salariés de cokerie administratifs		5 (3)	$0,09 \pm 0,11$ 0,04 [0,03-0,29]
[Bowman 1997]	Patients traités au coal-tar	Urines de 24h	43 (23)	$15,0 \pm 29,5$ 0 [0-124]
	Témoins		37 (33)	$1,3 \pm 4,2$ 0 [0-26]
[Weston 1993]	Consommation de viande grillée		4	$85,2 \pm 101,4$ [18,1– 235,3]
POPULATION PROFESSIONNELLE				
[Hochalter 2011]	Créosote		26	$1,30 \pm 1,02^*$ 1,04 [0,1-3,39]
[Wu 2002]	Cokerie	Fin de poste	41 (5)	$0,4 \pm 0,3$ 0,3 [0,005-1,3]
[Simpson 2000]	Cokerie		13 (0)	$0,32 \pm 0,23$ 0,25 [0,07-0,92]
[Bentsen-Farmen 1999]	Electrodes de carbone	Début de poste	17 (17)	< LD
	Electrodes de carbone	Fin de poste	17 (17)	< LD

(*) Les valeurs sont corrigées à la valeur moyenne attendue de la créatinine urinaire fixée à 1,5 g/l

Les concentrations de BaP-7,8,9,10-tétraol sont corrélées à celles de 1-OHP dans les urines de fin de poste pour les salariés de cokerie ($r=0,57$; $p<0,001$; $n=39$) [Wu 2002], les salariés au contact de la créosote ($r=0,83$; $n=26$; $p<0,001$), mais également chez les témoins fumeurs non-exposés professionnellement ($r=0,82$; $n=30$; $p<0,001$) [Hochalter 2011]. Aucune corrélation avec les niveaux atmosphériques de BaP ou d'HAP cancérrogènes n'a encore été rapportée dans la littérature.

En revanche, les ratios des concentrations urinaires BaP-7,8,9,10-tétraol/1-OHP varient d'un facteur de plus de 6000 fois (de 0,003 % à 16,2 %) dans les urines de 24 heures de 43 patients traités par du coal-tar. Les auteurs expliquent cet intervalle par les différences interindividuelles d'absorption, de métabolisation et d'élimination des HAP [Bowman 1997]. Pourtant la seule étude concernant l'impact du polymorphisme des enzymes de métabolisation du BaP sur les concentrations urinaires de ($\pm$)*trans-anti*-BaP-tétraol chez l'homme, rapporte une absence de différence entre les homozygotes *CYP1A1***MspI* et les hétérozygotes ou le phénotype sauvage [Wu 2002].

En conclusion, le BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire est un biomarqueur intéressant puisqu'il représente la fraction de BaP ayant emprunté la voie toxique du BPDE. Cependant, les méthodes de dosage permettant d'atteindre une sensibilité de 0,01 ng/l sont à ce jour très complexes et ne peuvent être utilisées que par quelques laboratoires de recherche. De plus, elles ne mettent pas en évidence de différence significative entre fumeurs et non-fumeurs. D'autres techniques moins performantes ne sont utilisables que dans le cas de très fortes expositions professionnelles (cokerie, créosote) du fait de leur manque de sensibilité.

I.1.1.2. Acides mercapturiques urinaires

Les composés électrophiles intracellulaires peuvent être pris en charge par le GSH spontanément, ou via l'action de la GST. Ces conjugués au GSH sont éliminés de l'organisme sous forme d'acides mercapturiques après une succession de réactions biochimiques. La première étape est le retrait de la fonction γ -glutamyl du groupement GSH par la γ -glutamyl-*trans*-peptidase, formant un composé conjugué à la cystéinyl-glycine. La cystéinyl-glycine-dipeptidase (ou aminopeptidase) dégrade ensuite ce métabolite en conjugué à la cystéine. La dernière étape est l'acétylation de la cystéine par la cystéine-S-conjugué-N-acétyltransférase pour former un acide mercapturique. Parce que l'excrétion sous forme d'acides mercapturiques représente le devenir principal des métabolites électrophiles et que ces composés possèdent généralement une demi-vie d'élimination courte, leur dosage urinaire peut permettre une évaluation de l'exposition toxique récente [Haufrond and Lison 2005]. Mais à ce jour, l'exposition humaine au BaP n'a jamais été évaluée par le dosage des acides mercapturiques urinaires du BaP.

Cette voie de détoxification n'a été décrite pour le BaP que pour les diol-époxydes. Lors de l'exposition *in-vivo* de rats par voie IP, l'acide mercapturique BaP-7-NAc, issu de la conjugaison du rev-BPDE au GSH, est le métabolite urinaire majoritaire [Yang 1998]. De la même façon, lors de l'exposition au BaP d'hépatocytes primaires humains, le BaP-7-NAc est présent dans tous les échantillons alors que l'acide mercapturique tetrahydro-trihydroxy-BaP-10-S-N-acetylcystéine (BaP-10-NAc), issu du BPDE cancérigène, n'est détecté que très rarement (Figure 24).

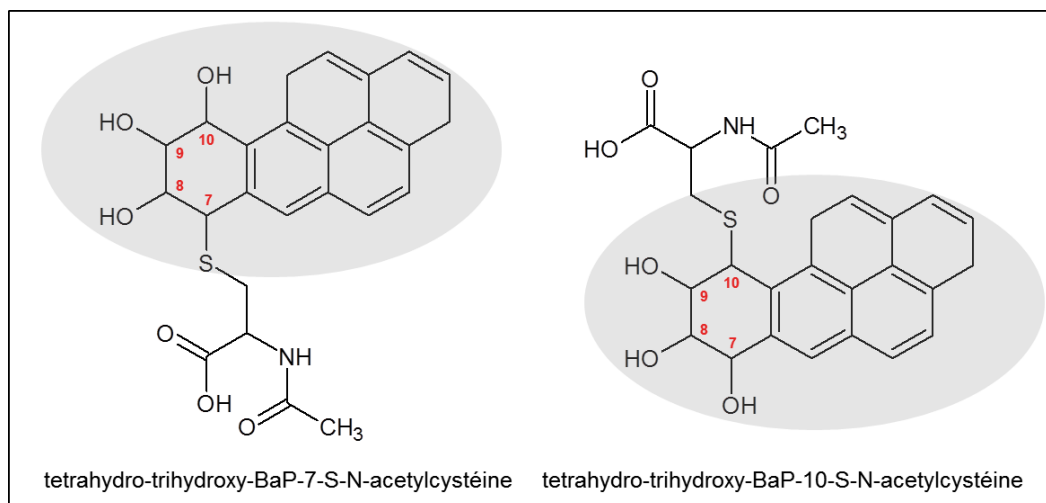


Figure 24 : Structures chimiques du BaP-7-NAc et du BaP-10-NAc

A partir d'une méthode de dosage très sensible, constituée d'une SPE suivie d'une analyse en HPLC-MS/MS, les auteurs parviennent à calculer que le BaP-7-NAc représente 0,04 % de la dose de BaP appliqué *in-vitro* aux hépatocytes [Upadhyaya 2010].

La proximité de la région de baie avec la position 10 de l'époxyde du BPDE, où la conjugaison au GSH devrait se produire, induit un encombrement supérieur à la position 7 du rev-BPDE, ce qui peut expliquer ces différences. La conjugaison des métabolites électrophiles du BaP au GSH ne semble donc pas essentielle à la détoxification du cancérigène ultime qu'est le BPDE. Ce constat pourrait remettre en cause l'étude de l'impact du polymorphisme de la GST sur le risque d'apparition de cancer bien que la détoxification par le GSH des métabolites réactifs issus des autres voies d'activation du BaP n'est aujourd'hui pas connue.

I.1.2. Biomarqueurs des autres voies d'activation métabolique

Comme nous l'avons vu précédemment, la métabolisation du BaP est complexe et produit un grand nombre de métabolites.

A ce jour, en dehors de la voie du BPDE précédemment traitée, il n'existe aucun métabolite issu des autres voies d'activation métabolique du BaP validé en tant que biomarqueur d'exposition pour la surveillance biologique humaine. Pourtant, certains d'entre eux, par leur spécificité, leur prépondérance et leur stabilité, sont de bons candidats (Figure 20). Ainsi, les 1,6- et 3,6-diones issues du 6-OHBaP, sont des biomarqueurs de la voie du radical cation, le dosage du 6-OHBaP étant impossible du fait de sa trop grande réactivité [Toriba 2003]. La 7,8-dione serait quant à elle un biomarqueur de la voie de l'o-quinone. Lu *et al.* démontre que l'exploration *in-vitro* du métabolisme du BaP dans les cellules bronchiques humaines, par le biais du dosage de biomarqueurs en tant que « signature » de chaque voie d'activation métabolique, est possible. Néanmoins, une méthode analytique complexe, en HPLC couplée à une détection par ionisation chimique en pression atmosphérique et spectrométrie de masse en mode tandem est requise [Lu 2011]. L'application de cette méthode à la matrice urinaire, dans le but de réaliser la SBE humaine au BaP, nécessite encore une amélioration de la sensibilité et de l'accessibilité du matériel analytique utilisé.

I.2. Biomarqueurs de la voie d'inactivation du BaP

Les métabolites issus de la détoxification du BaP sont dits précoces car produits au début de la chaîne de réactions métaboliques. Ils sont ainsi produits en plus grande quantité

que les biomarqueurs issus des voies d'activation métabolique du BaP lors de l'exposition au BaP *in-vitro* de cellules broncho-alvéolaires humaines [Jiang 2007, Lu 2011]. De plus, puisqu'ils ne font intervenir qu'un nombre limité d'enzymes (CYP et/ou EH), l'impact du polymorphisme enzymatique peut donc logiquement être considéré comme moins important sur leurs concentrations entraînant une variabilité interindividuelle plus faible.

Le BaP-9,10-diol, précurseur du rev-BPDE non cancérigène, ne semble pas être un métabolite utilisable en tant que biomarqueur d'exposition. En effet, il n'est presque jamais détecté dans les urines de rats après administration orale, cutanée ou IV de BaP [Bouchard and Viau 1997]. Son élimination serait principalement fécale, expliquant que les concentrations urinaires ne correspondent qu'à 0,0001 % de la dose de BaP. En revanche, les concentrations urinaires de BaP-4,5-diol sont près de mille fois plus élevées [Bouchard and Viau 1996]. Ramesh *et al.* rapportent que le BaP-4,5-diol est le métabolite majoritaire dans le plasma de rats exposés au BaP par voie respiratoire et que sa forme glucurono-conjuguée est prépondérante dans les urines [Ramesh 2001a]. Le BaP-11,12-diol a également été mis en évidence dans les urines de rats exposés par voie IP, mais les auteurs n'excluent pas un artefact et insistent sur le fait qu'aucun standard analytique validé ne soit disponible [Yang 1994]. Toutefois, il est important de noter que ces études animales sont toutes réalisées avec des doses élevées de BaP. A ce jour, aucune publication ne rapporte l'utilisation du BaP-4,5-diol urinaire comme biomarqueur d'exposition au BaP chez l'homme.

Les phénols du BaP semblent être les métabolites les mieux adaptés à la surveillance biologique humaine. Produits par hydrolyse spontanée des arènes oxydes du BaP les moins stables, ce sont les produits de dégradation du BaP qui possèdent le métabolisme le plus simple, puisqu'ils ne font intervenir que les CYP. Lors de l'incubation *in-vitro* de BaP avec

des CYP1A1 recombinants humains, parmi les douze isomères possibles de monohydroxybenzo(a)pyrène, seuls les 1-OHBaP, 3-OHBaP et 9-OHBaP ont été détectés [Toriba 2003]. Chez le rat, les concentrations urinaires de 3-OHBaP sont 50 à 110 fois supérieures à celles de 9-OHBaP après administration IV de BaP, 10 à 30 fois dans le cas d'une ingestion et de 10 à 20 fois pour une application cutanée [Bouchard and Viau 1997]. Dans les urines de trois salariés d'une cokerie, le 3-OHBaP est l'isomère très largement majoritaire [Grimmer 1997], et est le seul métabolite du BaP détecté chez un sujet non-fumeur non exposé professionnellement aux HAP [Toriba 2003].

Ainsi, le 3-OHBaP, métabolite majoritaire du BaP, identifié il y a une trentaine d'année [Gelboin 1980], a été dosé par différents auteurs pour évaluer l'exposition aux HAP. Les premiers travaux de Jongeneelen *et al.* ont permis de confirmer que ce concept était théoriquement viable [Jongeneelen 1984] et en 2008, Peter J. Boogaard, affirmait que le 3-OHBaP urinaire était un biomarqueur pertinent pour l'évaluation du risque cancérigène lié à l'exposition aux HAP [Boogaard 2008]. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à ce biomarqueur.

1.3. Le 3-OHBaP urinaire

Ce biomarqueur de dose interne a été relié aux biomarqueurs de dose efficace du BaP chez l'animal. Les concentrations urinaires de 3-OHBaP ont pu être corrélées aux concentrations d'adduits à l'ADN mesurées au niveau du site d'exposition : dans le poumon lors d'une injection intra-trachéale de forte doses de BaP ($r=0,85$; $n=15$), dans l'estomac lors d'une administration orale ($r=0,84$; $n=15$) et dans la peau lors d'une application cutanée

($r=85$; $n=15$) [Godschalk 2000]. Il est intéressant de noter que les concentrations urinaires de 3-OHBaP sont mieux corrélées aux adduits à l'ADN du BPDE au niveau pulmonaire ($r=0,94$; $n=32$) qu'au niveau des cellules mononucléées sanguines ($r=0,64$; $n=31$), après injection IV de BaP à des rats [Marie-Desvergne 2010]. De plus, les niveaux urinaires de 3-OHBaP ont également été corrélés aux concentrations plasmatiques d'adduits à l'hémoglobine ($r=0,94$; $n=14$), lors d'une exposition IV de rats [Bouchard and Viau 1995]. Chez l'homme, les concentrations de 3-OHBaP dans les urines de 24 heures ont également été corrélées à celles des adduits cutanés lors d'utilisation de coal-tar ($r=0,75$; $n=10$) [Godschalk 1998].

Cependant, le métabolite n'a été jusqu'à ces dernières années détecté que rarement dans les urines du fait d'un manque de sensibilité des méthodes d'analyse [Jongeneelen 1986, Jongeneelen 1988]. Ceci s'explique par le fait que seulement 0,1 % à 0,5 % de la dose de BaP sont éliminés sous forme de 3-OHBaP urinaire selon les voies d'exposition [Bouchard and Viau 1995, Bouchard and Viau 1996, Bouchard and Viau 1997, Lafontaine 2006, Marie 2010, Payan 2009, Tzekova 2004]. Les concentrations urinaires du 3-OHBaP sont donc de l'ordre du ng/l d'urine. Le Tableau 5 répertorie les valeurs de ce métabolite rapportées dans la littérature.

Tableau 5 : Niveaux de 3-OHBaP urinaire (nmol/mol)

Références	Sujets	Prélèvement	LD (ng/l)	N (<LD)	3-OHBaP moyenne ± ET médiane [min-max]
POPULATION GENERALE					
[Leroyer 2010]	Non-fumeurs	Avant exposition Immédiatement après exposition Exposition + 4h Exposition + 15h	0,08	284 (224)	[<LD-0,095]
[Lafontaine 2006]	Fumeurs	Urine de 24h	0,1	27 (9)	0,03 0,023 [0,01-0,084]
	Non-fumeurs			27 (22)	0,014 0,011 [0,01-0,045]
[Fan 2006]	Fumeurs		105	23	7 ± 11
	Non-fumeurs			26	6 ± 12
[Wang 2005]	Témoins		760	51 (28)	1310 [253-5396]
[Hollender 2000]	Témoins		51	10 (10)	< LD
[Godschalk 1998]	Patients traités au coal-tar		200	10	1180 [<LD-2140]
[Ariese 1994]	Fumeurs		0,5	3	1,6
POPULATION PROFESSIONNELLE					
[Förster 2008]	Convertisseurs électriques	FSFP	0,05	25 (0)	3,69 0,51 [0,08-19,53]
	Electrodes graphites			26 (0)	2,43 0,54 [0,21-14,58]
	Pierres réfractaires			86 (0)	2,00 0,46 [0,17-17,08]
	Cokerie			86 (3)	0,71 0,22 [<LD-8,05]
[Buratti 2007]	Asphalte	FSFP	60	75 (75)	< LD
	Construction			37 (37)	< LD
[Lafontaine 2006]	Créosote et disques de carbone		0,1		[0,14-35]
[Gündel 2000]	Pierres réfractaires	FSFP	6	19 (0)	5,9 [1,26-84,32]
[Ariese 1994]	Salariés exposés	FSFP	0,5	14 (0)	1,1 [0,5-22,5]

De nombreuses études rapportent des concentrations urinaires de 3-OHBaP inférieures à la LD que ce soit en population générale [Hollender 2000, Leroyer 2010], ou lors de faibles expositions professionnelles [Buratti 2007]. Quelques niveaux élevés, supérieurs à 5 nmol/mol [Fan 2006], voire extrêmement élevés, supérieurs à 1000 nmol/mol [Godschalk 1998, Wang 2005], ont été rapportés en populations non-exposées professionnellement. Mais les techniques analytiques utilisées présentent des LD très hautes et l'on peut se poser la question de leur spécificité.

En revanche, Simon *et al.* ont développé une technique en HPLC-FLD permettant d'améliorer la sensibilité analytique [Simon 2000] : le couplage de quatre colonnes chromatographiques en série, à l'aide de vannes de commutation, a permis de réaliser une séparation chromatographique suffisante pour obtenir un bruit de fond compatible avec le dosage du 3-OHBaP urinaire, lors d'exposition professionnelle ou en population générale. En utilisant cette méthode de dosage, les auteurs rapportent des concentrations de 3-OHBaP urinaire supérieures chez les salariés professionnellement exposés par rapport à la population générale [Förster 2008], mais également chez les fumeurs non professionnellement exposés par rapport aux non-fumeurs [Lafontaine 2006]. Néanmoins, le matériel requis pour ce dosage est complexe et artisanal, ne lui permettant pas d'être utilisé en routine par les laboratoires de biologie médicale.

Les niveaux de 3-OHBaP mesurés dans les urines de fin de poste sont corrélés aux concentrations atmosphériques de BaP chez les salariés d'une cokerie ($r=0,66$; $n=76$) et d'une usine de pierres réfractaires ($r=0,59$; $n=84$) alors qu'il n'existe pas de corrélation dans une usine de production d'électrodes graphite ($r=0,31$; $n=24$) ou de transformateurs ($r=0,35$; $n=11$) [Förster 2008]. Pourtant, les concentrations urinaires de 3-OHBaP sont plus élevées

dans ce dernier secteur industriel que dans les cokeries ou les usines de pierre réfractaire [Käfferlein 2012]. De nombreux facteurs peuvent expliquer ces discordances tant au niveau de l'activité de travail (contact cutané avec les produits, port d'équipement de protection individuelle) qu'au niveau de la toxicocinétique du 3-OHBaP (pic d'excrétion urinaire retardé surtout en cas d'absorption cutanée). En ce sens, la corrélation entre les niveaux de 3-OHBaP urinaire et le BaP atmosphérique est meilleure lorsque les salariés sont exposés majoritairement par voie respiratoire et que le métabolite est dosé au moment de son pic d'excrétion individuel (t_{MAX}) ($r=0,95$; $n=21$). Ainsi, à partir de cette corrélation, la valeur de 3-OHBaP urinaire mesurée en début de semaine début de poste correspondant à une exposition d'une journée à un niveau de BaP égal à 150 ng/m^3 (valeur recommandée en France) a été estimée à $0,35 \text{ nmol/mol}$ [Lafontaine 2004]. Après la prise en compte des expositions de début de poste, cette valeur a été estimée à $0,4 \text{ nmol/mol}$. De manière à pouvoir réaliser des campagnes d'échantillonnage standardisée en tenant compte du délai d'excrétion, le moment de prélèvement urinaire pour le dosage du 3-OHBaP a été fixé le lendemain matin de la fin de l'exposition (25 heures après le début de poste) [Gendre 2004]. Néanmoins, une forte variabilité interindividuelle du t_{MAX} est observée. De plus, le délai moyen de 25 heures après le début de poste, a été calculé chez des salariés exposés au BaP pendant une seule journée de travail et n'ayant pas été exposés depuis 36 heures. Ce calcul ne prend donc pas en compte les expositions cumulées inhérentes à une semaine complète de travail. La demi-vie moyenne d'élimination urinaire du 3-OHBaP ayant été calculée à 8,8 heures chez l'homme [Lafontaine 2004], son accumulation dans l'organisme lors d'expositions répétées est pourtant à suspecter.

II. BIOMARQUEURS DE DOSE EFFICACE DU BaP

La mesure de la dose efficace permet de quantifier la réaction des toxiques avec les cibles cellulaires. Elle est très intéressante puisqu'elle combine les intérêts du suivi de la dose interne, en ajoutant la prise en compte des facteurs métaboliques et des mécanismes de formation et de réparation des lésions moléculaires [Perera and Weinstein 2000]. Il est néanmoins important de noter que la positivité de ces indicateurs dans l'organisme ne suffit pas à induire la maladie.

II.1. Adduits à l'ADN

Le BaP à travers l'activité électrophile de ses métabolites, est capable de former des adduits avec l'ADN cellulaire, qui sont considérés comme essentiels à la cancérogénèse chimique. La mesure des adduits totaux peut être réalisée par des méthodes immuno-enzymatiques ou par le post-marquage au phosphore 32 (^{32}P). Cette dernière technique consiste à séparer par chromatographie sur couche mince les nucléosides normaux de ceux portant un adduit, puis de les quantifier après marquage radioactif. C'est une technique très sensible mais qui souffre d'une variabilité inter-laboratoire importante et qui est non spécifique [Hopf 2009]. En effet, de nombreux autres xénobiotiques sont capables de créer des adduits à l'ADN, qui seront alors quantifiés avec ceux du BaP. La mesure de ces adduits totaux peut donc rendre compte d'un effet génotoxique global, mais n'est pas directement reliée à l'exposition au BaP.

En revanche, les adduits du BPDE, sont spécifiques de l'exposition au BaP et suffisamment stables, malgré les mécanismes de réparation de l'ADN, pour être de bons biomarqueurs de dose efficace. Deux techniques permettent de les analyser. Premièrement, le dosage du BaP-7,8,9,10-tétraol, obtenu après hydrolyse acide des adduits, par HPLC-FLD est sensible et spécifique. L'inconvénient de cette technique réside dans les étapes pré-analytiques lourdes (hydrolyse acide) qu'elle nécessite. Deuxièmement, les adduits à l'ADN peuvent être analysés en HPLC-MS/MS. Cet outil possède une grande spécificité sans requérir d'étape pré-analytique. En revanche, au regard des concentrations d'adduits attendus chez l'homme, sa sensibilité n'est aujourd'hui pas suffisante. L'utilisation de cette technologie, pour le dosage des adduits du BPDE à l'ADN, est encore du domaine de la recherche.

Dans la majorité des cas, les adduits à l'ADN ne peuvent pas être analysés dans les organes cibles des individus. Ils sont alors recherchés dans les cellules sanguines. L'utilisation des cellules mononucléées est privilégiée par rapport aux leucocytes totaux. La question de la représentativité de ces adduits circulants par rapport à la dose efficace dans les tissus cibles reste posée [Demetriou 2012]. Chez l'animal, les adduits à l'ADN dans les leucocytes circulants sont corrélés aux adduits retrouvés au niveau du site d'application du BaP (poumon dans le cas d'une injection intra-trachéale, peau si cutanée et estomac lors d'une administration orale). Pour une même exposition, le métabolisme spécifique de chaque tissu est en effet responsable de différences dans la quantité d'adduits produits [Marie 2008]. En revanche, les concentrations d'adduits mesurées dans les échantillons de tissu pulmonaire, obtenus après ablation thérapeutique chez des patients atteints d'un cancer du poumon, sont significativement corrélées à celles analysées dans les lymphocytes périphériques, chez les non-fumeurs uniquement [Gyorffy 2004]. De la même façon, les niveaux d'adduits

pulmonaires sont liés aux nombres de cigarettes consommées mais cette corrélation n'existe qu'au-delà de 20 cigarettes par jour pour les adduits leucocytaires [Godschalk 2003].

Les adduits à l'ADN, dans les tissus ou les cellules sanguines, ne suffisent pas à prédire l'apparition du cancer, mais ils peuvent être utilisés pour hiérarchiser le risque [Godschalk 2003]. Dans une étude regroupant 89 cas de cancers du poumon et 173 témoins appariés, le risque de développer la maladie est trois fois plus élevé pour les patients dont les niveaux d'adduits plasmatiques, mesurés une dizaine d'année auparavant, étaient élevés [Tang 2001]. Le Tableau 6 présente des niveaux d'adduits à l'ADN du BPDE mesurés dans les cellules sanguines en population générale et professionnellement exposée.

Tableau 6 : Niveaux d'adduits à l'ADN lymphocytaires du BPDE (/10⁸ nucléosides normaux)

Référence	Technique	Sujets	N	Adduits à l'ADN Moyenne ± ET [min-max]
POPULATION GENERALE				
[Taioli 2007]	³² P	Fumeurs		0,9 ± 0,4
		Non-fumeurs		0,9 ± 0,3
[Lodovici 2004]	HPLC-FLD	Fumeurs <10 cigarettes/jour	14	0,9 ± 0,2
		Fumeurs >10 cigarettes/jour	27	1,4 ± 0,2
[Godschalk 2002]	³² P	Fumeurs 25 ± 9 cigarettes/jour	24	0,8 ± 0,4
POPULATION PROFESSIONNELLE				
[Sram 2011]	³² P	Policiers urbains	533	0,12 ± 0,04
[Topinka 2007]	³² P	Policiers urbains	78	0,3 ± 0,1
[Mensing 2005]	HPLC-FLD	Briques réfractaires	26	0,9 [0,5-2,8]
		Cokerie	9	2,1 [0,5-41]
[Pavanello 1999]	HPLC-FLD	Cokerie	15	19,5 ± 32,2
		Ramoneurs	19	5,5 ± 8,4
		Aluminium	36	11,5 ± 44,3
[Rojas 1995]	HPLC-FLD	Cokerie	39	15,7 ± 37,8

Les résultats de ces études rapportent un manque de spécificité de la méthode de dosage au ³²P. En effet, les niveaux obtenus par cette technique ne sont pas différents entre les sujets fumeurs et non-fumeurs [Godschalk 2002, Taioli 2007]. De plus, les niveaux de la population générale non-exposée professionnellement sont plus élevés que ceux de policiers urbains exposés aux HAP de la pollution atmosphérique de façon quotidienne [Sram 2011,

Topinka 2007]. La quantification des adduits plasmatiques du BPDE par le dosage du BaP-7,8,9,10-tétraol en HPLC-FLD après hydrolyse semble plus pertinent. En effet, les études rapportent des niveaux en population générale supérieurs chez les sujets fumeurs [Lodovici 2004] et encore plus élevés lors d'expositions professionnelles importantes en cokerie, lors de la production d'aluminium ou pour des activités de ramonage [Mensing 2005, Pavanello 1999, Rojas 1995].

En revanche, leurs niveaux ne sont pas corrélés aux concentrations atmosphériques d'HAP suggérant que des facteurs génétiques et environnementaux influencent la réponse de l'organisme [Brandt and Watson 2003].

Le rôle du polymorphisme des enzymes du métabolisme sur les niveaux d'adduits à l'ADN a été démontré. Il peut prendre place au niveau des enzymes de la détoxification du BPDE. L'absence d'activité de l'isoenzyme GSTM1-1 chez des individus fumeurs est ainsi associée à une concentration d'adduits importantes [Godschalk 2003]. Une méta-analyse récente démontre que les salariés exposés aux HAP qui portent ce génotype nul de GSTM1, sont plus susceptibles d'avoir des niveaux d'adduits élevés que les sujets possédant une enzyme fonctionnelle [Liu 2013]. Mais le polymorphisme génétique peut également moduler l'activation métabolique du BaP : Rojas *et al.* trouvent un effet significatif de l'association de génotypes rares du CYP1A1 et de la GSTM1 dans la formation des adduits à l'ADN du BPDE pulmonaires et lymphocytaires, cette combinaison de génotypes étant clairement reliée à un risque plus élevé de cancers épidermoïdes [Rojas 1998]. De la même façon, Lodovici *et al.* identifient que la combinaison des polymorphismes induisant une augmentation de l'activation du BaP (CYP1A1 et EH), avec ceux induisant une diminution de sa détoxification (GSTM1 et GSTP1), était responsable de la production d'une plus grande quantité d'adduits

chez les fumeurs [Lodovici 2004]. Il est intéressant de noter que le polymorphisme de la voie d'excision de nucléotides, impliquée dans la réparation de l'ADN, a aussi un effet sur le nombre d'adduits lymphocytaires retrouvés chez les fumeurs [Pavanello 2008].

La cinétique de formation et d'élimination longue des adduits peut également être mise en cause dans l'absence de lien avec la dose externe d'HAP. En effet, bien qu'elle leur permette d'être des indicateurs de l'exposition chronique et/ou ancienne, elle n'est pas adaptée la variabilité journalière des expositions [Hopf 2009]. Le niveau maximum d'adduits à l'ADN leucocytaires est atteint deux jours après une administration unique de BaP, quelle que soit la voie d'exposition, chez le rat [Godschalk 2000]. De plus, chez l'homme, l'élimination des adduits circulants est biphasique, avec une demi-vie de l'ordre de 10 à 12 semaines. Les lymphocytes ayant une durée de vie de plusieurs années, la recherche des adduits dans ces cellules pourraient refléter une exposition ancienne, mais les adduits au sein des monocytes, dont la durée de vie ne dépasse pas une journée, pourraient représenter une exposition plus récente [Godschalk 2003].

Cette cinétique particulière des adduits, associée à la variabilité des voies d'absorption en milieu industriel, peut également expliquer l'absence de corrélation entre les niveaux lymphocytaires de ces biomarqueurs de dose efficace avec la concentration de 1-OHP urinaire [Marczynski 2005, Pavanello and Lotti 2013].

Le dosage de ces adduits dans l'urine est également envisageable. En effet, ils peuvent être éliminés de l'organisme après leur clivage par les systèmes de réparation de l'ADN. La très faible quantité retrouvée, nécessite néanmoins des méthodes analytiques performantes, mais l'important volume d'urine autorise la concentration de l'échantillon [Chen 2005]. Environ 0,013 % de la dose de ^{14}C -BaP administrée à des rats sont éliminés dans les urines

[Rogan 1990]. L'inconvénient majeur de cet indicateur est l'absence d'information concernant l'origine des adduits dosés. Ces derniers peuvent ainsi provenir de tous les tissus de l'organisme, et ont pu se former à partir d'ADN, d'ARN ou même de nucléosides libres [Angerer 2007]. Chez des sujets exposés dans la production de silicium où les niveaux de 1-OHP atteignaient 7,9 $\mu\text{mol/mol}$, aucun adduit à l'ADN n'a pu être détecté dans l'urine par HPLC-MS/MS [Marie 2009].

II.2. Adduits aux protéines

Outre la formation d'adduits à l'ADN, le BPDE est également capable d'être distribué dans l'organisme et de réagir avec les protéines du compartiment sanguin. Les adduits à l'albumine et à l'hémoglobine sont particulièrement intéressants puisque ces protéines sont présentes en quantités importantes dans le sang. Ce sont de bons biomarqueurs de l'exposition chronique puisque, contrairement à l'ADN, aucun mécanisme de réparation n'entre en jeu et que l'albumine sérique et l'hémoglobine intra-érythrocytaire ont respectivement une durée de vie d'environ 4 et 17 semaines dans le compartiment sanguin.

Le dosage des adduits à l'albumine sérique peut être réalisé par la technique immuno-enzymatique ELISA. Mais cette méthode est peu spécifique du fait de l'existence de réactions croisées avec les métabolites du BaP. Inversement, le dosage du BaP-7,8,9,10-tétraol obtenu après hydrolyse acide des adduits est très spécifique. Il est réalisé en GC-MS après dérivatisation, ou en HPLC-FLD sans dérivatisation. Seules les études utilisant ces méthodes beaucoup plus spécifiques sont présentées ici. Dans les usines de production d'acier et d'électrodes graphite, la concentration sérique d'adduits à l'albumine n'augmente qu'à partir

de niveaux de BaP atmosphérique très élevés ($> 0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) [Tas 1994]. De la même façon, Wang *et al.* obtiennent des concentrations d'adduits à l'albumine égales à 34,4 fmol/mg chez les salariés très exposés d'une cokerie contre 21,9 fmol/mg chez les salariés moins exposés de la même usine [Wang 2007]. Les niveaux de ce biomarqueur sont seulement deux fois plus élevés chez 124 salariés de la production d'électrode de carbone (0,12 fmol/mg) que dans le groupe non exposé [Käfferlein 2010]. Dans la population générale, la majorité des études concluent à une sensibilité insuffisante des méthodes de dosage [Käfferlein 2010]. Seuls Scherer *et al.* obtiennent des valeurs faibles mais quantifiables, avec respectivement 0,04 fmol/mg (48 % $< \text{LD}$) et 0,02 fmol/mg (70 % $< \text{LD}$) chez les sujets fumeurs ($n = 27$) et non-fumeurs ($n = 42$) [Scherer 2000].

La mesure des adduits à l'hémoglobine passe uniquement par le dosage du BaP-7,8,9,10-tétraol après hydrolyse acide, en GC-MS après dérivation, ou en HPLC-FLD sans dérivation. Les niveaux de ce biomarqueur atteignent 31,8 fmol/mg dans un groupe de 206 salariés d'une cokerie et, à partir d'un modèle de régression linéaire, l'exposition aux HAP totaux explique 6 % de sa variation. Néanmoins, l'inconvénient de ce biomarqueur est son manque de sensibilité. En effet, l'augmentation de ses concentrations n'apparaît que pour de très fortes expositions, supérieures à $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ d'HAP totaux. Ainsi, en population générale, aucune étude ne trouve de différence significative entre les fumeurs et les non-fumeurs. Scherer *et al.* rapportent une concentration sérique d'adduits à l'hémoglobine de 0,11 fmol/mg chez 27 sujets fumeurs contre 0,08 fmol/mg pour les non-fumeurs [Scherer 2000]. Ragin *et al.* obtiennent des valeurs très proches avec une moyenne de 0,07 fmol/mg d'adduits chez 9 fumeurs et 0,10 fmol/mg chez 6 non-fumeurs [Ragin 2008].

La relation entre polymorphisme des enzymes de la métabolisation du BaP et adduits aux protéines a été étudiée chez des patients fumeurs atteint d'un cancer du poumon. Les auteurs concluent que les niveaux d'adduits à l'albumine sont significativement augmentés chez les patients fumeurs atteint d'un cancer du poumon et possédant l'allèle *CYP1A1**M1 ou *CYP1A1**M2 par rapport au phénotype sauvage. En revanche aucun effet n'est observé pour les adduits à l'hémoglobine [Pastorelli 1998]. Dans une étude récente, le polymorphisme du *CYP2B6* dans une population de salariés d'une cokerie, a été significativement associé à une diminution des niveaux d'adduits à l'albumine, mais pas les variations génétiques des *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CYP2E1* [Huang 2012a].

II.3. Conclusion sur les biomarqueurs de dose efficace du BaP

Ces biomarqueurs de dose efficace présentent l'intérêt d'être spécifiques du BaP et surtout plus proches du risque sanitaire. Néanmoins, à ce jour, le manque de connaissances scientifiques sur la représentativité de leurs concentrations dans le compartiment sanguin par rapport à la dose efficace dans les tissus, ne permet pas de les utiliser comme étant prédicteurs du risque d'apparition du cancer.

De plus, bien que leur longue demi-vie d'élimination permette d'évaluer l'imprégnation chronique des individus, elle complique l'évaluation pendant de courtes périodes telle que la semaine de travail. Les niveaux d'exposition très élevés nécessaires à l'augmentation de leur concentration est également un problème et une amélioration significative de la sensibilité des méthodes analytiques, au moins pour les adduits aux

protéines est encore requise. Enfin, le prélèvement sanguin reste un acte invasif en milieu professionnel, toujours plus difficile à utiliser en routine que le prélèvement urinaire.

III. BIOMARQUEURS D'EFFETS GENOTOXIQUES

La recherche d'effets liés à une exposition aux HAP passe par l'évaluation de la génotoxicité ou de la mutagénicité. Elle peut prendre la forme d'une recherche des altérations primaires de l'ADN (lésions oxydatives, test des comètes), d'une recherche de dommages chromosomiques (aberrations chromosomiques, test des micronoyaux, échange de chromatides sœurs) ou encore d'une recherche des mutations génétiques.

III.1. Lésions oxydatives

Les ERO sont des radicaux libres constamment produits dans les cellules, provenant notamment du métabolisme énergétique, qui sont normalement pris en charge par les mécanismes de la défense anti-oxydante. Si cet équilibre est rompu (exposition trop importante aux ERO ou mécanismes de défenses défaillants), ils peuvent exercer une action oxydante sur les lipides, les protéines et l'ADN cellulaire. Parmi les nucléotides, la guanine est la base la plus sensible aux réactions d'oxydation. La base oxydée majoritaire qui en résulte est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodGuo) (Figure 25).

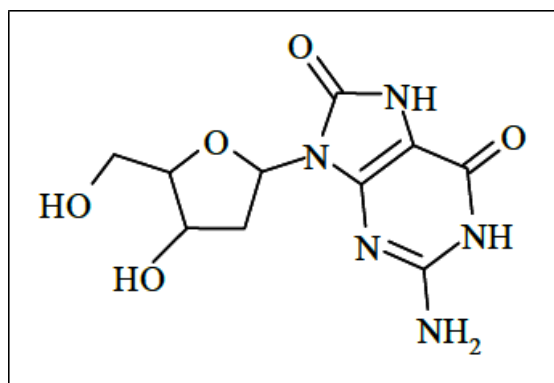


Figure 25 : Structure chimique de la 8-oxodGuo

Le métabolisme oxydatif des HAP peut être responsable de la production de grandes quantités d'ERO au sein des cellules. La 8-oxodGuo peut donc être analysée au sein des lymphocytes circulants ou dans les urines en tant que biomarqueur d'effet des HAP.

Le dosage de la 8-oxodGuo dans les lymphocytes fait appel à l'HPLC couplée à la détection électrochimique ou à la GC-MS, après extraction et hydrolyse de l'ADN. Puisque ces cellules sanguines sont constamment renouvelées, cet indicateur reflète un état d'équilibre. Mais la variabilité de la durée de vie des différentes populations lymphocytaires pose le problème de la période d'exposition couverte par ce biomarqueur.

Les niveaux de 8-oxodGuo plasmatique sont supérieurs chez les travailleurs des usines de fabrication d'électrodes de carbone et de pierres réfractaires par rapport aux groupes témoins, mais cette différence n'est retrouvée dans aucune autre situation d'exposition professionnelle de cette étude [Angerer 2007]. Marczynski *et al.*, observent une augmentation de ce biomarqueur dans le plasma de salariés exposés aux fumées de bitume entre le début et la fin de poste, mais également dans le plasma des salariés non exposés. De plus, bien que les concentrations de 8-oxodGuo en début et en fin de poste soient supérieures chez les salariés

exposés, elles ne sont pas corrélées aux concentrations urinaires de 1-OHP en fin de poste [Marczynski 2011]. A l'inverse, Käßlerlein *et al.* ne trouvent aucune différence dans les niveaux de cet indicateur entre les témoins fumeurs ou non-fumeurs et les salariés d'une cokerie, d'une usine de pierres réfractaires et de transformateurs [Käßlerlein 2012].

En parallèle des niveaux sanguins, la concentration urinaire de 8-oxodGuo reflète quant à elle une exposition plus récente et représente la fraction de bases oxydées éliminées de l'organisme. Elle peut être considérée comme un indicateur du stress oxydant de l'organisme. Son dosage fait appel à l'HPLC-ECD, à l'HPLC-MS/MS ou à la technique immuno-enzymatique ELISA. Le Tableau 7 présente des niveaux urinaires de 8-oxodGuo en population générale et professionnellement exposée aux HAP, issus de la littérature.

Tableau 7 : Niveaux urinaires de 8-oxodGuo (μmol/mol)

Référence	Sujets	Prélèvement	N	8-oxodGuo Moy ± ET [min-max]
POPULATION GENERALE				
[Chien and Yeh 2010]	Non-fumeurs	Matin	2	1,9
[Liu 2006]	Travailleurs de cokerie non exposés			
	Non-fumeurs	Fin de poste		1,0 [0,7-1,2]
	Fumeurs			1,7 [1,0-4,6]
[Harri 2005]	Non-fumeurs	Fin de poste		
		Hiver	17	1,6 ± 0,6
		Eté		1,4 ± 0,5
[Pilger 2001]	Non-fumeurs		45	1,6 ± 0,5
	Fumeurs		23	2,0 ± 0,4
POPULATION PROFESSIONNELLE				
[Marie 2009]	Silicium	Début de semaine, début de poste	51	2,8
		Fin de semaine, début de poste	13	2,8
		Fin de semaine, fin de poste	67	2,9
[Liu 2006]	Cokerie			
	Non-fumeurs	Fin de poste		2,9 [1,5-30,1]
	Fumeurs			1,9 [1,1-5,5]
[Harri 2005]	Garagistes et ripeurs	Fin de poste		
		Hiver	29	1,5 ± 0,4
		Eté		1,6 ± 0,3
[Wu 2003]	Cokerie	Fin de poste	217	3,7 ± 3,2

Les études montrent rarement une augmentation des niveaux urinaires de la 8-oxodGuo en lien avec l'exposition. Marie *et al.*, ne trouvent aucune augmentation chez des salariés de l'industrie du silicium après une journée ou une semaine de travail, alors que

l'augmentation des niveaux urinaires de 1-OHP dans les deux cas est significative [Marie 2009]. Aucune variation des concentrations urinaires en fonction des saisons n'est également mise à jour dans la population générale ou chez des garagistes [Harri 2005]. Concernant la consommation de tabac, les niveaux de 8-oxodGuo urinaires sont très proches entre les fumeurs et les non-fumeurs non-exposés professionnellement [Liu 2006, Pilger 2001]. Enfin, les concentrations urinaires de ce biomarqueur sont plus élevées en population professionnelle dans le cas d'expositions importantes chez des salariés des cokeries [Liu 2006, Wu 2003], mais pas lors d'expositions plus faibles, dans l'industrie du silicium [Marie 2009] ou chez les garagistes et ripeurs [Harri 2005].

La faible concordance des concentrations urinaires de 8-oxodGuo et l'exposition aux HAP, ne permet donc pas l'utilisation de ce biomarqueur dans le cas du suivi biologique des populations. Le fait que de nombreux xénobiotiques possèdent un mécanisme d'action oxydatif peut être à l'origine de ces discordances, mais également des facteurs extraprofessionnels comme l'âge, l'exercice physique ou l'alimentation [Sajous 2008].

III.2. Cassures de l'ADN

Ces lésions sont issues d'une atteinte clastogénique qui a comme origine une attaque génotoxique (stress oxydant, adduits,...) associée à une défaillance des mécanismes de réparation de l'ADN. Elles sont recherchées dans les lymphocytes obtenus à partir de sang veineux hépariné. Des cellules nasales, buccales et urothéliales peuvent également être utilisées. Le test des comètes est une méthode permettant de quantifier les dommages à l'ADN de façon globale. Il s'agit d'une électrophorèse sur gel en milieu alcalin, permettant de

séparer les brins d'ADN en fonction de leur poids moléculaire, les plus petits migrant le plus loin vers l'anode. La migration des fragments est ensuite révélée par fluorescence. Lors de la présence de nombreux fragments de faibles poids moléculaires issus des cassures de l'ADN, le signal de fluorescence dessine la queue d'une comète (Figure 26).

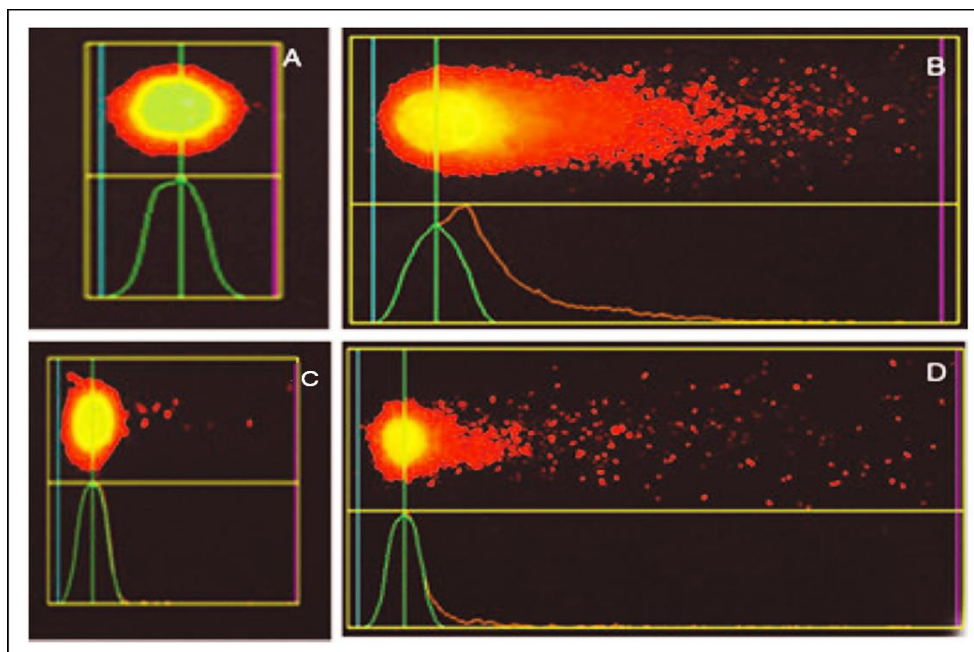


Figure 26 : Test des comètes sur des cellules de vessie. A : cellules non exposées ; B : control positif ; C : cellules exposées à 0,1 $\mu\text{mol/l}$ de BaP ; D : cellules exposées à 10 $\mu\text{mol/l}$ de BaP [Verma 2012]

Les cassures à l'ADN sont plus importantes chez les salariés fortement exposés des cokeries et des usines de fabrication d'électrodes de carbone, mais aussi moins exposés dans le cas d'application de bitume, que chez les témoins non exposés [Angerer 2007, Marczyński 2011]. Pourtant, ces lésions de l'ADN ne sont corrélées ni aux concentrations d'HAP totaux ou de BaP atmosphériques, ni aux niveaux urinaires de 1-OHP, chez près de 300 salariés des

usines de pierres réfractaires, d'électrodes en graphite, de cokeries, de distillation de houille ou de production d'acier [Pesch 2007]. En revanche, le polymorphisme génétique des mécanismes de réparation de l'ADN semble corrélé à la quantité de cassures de l'ADN observée chez des salariés des cokeries [Qiu 2007].

Il existe donc une forte variabilité intra- et interindividuelle provenant du bagage génétique, de l'état pathologique, de l'alimentation, de l'existence d'une médication et de l'hygiène de vie, pouvant expliquer les différences observées. De plus, ce type de dommages à l'ADN n'est pas spécifique d'une exposition aux HAP et est très dépendant du tissu biologique étudié. Par exemple, dans les cellules de foie humain, le BaP pur ou dans des mélanges environnementaux entraîne peu de lésions oxydatives in-vitro contrairement à la production d'adduits à l'ADN [Tarantini 2009, Tarantini 2011a]. L'importance des défenses anti-oxydantes de ce type de cellules pourrait expliquer en partie ce résultat.

III.3. Effets cytogénétiques

Ces indicateurs sont recherchés dans les lymphocytes circulants.

Les aberrations chromosomiques sont définies comme des modifications du nombre ou de la structure des chromosomes dues à des délétions, des duplications ou des réarrangements du matériel génétique. Ce biomarqueur a une valeur prédictive dans l'apparition du cancer mais la plupart des niveaux obtenus chez des salariés exposés aux HAP ne sont pas significativement différents de ceux des témoins [Brandt and Watson 2003].

Les micronoyaux sont constitués de matériel génétique séparé du noyau véritable de la cellule. Cette séparation a lieu lorsque les chromosomes sont cassés lors de la division cellulaire, empêchant leur intégration dans le noyau de la cellule fille. Dans le cas des HAP, le nombre de micronoyaux est significativement plus élevé dans les lymphocytes de sujets exposés à des émissions de fours à coke que chez les sujets non exposés [Liu 2006]. Pour des expositions plus faibles, dans le secteur de la production d'aluminium, aucune différence n'a été observée [Crebelli 2002].

Les échanges de chromatides sœurs sont des recombinaisons intra-chromosomiques de chromatides. On mesure le pourcentage de cellules avec une fréquence élevée de ces échanges. Les études ne retrouvent pas d'augmentation significative de la fréquence des échanges de chromatides sœurs ni de relation dose-réponse chez les sujets professionnellement exposés aux HAP [Brandt and Watson 2003]. Une augmentation est néanmoins rapportée chez des sujets fumeurs [DeMarini 2004].

Bien que ces trois biomarqueurs d'effets cytogénétiques semblent corrélés lors d'une exposition professionnelle à divers génotoxiques [Somorovská 1999], l'absence de signification de leurs niveaux vis-à-vis du risque individuel et la grande variabilité intra- et interindividuelle, ne permettent pas leur utilisation dans la SBE humaine aux HAP. En revanche, ils peuvent s'avérer très intéressants pour valider la pertinence d'IBE, par la comparaison des niveaux de ces derniers avec ces effets précoces induits par les expositions.

III.4. Conclusion sur les biomarqueurs d'effet du BaP

En conclusion, un certain nombre des biomarqueurs de génotoxicité sont actuellement utilisés en recherche mais leurs principales limites restent leur interprétation délicate, liée à leur manque de spécificité, et leur valeur prédictive mal connue. En revanche, leur intérêt est indéniable pour des évaluations de risque dans des populations exposées en milieu de travail, même si l'étude de leur lien avec la survenue d'un cancer reste encore à faire avant qu'ils puissent être utilisés en routine [Pillière 2001].

IV. SYNTHESE DU CHAPITRE 3

Le BaP étant le seul HAP classé cancérigène certain pour l'homme par le CIRC et sa présence étant systématique mais variable au sein des mélanges professionnels et environnementaux, le suivi de son exposition apparaît comme l'approche la plus adaptée pour évaluer le risque cancérigène des populations exposées aux HAP.

Les biomarqueurs d'effets ne peuvent pas encore être utilisés dans le cadre de la surveillance des populations. En effet, les concentrations urinaires de 8-oxodGuo ne sont pas concordantes avec l'exposition aux HAP et les résultats du test des comètes sont soumis à de fortes variabilités intra- et interindividuelles. Alors que les lésions cytogénétiques en lien avec la production d'adduits à l'ADN sont des marqueurs plus intéressants, il n'existe pas encore de lien clair entre les valeurs de ces tests et le risque individuel d'apparition du cancer. Devant ce manque de spécificité et de prédictivité, l'évaluation des risques passe actuellement par la

mise en évidence de groupes de sujets très exposés et donc par la quantification de leur exposition.

La SBE est la méthode la plus proche des risques sanitaires car elle prend en compte toutes les sources d'exposition et d'absorption, les équipements de protection mais aussi les facteurs intrinsèques des sujets exposés. Les biomarqueurs de dose efficace les plus pertinents semblent être les adduits à l'ADN leucocytaire. Mais leur cinétique d'élimination n'est pas adaptée à l'évaluation des expositions journalières et variables des salariés et le prélèvement sanguin reste un acte plus invasif que le prélèvement urinaire en milieu industriel. Enfin, la sensibilité analytique des méthodes nécessaires à leur dosage nécessite encore d'être améliorée. Les biomarqueurs de dose interne sont donc de meilleurs candidats en tant qu'IBE au BaP. Parmi eux le BaP-7,8,9,10-tétraol et les acides mercapturiques du BaP urinaires sont intéressants, puisqu'ils sont issus du cancérogène ultime qu'est le BPDE. Mais leurs niveaux urinaires très faibles imposent des LD que seules des méthodes analytiques trop complexes pour être utilisées en routine, peuvent atteindre. Ainsi, le choix s'est porté sur le 3-OHBaP urinaire. En effet, ce composé est majoritaire au sein du métabolisme du BaP, l'influence du polymorphisme des enzymes de détoxification sur ses proportions semble faible et il est corrélé aux biomarqueurs de dose efficace que sont les adduits du BPDE dans les poumons. Les techniques d'analyse déjà publiées permettent d'atteindre des LD suffisantes pour que ce biomarqueur puisse être utilisé en milieu professionnel et en environnement général. Néanmoins d'importantes améliorations tant au niveau des étapes pré-analytiques qu'analytiques sont nécessaires pour que ce dosage puisse être utilisé en routine dans le cadre de la SBE.

CHAPITRE 4 :

DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE D'UNE METHODE DE

DOSAGE DU 3-HYDROXYBENZO(A)PYRENE URINAIRE

UTILISABLE EN ROUTINE POUR LA SURVEILLANCE

BIOLOGIQUE DES EXPOSITIONS

Article 1 : « Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction »

I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

De 1994 à nos jours, quatorze méthodes de dosage du 3-OHBaP urinaire ont été publiées. L'utilisation de l'HPLC-MS/MS [Fan 2006] ou de la GC-MS [Campo 2008] n'a pas permis d'atteindre des LD inférieures à 1 µg/l. Seules des techniques de GC-MS haute résolution [Romanoff 2006], ou de chromatographie liquide ultra performante couplée à un spectromètre de masse en mode tandem (UPLC-MS/MS) [Sarkar 2010] ont permis d'atteindre une meilleure sensibilité (LD=0,05 ng/l). Toutefois, ces méthodes de dosage nécessitent une étape pré-analytique de dérivatisation chimique de l'analyte et l'utilisation de matériel à ce jour disponible en laboratoire de recherche uniquement. Elles n'apparaissent donc pas adaptées à une utilisation en routine.

A côté de ces techniques prometteuses, la plupart des études ont utilisé l'HPLC-FLD [Ariese 1994, Buratti 2007, Gündel and Angerer 2000, Hollender 2000, Simon 2000, Wang 2005]. Bien que plus répandu et moins onéreux, ce type de détection est moins spécifique. La séparation chromatographique de l'analyte et des constituants urinaires, potentiellement interférents, doit donc être optimisée. De plus, une séparation efficace permet d'atténuer le signal du bruit de fond et d'obtenir une sensibilité satisfaisante. Ainsi, la seule méthode analytique publiée permettant d'atteindre une LD inférieure à 0,1 ng/l par HPLC-FLD a nécessité le montage d'un système de séparation chromatographique utilisant quatre colonnes fabriquées in situ et reliées par trois de vannes de commutation [Simon 2000].

Dans ce travail, l'objectif était de développer une méthode de dosage sensible permettant d'atteindre une LD d'au moins 0,1 ng/l qui soit utilisable en routine dans de nombreux laboratoires. Deux étapes ont été associées pour atteindre la sensibilité requise : la

première est la concentration de l'échantillon par extraction en phase solide (SPE), afin de purifier l'échantillon et d'augmenter le signal et la deuxième est l'optimisation des conditions analytiques de dosage par HPLC-FLD à l'aide de deux colonnes chromatographiques disponibles dans le commerce et commutées par une vanne.

II. MATERIEL ET METHODE

II.1. Mise au point et validation analytique du dosage du 3-OHBaP

II.1.1. Pré-analytique

La prise d'essai urinaire a été fixée à 10 ml en rapport avec les faibles niveaux attendus de 3-OHBaP. Le 3-OHBaP étant éliminé sous forme glucurono- et sulfo-conjuguée dans les urines, la première étape est l'hydrolyse enzymatique des échantillons, pour obtenir le métabolite sous forme libre. La β -glucuronidase/arylsulphatase (Roche) a été utilisée afin de réaliser cette déconjugaison. La durée de cette étape a été fixée à 2 heures conformément aux études déjà publiées [Simon 2000, Toriba 2003].

Les urines une fois hydrolysées ont été purifiées par SPE permettant l'élimination de nombreux composés urinaires (Figure 27). Les cartouches SPE utilisées étaient des Sep-Pak C18 d'une capacité de 500 mg (Waters).

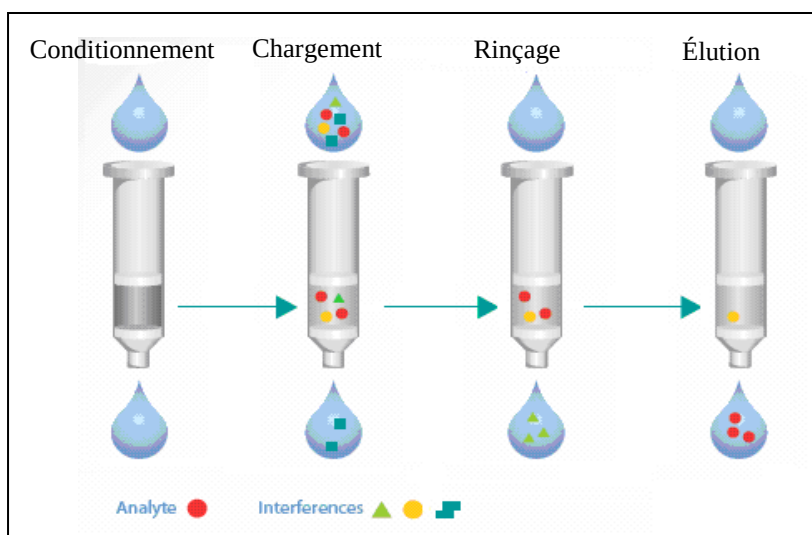


Figure 27 : Phases composant la SPE

Cette étape de SPE a été automatisée à l'aide d'un automate ASPEC GX-271 (Gilson) afin de maîtriser tous les paramètres influençant la qualité de la purification des urines et le rendement d'extraction du 3-OHBaP. De plus l'automatisation de cette tâche a amélioré la reproductibilité des analyses. Les réglages utilisés pour les différentes phases de la SPE sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres de l'extraction en phase solide automatisée

Phase de la SPE	Solution	Volume (ml)	Débit appliqué (ml/min.)
Conditionnement	Méthanol	5,0	5,0
	Méthanol/Eau (50/50 ; v/v)	10,0	5,0
Chargement	Urine hydrolysée	20,0	10,0
Lavage	Méthanol/Eau (50/50 ; v/v)	10,0	10,0
Elution	Méthanol	5,0	5,0

L'éluat résultant de cette étape est ensuite évaporé à sec et repris dans un volume de 1 ml, soit une concentration par dix par rapport à la prise d'essai urinaire de 10 ml.

II.1.2. Conditions analytiques

Malgré l'étape pré-analytique de purification, de nombreux composés interférents sont encore présents dans l'échantillon concentré. Afin d'améliorer la séparation chromatographique et d'éliminer ces interférences, deux colonnes distinctes ont été placées en série. La première colonne de purification (C1) est une Supelcosil LC-18 50mm x 4mm ; 5µm (Supelco). La deuxième colonne d'analyse (C2) était une PAH-C18 (250mm x 3mm ; 5µm) (Waters). Le matériel utilisé (Figure 28) était une HPLC Alliance 2695 (Waters) composée d'un module de séparation possédant une pompe quaternaire (P1) et couplée à une pompe 600 (P2) (Waters) par une vanne de commutation 10 voies 2 positions.

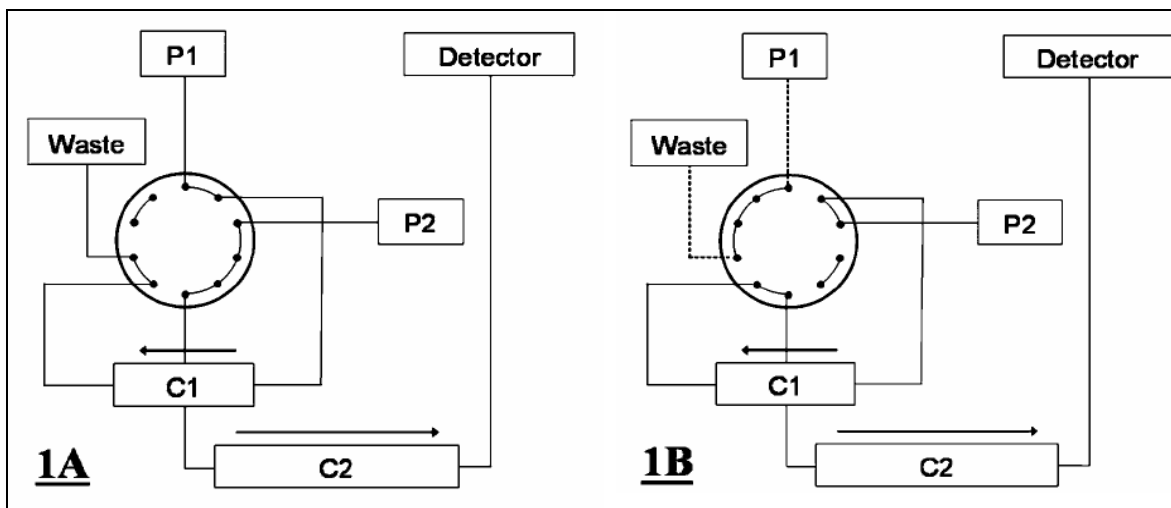


Figure 28 : Schéma du système chromatographique. P1, pompe 1 ; P2, pompe 2 ; C1, colonne 1 : Supelcosil LC-18 (150 x 4,6mm, 5µm) ; C2, colonne 2 : PAH-C18 (250mm x 3mm, 5µm) ; Waste, poubelle ; Detector, fluorimètre

Ce système a été configuré pour utiliser la technique dite de « heart-cut » [Kuklennyik 2009]. Après l'injection de l'échantillon la vanne est en position d'analyse (Figure 28, 1A). P1 applique un gradient de solvants (E1) sur la colonne C1 pour effectuer une première séparation, tandis que P2 conditionne la colonne C2. Les composés peu retenus sur C1 sont éliminés. Entre la 18^{ème} et la 20^{ème} minute de l'analyse chromatographique, la vanne passe dans sa position alternative (Figure 28, 1B). P2 applique un gradient (E2) de solvant sur les deux colonnes en série, et les composés urinaires élués de C1 à ce moment, dont le 3-OHBaP, ne sont plus éliminés mais transférés sur C2. Pour finir, la vanne retourne en position d'analyse et une seconde séparation a lieu au sein de la colonne C2 à l'aide d'un gradient de solvant linéaire appliqué par P2. Les paramètres des gradients de solvants et des positions associées de la vanne, sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Résumé des paramètres de l'analyse chromatographique

Temps (min)	Phase mobile E1		Position de la vanne	Phase mobile E2	
	Tampon formiate 0,5mM (%)	Méthanol (%)		Tampon formiate 0,5mM (%)	Méthanol (%)
0	100	0	A	20	80
2	100	0	A	-	-
6	70	30	A	-	-
8	70	30	A	-	-
10	50	50	A	-	-
12	50	50	A	-	-
13	↓	↓	A	20	80
14	20	80	A	↓	↓
18	16	84	B	15	85
20	14	86	B	13	87
24	10	90	A	↓	↓
25	0	100	A	↓	↓
30	0	100	A	↓	↓
31	50	50	A	↓	↓
32	100	0	A	↓	↓
33	-	-	A	0	100
35	-	-	A	20	80
45	100	0	A	20	80

La détection a été assurée par un fluorimètre 2475 (Waters) dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement réglées à 425 et 465 nm.

II.1.3. Validation analytique

La validation de la méthode de dosage a été réalisée à partir des recommandations de l'Association Française de Normalisation [ISO 2003] et de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques [Ramond 2002]. Le rendement d'extraction, la linéarité de la gamme d'étalonnage, la justesse, la fidélité, la LQ et la LD de l'analyse ont été déterminés.

II.2. Analyses urinaires

Le 3-OHBaP a été mesuré dans des urines issues de la population générale non exposée professionnellement. Les sujets étaient des hommes et des femmes âgés de 18 à 65 ans, dont 23 étaient non-fumeurs et 13 étaient fumeurs (plus de 10 cigarettes par jour).

Afin d'étudier le potentiel du 3-OHBaP comme nouveau biomarqueur d'exposition aux HAP, ses niveaux urinaires ont été comparés à ceux du 1-OHP, métabolite classiquement utilisé à ce jour. Un échantillon d'urine du matin pour l'analyse du 3-OHBaP et un échantillon d'urine du soir pour le 1-OHP ont été récoltés pour chaque sujet. Les concentrations des métabolites ont été corrigées par la créatinine urinaire et seuls les échantillons dont les niveaux de créatinine étaient compris entre 0,3 g/l et 3 g/l ont été inclus dans l'étude.

Le dosage du 1-OHP urinaire a été réalisé au sein du laboratoire par une méthode analytique déjà décrite dans la littérature [Leroy 2010] et répondant aux normes du système de contrôle externe de la qualité, organisé par la société allemande pour la médecine professionnelle et environnementale.

La créatinine urinaire a été mesurée par une méthode modifiée de la réaction de Jaffé, pour prendre en compte les variations inter et intra-individuelles de la diurèse. Les concentrations urinaires sont donc exprimées en mol/mol.

La significativité des résultats a été étudiée à partir du test non paramétrique de Mann-Whitney pour les comparaisons de moyennes et du test non paramétrique de Spearman pour les corrélations. Le risque d'erreur a été fixé à 5 % pour les deux tests statistiques.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Optimisation de la méthode d'extraction

L'étape d'extraction du 3-OHBaP est essentielle pour l'obtention d'une sensibilité satisfaisante. En effet, la matrice urinaire contient de très nombreux composés pouvant interférer avec le signal de fluorescence de l'analyte lors de sa détection. De plus, au vu des niveaux urinaires de 3-OHBaP attendus, la concentration de l'échantillon était nécessaire.

Certaines méthodes de dosage de métabolites des HAP ont utilisé l'extraction liquide-liquide [Buratti 2007, Campo 2008] mais cette technique nécessite de trop grands volumes de solvants et demande beaucoup de temps. La SPE semblait plus appropriée et présentait une sélectivité meilleure pour la purification des composés urinaires interférents [Gündel and Angerer 2000, Hollender 2000, Romanoff 2006].

Les tests de différentes phases solides composant les cartouches d'extraction et de différents solvants permettant le nettoyage des urines et l'élution du 3-OHBaP ont conduit à l'utilisation des Sep-Pak C18 500 mg (Waters). Les rendements d'extraction obtenus étaient de $77,7 \pm 7 \%$, $76,4 \pm 0,8 \%$ et $77,8 \pm 2,0 \%$ pour des concentrations urinaires de 3-OHBaP respectivement de 0,4 ng/l, 3 ng/l et 10 ng/l. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hollender et al. [Hollender 2000] et meilleurs que ceux des autres méthodes décrites dans la littérature [Ariese 1994, Gündel and Angerer 2000].

L'évaporation qui suit cette étape a été réalisée sous vide, de manière à être totale en 2 heures sans dépasser une température de 50°C, ceci pour éviter une possible dégradation de l'analyte [Wang 2009].

III.2. Conditions chromatographiques

Afin d'obtenir un bruit de fond le plus faible possible sans utiliser plus de deux colonnes chromatographiques commercialement disponibles, les compositions de la phase mobile et des phases stationnaires ont été optimisées.

La séparation des composés dans la première colonne a été améliorée en alternant les modes isocratique et gradient. Le temps de commutation des deux colonnes a été réduit à 2 minutes, de manière à transférer la totalité du 3-OHBaP, tout en limitant le nombre de composés indésirables ayant des temps de rétention proches du 3-OHBaP sur la colonne C1 de purification. La phase stationnaire de la colonne d'analyse C2 était spécifique des HAP, afin que le 3-OHBaP soit mieux retenu que les autres molécules. En effet, ce métabolite présente une structure très proche du BaP et possède donc une forte affinité pour ce type de phase stationnaire.

Pour la détection, le couple de longueur d'onde 425/460 nm (excitation/émission) a été retenu pour son rapport signal sur bruit de fond bien supérieur à d'autres couples proposés dans la littérature et testés lors de notre travail [Bouchard and Viau 1997, Gündel and Angerer 2000, Hollender 2000, Simon 2000].

Au final, l'analyse chromatographique et le reconditionnement des colonnes précédant l'injection suivante, nécessitaient 45 minutes par échantillon, ce qui est proche des temps d'analyse des méthodes de dosage publiées [Simon 2000, Whiton 1995].

III.3. Performances de la méthode

La méthode a montré une LQ de 0,05 ng/l d'urine et une LD de 0,02 ng/l d'urine ce qui est tout fait conforme à l'objectif de travail. Les dosages précédemment décrits et permettant d'atteindre une sensibilité comparable, ont été réalisés à partir d'un système chromatographique original [Simon 2000] ou à partir d'une UPLC-MS/MS, matériel aujourd'hui disponible en laboratoire de recherche uniquement [Sarkar 2010].

Le coefficient de répétabilité obtenu était inférieur à 3 % et le coefficient de fidélité intermédiaire inférieur à 4 % pour des concentrations de 0,2 ng/l, 2 ng/l et 16 ng/l. L'utilisation d'un automate pour le traitement pré-analytique a permis d'obtenir ces résultats, qui sont systématiquement meilleurs que les dosages déjà publiés, utilisant la SPE [Fan 2006, Hollender 2000, Romanoff 2006]. Les calculs de justesse ont montré des pourcentages de déviation de la valeur cible de 8,1 %, 0,3 %, et 5 %, pour des concentrations respectivement de 0,2 ng/l, 2 ng/l et 16 ng/l. La linéarité des gammes d'étalonnage a été statistiquement validée dans l'intervalle de concentrations de 0,1 ng/l à 20 ng/l.

La Figure 29 présente les chromatogrammes issus du dosage d'urines contenant des concentrations de 3-OHBaP de 0,2 ng/l (A), inférieure à la LQ (B) et de 10 ng/l (C). Le dernier chromatogramme est également obtenu pour une urine dont la concentration était de 10 ng/l, lorsque l'étape de SPE a été volontairement omise (D).

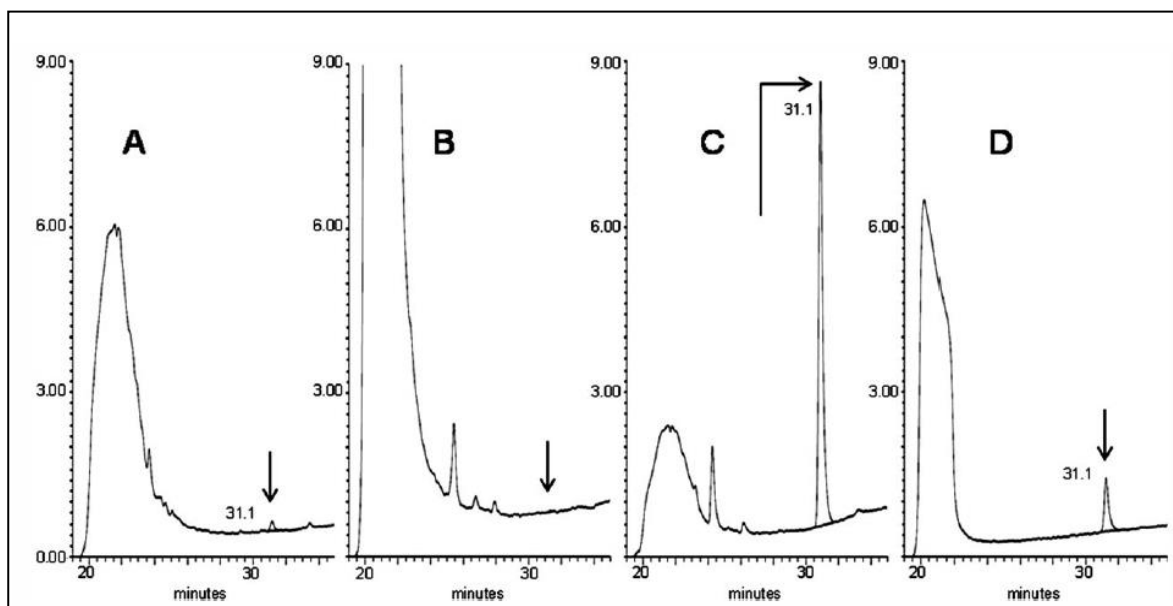


Figure 29 : Chromatogrammes urinaires. A, sujet fumeur 3-OHBP = 0,2 ng/l ; B, sujet non-fumeur 3-OHBP < LQ ; C, urine surchargée, 3-OHBP = 10 ng/l ; D, urine surchargée et dosage réalisé sans l'étape de SPE, 3-OHBP = 10 ng/l.

Quelle que soit l'urine analysée, le bruit de fond au niveau du temps de rétention du 3-OHBP (31,1 min.) était très faible. Ainsi, un pic de 3-OHBP à 0,2 ng/l, est facilement quantifiable. Pour un sujet non-fumeur, aucun pic parasite n'est détecté, démontrant la sélectivité de la méthode. Il est intéressant de voir que même lorsque l'étape de SPE est volontairement omise, le bruit de fond au niveau du temps de rétention du 3-OHBP est très faible. Cette étape pré-analytique est donc plus utile pour la concentration de l'échantillon que pour sa purification. Ce point est important car si la SPE reste essentielle pour pouvoir évaluer les niveaux urinaires de 3-OHBP des sujets fumeurs, elle devient optionnelle pour réaliser le dosage des urines de salariés dont les niveaux seraient supérieurs à 1 ng/l.

III.4. **Analyses urinaires chez des sujets fumeurs et non-fumeurs**

Dans les années 1980, Jongeneelen et al. a proposé l'utilisation du 1-OHP pour évaluer l'exposition aux HAP en mélanges [Jongeneelen 1986]. Son élimination principalement urinaire et la présence du Pyr en grande quantité dans les mélanges atmosphériques particuliers, ont pour conséquence des niveaux urinaires de 1OHP de l'ordre du µg/l, facilitant son dosage en routine. Pour les mêmes raisons, les métabolites urinaires des HAP gazeux ont été largement étudiés [Hagedorn 2009, Kuusimäki 2004, Raulf-Heimsoth 2008]. Des différences dans les concentrations urinaires de chacun de ces biomarqueurs ont été retrouvées entre des groupes de sujets fumeurs et non-fumeurs, ou entre des salariés exposés par rapport à la population générale. Néanmoins, c'est bien l'exposition aux HAP particuliers qui présente un risque cancérigène pour l'homme et tout particulièrement l'exposition au BaP. En ce sens, des méthodes de dosage ont été développées pour analyser en même temps les métabolites mono-hydroxylés du BaA, du Chr et/ou du BaP [Buratti 2007, Campo 2008, Campo 2010, Hollender 2000, Onyemauwa 2009, Rossella 2009]. Mais cette approche multi-analytes ne permet pas d'atteindre la sensibilité nécessaire à leur utilisation dans la SBE des populations aux HAP cancérigènes.

Dans ce travail, nous avons choisi de développer une méthode analytique spécifique du 3-OHBaP. En effet, ce dernier est le métabolite monohydroxylé majoritaire du BaP [Bouchard and Viau 1997, Viau 1995a], seul HAP classé cancérigène certain pour l'homme [IARC 2010]. En revanche, du fait de l'existence d'un retard de 16 heures dans sa cinétique d'élimination par rapport à celle du 1-OHP, les deux dosages ne doivent pas être réalisés dans les mêmes échantillons urinaires [Gendre 2004, Marie 2010]. Ainsi, afin d'évaluer l'exposition aux HAP sur une même journée par ces deux biomarqueurs, le 1-OHP est dosé

dans les urines récoltées le soir de l'exposition, tandis que le 3-OHBaP est dosé dans les urines récoltés le matin après l'exposition. Les niveaux urinaires obtenus dans la population de l'étude sont regroupés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP (nmol/mol) chez des sujets fumeurs et non-fumeurs.

	Nombre de cigarettes par jour	3-OHBaP Matin	1-OHP Soir
	med [min;max] m $\pm$ ET N	med [min;max] m $\pm$ ET N (< LD)	
Non-fumeurs		0,009 [0,003;0,023] 0,010 $\pm$ 0,005 23 (18)	38 [7;167] 42 $\pm$ 33 23 (0)
Fumeurs	17,8 [10;40] 20 $\pm$ 8.9 13	0,023 [0,003;0,075] 0,029 $\pm$ 0,024 13 (1)	133 [33;330] 162 $\pm$ 90 13 (0)

Med, médiane ; min, minimum ; max, maximum ; m, moyenne ; ET, écart-type ; n, nombre d'échantillons ; (n < LD), nombre de dosages inférieurs à la LD

Dans les urines de sujets non-fumeurs 78 % des concentrations de 3-OHBaP sont inférieures à la LD alors que moins de 10 % le sont chez les sujets fumeurs.

Le dosage du 3-OHBaP, par la méthode que nous avons proposée, a donc permis l'évaluation de l'exposition aux HAP liée au tabagisme. Les niveaux urinaires de 1OHP sont 3,5 fois plus élevés ($p < 0,001$), chez les sujets fumeurs que chez les non-fumeurs et ceux de 3-OHBaP, 2 fois plus élevés ($p < 0,05$). L'augmentation plus forte du 1OHP par rapport au 3-OHBaP entre les deux groupes est expliquée par la quantité plus importante de Pyr que de BaP, dans la fumée de cigarette [Ding 2005]. Ces résultats confirment également la présence

de 3-OHBaP dans les urines de sujets fumeurs, à des niveaux 5000 fois plus faibles que ceux de 1-OHP. Les concentrations de 3-OHBaP urinaire quantifiées ici sont très proches de celles décrites dans la littérature. Ainsi, Sarkar et al. a évalué à 193 pg la quantité de ce métabolite éliminée en 24 h chez des sujets dont la consommation tabagique était comparable à celle de notre étude [Sarkar 2010]. Les niveaux obtenus dans notre travail correspondent à une quantité éliminée en 24 h de 155 pg, en considérant un volume d'excrétion urinaire moyen en 24 h de 1,5 litres et une concentration urinaire moyenne de créatinine égale à 1.5 g/l. Lafontaine et al, a rapporté des concentrations de 3-OHBaP de 0,023 nmol/mol dans les urines de 24 h de sujets fumeurs [Lafontaine 2006]. Les concentrations que nous avons quantifiées le lendemain matin de l'exposition à la cigarette sont donc identiques à celles retrouvées dans des urines de 24 h, mais l'échantillonnage est plus simple et plus adapté à une surveillance biologique de routine.

En conclusion, la méthode développée possède une LD égale à 0,05 ng/l qui permet d'évaluer le niveau d'exposition au BaP de la population générale, ce qui est essentiel pour pouvoir comparer les niveaux des salariés professionnellement exposés. De plus, le système chromatographique est simple et tout le matériel utilisé est disponible dans le commerce. La SPE, qui est une étape habituellement laborieuse, a été automatisée accélérant la cadence analytique et améliorant la robustesse de la méthode. Cette technique analytique est donc adaptée à la réalisation de la SBE au BaP en routine par le dosage du 3-OHBaP urinaire.

IV. ARTICLE PUBLIE

Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction

Damien Barbeau,^{ab} Anne Maître^{*ab} and Marie Marques^a

Received 21st June 2010, Accepted 15th December 2010

DOI: 10.1039/c0an00428f

Many workers and also the general population are exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and benzo[a]pyrene (BaP) was recently classified as carcinogenic for humans (group 1) by the International Agency for Research on Cancer. Biomonitoring of PAHs exposure is usually performed by urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) analysis. 1-OHP is a metabolite of pyrene, a non-carcinogenic PAH. In this work, we developed a very simple but highly sensitive analytical method of quantifying one urinary metabolite of BaP, 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHBP), to evaluate carcinogenic PAHs exposure. After hydrolysis of 10 mL urine for two hours and concentration by automated off-line solid phase extraction, the sample was injected in a column-switching high-performance liquid chromatography fluorescence detection system. The limit of quantification was 0.2 pmol L⁻¹ (0.05 ng L⁻¹) and the limit of detection was estimated at 0.07 pmol L⁻¹ (0.02 ng L⁻¹). Linearity was established for 3-OHBP concentrations ranging from 0.4 to 74.5 pmol L⁻¹ (0.1 to 20 ng L⁻¹). Relative within-day standard deviation was less than 3% and relative between-day standard deviation was less than 4%. In non-occupationally exposed subjects, median concentrations for smokers compared with non-smokers were 3.5 times higher for 1-OHP ($p < 0.001$) and 2 times higher for 3-OHBP ($p < 0.05$). The two urinary biomarkers were correlated in smokers ($\rho = 0.636$; $p < 0.05$; $n = 10$) but not in non-smokers ($\rho = 0.09$; $p > 0.05$; $n = 21$).

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitously present in the environment and represent a very rich family of compounds, since more than one hundred derivatives have been identified. Produced during incomplete combustion of organic matter, they are always emitted in the atmosphere as mixtures, the composition of which strongly depends on the raw material, combustion circumstances and meteorological conditions. PAHs occur both in gaseous form and adsorbed to particles, depending on the volatility of the PAHs species. More highly condensed molecules with four or more rings are particle bound, whereas lighter PAHs remain in the gas phase.¹ PAHs exposure is associated with cancer of the lung, skin and bladder.^{2,3} Only benzo[a]pyrene (BaP) is classified as a recognized carcinogen (group 1) by the International Agency for Research on Cancer

(IARC), and a dozen of other particulate PAHs are classified in group 2A or 2B (likely or suspected carcinogens).³ High exposure levels have been reported in some workplaces, such as factories producing graphite electrodes, aluminium, tar, fireproof material and coke ovens. The general population is also exposed to PAHs in tobacco smoke, traffic exhaust, wood heating or industrial emissions.⁴ In non-smokers, food is responsible for 96% of PAHs contamination⁵ and some studies have also indicated that dermal exposure may be an important exposure pathway.^{6–8} While airborne monitoring of PAHs concentrations may underestimate individual internal burden, biological monitoring of PAHs metabolites plays an important role in determining the internal dose, and thus the real exposure taking into account all ways of absorption.⁹ PAHs can be analyzed in urine by “reverse metabolism”,¹⁰ but this approach is not used for biomonitoring because of the risk of urine contamination during sampling as well as unexplained variability.¹¹ Analysis of urinary metabolites of PAHs is more appropriate. Once PAHs have been absorbed, they undergo metabolic transformation mediated by enzymes of the CYP450 family to form epoxides.¹² These reactive compounds can react with glutathione. They can also spontaneously rearrange to form phenols or be catalytically hydrolyzed to form dihydrodiols.¹³ These hydroxylated metabolites are excreted in feces or urine in the form of sulfate or glucuronide conjugates.¹⁴

^aEquipe EPSP, Environnement et Prédiction de la Santé des Populations—Laboratoire TIMC (UMR CNRS 5525), Université Joseph Fourier Grenoble, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France. E-mail: anne.maitre@ujf-grenoble.fr; Fax: +33 4 76 63 75 02; Tel: +33 4 76 63 75 01

^bLaboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, Département de Biochimie Toxicologie Pharmacologie, Pole de Biologie, CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

Over the past 20 years, internal exposure has been determined by assessment of urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), the mono-hydroxylated metabolite of pyrene.¹⁵ However, pyrene is not carcinogenic and the ratio between atmospheric concentrations of pyrene and BaP or carcinogenic PAHs varies depending on emission sources. Thus, exposure to carcinogenic compounds cannot be extrapolated automatically from urinary 1-OHP levels. Inversely, 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHBP), a metabolite of BaP, could possibly assess internal exposure more accurately in relation to the carcinogenic potential.¹⁶ It is difficult to use because of the high sensitivity of the analytical method required for biomonitoring. Levels of urinary 3-OHBP were in fact 1000 to 30 000 times lower than those of 1-OHP in the urine of workers exposed to creosote or to coke-ovens, as well as in dermatological patients after treatment with a coal tar ointment.^{15,17,18} This can be explained by metabolism of BaP in the form of many metabolites such as phenols, diols, triols, quinones, tetraols or epoxydes, and by their predominant elimination in feces, *via* biliary excretion.¹⁹ Thus, levels of urinary 3-OHBP are very low, in the range of pmol L⁻¹ (ng L⁻¹), and most analytical methods previously published were not sufficiently sensitive to discriminate environmental exposures. The use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)²⁰ or standard gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)²¹ made it possible to reach limits of detection (LOD) in the range of nmol L⁻¹ (μg L⁻¹). Romanoff *et al.*²² and Sarkar *et al.*²³ obtained better sensitivity using isotope-dilution gas chromatography-high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS) and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), respectively. However, these promising techniques for biomonitoring are currently available only in research laboratories and additional tedious analyte derivatization step is necessary. Most analytical methods described used high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLUO).^{17,24–28} With this technique, the lowest detection and quantification limits of urinary 3-OHBP published were 0.3 pmol L⁻¹ (0.08 ng L⁻¹) and 0.9 pmol L⁻¹ (0.25 ng L⁻¹), respectively.²⁶ The HPLC system consisted of two chromatographic pumps, four automated switching valves, three purification columns and one analytical column. This method was used to perform urinary 3-OHBP analysis among workers in different workplaces²⁹ and also among non-occupationally exposed people.³⁰ However, it is not easy to use in routine analysis due to the complex switching system and home-made packed columns.

This paper describes a new analytical method which can be routinely used for biological monitoring of BaP exposure in the general population. To achieve sufficient sensitivity to study the influence of tobacco smoking on concentrations of urinary 3-OHBP, we chose to associate two steps: after purification and concentration of urine samples by automated off-line solid phase extraction (SPE), 3-OHBP was analyzed by automated column-switching HPLC-FLD. The method was used to quantify urinary 3-OHBP concentrations in smokers and non-smokers who were not occupationally exposed to PAHs. Associations between urinary 3-OHBP and 1-OHP concentrations were studied. This method using commercially available SPE cartridges and a conventional detector will allow us to perform urinary analysis of 3-OHBP in routine by many laboratories and, thus, to get missing but important biological data for evaluation of carcinogenic PAH exposure.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Acetate buffer solution (pH = 4.66) was obtained from Merck® (Germany). All aqueous solutions were prepared with water purified using the Milli-Q treatment system (Millipore®, USA). Chromatographic grade methanol G Chromasolv® (purity 99.9%) was obtained from Sigma-Aldrich (Germany) and used throughout in all methanolic solutions. Ammonium formate (purity 98%) and formic acid AnalAR Normapur® (purity 99–100%) were purchased from Fluka AG (Switzerland) and Prolabo (France), respectively. β-Glucuronidase/arylsulfatase solution (from Helix pomatia) was obtained from Roche Diagnostics GmbH (Germany). 3-Hydroxybenzo[a]pyrene (10 μg mL⁻¹ in methanol) was from LGC Standards (France).

Apparatus

The SPE off-line system was an automated sample preparation with extraction cartridges system (GX-271 ASPEC®, Gilson, France). It consists of an automatic sampling injector module, a 406 dilutor-pipettor model with 10 mL and 100 μL syringes and a set of racks and accessories for handling SPE cartridges, urine samples and solvents.

The SPE cartridges used were Sep-Pak® C18 500 mg with a capacity of 6 mL (Waters, France). Evaporation was performed with a Labconco® laboratory concentrator (Kansas City, USA) composed of a CentriVap® concentrator, a CentriVap® cold trap and a Vacubrand® CVC 3000 pump (Wertheim, Germany).

Chromatographic analysis was performed using an HPLC Waters® Model 2695 separation module with a quaternary pump (P1), a thermostatted compartment for chromatographic columns, an autosampler, an automatic injector and an integrated degasser. Autosampler used was composed of a two millilitres sample loop and a two millilitres injection syringe which allowed to inject large volumes of sample. This module was coupled with a Waters 600 controller pump (P2) and a Waters in-line degasser AF by an automatic ten-ports two-position switching valve. Detection was performed by a Waters 2475 multi-wavelength fluorescence detector. The purification column (C1) was a Supelcosil® LC-18 (50 mm × 4 mm, 5 μm) from Supelco and the analytical column (C2) was a PAH-C18 (250 mm × 3 mm, 5 μm) from Waters.

Creatinine and 1-OHP analysis

Urine samples were collected in 50 mL polypropylene tubes. A 2 mL aliquot was twice sampled in order to determine the quantity of creatinine by Jaffe's method and 1-OHP concentration was determined using a previously described method.³¹ Briefly, aliquot was diluted 1 : 1 in buffer before hydrolysis and directly injected into the chromatographic system. On-line extraction of 1-OHP was performed with a Supelguard® C18 column (Sigma-Aldrich). Finally, 1-OHP elution was performed with a LiChrospher® C18 column (Merck) by means of a water/methanol gradient. The excitation wavelength of the fluorescence detector was 333 nm and the emission wavelength was 390 nm. The LOD was 91.6 pmol L⁻¹ (20 ng L⁻¹). The laboratory meets

the German Society for Occupational and Environmental Medicine external quality control system for 1-OHP.

Development and validation of 3-OHBP analysis

Pre-analytical procedure. A 10 mL aliquot of urine was diluted 1 : 1 in buffer to adjust the pH to 4.6. The sample was incubated for 2 h at 37 °C in a water bath, with 20 µL of β-glucuronidase/arylsulfatase in a 50 mL Falcon® tube (Becton Dickinson Labware, USA). Time of hydrolysis was based upon published data.^{26,32} After hydrolysis, the mixture was centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4 °C, before performing SPE using the ASPEC® system.

The first step consisted of washing the needle and the external tubing with 2 mL of methanol. Between each step, the needle and the transfer tubing of the dilutor were rinsed with 1 mL of methanol and a 30 µL air gap was generated inside the transfer tubing before aspiration of other liquids in order to avoid cross-contamination. The SPE cartridge was first conditioned with 5 mL of methanol and 10 mL of 50 : 50 (v/v) methanol : water mixture. The whole sample was loaded onto the SPE cartridge. The washing step was performed with the same 50 : 50 (v/v) methanol : water mixture. 5 mL of methanol was required for elution, and the eluate was transferred into a glass tube of 8 mL closed by a septum. Automated SPE conditions are summarized in Table 1. The methanol extract was evaporated to dryness at 50 °C under vacuum within 120 min. The dry residue was dissolved in 500 µL of methanol and ultrasonicated for 5 min before dilution 1 : 1 in water. Lastly, 400 µL of the sample were injected into the chromatographic system.

Analytical conditions. HPLC analysis was performed at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ using 0.5 mM formate buffer and methanol. Formate buffer was obtained after dissolution of ammonium formate in water and addition of formic acid to reach a pH = 3.5. Both columns C1 and C2 were thermostatted at 30 °C while samples were kept at 10 °C. Excitation and emission wavelengths were fixed at 425 and 465 nm, respectively.

During sample injection, the system was in “analysis position” (Fig. 1A). The C1 column performed an initial separation of urinary compounds with a mobile phase (E1) while C2 was preconditioned by the mobile phase E2. Between 18 min and 20 min, the switching valve was turned to its alternate position (Fig. 1B) to transfer analytes to C2, *i.e.* just at the time of elution

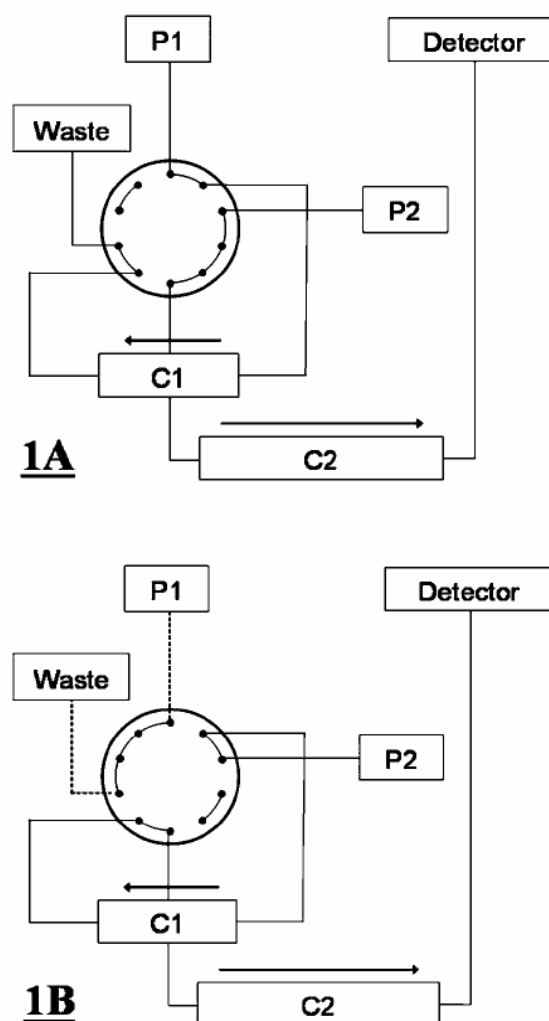


Fig. 1 (A) Chromatographic system in the “analysis position”: the P1 pump provides a gradient on the C1 column and the P2 pump provides a gradient on the C2 column. (B) Chromatographic system in its alternate position to transfer analytes from C1 to C2: the flow rate of P1 is diverted to trash and the P2 pump provides a gradient on both columns.

of 3-OHBP from C1, known as “heart-cut”.³³ The C1 and C2 columns were eluted by E2 using the P2 pump while the flow rate of P1 was diverted to trash. After the system returned to the “analysis position” (Fig. 1A), elution of 3-OHBP was performed using a linear gradient of solvent on the C2 column while C1 was cleaned and reconditioned with E1 to prepare the next injection. Elution gradients and associated switching valve positions are summarized in Table 2.

Standards and calibration curve. A stock solution of 3-OHBP (10 µg mL⁻¹) was prepared and diluted in methanol to obtain three working standard solutions: 40 ng mL⁻¹ (S1), 2 ng mL⁻¹ (S2) and 0.2 ng mL⁻¹ (S3). No loss of 3-OHBP occurred during the storage of stock solution at -18 °C for six months.

The calibration curves were carried out by spiking 3-OHBP in a 10 mL aliquot of blank urine at concentrations of 0.4, 1.9, 11.2, 37.3, 74.5 pmol L⁻¹ (0.1, 0.5, 3, 10, and 20 ng L⁻¹). These samples

Table 1 Automated solid-phase extraction scheme

SPE steps	Liquid	Volume/ mL	Dispensing flow-rate/ mL min ⁻¹
Conditioning	Methanol	5.0	5.0
	Methanol : water (50 : 50;v/v)	10.0	5.0
Sample loading	Hydrolyzed urine	15.0	10.0
Washing	Methanol :	10.0	10.0
	water (50 : 50;v/v)		
Elution	Methanol	5.0	5.0

Table 2 Composition of mobile phases and position of switching valve during the whole run. Valve is in analysis position (A) or alternate position (B) and solvent proportions of elution gradient can be stable (—) or in progress (↓)

Time/ min	Mobile phase E1		Position of valve	Mobile phase E2	
	Formate buffer (%)	Methanol (%)		Formate buffer (%)	Methanol (%)
0	100	0	A	20	80
2.0	100	0	A	—	—
6.0	70	30	A	—	—
8.0	70	30	A	—	—
10.0	50	50	A	—	—
12.0	50	50	A	—	—
13.0	↓	↓	A	20	80
14.0	20	80	A	↓	↓
18.0	16	84	B	15	85
20.0	14	86	B	13	87
24.0	10	90	A	↓	↓
25.0	0	100	A	↓	↓
30.0	0	100	A	↓	↓
31.0	50	50	A	↓	↓
32.0	100	0	A	↓	↓
33.0	—	—	A	0	100
35.0	—	—	A	20	80
45.0	100	0	A	20	80

were analyzed as described above for experimental samples. Non-smokers and non-occupationally exposed volunteers provided blank urine samples. Since no commercial certified solution of 3-OHBAp was available, internal quality control (QC) samples were prepared in blank urine samples at 3-OHBAp concentrations of 0.7, 7.5 and 59.6 pmol L⁻¹ (0.2, 2 and 16 ng L⁻¹). For a given urine sample, the retention time was compared with that of an external standard, and 3-OHBAp was quantified by the peak area measurement method.

Analytical validation. The analytical validation procedure was in accordance with the recommendations of the French Standardized Technical Specifications³⁴ and those of the French Society of Pharmaceutical Science and Technology.³⁵ Extraction recovery, linearity, accuracy, precision, LOD and limit of quantification (LOQ) were determined. Unfortunately, no external quality control or no Certified Reference Materials exist for 3-OHBAp analysis in urine.

In order to determine the losses which occur during extraction, blank urine samples were spiked with 3-OHBAp at 1.5, 11.9, 35.8 pmol L⁻¹ (0.4, 3.2 and 9.6 ng L⁻¹) in triplicate for each concentration and purified by automated SPE as described above. In addition, blank urine samples from the same pool were directly purified by automated SPE, then eluate was spiked with 3-OHBAp at the same amounts as previously described. The extraction recovery was calculated from the quotient $\pm$ standard error of the area units which were obtained by spiking urine samples before and after SPE.

Linearity was established from three calibration curves prepared on three different days. Two statistical tests with $\alpha = 0.05$ were performed: the Cochran test to evaluate the homogeneity of variances and the Fisher–Snedecor test to study the difference between zero and the deviation from linearity.

Accuracy and precision were determined using QC at 0.7, 7.5 and 59.6 pmol L⁻¹. For each concentration, the same sample was analyzed six times on three different days. Accuracy was quantified by calculating the percentage deviation from the mean of the target value. Precision was determined by calculating relative standard deviations for within-day (RSD_{WIT}) and between-day (RSD_{BET}) precision.

The LOD was estimated by multiplying by three the signal-to-noise ratio (*S/N*) of 30 blanks. The LOQ was equal to the lowest concentration with a relative standard deviation (RSD) <10% from the analysis of 10 spiked urine samples.

Study population

The subjects were healthy male volunteers between 18 and 65 years old, non-occupationally exposed to PAHs: 23 non-smokers and 13 smokers (>10 cigarettes per day). The participants lived in Grenoble or in its suburbs. They were given no special instructions concerning diet. One morning urine sample for 3-OHBAp analysis and one evening urine sample for 1-OHP analysis were collected from each participant during February and May. All metabolite concentrations were normalized to urinary creatinine. Only samples with a creatinine level between 2.7 and 26.5 mmol L⁻¹ (0.3 and 3 g L⁻¹) were included in the data analysis.

Statistical analysis was conducted with SPSS Statistics 17.0 software (SPSS, France). Metabolite concentrations lower than the LOD and lower than the LOQ were assigned values equal to half of their value. Non-parametric tests were performed to compare urinary concentration values of the two groups (Mann–Whitney test) and to study their correlations (Spearman test). ρ and *p* values under 0.05 were considered significant.

Results and discussion

Optimization of the extraction method

To achieve a very low detection limit, a step of purification and concentration of urine samples was necessary before analysis. To this end, the liquid–liquid extraction (LLE) method has been employed for PAHs,^{21,24} but it requires large volumes of solvents and is tedious and time-consuming. Due to its better selectivity for sample purification, SPE seems more appropriate.^{22,27,28} Furthermore, SPE can be automated, unlike LLE. The control flow of sample loading, cartridge washing and analyte elution makes it possible to optimize the extraction recovery of metabolites and to improve reproducibility. The first step was to test the 3-OHBAp recovery of different SPE cartridges using different solvent mixtures for cartridge conditioning, washing and analyte elution. Because of excessive retention of 3-OHBAp in the cartridge, whatever the solvent mixture used, resulting in poor recovery, Oasis® HLB 200 mg and 150 mg (Waters, France) were not retained. On the contrary, considerable loss of analyte during sample loading was observed with Sep-Pak® C8 500 mg SPE cartridges (Waters, France). The best results were obtained with Sep-Pak® C18 500 mg SPE cartridges: the extraction yields obtained were 77.7 $\pm$ 7%, 76.4 $\pm$ 0.8% and 77.8 $\pm$ 2.0%, for 1.5, 11.9 and 35.8 pmol L⁻¹ of urinary 3-OHBAp, respectively.

These results were in the same range as those of Hollender *et al.*,²⁷ but better than those of other studies where recoveries

reached about only 60%.^{17,28} Indeed, the improvement in recovery was achieved—thanks to the cartridge conditioning and washing with methanol : water mixture. Firstly, it led to better purification of the sample without elution of analyte during the wash. Secondly, it prevented excessive retention of 3-OHBP during loading. Consequently, 5 mL of methanol were sufficient for analyte elution. But in the case of 3-OHBP, the difficulties of the SPE step were not only correlated with too much or too little retention in the cartridges. Wang *et al.* succeeded in improving extraction recovery of 3-OHBP using gold nanoparticles instead of the classic evaporation step, showing that because of degradation of the analyte, evaporation was also a limiting step.³⁶ In this work, the low elution volume used was rapidly evaporated (120 min) at only 50 °C, which ensured the absence of analyte degradation during this step.

Chromatographic conditions

Sensitivity is much better when background noise is low, which implies excellent chromatographic separation of the compounds. Sample clean-up can be improved by increasing the number of columns²⁶ or by using special columns.²⁸ For trace determination of urinary 3-OHBP with a more conventional system, the performances of the mobile and solid phases had to be optimized.

The pH was adjusted to reduce the interactions between urinary impurities and the column's stationary phase without changing the retention time of 3-OHBP. A low concentration of formate buffer (0.5 mM) was sufficient to reach a pH of 3.5, avoiding any risk of crystallization of salts in the chromatographic system. Finally, background noise was limited by the use of very high purity methanol and pure methanol was injected to check purity before each series of analyses.²⁸ Addition of vitamin C at 5.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1 mg L^{-1}) in the mobile phase to improve peak resolution has been proposed by several authors.^{26,37,38} However, this option was not retained because it led to a column memory effect.

For separation on the C1 column, the gradient used was optimized. During start of the run, isocratic and gradient modes were alternated in order to improve purification. Then, between 14 and 24 min the percentage of methanol was increased from 80 to 90%, so as to obtain the best separation. In consequence, only 3-OHBP and some compounds whose elution took place exactly during the time of switch were injected into the analytical column. The switching time was set at 2 min to ensure complete transfer of 3-OHBP from C1 column to C2 column without transfer of undesirable compounds.

For the second separation, the gradient was determined so that the percentage of methanol during the switch was the same in both chromatographic columns. Consequently, the interfering peaks had a poor retention in C2 column and were eluted very close to the switch. On the contrary, 3-OHBP was eluted later at about 31 min (Fig. 2). This can be explained by the choice of the stationary phase of C2 column which was specific for PAHs analysis. Indeed, the chemical structure of 3-OHBP is very similar to that of BP and is responsible for its strong affinity with this stationary phase.

To perform the detection, many couples of wavelengths were proposed in the literature: 248/439 nm, 265/430 nm, 262/439 nm or 425/460 nm (λ excitation/ λ emission).^{16,26–28,39} In order to

minimize the background response and increase the selectivity, the couple 425/460 nm was chosen because of a high λ excitation. Interfering peak was never observed with these wavelengths.

Finally, the run time was set at 45 min so that the columns were fully reconditioned before the next injection, in accordance with other data.^{26,39}

Method performance

LOQ was 0.2 pmol L^{-1} (0.05 ng L^{-1}) with an RSD of 9%, and LOD was estimated at 0.07 pmol L^{-1} (0.02 ng L^{-1}) using either area or height peak measurement. RSD_{WIT} was less than 3% and RSD_{BET} was less than 4% for 0.7, 7.5 and 59.6 pmol L^{-1} . Percentage deviations from the mean of the target value (accuracy) were 8.1%, 0.3% and 5% for 0.7, 7.5 and 59.6 pmol L^{-1} , respectively. Linear equations of calibration curves were $y = 153\,206x + 7218.3$ ($r^2 = 0.999$), $y = 144\,371x + 1372.4$ ($r^2 = 0.999$) and $y = 145\,359x - 13\,699$ ($r^2 = 0.999$) on three days respectively. The Cochran test did not identify any significant heterogeneity of variance. The Fisher–Snedecor test showed that the slope was significantly different from zero and there was no significant deviation from linearity. The mean regression equation of the three calibration curves was $y = 147\,645x - 1703$ ($r^2 = 0.943$). The linearity of the analytical method was thus established for 3-OHBP concentrations ranging from 0.4 to 74.5 pmol L^{-1} .

Gundel *et al.* obtained a LOD of 22.4 pmol L^{-1} (6 ng L^{-1}) combining off-line and on-line SPE.²⁸ However, this sensitivity was not sufficient for urinary 3-OHBP monitoring and an expensive “tailor-made” pre-column was necessary. Ariese *et al.*¹⁷ reached an LOD of 1.9 pmol L^{-1} (0.5 ng L^{-1}) with only one C₁₈ column, but with a time-consuming derivatization step of 3-OHBP and a sophisticated laser-excited Shpol'skii spectrometry detector. Only use of four columns with different stationary phases made it possible to reach an LOD of 0.3 pmol L^{-1} (0.08 ng L^{-1}) and an LOQ of 0.9 pmol L^{-1} (0.25 ng L^{-1}).²⁶ However, this approach used a complex home-made switching system and the four columns had to be packed in the laboratory. To obtain a LOQ of 0.2 pmol L^{-1} (0.05 ng L^{-1}), Sarkar *et al.* recently developed a method using a new sensitive system, *i.e.* Acquity UPLC® coupled with AB/Sciex API 5000®.²³ However, this promising technique for biomonitoring is currently available only in research laboratories and requires tedious analyte derivatization step.

The method we propose reached an excellent sensitivity and specificity performances using conventional detector, and commercially available SPE cartridges making it a method of choice for routine analysis of the 3-OHBP in urine. Finally, thanks to automated extraction, intraday and interday variabilities were always lower than those of other authors who used SPE,^{20,22,27} justifying the fact that we did not use an internal standard.

Results are shown in Fig. 2. The peak of Fig. 2A corresponded to a 3-OHBP urinary concentration of 0.7 pmol L^{-1} (0.2 ng L^{-1}), *i.e.* a very low level, and was clearly seen. Conversely, after injection of a non-smoker urine sample, background noise was very low and no peak could be identified, demonstrating the selectivity of the method (Fig. 2B). To monitor the relevance of SPE step, 400 μL of hydrolyzed urine spiked with 37.3 pmol L^{-1}

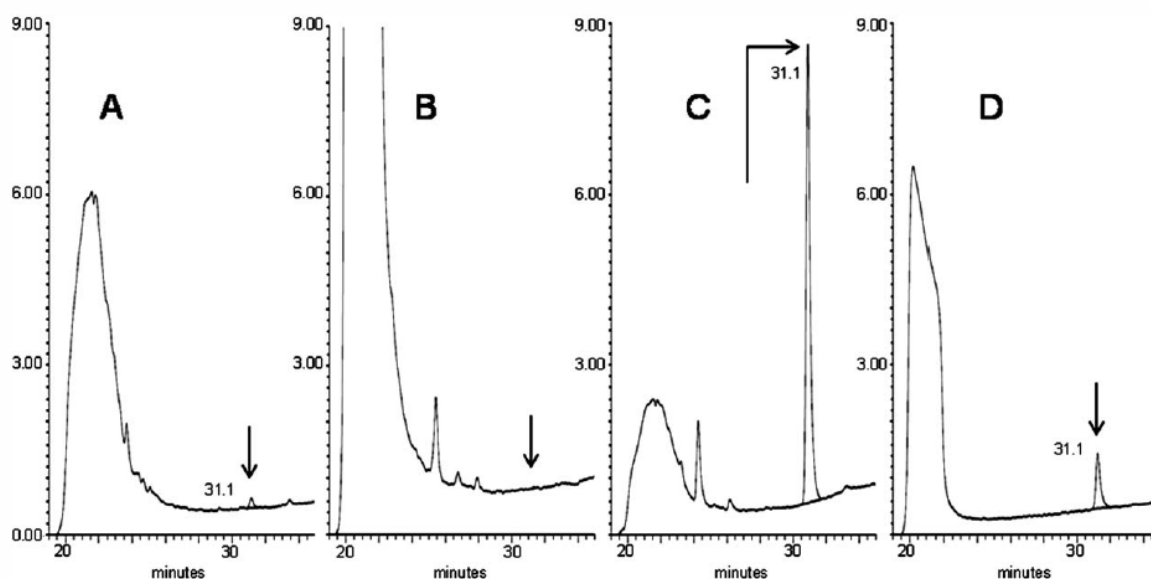


Fig. 2 Chromatograms of human urine samples: (A) smoker, 3-OHBP = 0.7 pmol L^{-1} (0.2 ng L^{-1}); (B) non-smoker, 3-OHBP < 0.2 pmol L^{-1} (0.05 ng L^{-1}); (C) spiked blank urine with SPE step, 3-OHBP = 37.3 pmol L^{-1} (10 ng L^{-1}); (D) spiked blank urine without SPE step, 3-OHBP = 37.3 pmol L^{-1} (10 ng L^{-1}).

(10 ng L^{-1}) of 3-OHBP were injected with and without this pre-analytical handling (Fig. 2C and D). In either case, the 3-OHBP peak was well separated from the other urinary compounds. Analyte response was 10 times lower due to the absence of sample concentration and background noise remained low. SPE step was more useful to concentrate than to purify the sample. If the SPE concentration step and the collection of an important volume of urine are necessary to achieve the sensitivity required for quantification of 3-OHBP patients smoking, it will be possible to omit the SPE concentration or to reduce the volume of urine sample to evaluate PAH exposure among workers involved in industrial sectors where 3-OHBP levels are higher than 1 ng L^{-1} .

Toriba *et al.* identified the 1-, 3- and 9-OHBaPs as *in vitro* major metabolites of benzo[a]pyrene by recombinant P450 1A1 and observed a co-elution between 1- and 3-OHBP under simple analytical conditions.³² However, with more efficient analytical separation, only the 3-OHBP was detected in human urine because its fluorescence intensity was between five and eight fold higher than other monohydroxy-benzo[a]pyrene isomers. Moreover, 3-OHBP concentrations were always much higher than those of 9-OHBP in urine of rats whatever the route of absorption.¹⁶ So even if a coelution of different isomers is always possible, the quantification bias of 3-OHBP level will be very small due to low abundance and low fluorescence intensity of other isomers.

Urinary analysis

Jongeneelen *et al.* were the first to propose 1-OHP for PAHs biomonitoring.¹⁵ This pyrene metabolite is the most common biomarker of exposure to these compounds. Pyrene is one of the most predominant particular PAHs in atmospheric mixtures and its metabolism produces only a single monohydroxylated metabolite eliminated in urine, due to its high rotational

symmetry.⁴⁰ Thus, levels of urinary 1-OHP were in the nmol L^{-1} ($\mu\text{g L}^{-1}$) range, which facilitated its analysis.⁹ In the same way, metabolites of gaseous PAHs like naphthalene, fluorene or phenanthrene were also studied.^{41–43} Significant differences were found between smokers and non-smokers and between pre- and post-shift workers for all these biomarkers. Indeed, like 1-OHP, their glucuronide conjugates are principally eliminated in urine, and their parent compounds are present at high levels in mixtures. However, except naphthalene which has been classified as possibly carcinogenic to humans (group 2B) by the IARC, neither pyrene nor other gaseous PAHs are carcinogenic and ratios between them and BaP are a function of emission sources. Even if these biomarkers appear to be good indicators of total PAHs exposure, carcinogenic risk cannot be extrapolated from their urinary concentrations.

For these reasons, we chose to study urinary 3-OHBP. Although BaP represents less than 5% of atmospheric particulate PAHs and its metabolites are principally eliminated in feces, it is the only PAH classified as a recognized carcinogen (group 1) by the IARC.³ Consequently, a very highly sensitive method was necessary for its analysis because its urinary levels were in the pmol L^{-1} (ng L^{-1}) range.

Various methods have been developed to analyze monohydroxy-benzo[a]anthracene, -chrysene, and/or -BaP in the same run.^{21,24,27,44–46} In these studies, all concentrations of urinary 3-OHBP were below the LOQ because of inadequate sensitivity. Only Gundel *et al.* succeeded in quantifying this metabolite in urine samples from workers engaged in the production of fire-proof materials, and found a median concentration of $5.9 \text{ nmol mol}^{-1} \text{ creat}$ (21 ng L^{-1} for a mean urinary creatinine concentration of 1.5 g L^{-1}), *i.e.* very high urinary levels.⁴⁷ Moreover, 3-OHBP urinary excretion reaches a maximum 16 h after that of 1-OHP after respiratory or intravenous intake,^{48,49} preventing the analysis of these two metabolites in the same urine sample. In this study, the analytical method that we developed did not

Table 3 Urinary concentrations of 3-OHBP and 1-OHP for smokers and non-smokers. Values corresponding to the median (med), minimum (min), maximum (max), mean (m) $\pm$ standard deviation (SD), number of samples (n) and number of samples with a concentration below the LOD ($n < \text{LOD}$) are presented. N.R.: not relevant

	Number of cigarettes consumed per day med [min;max], $m \pm \text{SD}$, n	3-OHBP/nmol mol ⁻¹ creat med [min;max], $m \pm \text{SD}$, n ($n < \text{LOD}$)	1-OHP/nmol mol ⁻¹ creat med [min;max], $m \pm \text{SD}$, n ($n < \text{LOD}$)
Non-smokers	N.R.	0.009 [0.003;0.023], 0.010 ± 0.005 , 23 (18)	38 [7;167], 42 ± 33 , 23 (0)
Smokers	17.8 [10;40], 20 ± 8.9 , 13	0.023 [0.003;0.075], 0.029 ± 0.024 , 13 (1)	133 [33;330], 162 ± 90 , 13 (0)

simultaneously analyze several metabolites, but was specific to a single metabolite, in order on the one hand to reach sufficient sensitivity and on the other hand to evaluate exposure within the appropriate sampling time.

Urinary 3-OHBP and 1-OHP were analyzed in smokers and non-smokers. In order to investigate how tobacco consumption affected urinary concentrations, and because of their different toxicokinetics, evening and next morning urine samples were collected and analyzed for 1-OHP and 3-OHBP, respectively. For smokers, median values were 0.023 nmol mol⁻¹ creat for 3-OHBP and 133 nmol mol⁻¹ creat for 1-OHP. All urinary concentrations were above the LOD except for one sample in the case of 3-OHBP (Table 3, Fig. 3). For non-smokers, median values of urinary concentrations were 0.009 and 38 nmol mol⁻¹ creat for 3-OHBP and 1-OHP, respectively. 78% of 3-OHBP concentrations were below the LOD whereas all 1-OHP concentrations were above the LOD (Table 3, Fig. 3). One urine sample from a non-smoker was found to contain a 3-OHBP concentration above the LOQ ($C = 0.2 \text{ pmol L}^{-1}$), probably due to a diet rich in BP. For both metabolites, urinary levels were statistically higher in smokers than in non-smokers. Median values were 3.5 times higher ($p < 0.001$) for 1-OHP and 2 times higher ($p < 0.05$) for 3-OHBP. This difference resulted from higher levels of pyrene than BP in cigarette smoke.⁵⁰ As expected, 3-OHBP concentrations were on average 5000 times lower than 1-OHP concentrations. Correlation between the two biomarkers was significant for smokers ($\rho = 0.636$; $p < 0.05$; $n = 10$). In this group, the most important source of PAHs exposure was tobacco consumption, and all subjects were exposed to a similar mixture of PAHs resulting from cigarette smoke. Inversely, there was no significant correlation for the non-smokers group ($\rho = 0.09$; $p > 0.05$; $n = 21$). This can be explained by the number of urinary 3-OHBP concentrations below the LOD and the different sources of exposure for each subject.

These results were in accordance with previous studies. Using a very sensitive method, Leroy *et al.* were unable to detect 3-OHBP in urine samples from non-occupationally exposed non-smokers.³¹ Using the same analytical technique, Forster *et al.* found median values of urinary 3-OHBP concentration ranging from 0.21 to 0.54 nmol mol⁻¹ creat (from 0.77 to 1.90 ng L⁻¹ for an average urinary creatinine concentration of 1.5 g L⁻¹) among workers exposed to high atmospheric levels of PAHs in the industrial sectors of coking plants, refractories, converter infeed and graphite electrode production.²⁹ Significant correlations were found between urinary 1-OHP and 3-OHBP. However, these values were obtained without taking into account the gap between 3-OHBP and 1-OHP excretion and both metabolites were quantified in the same sample. Considering a volume of urine excreted in 24 h equal to 1.5 litres and an average of urinary creatinine concentration equal to

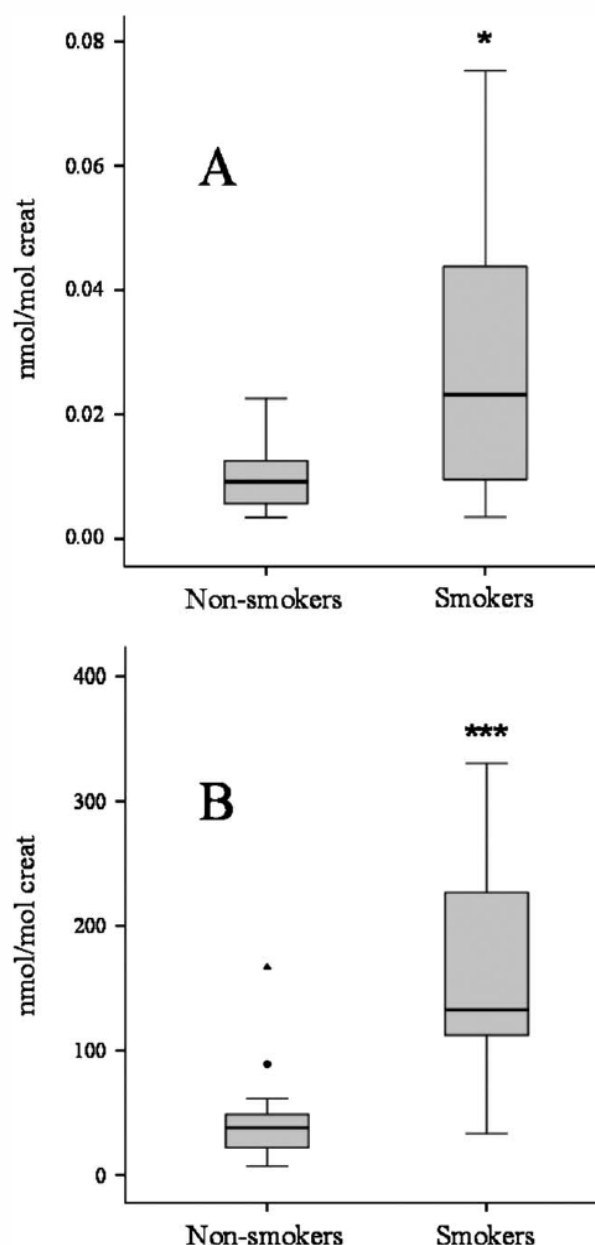


Fig. 3 Box plots for 3-OHBP (A) and 1-OHP (B) urinary concentrations for smokers and non-smokers. Horizontal lines represent from bottom to top: the minimum, 25th, 50th, 75th percentiles and the maximum when the outliers (●) and the extreme values (▲), which are outside the 1.5 and the 3 box length range from the upper and lower value of the box, respectively, are not considered. The statistical significance of differences between the two groups is shown: * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$.

1.5 g L⁻¹, the averages of urinary 3-OHBP concentrations were around 155 pg/24 h and 54 pg/24 h for smokers and non-smokers, respectively. These values were close with those of Sarkar *et al.* which found an average of urinary 3-OHBP concentrations equal to 193 pg/24 h and 56 pg/24 h for smokers and non-smokers, respectively, with a comparable tobacco consumption among smokers population.²³ The poor difference observed in the smokers group can be explained by the approximation made to compare data. Indeed, Lafontaine *et al.* reported medians of urinary 3-OHBP concentrations equal to 0.023 nmol mol⁻¹ creat and 0.011 nmol mol⁻¹ creat for smokers and non-smokers, respectively, *i.e.* perfectly matched with our results.³⁰ Thus, 3-OHBP concentrations determined in urine samples collected the next morning were very close to the 24 h concentrations and sample collection was easier.

Conclusion

The proposed method reached high sensitivity to detect urinary 3-OHBP levels below 0.2 pmol L⁻¹. The chromatographic system was very simple because only one switching valve and two solvents were used. Moreover, all materials used were commercially available, in particular the chromatographic columns, and SPE, considered the most laborious step, was entirely automated thanks to ASPEC. Pre-analytical sample preparation was not time consuming and the robustness of the method was improved. The extreme simplicity and the low cost of our method will allow us to perform urinary analysis of 3-OHBP in routine by many laboratories and, thus, to get missing but important biological data for evaluation of carcinogenic PAH exposure.

Biomonitoring has the advantage to take into account all the environmental and occupational PAH emissions and all routes of absorption even if it is difficult to distinguish the part of occupational and environmental sources to explain low urinary levels of 3-OHBP. Health risk is linked to internal dose whatever be the source of pollution. In order to use a metabolite as a biomarker of exposure to ubiquitous pollutants, it is important to know the background level of general population. The performances of our method make it possible to study tobacco consumption as a source of exposure to BP in non-occupationally exposed populations. Urinary 3-OHBP concentration was significantly higher in smokers than in non-smokers. This biomarker can therefore be used as a sensitive and specific indicator of occupational carcinogenic PAHs, levels monitored in workplaces becoming lower and sometimes closer to those of the general environment.

Acknowledgements

This study was supported by the "Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail", the "Direction Régionale du Travail, de l'Emploi et de la Formation Professionnelle" and the "Cluster Environnement" of the region Rhône-Alpes.

References

- 1 M. Rehwagen, A. Müller, L. Massolo, O. Herbarth and A. Ronco, *Sci. Total Environ.*, 2005, **348**, 199–210.

- 2 C. Bosetti, P. Boffetta and C. La Vecchia, *Ann. Oncol.*, 2007, **18**, 431–446.
- 3 IARC, in *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2010, vol. 92, 856 p.
- 4 Efsa, *EFSA J.*, 2008, **724**, 1–114.
- 5 C. A. Menzie, B. B. Potocki and J. Santodonato, *Environ. Sci. Technol.*, 1992, **26**, 1278–1284.
- 6 P. J. Boogaard and N. Van Sittert, *Sci. Total Environ.*, 1995, **163**, 203–209.
- 7 J. G. Van Rooij, M. M. Bodelier-Bade and F. J. Jongeneelen, *Br. J. Ind. Med.*, 1993, **50**, 623–632.
- 8 J. G. Van Rooij, J. H. De Roos, M. M. Bodelier-Bade and F. J. Jongeneelen, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 1993, **38**, 355–368.
- 9 F. J. Jongeneelen, *Sci. Total Environ.*, 1997, **199**, 141–149.
- 10 G. Becher and A. Bjorseth, *Cancer Lett.*, 1983, **17**, 301–311.
- 11 T. J. Buckley, J. M. Waldman, R. Dhara, A. Greenberg, Z. Ouyang and P. J. Liroy, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1995, **67**, 257–266.
- 12 W. Xue and D. Warshawsky, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, **206**, 73–93.
- 13 J. Angerer, C. Mannschreck and J. Gundel, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1997, **70**, 365–377.
- 14 J. Jacob and A. Seidel, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, **778**, 31–47.
- 15 F. J. Jongeneelen, R. P. Bos, R. B. Anzion, J. L. Theuws and P. T. Henderson, *Scand. J. Work Environ. Health*, 1986, **12**, 137–143.
- 16 M. Bouchard and C. Viau, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, **75**, 185–192.
- 17 F. Ariese, M. Verkaik, G. P. Hoornweg, R. J. van de Nesse, S. R. Jukema-Leenstra, J. W. Hofstra, C. Gooijer and N. H. Velthorst, *J. Anal. Toxicol.*, 1994, **18**, 195–204.
- 18 M. Lafontaine, C. Gendreau, P. Delsaut and P. Simon, *Polycyclic Aromat. Compd.*, 2004, **24**, 441–450.
- 19 K. Peltonen and A. Dipple, *J. Occup. Environ. Med.*, 1995, **37**, 52–58.
- 20 R. Fan, Y. Dong, W. Zhang, Y. Wang, Z. Yu, G. Sheng and J. Fu, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2006, **836**, 92–97.
- 21 L. Campo, F. Rossella and S. Fustinoni, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **875**, 531–540.
- 22 L. C. Romanoff, Z. Li, K. J. Young, N. C. Blakely, 3rd, D. G. Patterson, Jr and C. D. Sandau, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2006, **835**, 47–54.
- 23 M. Sarkar, J. Liu, T. Koval, J. Wang, S. Feng, R. Serafin, Y. Jin, Y. Xie, K. Newland and H. J. Roethig, *Nicotine Tob. Res.*, 2010, **12**, 105–116.
- 24 M. Buratti, L. Campo, S. Fustinoni, P. E. Cirila, I. Martinotti, D. Cavallo and V. Foa, *Biomarkers*, 2007, **12**, 221–239.
- 25 Y. Wang, W. Zhang, Y. Dong, R. Fan, G. Sheng and J. Fu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **383**, 804–809.
- 26 P. Simon, M. Lafontaine, P. Delsaut, Y. Morele and T. Nicot, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 2000, **748**, 337–348.
- 27 J. Hollender, B. Koch and W. Dott, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 2000, **739**, 225–229.
- 28 J. Gundel and J. Angerer, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 2000, **738**, 47–55.
- 29 K. Forster, R. Preuss, B. Rossbach, T. Bruning, J. Angerer and P. Simon, *Occup. Environ. Med.*, 2008, **65**, 224–229.
- 30 M. Lafontaine, C. Champmartin, P. Simon, P. Delsaut and C. Funck-Brentano, *Toxicol. Lett.*, 2006, **162**, 181–185.
- 31 A. Leroyer, F. Jeandel, A. Maitre, M. Howsam, D. Deplanque, M. Mazza and C. Nisse, *Sci. Total Environ.*, 2010, **408**, 1166–1173.
- 32 A. Toriba, H. Nakamura, T. Chetianukornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, T. Yokoi and K. Hayakawa, *Anal. Biochem.*, 2003, **312**, 14–22.
- 33 Z. Kuklenyik, X. Ye, L. Needham and A. Calafat, *J. Chromatogr. Sci.*, 2009, **47**, 12–18.
- 34 French-Standardized-Technical-Specifications, *Standard International Organization for Standardization (ISO) 15189:2003, Medical Laboratories—Particular Requirements for Quality and Competence*, ISO, Geneva, 2003.
- 35 B. Ramond, A. Gaillandre, N. Gibelin, N. Maignan, C. Michalski, P. Nabet, C. Niewiaski, D. Poirault, B. Poirier and H. Rigal, *STP Pharma Prat.*, 2002, **12**, 317–336.
- 36 H. Wang, W. B. Wilson and A. D. Campiglia, *J. Chromatogr., A*, 2009, **1216**, 5793–5799.

-
- 37 M. Bouchard and C. Viau, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1996, **139**, 301–309.
- 38 M. Bouchard, C. Dodd and C. Viau, *J. Anal. Toxicol.*, 1994, **18**, 261–264.
- 39 R. S. Whiton, C. L. Witherspoon and T. J. Buckley, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 1995, **665**, 390–394.
- 40 P. J. Boogaard, *Occup. Environ. Med.*, 2008, **65**, 221–222.
- 41 H. Hagedorn, G. Scherer, J. Engl, K. Riedel, F. Cheung, G. Errington, J. Shepperd and M. McEwan, *J. Anal. Toxicol.*, 2009, **33**, 301–309.
- 42 M. Raulf-Heimsoth, J. Angerer, B. Pesch, B. Marczynski, J. Hahn, A. Spickenheuer, R. Preuss, R. Rühl, P. Rode and T. Brüning, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 2008, **71**, 746–750.
- 43 L. Kuusimäki, Y. Peltonen, P. Mutanen, K. Peltonen and K. Savela, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2004, **77**, 23–30.
- 44 F. Onyemauwa, S. Rappaport, J. Sobus, D. Gajdosová, R. Wu and S. Waidyanatha, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 1117–1125.
- 45 F. Rossella, L. Campo, S. Pavanello, L. Kapka, E. Siwinska and S. Fustinoni, *Occup. Environ. Med.*, 2009, **66**, 509–516.
- 46 L. Campo, F. Rossella, S. Pavanello, D. Mielzynska, E. Siwinska, L. Kapka, P. Bertazzi and S. Fustinoni, *Toxicol. Lett.*, 2010, **192**, 72–78.
- 47 J. Gundel, K. H. Schaller and J. Angerer, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2000, **73**, 270–274.
- 48 C. Gendre, M. Lafontaine, P. Delsaut and P. Simon, *Polycyclic Aromat. Compd.*, 2004, **24**, 433–439.
- 49 C. Marie, M. Bouchard, R. Heredia-Ortiz, C. Viau and A. Maitre, *J. Appl. Toxicol.*, 2010, **30**, 402–410.
- 50 Y. S. Ding, J. S. Trommel, X. J. Yan, D. Ashley and C. H. Watson, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 471–478.

CHAPITRE 5 :

VALIDATION DU 3-HYDROXYBENZO(A)PYRENE URINAIRE

EN POPULATION PROFESSIONNELLEMENT EXPOSEE

Article 2 : « Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers »

I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

En France, près de 1,6 millions de salariés étaient exposés aux HAP dans les années 2000, incluant 93 000 travailleurs des industries de la métallurgie [Cavet and Léonard 2013]. Ces expositions sont notamment retrouvées au sein des secteurs de production d'électrodes de carbone et graphite, d'aluminium et de silicium. Les niveaux élevés d'HAP atmosphériques présents dans ces usines sont liés à l'utilisation de brai de houille pour la fabrication des anodes et des cathodes et à leur combustion pendant l'électrolyse de l'aluminium ou la réduction du silicium. Ainsi, la production d'aluminium est classée cancérigène certain pour l'homme par le CIRC depuis 2012 [IARC 2012]. Les anodes de type Söderberg, associées à un risque élevé de cancer du poumon et de la vessie [Gibbs 2007], ont été progressivement remplacées par des anodes précuites responsables de plus faibles émissions d'HAP [Carta 2004]. Les expositions se situent alors en amont de la production du métal, lors de la fabrication avant cuisson de ces électrodes, activité professionnelle classée cancérigène probable pour l'homme en 2010 [IARC 2010].

Dans ces secteurs industriels, la quantification de la dose interne de toxique est indispensable pour évaluer l'exposition professionnelle et les risques sanitaires, du fait de l'importance de l'absorption cutanée, du port variable de combinaisons, de gants et de masques respiratoires [Van Rooij 1993b]. Les mesures disponibles rapportent des concentrations urinaires de 1-OHP très largement supérieures à la valeur sans effet observé de 1 $\mu\text{mol/mol}$ [Siwińska 2004]. Les niveaux des salariés des fours d'aluminium avoisinent 3,6 $\mu\text{mol/mol}$ [Lafontaine 2000], tandis qu'ils s'élèvent à 9,2 $\mu\text{mol/mol}$ pour ceux travaillant proche des anodes [Petry 1996]. Dans l'industrie des électrodes graphite, ces niveaux sont passés de 6,8 $\mu\text{mol/mol}$ en moyenne en 1998 [Van Delft 1998] à 2,9 $\mu\text{mol/mol}$ en 2007

[Rossbach 2007] et ils sont inférieurs à 0,5 $\mu\text{mol/mol}$ chez les salariés du silicium [Marie-Desvergne 2010]. Très peu de niveaux de 3-OHBaP urinaire dans ces secteurs sont disponibles et seule une publication rapporte des concentrations urinaires médianes en fin de poste égales à 0,5 nmol/mol chez des salariés de la production d'électrodes graphite [Förster 2008].

De plus, l'évaluation de l'exposition aux HAP par secteur manque de précision car cette dernière peut varier au sein d'une même usine, en fonction des tâches effectuées par les salariés. La constitution de GEH, rassemblant plusieurs individus réalisant des activités similaires, est donc nécessaire pour la réalisation d'une évaluation pertinente.

L'objectif de ce travail est d'utiliser le 3-OHBaP urinaire pour évaluer l'exposition aux HAP cancérigènes de salariés modérément exposés dans l'industrie du silicium et fortement exposés dans les industries de production d'anodes et d'électrodes. Les concentrations urinaires de ce métabolite sont comparées à celles du 1-OHP pour évaluer sa pertinence en tant que biomarqueur. Les niveaux entre les salariés engagés dans les différents secteurs, mais également dans les différentes activités d'une même usine, sont également étudiés pour analyser la variabilité des niveaux d'exposition mais aussi des ratios 1-OHP/3-OHBaP. Enfin, les deux métabolites sont analysés dans les urines émises à différents moments de la semaine de travail, pour confirmer les temps de prélèvements optimaux.

II. MATERIEL ET METHODE

La population de l'étude était constituée de 129 hommes sains, âgés de 18 à 65 ans, travaillant dans les secteurs de la production d'anodes précuites (n=35), de cathodes (n=50) et de silicium (n=44).

Dans le premier secteur, les salariés ont été divisés en trois GEH : 1/ « Electrode maintenance », comprenant les mécaniciens et les électriciens ; 2/ « Carbon department », comprenant le déchargement et le recyclage des matières premières, le nettoyage des installations et le contrôle de la production ; 3/ « Electrode baking furnace », comprenant les conducteurs d'engins, les grutiers, les opérateurs fours et la finition des anodes cuites.

Dans le deuxième secteur, les activités des salariés appartiennent aux mêmes GEH que précédemment, excepté pour le groupe « Carbon department » qui ne comprend alors que l'extrusion de la cathode crue. Un quatrième groupe, « Pitch impregnation », correspond à l'application de brai liquide sur les électrodes après cuisson.

Dans le secteur du silicium, deux GEH correspondent à la réparation des installations : « Furnace maintenance » comprenant les opérateurs intervenant dans les fours et « Tamping pitch » rassemblant les opérateurs appliquant une pâte carbone étanche au fond du four. Deux autres GEH correspondent à la production du métal : « Electrode » constitué des salariés proches des électrodes placés en haut des fours et « Production » constitué des opérateurs en bas des fours, pour la coulée du métal.

Des échantillons urinaires en début de semaine début de poste (DSDP), fin de semaine fin de poste (FSFP) et du lendemain matin (FSFP16) ont été collectés pour chaque salarié. Le

3-OHBaP, le 1-OHP et la créatinine ont été analysés dans chaque échantillon urinaire par les méthodes de dosage précédemment décrites [Barbeau 2011].

Pour les groupes dont l'effectif est inférieur à 30 individus, les tests statistiques non paramétriques de Wilcoxon et de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer les résultats des variables respectivement indépendantes et appariées. Pour les groupes dont l'effectif est supérieur à 30 individus, le logarithme de chaque concentration urinaire a été calculé et le test statistique de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé pour s'assurer que les valeurs transformées avaient une distribution normale. Le test statistique de Student a alors été utilisé pour comparer les résultats des variables indépendantes et appariées et le coefficient linéaire de Pearson (r) a été calculé pour évaluer les corrélations entre les concentrations urinaires des deux métabolites. Pour tous les tests statistiques, les différences étaient considérées comme significatives si p était inférieur à 0,05.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Seulement 3 % des concentrations de 3-OHBaP en FSFP et 12 % en DSDP sont inférieures à la LQ. Ces résultats confirment la grande sensibilité de la méthode de dosage utilisée et sa capacité à être utilisée en routine pour la surveillance biologique des expositions professionnelles aux HAP [Barbeau 2011].

Pour les deux biomarqueurs étudiés, les niveaux les plus élevés sont retrouvés dans le secteur de la production d'anodes. La médiane des concentrations de 3-OHBaP en FSFP16 est supérieure à 0,7 nmol/mol, tandis que celle de 1-OHP en FSFP est supérieure à 4 μ mol/mol.

Dans les secteurs de la production de silicium et d'électrodes de carbone, ces valeurs sont respectivement 3 et 4 fois plus faibles pour le 3-OHBaP et 4 et 10 fois plus faibles pour le 1-OHP (Tableau 11). Le contact rapproché avec le brai contenu dans la pâte de carbone crue des anodes explique ces différences de niveaux.

Tableau 11 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP (noml/mol) et de 1-OHP (μmol/mol) aux différents temps de prélèvement dans les secteurs de la production d'anodes, d'électrodes et de silicium.

N (< LQ) médiane [intervalle]	DSDP	FSFP	FSFP16
ANODE			
3-OHBaP	35 (0) 0,33 [0,04-1,40]	35 (1) 0,73 [<LQ-3,97]	35 (0) 0,74 [0,10-5,05]
1-OHP	35 (0) 0,80 [0,15-2,97]	35 (0) 4,01 [0,18-19,54]	35 (0) 2,47 [0,24-11,06]
CATHODE			
3-OHBaP	50 (1) 0,07 [<LQ-0,92]	50 (0) 0,25 [0,01-3,02]	50 (0) 0,28 [0,02-5,27]
1-OHP	50 (0) 0,23 [0,05-3,78]	50 (0) 0,96 [0,12-6,99]	50 (0) 0,56 [0,09-5,91]
SILICIUM			
3-OHBaP	44 (14) 0,02 [<LQ-0,18]	44 (2) 0,15 [<LQ-1,09]	44 (0) 0,20 [0,03-1,14]
1-OHP	44 (0) 0,15 [0,01-0,59]	44 (0) 0,44 [0,10-2,87]	44 (0) 0,34 [0,06-1,50]

DSDP : début de semaine début de poste ; FSFP : fin de semaine fin de poste ; FSFP16 : fin de semaine fin de poste + 16 heures

Les concentrations de 1-OHP rapportées dans notre étude sont comparables à celles de la littérature, pour les secteurs de la production d'anode et de silicium [Bentsen-Farmen 1999, Marie-Desvergne 2010]. En revanche, elles sont plus faibles pour l'industrie de la production

de cathodes [Förster 2008]. La proportion d'échantillons dont la concentration dépassait 1 $\mu\text{mol/mol}$ de 1-OHP (valeur sans effet génotoxique) était de 83 % pour la production d'anodes, de 46 % pour les électrodes et de 27 % pour le silicium. Concernant le 3-OHBaP, la proportion d'échantillons dont la concentration dépassait 0,4 nmol/mol (valeur recommandée en France à partir d'une corrélation avec le BaP atmosphérique) était de 71 % pour la production d'anodes, de 40 % pour les électrodes et de 30 % pour le silicium. Ces différences de concentrations des IBE entre les secteurs d'activité ne peuvent pas s'expliquer par le port ou non de protection individuelle. En effet, tous les salariés de l'industrie des anodes portaient un masque contre 50 % dans l'industrie des cathodes. Ces résultats soulignent la difficulté de prévenir l'exposition des salariés en utilisant uniquement des équipements de protection individuelle. La possibilité d'une importante pénétration cutanée à certains postes de travail n'est pas non plus responsable, puisque les niveaux de 1-OHP en FSFP16 sont plus faibles que ceux de FSFP pour les trois secteurs. En effet, dans le cas d'une absorption des HAP majoritairement par la peau, la cinétique d'élimination du 1-OHP est plus lente ce qui entraîne des niveaux plus élevés en FSFP16 qu'en FSFP [Lafontaine 2002].

Au niveau des GEH, on retrouve des divergences entre les niveaux des deux métabolites. Au sein de l'industrie des anodes, alors que les médianes de 1-OHP en FSFP sont équivalentes entre les groupes « Electrode maintenance » et « Carbon department », les valeurs de 3-OHBaP en FSFP16 sont deux fois plus faibles dans le premier groupe, par rapport au deuxième (Figure 30).

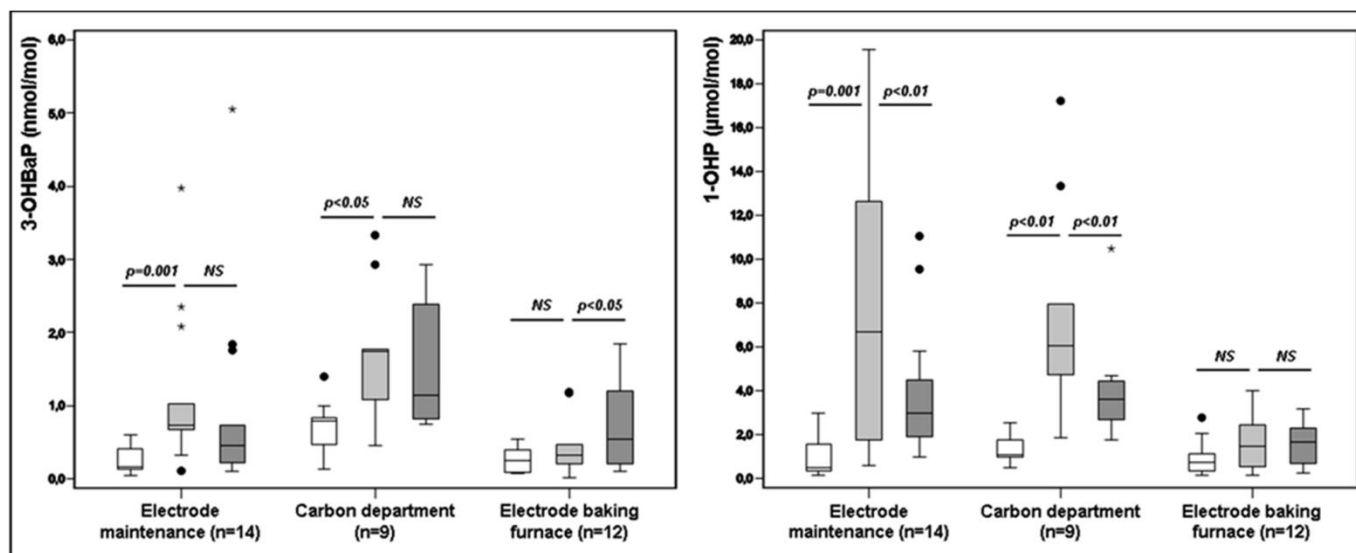


Figure 30 : Concentrations urinaires de 3-OHBP (nmol/mol) et de 1-OHP (μmol/mol) dans les échantillons de DSDP (blanc), FSFP (gris clair) et FSFP16 (gris foncé) dans les différents GEH de l'industrie de la production d'anodes.

Ceci s'explique par la composition spécifique en HAP de chaque source d'émission au sein des différents GEH. Ainsi, pour des expositions au Pyr similaires, la proportion de BaP est plus grande dans le mélange présent au poste de travail « carbon department » qu'au sein de l'activité « Electrode maintenance ».

Pour la production de cathodes, les niveaux de 3-OHBP en FSFP16 sont deux fois plus élevés dans le groupe « Carbon department » que dans le groupe « Pitch impregnation », tandis que les niveaux de 1-OHP en FSFP sont plus faibles (Figure 31).

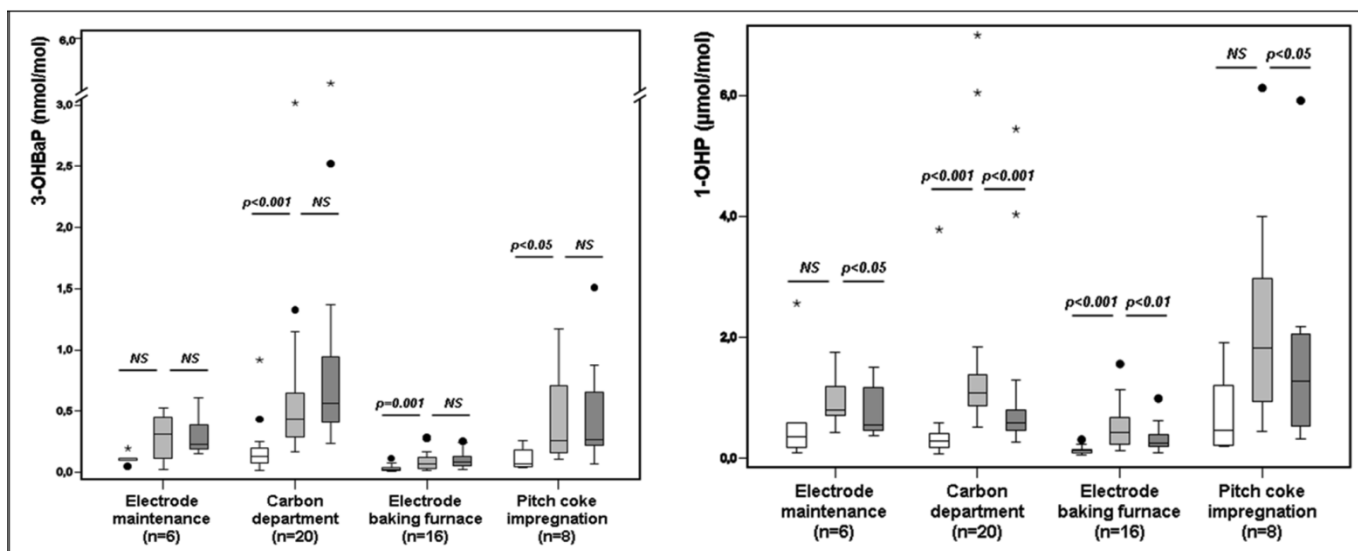


Figure 31 : Concentrations urinaires de 3-OHBaP (nmol/mol) et de 1-OHP (μmol/mol) dans les échantillons de DSDP (blanc), FSFP (gris clair) et FSFP16 (gris foncé) dans les différents GEH de l'industrie de la production de cathodes.

Là encore, l'exposition au BaP est plus importante dans le groupe « carbon department » que dans le groupe « Pitch impregnation », bien que les expositions au Pyr soient supérieures pour le deuxième GEH, indiquant une composition des mélanges très différentes.

La même constatation est faite dans l'industrie du silicium, où la médiane des niveaux de 3-OHBaP en FSFP16 est plus élevée dans le groupe « Furnace maintenance » que dans tous les autres GEH, alors que celle de 1-OHP est inférieure ou similaire (Figure 32).

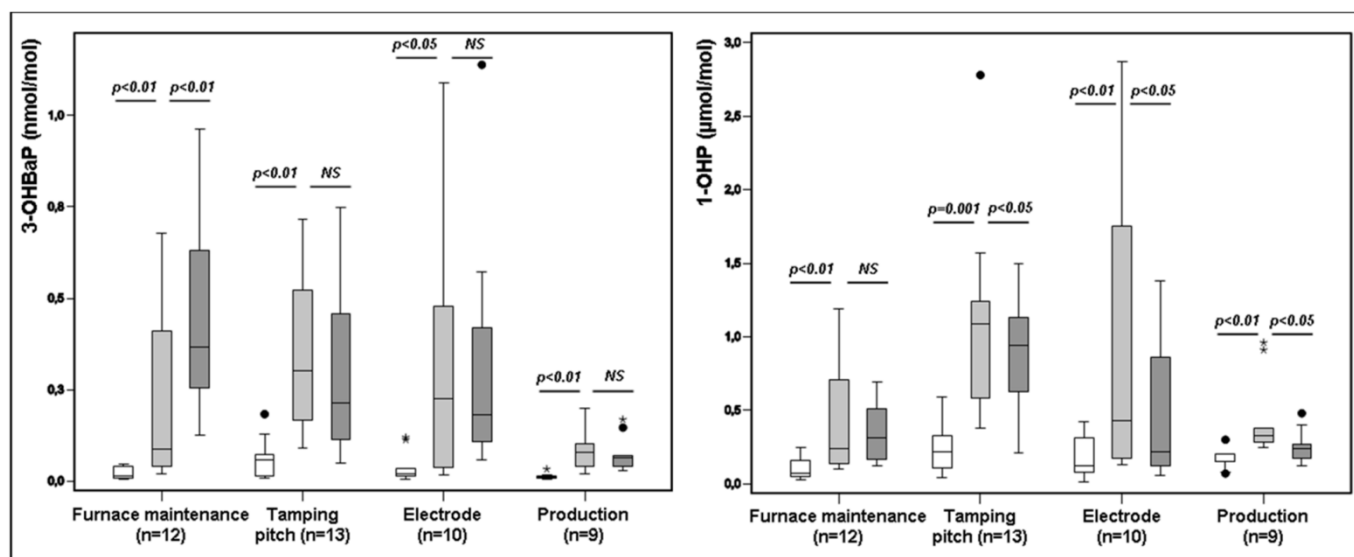


Figure 32 : Concentrations urinaires de 3-OHBP (nmol/mol) et de 1-OHP (μmol/mol) dans les échantillons de DSDP (blanc), FSFP (gris clair) et FSFP16 (gris foncé) dans les différents GEH de l'industrie de la production de silicium.

La proportion relative de Pyr et de BaP au sein des sources présentes lors des différentes activités peut être étudiée par le rapport $1\text{-OHP}_{\text{FSFP}}/3\text{-OHBP}_{\text{FSFP16}}$ [Lafontaine 2004]. Les mélanges contenant moins de BaP induisent des valeurs de ces ratios plus élevées, comme au sein des GEH « Electrode maintenance » de la production d'anodes, « Pitch impregnation » lors de la fabrication de cathodes et « Production » dans le secteur du silicium (Figure 33).

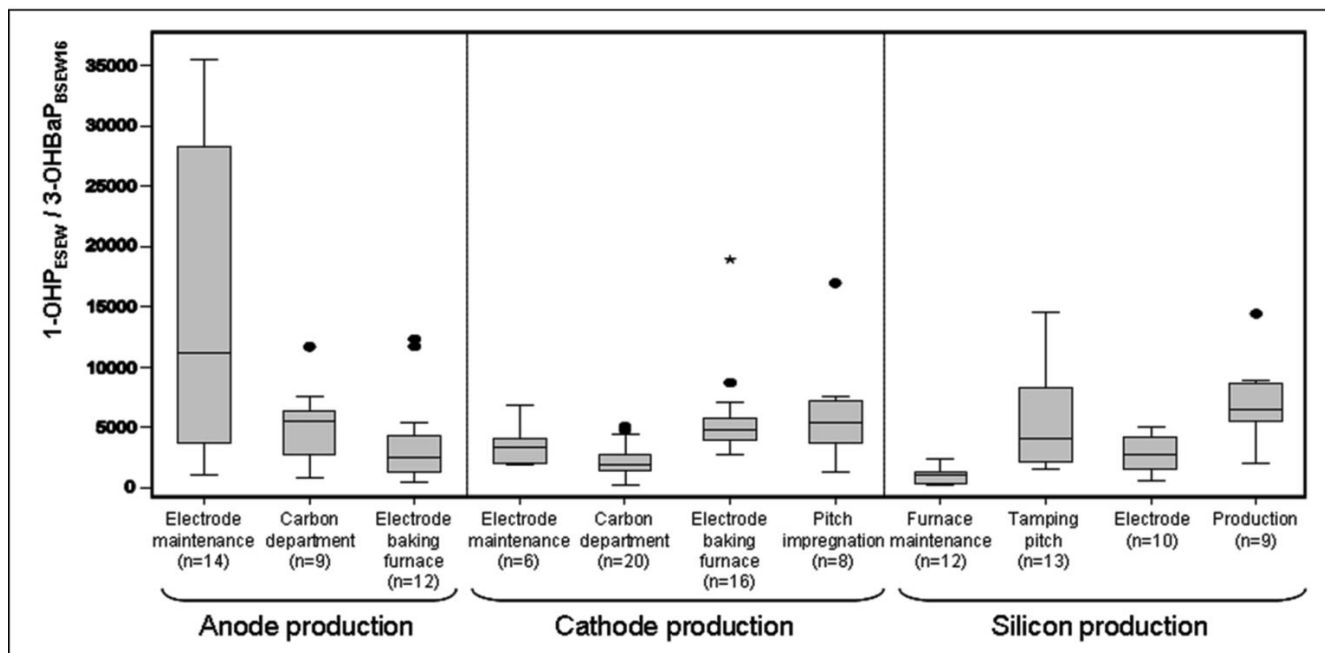


Figure 33 : Ratios des concentrations urinaires de 1-OHP en FSFP divisées par celles de 3-OHBaP en FSFP16 dans les différents GEH des industries étudiées.

La largeur des intervalles de valeurs de ces ratios au sein d'un même secteur industriel confirme la nécessité de constituer des GEH pour interpréter correctement les résultats des évaluations d'exposition. Cette constatation est également faite pour le groupe « Electrode maintenance » du secteur de la production d'anodes qui est composé de salariés (électriciens et mécaniciens) effectuant des tâches transversales, dans différentes zones de l'usine et pour lesquels les expositions peuvent être très variables.

Dans ce travail, les intervalles des ratios de concentrations ne sont pas plus grands lorsqu'ils sont calculés à partir des valeurs obtenues lors du dosage des deux métabolites dans un même prélèvement. Ces résultats ne confirment donc pas l'importance de prendre en compte le délai d'élimination urinaire du 3-OHBaP décalé de 16 heures par rapport au 1-OHP comme l'avait souligné Gendre *et al.* [Gendre 2002, Gendre 2004]. En effet, sur les onze

GEH étudiés, neuf ne montrent aucune différence significative entre les concentrations de 3-OHBaP dans les urines en FSFP et en FSFP16. Seuls les salariés des groupes « Electrode baking furnace » du secteur des cathodes et « Furnace maintenance » de l'industrie du silicium présentent des concentrations urinaires de 3-OHBaP en FSFP16 significativement plus élevées que celles prélevées en FSFP. Mais l'observation de ce délai d'élimination urinaire du 3-OHBaP a été faite après une exposition de courte durée aux HAP, alors que dans notre étude, l'exposition des salariés est répétée durant 4 ou 5 jours consécutifs. Ainsi, les deux groupes présentant le délai d'élimination dans notre étude n'ont pas été soumis à une exposition cumulée, comme le montre la très faible différence des médianes de 3-OHBaP entre les prélèvements de DSDP et de FSFP dans ces GEH. Il est donc possible d'avancer l'hypothèse que l'exposition cumulée sur une semaine de travail est responsable d'une imprégnation de l'organisme induisant un équilibre entre les niveaux de FSFP et ceux de FSFP16. De plus, les niveaux de 1-OHP sont significativement plus élevés en FSFP16 qu'en FSFP uniquement dans les groupes présentant le délai d'élimination du 3-OHBaP, ce qui indique une importante absorption cutanée des HAP à ces postes, responsable d'un retard dans l'élimination urinaire du 3-OHBaP (Figure 31 et Figure 33).

Les meilleurs coefficients de corrélation entre les niveaux des deux métabolites dans chacun des secteurs, ont été obtenus à partir de leurs concentrations en FSFP et sont proches de celles précédemment publiées [Förster 2008].

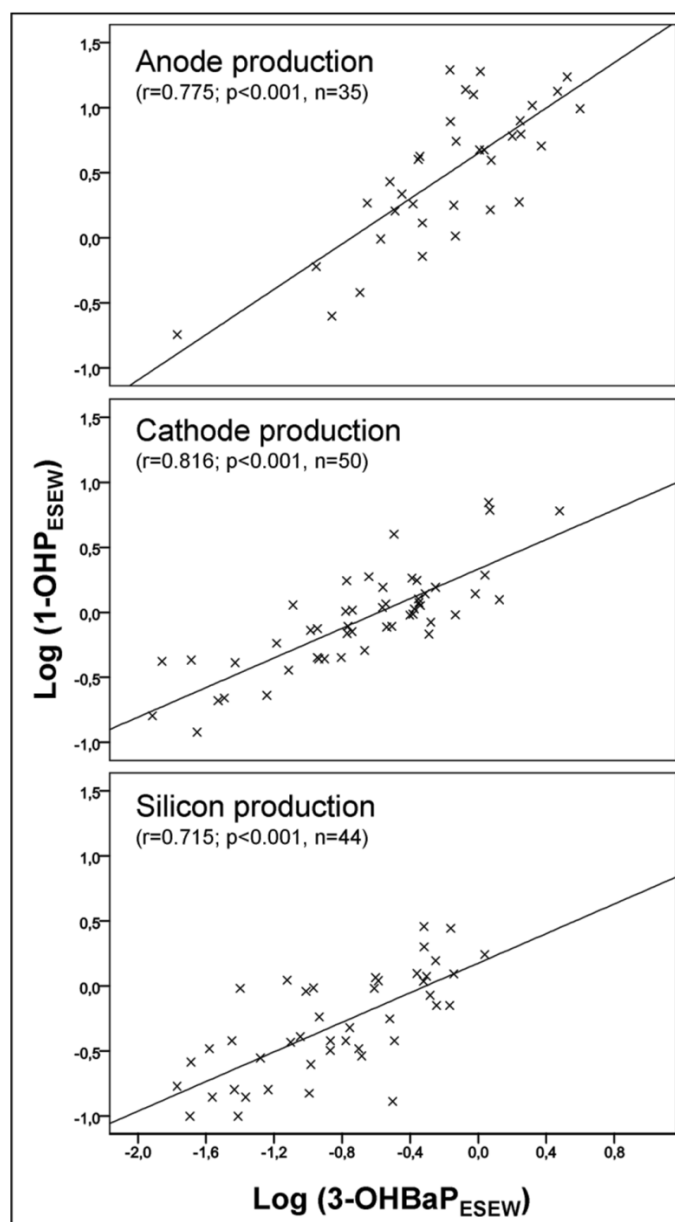


Figure 34 : Corrélations entre les valeurs logarithmiques des concentrations de 1-OHP et de 3-OHBaP mesurées dans le même échantillon urinaire prélevé en FSFP.

La valeur de 1-OHP calculée à partir des droites de régression et correspondant à la valeur de 3-OHBaP égale à 0,4 nmol/mol recommandée en France, varie de 0,7 $\mu\text{mol/mol}$ dans le secteur de la production de cathode, à 2,4 $\mu\text{mol/mol}$ dans le secteur du silicium. Cette

variabilité s'explique par les différences de composition des mélanges de ces secteurs comme le montre la variabilité des ratios BaP/Pyr.

Pour conclure, ce travail démontre que lors d'une exposition cumulée aux HAP pendant une semaine de travail, il n'est pas nécessaire de prélever les urines du lendemain matin suivant l'arrêt de travail pour utiliser le 3-OHBaP comme IBE aux HAP. Un dosage sur des urines collectées en FSFP est tout à fait satisfaisant ce qui simplifie grandement la mise en œuvre en milieu de travail. Ce biomarqueur de dose interne est fiable et utilisable en routine, tant pour les fortes expositions professionnelles (production d'anodes) que pour les plus faibles (électrolyse du silicium). De plus, les ratios des concentrations de 1-OHP et de 3-OHBaP sont variables entre les GEH mais également au sein de ces groupes. Ces résultats confirment la difficulté d'établir une valeur guide pour le 1-OHP qui serait en lien avec le risque cancérigène des HAP mais démontrent l'intérêt de fixer plutôt une valeur limite pour le 3-OHBaP urinaire.

IV. ARTICLE SOUMIS

Page 1 of 25

Annals of Occupational Hygiene

Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers

DAMIEN BARBEAU^{1,2}, RENAUD PERSOONS², MARIE MARQUES¹, CLAIRE HERVE², GILBERT LAFFITTE-RIGAUD^{3,4} and ANNE MAITRE^{1,2*}

*Author to whom correspondence should be addressed:

Tel: +33 4 76 63 75 01 ; fax : +33 4 76 63 75 02 ; email: anne.maitre@ujf-grenoble.fr

¹EPSP, TIMC-IMAG, Université Joseph Fourier de Grenoble, La Tronche, France. ²Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, DBTP, CHU de Grenoble, France. ³Aluminium Pechiney, Rio Tinto Alcan, Saint Jean de Maurienne, France. ⁴FerroPem, Montricher, France

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); biological monitoring; 3-hydroxybenzo(a)pyrene (CAS n°: 13345-21-6); 1-hydroxypyrene (CAS n°:5315-79-7); occupational exposure; metallurgy

ABSTRACT

Introduction: In metallurgy, workers are exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in which some compounds are carcinogenic. Biomonitoring of PAH exposure has been performed by measuring urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), a metabolite of pyrene which is not carcinogenous. This study investigated the use of 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP), a metabolite of benzo(a)pyrene (BaP) which is the main carcinogenic component in PAHs, to improve carcinogen exposure assessment.

Methods: We included 129 metallurgy workers routinely exposed to PAHs during working hours. Urinary samples were collected at three sampling times at the beginning and at the end of the working week for 1-OHP and 3-OHBaP analyses.

Results: Workers in anode production showed greater exposure to both biomarkers than those in cathode or silicon production, with respectively 71%, 40% and 30% of 3-OHBaP concentrations exceeding the French guideline value of 0.4 nmole/mole creatinine. No difference was observed between the 3-OHBaP levels found at the end of the last-but-one workday shift and those at the beginning of the last workday shift. Within these plants, the 1-OHP/3-OHBaP ratios varied greatly according to the workers' activity and emission sources. Using linear regression between these two metabolites, the 1-OHP level corresponding to the guide value for 3-OHBaP ranged from 0.7 to 2.4 μ mole/mole creatinine, depending on the industrial sector.

Conclusion: This study emphasizes the interest of monitoring urinary 3-OHBaP at the end of the last workday shift when working week exposure is relatively steady, and the irrelevance of a single guideline value for 1-OHP when assessing occupational health risk.

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants which are found in the atmosphere as complex gaseous and particulate mixtures whose composition varies considerably according to the source of emission [Jongeneelen 1997]. PAHs are emitted during incomplete combustion of organic matter and coal or petroleum distillation. Within this chemical family of more than one hundred compounds, benzo(a)pyrene (BaP) is carcinogenic to Humans (Group 1) while other particulate PAHs with more than four benzene rings are classified as probably (group 2A) or possibly (group 2B) carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer [IARC 2010]. Furthermore, eight particulate PAHs have been classified as assumed human carcinogens by the European Union [European Union 2004].

In France, nearly 1.6 million workers were exposed to PAHs in the early 2000s, including 93,000 workers in the metallurgy industry, particularly those involved in carbon electrode manufacturing, aluminium smelting and silicon production [Guignon and Sandret 2005]. In these industries, PAHs exposure levels are high due to coal tar pitch used for manufacturing anodes and cathodes and to its combustion during aluminium electrolysis or silicon reduction. Aluminium production has been classified as carcinogenic to humans by IARC [IARC 2012] because the Söderberg anodes used over many years for aluminium production were highly polluting and are associated with an increased risk of bladder and lung cancers [Gibbs 2007]. Söderberg anodes are currently being replaced by prebaked anodes whose PAHs emissions are lower [Carta 2004] and are mainly emitted during anode or cathode manufacturing stages that precede baking. Graphite electrode production has been

classified as probably carcinogenic to humans [IARC 2010], with a standardized mortality ratio (SMR) for lung cancer reaching 2.62 [1.20-4.98] [Mori 2002].

Previous studies have shown that airborne BaP levels measured during aluminium electrolysis ranged from 0.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ to 2.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in the electrolysis potroom [Lafontaine 2000, Levin 1995], but reached 48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in the vicinity of Söderberg anodes [Tjoe Ny 1993]. In carbon electrode production, BaP levels ranged from 0.37 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for maintenance activities [Van Delft 1998] to 1.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for electrode impregnation with pitch liquid or electrode baking [Angerer 1997, Van Schooten 1995]. The wide range of individual exposure was explained by the varying composition of electrodes, the nature of the workplace tasks and the distance to emission sources. In the silicon industry, there is little data on atmospheric BaP levels, but the expected levels are assumed to be lower because prebaked electrodes are used for silicon reduction and most of the workers are not in the vicinity of electrode combustion.

Although exposure sources can easily be identified by measurements of airborne PAHs, biological monitoring has the advantage of taking into account all sources of emission and absorption routes of pollutants, protective equipment efficiency and individual genetic as well as non-genetic factors. In metallurgy, quantification of the internal dose is the best way for assessing occupational exposure and health risks because of the importance of dermal absorption and wide variability in the wearing of overalls, gloves and respiratory masks [Van Rooij 1993b]. The determination of urinary metabolites is the most widely used method to measure the internal dose of PAHs [Viau 1995a]. During the last decades, PAHs biomonitoring has been performed by the determination of 1-hydroxypyrene (1-OHP) in urine collected at the end of the last shift of the workweek. Its use is more suitable for routine monitoring than the determination of DNA adducts, chromosome aberrations, micronuclei or

sister chromatid exchange in white blood cells, whose use is limited to research projects [Brandt and Watson 2003, Jongeneelen 1997]. 1-OHP is the metabolite of pyrene, which is the major particulate PAH in airborne mixtures. The urinary levels are frequently measured as $\mu\text{mole/mole}$ of creatinine ($\mu\text{mol/mol}$) making the analysis simple and reliable [Lafontaine 2004]. Urinary 1-OHP levels vary widely across the different activities in the metallurgy industry. While levels are around $3.6 \mu\text{mol/mol}$ for workers near the aluminium electrolysis smelter [Lafontaine 2000] and $9.2 \mu\text{mol/mol}$ for those working close to anodes [Petry 1996], they are below $0.5 \mu\text{mol/mol}$ among silicon production workers [Marie-Desvergne 2010]. In graphite electrode production, urinary 1-OHP levels decreased from $6.8 \mu\text{mol/mol}$ in 1998 [Van Delft 1998] to $2.9 \mu\text{mol/mol}$ in 2007 [Rossbach 2007].

However, the urinary 1-OHP concentration does not reflect carcinogenic PAHs exposure because pyrene itself is not carcinogenic and the ratio BaP/pyrene varies considerably depending on the source of emission [Gendre 2002, Lafontaine 2004]. In recent years, the determination of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP), the main monohydroxylated BaP metabolite, has been developed because this biomarker is more closely related to the internal genotoxic entity and therefore to the health risk to workers exposed to PAHs. Indeed, an excellent correlation has been found between the urinary concentration of 3-OHBaP and the amount of BPDE-DNA adducts measured in the lung of rats exposed to BaP [Marie 2010]. However, 3-OHBaP levels measured in urine are of the order of ng/l , *ie* 3 to 4 orders of magnitude lower than those of 1-OHP [Lafontaine 2004]. This is due not only to the small amount of airborne BaP, but also to its complex metabolism into many compounds (phenols, diols, triols, quinones, etc.) [Gelboin 1980] and to their elimination mainly through the faeces via biliary excretion [Peltonen and Dipple 1995]. Thus, 3-OHBaP

excreted in urine accounts for only 0.21% of the BaP dose according to a study in animals [Marie 2010].

Nevertheless, urinary 3-OHBaP has recently been analyzed in a routine manner using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction [Barbeau 2011]. Mean end of shift levels of 3-OHBaP were indeed as low as 0.2 nmol/mol in coke production workers and 0.5 nmol/mol in a graphite electrode production line [Förster 2008].

Moreover, while the 1-OHP excretion peak occurs about 3 hours after the end of the shift, that of 3-OHBaP was detected on average 15 hours later following a single exposure, with a range of 3 to 24 hours post-shift among the different occupations studied [Gendre 2002, Gendre 2004]. For urinary 3-OHBaP analysis, the sampling time currently recommended by the French Institute for Research and Safety (INRS) is thus at the beginning of the shift the day after occupational exposure and the associated guideline value for occupational exposure is 0.4 nmol/mol.

The aim of this study was to assess carcinogenic PAHs exposure using urinary 3-OHBaP analysis among workers exposed to either moderate PAHs levels in silicon production or high levels in cathode and anode production. 3-OHBaP levels were compared to those of 1-OHP among workers involved in these different sectors and also between the different activities within each sector to assess the relevance of this new biomarker and to determine a guideline value for 1-OHP. Finally, both metabolites were measured in urine samples collected at the various time points, to confirm the optimal sampling time.

METHODS

Study population

The subjects were 129 healthy male volunteers between 18 and 65 years of age involved in prebaked anode production (n = 35), graphite cathode production (n = 50) and silicon production (n = 44). A questionnaire was completed by each worker in order to inform them about the study and obtain their consent, and to collect detailed data about products, processes, daily activities, personal protective equipment and smoking habits. No special instruction concerning diet was given.

In anode production, workers were divided into three Similar Exposure Groups (SEGs): 1/ "Electrode maintenance, including mechanics and electricians, 2/ "Carbon department", including unloading raw materials (carbon and pitch coke), waste cleaning, control and anode recycling, and 3/ "Electrode baking furnace", including truck drivers, crane operators, firing and degassing ramp operators, and anode rodding and scraping. In cathode production, workers were pooled into four SEGs where the first three groups were similar to those of anode production except for the "Carbon department" which included only electrode extrusion. The fourth group corresponded to "Pitch impregnation" which takes place after cathode baking. In silicon production, four SEGs were formed; the first two groups were involved in furnace repair: 1/ "Furnace maintenance", including mechanics working inside it, 2/ "Tamping pitch", including the job of ramming paste in the furnace shaft; the two other groups were involved in silicon production: 3/ "Electrode" including workers located in the upper parts of furnaces close to the electrodes and 4/ "Production" including casting operators located in the lower parts of the furnaces far from the electrodes.

Urine collection

Three urine samples were collected from each worker: the first at the beginning of the first shift of the working week (BSBW), the second at the end of the shift on the last-but-one workday (ESEW) and the third, at the beginning of the last shift of the week (BSEW16). Samples were collected in 50 ml propylene bottles and stored at -20°C until analysis.

Urinary metabolite analyses

After thawing the urine overnight, the 3-OHBaP analysis was conducted using the method previously described by Barbeau *et al.* [Barbeau 2011]. Briefly, a 10 ml aliquot of urine was diluted in acetate buffer before enzymatic hydrolysis. The sample was purified and concentrated by automated solid phase extraction using Sep-Pak C18, 500 mg with a capacity of 6 ml from Waters[®]. Urinary 3-OHBaP was quantified by high pressure liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FLD). The heart-cut technique was used, with a first sample separation performed on a purification column Supelcosil LC-18 (50 mm x 4 mm, 5 µm) from Supelco[®] and a second separation performed on an analytical column PAH-C18 (250 mm x 3 mm, 5 µm) from Waters[®]. Excitation and emission wavelengths were fixed at 425 and 465 nm, respectively. The limit of quantification (LQ) was 0.2 pmol/l (0.05 ng/l).

Urinary 1-OHP was determined using a modified method of that previously described by Jongeneelen *et al.* [Jongeneelen 1988]. Briefly, a 2 ml aliquot of urine was diluted in acetate buffer before enzymatic hydrolysis and directly injected into a HPLC-FLD system. On-line extraction of 1-OHP was performed with a Supelguard C18 column from Sigma-Aldrich[®] and elution was performed with a LiChrospher C18 column from Merck[®]. Excitation and emission wavelengths were fixed at 333 and 390 nm, respectively. The LQ

was 91.6 pmol/l (20 ng/l). The laboratory meets the German Society for Occupational and Environmental Medicine external quality control system standards for 1-OHP.

Urinary creatinine was determined by Jaffe's method in a 2 ml aliquot of urine.

Data analyses

All metabolite concentrations were normalized to urinary creatinine (mol/mol). Only samples with a creatinine level between 2.7 and 26.5 mmol/l (0.3 and 3 g/l) were included in the data analysis. The distributions of urinary concentrations in the different groups are described by median, minimum, maximum, number of workers and number of samples with a concentration below the LQ. Metabolite concentrations lower than the LQ were assigned values equal to half of the LQ for graphical representation and statistical analyses. Results in different SEGs are shown as box-plots, with horizontal lines representing from bottom to top: the minimum, 25th, 50th, 75th percentiles and the maximum. Values outside 1.5 and 3 times the range between the 25th and the 75th percentiles are symbolized as outliers (•) and extreme values (*), respectively. Statistical analyses were conducted with SPSS Statistics® 17.0 software from IBM. For groups whose population was less than thirty, the nonparametric Wilcoxon or Mann-Whitney tests were used to compare the results of independent or matched groups, respectively. For groups exceeding 30 subjects, the common logarithm of each urinary concentration was calculated and the Kolmogorov-Smirnov test was used to ensure that the log transformed values followed a normal distribution. The Student test was used to compare the results in these independent or matched groups and the linear coefficient of Pearson (r) was used to study the correlation between the two metabolites. For all tests, *p* values under 0.05 were considered significant.

RESULTS

Population

No significant difference in age distribution was found between the different sectors. Respiratory protective equipment (P3 mask) was worn by 100%, 92% and 52% of workers involved in anode, silicon and cathode production, respectively. All workers had handling gloves and standard dungarees. There were more smokers in silicon (50%) and cathode (36%) than in anode production (8%).

Urinary metabolite concentrations among smokers versus non-smokers

3-OHBaP concentrations were below the LQ in only 18 samples mainly collected at BSBW inform silicon production workers. The 1-OHP concentration could be quantified in all 387 urine samples.

No significant difference between smokers and non-smokers was found for 3-OHBaP or 1-OHP for the production of cathodes or anodes, whatever the sampling time. In silicon production, there was also no difference for metabolites measured at BSEW16 and ESEW while smokers had higher levels than non-smokers at BSBW, both for 3-OHBaP ($p<0.001$) and 1-OHP ($p<0.01$).

Urinary metabolite concentrations in different industrial sectors and activities

The highest median level was found in anode production whatever the metabolite and the sampling time with a maximum reaching 5 nmol/mol for 3-OHBaP at BSEW16 and 20 μ mol/mol for 1-OHP at ESEW (Table 1). The BSEW16 median concentration of 3-OHBaP measured in anode production was 3 to 4 times higher than in the two other sectors while the ESEW median for 1-OHP was 4 and 10 times higher. The percentage of BSEW16 urine

samples with 3-OHBaP levels exceeding the French guideline value of 0.4 nmol/mol reached 71% for anode production, compared with 40% and 30% in cathode and silicon production, respectively. The exposure levels were highly variable in all 3 sectors and the largest range of metabolite concentrations was found in anode production.

Table 1. Concentrations of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene at different sampling times for workers involved in anode, cathode and silicon production.

n (n below the LQ) median [range]	BSBW	ESEW	BSEW16
ANODE			
3-OHBaP (nmol/mol)	35 (0) 0.33 [0.04-1.40]	35 (1) 0.73 [<LQ-3.97]	35 (0) 0.74 [0.10-5.05]
1-OHP (μmol/mol)	35 (0) 0.80 [0.15-2.97]	35 (0) 4.01 [0.18-19.54]	35 (0) 2.47 [0.24-11.06]
CATHODE			
3-OHBaP (nmol/mol)	50 (1) 0.07 [<LQ-0.92]	50 (0) 0.25 [0.01-3.02]	50 (0) 0.28 [0.02-5.27]
1-OHP (μmol/mol)	50 (0) 0.23 [0.05-3.78]	50 (0) 0.96 [0.12-6.99]	50 (0) 0.56 [0.09-5.91]
SILICON			
3-OHBaP (nmol/mol)	44 (14) 0.02 [<LQ-0.18]	44 (2) 0.15 [<LQ-1.09]	44 (0) 0.20 [0.03-1.14]
1-OHP (μmol/mol)	44 (0) 0.15 [0.01-0.59]	44 (0) 0.44 [0.10-2.87]	44 (0) 0.34 [0.06-1.50]

Abbreviations: 3-OHBaP, 3-hydroxybenzo(a)pyrene; 1-OHP, 1-hydroxypyrene; BSBW, beginning of the shift the first day of the working week; ESEW, end of shift the last-but-one working day; BSEW16, beginning of the last shift the last day of the working week; n, number; LQ, limit of quantification.

When results were analyzed according to the different SEGs, there were some discrepancies between the levels of the two urinary metabolites. In the "carbon department" of anode production, the median levels of 3-OHBaP at BSEW16 and 1-OHP at ESEW were respectively 2 and 4 times higher than those measured in the "electrode baking furnace". In contrast, the 3-OHBaP median was also 2 times higher than those from "electrode maintenance" whereas the 1-OHP median was similar. Furthermore, there was a large range of 1-OHP concentrations in this last group (Fig. 1). In the "carbon department" of cathode production, the median levels of 3-OHBaP at BSEW16 and 1-OHP at ESEW were respectively 7 and 2.5 times higher than those measured in the "electrode baking furnace", and 2.5 and 1.5 higher than in the "electrode maintenance" groups. In contrast, the 3-OHBaP median was 2 times higher than those from "pitch coke impregnation" whereas the 1-OHP median was 1.5 lower (Fig. 2). In silicon production, the 3-OHBaP levels at BSEW16 from the "furnace maintenance" group were 2 times higher than those measured in the "tamping pitch" and "electrode" groups, and 6 times higher than in the "production". However, the 1-OHP median in at ESEW from "furnace maintenance" is 4.5 and 2 times lower than those from "tamping pitch" and "electrode", groups respectively, but comparable to those from "production" (Fig. 3). The range of the two metabolites was narrower in production than in the other groups, and was especially wide for 1-OHP levels in the "electrode" group.

Evolution of metabolite concentrations during the working week

The 3-OHBaP levels measured in BSEW16 and ESEW urine samples were significantly higher than those at BSBW for all three sectors ($p < 0.001$). The 3-OHBaP concentrations from BSEW16 samples were significantly higher than those at ESEW in cathode production ($p < 0.01$), but similar in anode and silicon production ($p > 0.05$). When

results were analysed according to the different SEGs, the 3-OHBaP concentrations were similar at BSEW16 and ESEW, except for 2 groups, “electrode baking furnace” in anode production ($p<0.05$) and “furnace maintenance” in silicon production ($p<0.01$), for which 67% and 83% of 3-OHBaP concentrations in BSEW16 were higher than those in ESEW, respectively.

Median 1-OHP values measured at ESEW was significantly higher than those at BSBW and BSEW16 for the three sectors ($p<0.05$). Only 10% workers involved in cathode production and around 24% workers in silicon and anode production had higher 1-OHP levels at BSEW16 than at ESEW. When results were analysed according to the different SEGs, the 1-OHP medians measured at ESEW were also higher than those at BSEW16 in all groups except for the “electrode baking furnace” in anode production and “furnace maintenance” in silicon production. Indeed, 42% and 50% workers, respectively, of these two groups had higher 1-OHP levels at BSEW16 than at ESEW, while the percentage was much lower for all other activities, ranging from 0% to 22%.

1-OHP/3-OHBaP concentration ratios

The ratios of 1-OHP concentration at ESEW to those of 3-OHBaP at BSEW16 ($1\text{-OHP}_{\text{ESEW}}/3\text{-OHBaP}_{\text{BSEW16}}$) are presented in Fig. 4. Values found in anode production (median = 5444) were 1.5 and 2 times higher than in cathode production (median = 3684) and in silicon production (median = 2758), respectively. The ratios ranged by a factor 64 within silicon production [228-14540], 81 within anode production [439-35545] and 94 within cathode production [202-18928]. Ratios calculated from concentrations of the two metabolites measured in the same ESEW or BSEW16 sample were similar to previously. When results were analysed according to SEGs, the median $1\text{-OHP}_{\text{ESEW}}/3\text{-OHBaP}_{\text{BSEW16}}$ ratios varied by a

factor of 3 to 6 within the same sector, and the individual values ranged by a factor 4 to 35 within a SEG. The lowest median ratio was found for “furnace maintenance” in silicon production (median = 1094) and the highest for “electrode maintenance” in anode production (median = 11224). In this last group, there was the widest dispersion of the ratios.

Urinary metabolite correlations

A strong correlation between levels of 3-OHBaP at BSEW16 and 1-OHP at ESEW was observed for cathode production ($r=0.747$; $p<0.001$, $n=50$), whereas low to moderate correlations were observed for anode ($r=0.482$; $p<0.01$, $n=35$), and silicon production ($r=0.380$; $p<0.05$, $n=44$). The same results were found when the 2 metabolites were measured at BSEW16, but the correlation was better when the 2 metabolites were measured at ESEW for cathode ($r=0.816$; $p<0.001$, $n=50$), anode ($r=0.775$; $p<0.001$, $n=35$) and silicon production ($r=0.715$; $p<0.001$, $n=44$) (Fig. 5).

The 1-OHP concentration in ESEW urine samples corresponding to the guideline value of 0.4 nmol/mol for 3-OHBaP at BSEW16, was calculated from the equations of the regression lines between these two metabolites for each sector. This value was equal to 0.7 (CI=[0.5-0.9]) and 1.1 (CI=[0.9-1.3]) $\mu\text{mol/mol}$ for silicon and cathode production, respectively, but reached 2.4 $\mu\text{mol/mol}$ in anode production with a large confidence interval (CI=[1.6-3.5]).

DISCUSSION

The 1-OHP levels found in silicon production were low (median = 0.4 $\mu\text{mol/mol}$) and comparable to those previously reported in this sector [Marie 2009]. In contrast, 1-OHP levels

in anode production (median = 4 $\mu\text{mol/mol}$) were 4 and 10 times higher than those in cathode and silicon production, respectively. These high values are close to those previously reported in anode production [Alexandrie 2000]. The highest median of 1-OHP, close to 6.5 $\mu\text{mol/mol}$, was found in “electrode maintenance” and the “carbon department” of anode production, in agreement with previous data [Bentsen-Farmen 1999]. For the “carbon department” in cathode production, the 1-OHP levels were 6 times lower, as recently reported [Förster 2008]. While on one hand, Bentsen et al. showed that electrode paste plant workers wearing P3 masks had lower urinary 1-OHP concentrations than others; on the other hand they emphasized the significance of variability in levels due to skin uptake of pyrene depending on work-category [Bentsen 1998]. In our study, the difference of 1-OHP levels between the sectors cannot be explained by the efficiency of individual protective equipment because 100% of the employees involved in anode production wore a P3 respiratory mask while only 30% workers in the “carbon department” in cathode production wore one. Furthermore, skin is not the main route of absorption, as shown by the 1-OHP levels at BSEW16 which were much lower than those found at ESEW for these three groups. Indeed, Lafontaine et al. showed a slower decrease in cases of dermal absorption [Lafontaine 2002]. Basically, the high exposure levels measured in the “carbon department” of anode production can be explained by inhalation of the aerosol of airborne PAHs emitted from carbon paste rather than skin absorption. In this department, workers carry out operations known to be highly polluting, such as unloading raw materials, waste cleaning and anode recycling. In contrast, employees of the “carbon department” in cathode production are only involved in electrode extrusion activities, where they are less exposed. These results highlight the difficulty to prevent PAHs exposure using personal protective equipment alone, and reiterate the need for accurate assessment of the way in which tasks are performed by workers.

Only 3% of 3-OHBaP concentrations measured in ESEW samples and 12% in BSBW were below the LQ including more than 80% non-smokers and more than 80% silicon workers. This finding confirmed the high sensitivity of the analytical method which can thus be confidentially used to perform biological monitoring of occupational exposure [Barbeau 2011]. The median of 3-OHBaP concentrations measured at BSBW in cathode and anode production were 3 and 14 times higher than those of non-occupationally exposed smokers while the 1-OHP median was 2 and 6 times higher [Barbeau 2011, Lafontaine 2006]. Proportionally higher levels of 3-OHBaP than 1-OHP, were due to the higher proportion of BaP emitted by electrode production than by tobacco smoke. Within these two highly exposed sectors, the impact of smoking habits is negligible whatever the sampling time, as well as in silicon production for samples collected at ESEW and ESEW16. In contrast, urinary levels of both metabolites measured at BSBW were higher in smokers than in non-smoker workers in silicon production because of the total elimination during the weekend of the PAHs accumulated throughout the working week. This was consistent with a measurable impact of smoking on levels of metabolites having been demonstrated only in the case of low occupational exposure [Buratti 2007].

The specific composition of the emission sources result in differences between 3-OHBaP and 1-OHP levels expected between the SEGs. This could be studied through the calculation of $1\text{-OHP}_{\text{ESEW}}/3\text{-OHBaP}_{\text{BSEW16}}$ ratios [Lafontaine 2004]. When this ratio is high, the proportion of BaP in the mixture at the workstation is assumed to be lower than that of pyrene and vice versa. Thus, the higher ratio for “electrode maintenance” than for other activities in anode production, results from a higher proportion of pyrene. Box-plots show the same ESEW medians of 1-OHP for “electrode maintenance” and “carbon department”, while the BSEW16 median of 3-OHBaP was twice as low for the first group. In contrast, BaP

proportion was higher in the “carbon department” of cathode production and its corresponding ratio was low. The BSEW16 median for 3-OHBaP in this group was twice as high as in “pitch coke impregnation” but the median for 1-OHP at ESEW was lower. Finally, BaP proportion was even higher for the group “furnace maintenance” in silicon production, with the lowest $1\text{-OHP}_{\text{ESEW}}/3\text{-OHBaP}_{\text{BSEW16}}$ ratio. The median of 3-OHBaP at BSEW16 was higher in the group “furnace maintenance” than in all others in this sector, while the ESEW medians for 1-OHP were always lower or similar. The highly variable $1\text{-OHP}_{\text{ESEW}}/3\text{-OHBaP}_{\text{BSEW16}}$ ratios within a single industrial sector confirm that there is a great variability in the emission sources in the workplaces. The same observation was made for “electrode maintenance” in anode production, where except from this activity, the ratio variations were lower within other SEGs.

The range of 1-OHP/3-OHBaP ratios were not so wide when calculated from the concentrations of the two metabolites measured in the same sample. This contradicts the data published by Gendre *et al.* who reported the necessity to take into account the 16-hour delay in the 3-OHBaP elimination rate compared to that of 1-OHP [Gendre 2002, Gendre 2004], due to BaP retention by the kidneys [Marie 2010]. However, this toxicokinetic data was obtained after a single exposure of subjects whereas the workers involved in our study were exposed for 4 or 5 consecutive days. Cumulative exposure during the working week probably created an equilibrium between the absorbed BaP and eliminated 3-OHBaP, due to its urinary half-life of around 8 hours after reaching a maximum 16 hours after the end of exposure [Bouchard and Viau 1996, Lafontaine 2004]. If, for the first workday, the urinary concentration measured 16 hours after the end of the shift was higher than at the end of the shift, the difference would probably decrease after several consecutive days of relatively stable exposure, reaching comparable levels at sampling times 16 h apart. Indeed, in the two

groups where the 3-OHBaP levels at BSEW16 were higher than at ESEW (“electrode baking furnace” of anode production and “furnace maintenance” of silicon production) PAHs exposure was very low during the working week as indicated by the small difference in 3-OHBaP between BSBW and ESEW samples. Furthermore, skin absorption seemed to be important in these groups as shown by 1-OHP levels which did not decline between ESEW and BSEW16. This dermal absorption could lead to a greater delay in urinary excretion of 3-OHBaP.

The best correlation between 3-OHBaP and 1-OHP levels was found when the two metabolites were analysed on the same sample collected at ESEW and this correlation was very close to those previously published [Förster 2008]. For all three industrial sectors, the strength of the link between the two metabolites measured in the same ESEW sample after several consecutive days of exposure was as strong as that obtained by Gendre et al. between the maximum urinary concentration of 3-OHBaP and that of the 1-OHP sample after one-day exposure [Gendre 2002].

Our results provide evidence that biological monitoring of PAH exposure could be performed by measuring 3-OHBaP concentrations in urine samples collected at the end of the shift on the last day of the working week in the case of similar exposure levels throughout the week. For monitoring in an industrial context, this sampling time would be more convenient than collecting urine samples 16 hours after the end of the shift. In contrast, the best sampling time for monitoring short exposure, such as one-day exposure, remains the following morning.

The value of 1-OHP calculated from a urinary level of 3-OHBaP of 0.4 nmol/mol (guideline value recommended in France) ranged from 0.7 to 2.4 μ mol/mol depending on the

sector. This variability was due to the different proportions of BaP and pyrene in PAHs mixtures as demonstrated by the $1\text{-OHP}_{\text{ESEW}}/3\text{-OHBaP}_{\text{BSEW16}}$ ratios. A similar result has already been observed and several 1-OHP biological exposure indexes suggested for coke, aluminium or graphite electrode plants [Jongeneelen 2001]. Bouchard *et al.* proposed an approach whereby the guideline value was adjusted according to the proportion of airborne BaP within other industrial sectors [Bouchard and Viau 1999]. The calculated value ranged from 1.1 $\mu\text{mol/mol}$ for coke plants to 9.8 $\mu\text{mol/mol}$ for pre-baked aluminium plants. However, this method requires systematic air sampling and the proportion of BaP is assumed to be constant throughout the plant. Our study shows that the guideline value for 1-OHP can widely vary within the same sector when there are several emission sources, with a confidence interval which ranged from 1.6 to 3.5 $\mu\text{mol/mol}$ in anode production. Finally, while the recommended guideline value for 3-OHBaP was 20 times higher than the levels found among non-occupationally exposed smokers [Barbeau 2011], the calculated guideline value for 1-OHP was only 5 and 8 times higher in silicon and cathode production, respectively. These results show that it is not possible to have a single guideline value for 1-OHP and that this value may be close to the levels found among non- occupationally exposed people in several industrial sectors.

To summarize, our study confirms that urinary 3-OHBaP is an essential marker of exposure to carcinogenic PAHs and that its analysis does not necessarily require supplementary urine samples to be collected, rendering this new biomarker easier to use in the context of monitoring occupational exposure.

FUNDING

“Agence nationale de sécurité sanitaire de l’environnement, de l’alimentation et du travail” (ANSES).

Acknowledgment—We thank Dr. Bruno Buclez and Dr. Philippe Thoumelin for allowing us to perform this work, and Dr Alison Foote for editing the manuscript. There are no conflicts of interest for any of the authors.

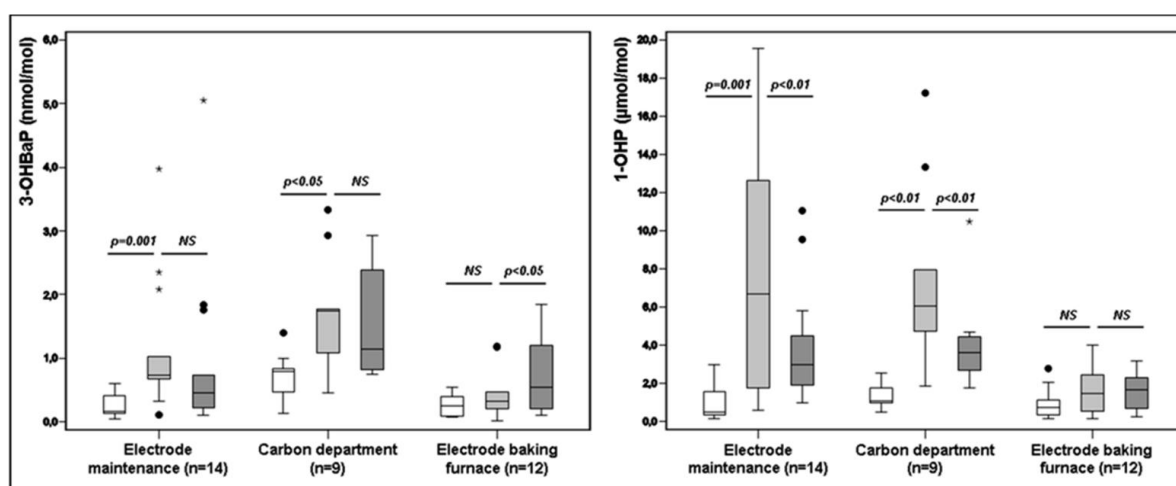


Fig. 1. Box-plots for 3-OHBaP (nmol/mol) and 1-OHP (μmol/mol) urinary concentrations measured in BSBW (white), ESEW (light-gray) and BSEW16 (dark-gray) urine samples in the different SEGs of anode production. Number of workers (n) and statistical significance of differences between metabolite concentrations from two sample times (p) are shown (NS: non-significant).

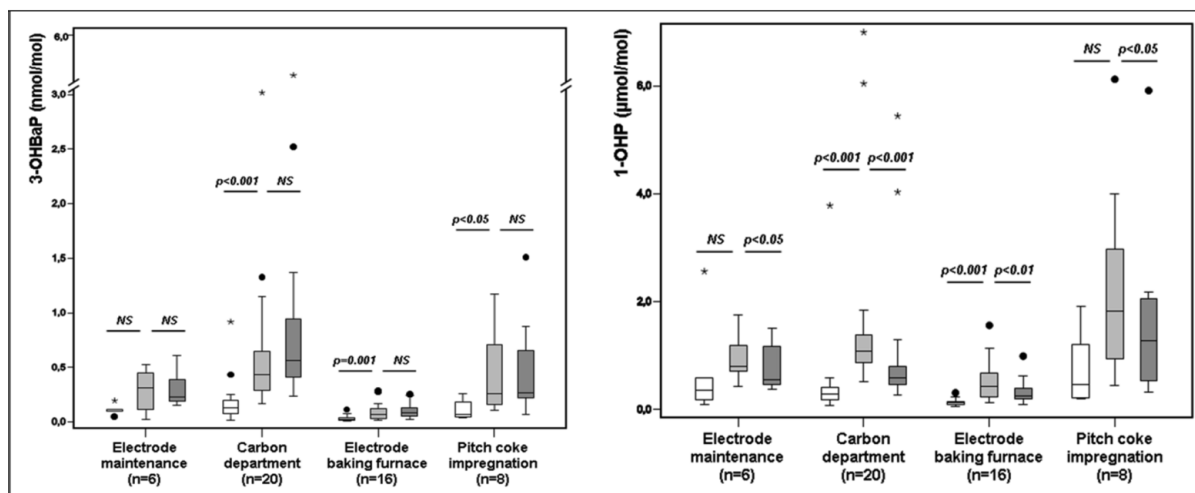


Fig. 2. Box-plots for 3-OHBP (nmol/mol) and 1-OHP (μmol/mol) urinary concentrations measured in BSBW (white), ESEW (light-gray) and BSEW16 (dark-gray) urine samples in the different SEGs of cathode production. Number of workers (n) and statistical significance of differences between metabolite concentrations from two sample times (p) are shown (NS: non-significant).

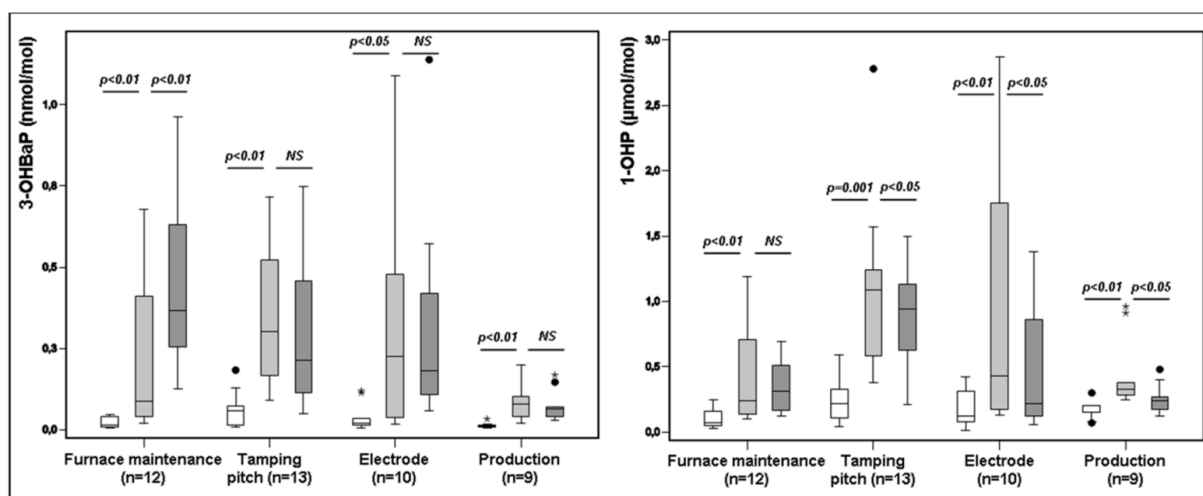


Fig. 3. Box-plots for 3-OHBP (nmol/mol) and 1-OHP (μmol/mol) urinary concentrations measured in BSBW (white), ESEW (light-gray) and BSEW16 (dark-gray) urine samples in the different SEGs of silicon production. Number of workers (n) and statistical significance of differences between metabolite concentrations from two sample times (p) are shown (NS: non-significant).

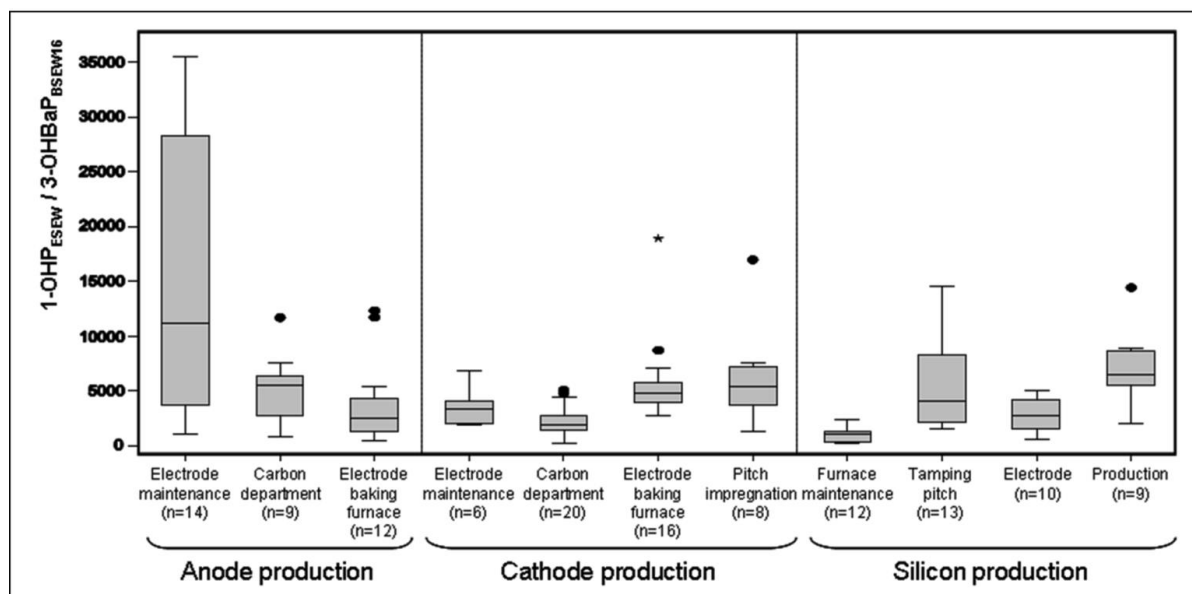


Fig. 4. Box-plots for 1-OHP concentrations in ESEW urine samples divided by 3-OHBaP concentrations in BSEW16 urine samples ($1\text{-OHP}_{\text{ESEW}}/3\text{-OHBaP}_{\text{BSEW16}}$) in the different similar exposure groups within anode, cathode and silicon industries.

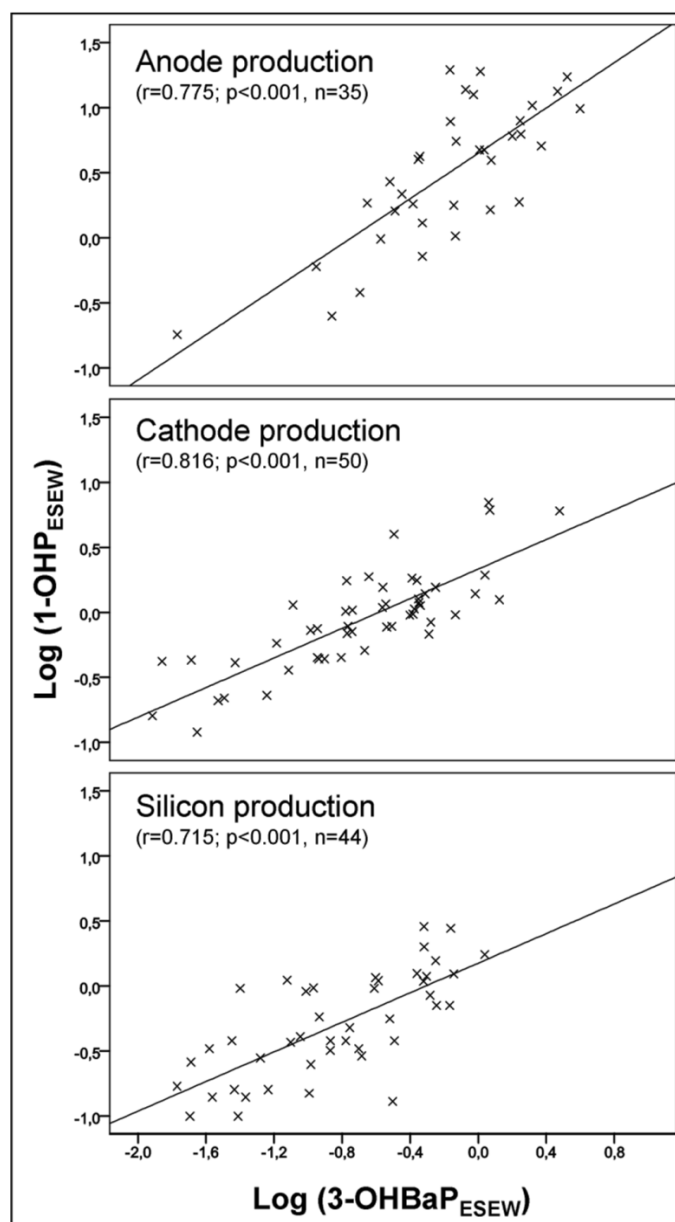


Fig. 5. Correlations between logarithmic values of 1-OHP and 3-OHBaP concentrations measured in the same ESEW urine sample from workers involved in anode, cathode and silicon production. Correlation coefficient (r), statistical significance (p) and number of workers (n) are shown.

CHAPITRE 6 :

CONCLUSION DU TRAVAIL ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Ce travail de thèse avait pour objectif de développer un biomarqueur permettant de réaliser la surveillance de l'exposition aux HAP cancérogènes, afin de permettre une estimation du risque sanitaire des différentes populations exposées.

En France, plus de 1 400 000 salariés sont professionnellement exposés. Les tableaux de maladies professionnelles 16 bis et 36 bis du régime général français reconnaissent les carcinomes de la peau, le cancer broncho-pulmonaire, et les tumeurs des voies urinaires comme possiblement en lien avec des expositions aux dérivés de houille et de pétrole contenant des HAP. Dans une moindre mesure, la population générale, via l'alimentation, la consommation de tabac et la pollution urbaine est également concernée par l'exposition aux HAP.

Les HAP étant émis en mélanges complexes de compositions variables, il est difficile de sélectionner un unique composé à suivre pour estimer le risque cancérogène des populations. Les HAP gazeux, bien que présents en grandes quantités dans les mélanges, n'ont pas été retenus car ils ne possèdent pas de mécanisme d'action cancérogène. Parmi les HAP particuliers, le choix s'est porté sur le BaP, car il est toujours présent dans les mélanges et est le seul HAP classé cancérogène certain pour l'homme par le CIRC.

Les HAP étant ubiquitaires et leur pénétration dans l'organisme se faisant par voie respiratoire, mais également cutanée et digestive, la surveillance de leur dose interne est à privilégier, devant l'évaluation de la dose externe. Depuis une trentaine d'année, la réalisation de la SBE aux HAP, passe par le dosage du 1-OHP urinaire. Mais ce métabolite est issu du Pyr, HAP non cancérogène. Le métabolisme complexe du BaP a donc été détaillé à partir des données de la littérature pour trouver un métabolite qui serait un meilleur candidat en tant qu'IBE.

Les effets précoces engendrés par les métabolites toxiques du BaP ne peuvent pas être utilisés dans la surveillance de l'exposition. En effet, les concentrations de 8-oxodGuo ne sont pas concordantes avec l'exposition aux HAP, les résultats du test des comètes sont soumis à de fortes variabilité inter- et intra-individuelle et il n'existe pas de lien entre les tests cytogénétiques et le risque individuel d'apparition du cancer.

Les biomarqueurs de dose efficace, représentés par les adduits du BPDE à l'ADN, à l'albumine et à l'hémoglobine, qui représentent la quantité de toxique ayant réagi avec une cible cellulaire, n'ont pas non plus été retenus. Bien qu'ils présentent l'intérêt d'être spécifiques du BaP, leur manque de sensibilité ne permet de les utiliser que lors de très fortes expositions. De plus, leur longue demi-vie d'élimination ne correspond pas à la surveillance des expositions journalières qui sont variables et le prélèvement sanguin qu'ils nécessitent pour leur dosage est plus invasif que le prélèvement d'urine.

Parmi les biomarqueurs de dose interne, les acides mercapturiques, ne sont pas pertinents, car la conjugaison au GSH n'est pas essentielle à la prise en charge du cancérigène ultime qu'est le BPDE. En revanche, le dosage du BaP-7,8,9,10-tétraol urinaire, issu de ce métabolite toxique, permet d'évaluer l'exposition à la fraction de BaP ayant emprunté cette voie d'activation métabolique. Cependant, les méthodes de dosage permettant d'atteindre une sensibilité suffisante sont encore trop complexes et ne mettent pas à jour de différence significative entre les sujets fumeurs et non-fumeurs.

Au final, le 3-OHBaP urinaire a été retenu comme le meilleur candidat pour être utilisé en tant qu'IBE aux HAP cancérigènes. Il est le métabolite majoritaire du BaP, l'influence du polymorphisme des enzymes de détoxification sur ses proportions semble faible et surtout il est très bien corrélé aux biomarqueurs de dose efficace que sont les adduits pulmonaires du

BPDE chez le rat. Sa cinétique d'élimination urinaire particulière est à prendre en compte pour son dosage, car son stockage rénal retarde son pic d'excrétion, qui n'apparaît alors que 10 à 20 heures après l'exposition. De plus, puisque son élimination est principalement fécale, ses niveaux urinaires correspondent à moins de 0,5 % de la dose de BaP absorbée par l'organisme et sont de l'ordre du ng/l d'urine.

Dans ce travail, nous avons développé une méthode de dosage qui présente les caractéristiques de sensibilité, de fidélité et de justesse requises pour l'analyse du 3-OHBaP urinaire au niveau des populations exposées en milieu industriel et en environnement général. Contrairement aux méthodes précédemment publiées, le système chromatographique utilisé (HPLC-FLD) est simple et commercialement disponible et l'automatisation de l'étape pré-analytique de SPE limite le temps de travail et améliore la reproductibilité. La SBE humaine au BaP, par l'utilisation du 3-OHBaP urinaire en tant qu'IBE, peut donc être réalisée en routine par les laboratoires de toxicologie.

Cette méthode a également permis d'évaluer les niveaux de 3-OHBaP urinaire dans la population générale non-exposée professionnellement, ceci afin de disposer d'une VBR pour interpréter les résultats des salariés exposés. Les concentrations mesurées chez les sujets fumeurs sont faibles mais significativement plus élevées que chez les non-fumeurs, avec des médianes respectivement de 0,023 nmol/mol et de 0,009 nmol/mol.

Afin de valider l'utilisation du 3-OHBaP urinaire en tant qu'IBE aux HAP, la surveillance de l'exposition modérée de salariés dans l'industrie du silicium et plus élevée dans les industries de production d'anodes et d'électrodes, a été réalisée à partir de la méthode développée. Dans le secteur de la production d'anodes, 71 % des niveaux de 3-OHBaP en FSFP16 étaient supérieurs à la valeur recommandée en France et ils étaient 40 % pour la

production d'électrodes et 30 % pour le silicium. Ces résultats confirment le risque sanitaire important lié à ces activités professionnelles. Au niveau des GEH, on retrouve des divergences entre les niveaux des deux métabolites expliquées par la composition variable des mélanges d'HAP aux postes de travail entre les secteurs mais également entre les activités au sein d'une même usine. Les postes de travail au contact de la pâte de carbone crue sont particulièrement exposés au BaP, avec des ratios de concentrations urinaires 1-OHBaP_{FSFP}/3-OHBaP_{FSFP16} très bas. De plus, pour neuf GEH sur les onze étudiés, on ne retrouve aucun retard d'élimination urinaire du 3-OHBaP par rapport au 1-OHP en fin de semaine de travail. Ces résultats s'expliquent par le fait que l'exposition des salariés tout au long de la semaine de travail, est responsable en fin de semaine d'un plateau au niveau de l'imprégnation en BaP de l'organisme, du fait de l'atteinte d'un équilibre entre les flux entrants de BaP et les flux sortants de métabolites. De ce fait, le 3-OHBaP peut être dosé aussi bien sur des urines collectées en FSFP qu'en FSFP16 ce qui facilite grandement la mise en œuvre de la SBE. Finalement, la valeur de 1-OHP urinaire calculée à partir des droites de régression établies pour les différents groupes et correspondant à la valeur de 3-OHBaP recommandée en France, varie de 0,7 µmol/mol dans le secteur de la production de cathode, à 2,4 µmol/mol dans le secteur du silicium, du fait d'une composition variable des mélanges d'HAP comme l'atteste la variabilité des ratios BaP/Pyr.

En conclusion, ce travail a démontré que le 3-OHBaP urinaire était un IBE fiable, utilisable en routine, tant pour les fortes expositions professionnelles aux HAP (production d'anodes), que pour les plus faibles (électrolyse du silicium), ou même pour les expositions environnementales (consommation de tabac). De plus, l'atteinte d'un plateau dans ses niveaux urinaires après une exposition aux HAP pendant une semaine de travail, montre qu'il n'est pas nécessaire de prélever les urines le lendemain matin suivant la dernière journée de travail pour

réaliser son dosage. Enfin, cette étude confirme la difficulté d'établir une valeur guide pour le 1-OHP urinaire qui serait en lien avec le risque cancérigène des HAP, mais démontre plutôt l'intérêt de fixer une VLB pour le 3-OHBaP.

Plusieurs perspectives de recherche se dessinent à la suite de ce travail. L'étude précise de la cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP chez des sujets soumis à différentes conditions d'exposition est nécessaire. Celle-ci va permettre d'évaluer la variabilité intra- et interindividuelle, tant au niveau des concentrations, que des délais d'excrétion, éléments indispensables à connaître pour son utilisation large en populations. L'utilisation de ces données permettra également de modéliser le devenir du BaP dans l'organisme humain, afin d'améliorer les connaissances sur les liens entre ses concentrations urinaires et la dose interne au contact des tissus cibles, voire la dose externe.

Des travaux sur les mécanismes du stockage du 3-OHBaP dans les tubules rénaux devraient également être entrepris. La recherche de la responsabilité de certaines protéines d'efflux et particulièrement des transporteurs d'anions organiques, pourrait permettre de préciser s'il s'agit d'un stockage avant excrétion ou d'une réabsorption tubulaire de ce métabolite. L'utilisation de la créatinine urinaire pour corriger les effets de dilution et de concentration des urines sur les niveaux de 3-OHBaP, pourrait être remise en question dans ce dernier cas, puisque cette protéine est uniquement filtrée par le glomérule rénal. D'autres composés endogènes pourraient alors être proposés pour effectuer cette correction.

Le développement des dosages urinaires des autres métabolites du BaP, afin d'évaluer les capacités individuelles à activer et à détoxiquer le BaP, mais également pour comprendre les responsabilités des différentes voies, est également une perspective très intéressante. L'établissement de phénotypes de ces métabolites urinaires chez l'homme pourrait conduire à

identifier des populations plus à risques de développer un cancer et améliorer la prise en charge de ce risque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alexandrie AK, Warholm M, Carstensen U, Axmon A, Hagmar L, Levin JO, et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis*. 2000 Apr;21(4):669-76.

Angerer J, Mannschreck C, Gündel J. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene. *Int Arch Occup Environ Health*. 1997;69(5):323-31.

Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health*. 2007 May;210(3-4):201-28.

ANSES. Les valeurs limites biologiques pour les agents chimiques en milieu professionnel 2013 [mise à jour du 25/04/2013; consulté en 2013]. <http://www.anses.fr/fr/content/les-valeurs-limites-biologiques-pour-les-agents-chimiques-en-milieu-professionnel>.

Aquilina NJ, Delgado-Saborit JM, Meddings C, Baker S, Harrison RM, Jacob P, et al. Environmental and biological monitoring of exposures to PAHs and ETS in the general population. *Environ Int*. 2010 Oct;36(7):763-71.

Arenas-Huertero F, Apátiga-Vega E, Miguel-Pérez G, Villeda-Cuevas D, Trillo-Tinoco J. Chapter 4: Molecular markers associated with the biological response to aromatic hydrocarbons from urban air in humans. In: Moldoveanu AM, editor. *InTech*, [intechopen.com](http://www.intechopen.com). Air Pollution - New Developments;2011: 87-113

Ariese F, Verkaik M, Hoornweg GP, van de Nesse RJ, Jukema-Leenstra SR, Hofstraat JW, et al. Trace analysis of 3-hydroxy benzo[a]pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Anal Toxicol*. 1994 Jul-Aug;18(4):195-204.

ATSDR. Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Atlanta (USA): ATSDR;1995: 458 p.

Bader M, Messerer P, Will W. Urinary creatinine concentrations in an industrial workforce and comparison with reference values of the general population. *Int Arch Occup Environ Health*. 2013 Aug;86(6):673-80.

Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN, Perry R. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, Air, Soil Pollut*. 1991;60:279-300.

Barbeau D, Maître A, Marquès M. Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst*. 2011 Mar 21;136(6):1183-91.

Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect*. 2005 Feb;113(2):192-200.

Bauer E, Guo Z, Ueng YF, Bell LC, Zeldin D, Guengerich F. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*. 1995;8(1):136-42.

Bentsen-Farmen RK, Botnen IV, Noto H, Jacob J, Ovrebo S. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by high-pressure liquid chromatography after purification on immunoaffinity columns in urine from occupationally exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1999 May;72(3):161-8.

Bentsen RK, Noto H, Halgard K, Ovrebo S. The effect of dust-protective respirator mask and the relevance of work category on urinary 1-hydroxypyrene concentration in PAH exposed electrode paste plant workers. *Ann Occup Hyg*. 1998 Feb;42(2):135-44.

Binet S. Tests de génotoxicité : aspects fondamentaux. *Arch Mal Prof*. 2001;62(6):501-5.

Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*. 1997 May;8(3):444-72.

Boogaard PJ. Urinary biomarkers in the risk assessment of PAHs. *Occup Environ Med.* 2008 Apr;65(4):221-2.

Bostrom CE, Gerde P, Hanberg A, Jernstrom B, Johansson C, Kyrklund T, et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect.* 2002 Jun;110 Suppl 3:451-88.

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

Bouchard M, Viau C. Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996 Aug;139(2):301-9.

Bouchard M, Viau C. Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 Mar;75(3):185-92.

Bouchard M, Viau C. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers.* 1999;4(3):159-87

Bouchard M, Normandin L, Gagnon F, Viau C, Dumas P, Gaudreau E, et al. Repeated measures of validated and novel biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in individuals living near an aluminum plant in Quebec, Canada. *J Toxicol Environ Health A.* 2009;72(23):1534-49.

Bouchard M, Viau C, Marie C, Maître A. Apport de la toxicocinétique dans le suivi biologique des expositions aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Arch Mal Prof.* 2010;71:520-2.

Bowman ED, Rothman N, Hackl C, Santella RM, Weston A. Interindividual variation in the levels of certain urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites following medicinal exposure to coal tar ointment. *Biomarkers.* 1997;2(5):321-7.

Brandt HC, Watson WP. Monitoring human occupational and environmental exposures to Polycyclic Aromatic Compounds. *Ann Occup Hyg*. 2003 Jul;47(5):349-78.

Buchet JP, Ferreira M, Burrion JB, Leroy T, Kirsch-Volders M, Van Hummelen P, et al. Tumor markers in serum, polyamines and modified nucleosides in urine, and cytogenetic aberrations in lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am J Ind Med*. 1995 Apr;27(4):523-43.

Buckley TJ, Waldman JM, Dhara R, Greenberg A, Ouyang Z, Liroy PJ. An assessment of a urinary biomarker for total human environmental exposure to benzo[a]pyrene. *Int Arch Occup Environ Health*. 1995;67(4):257-66.

Buratti M, Campo L, Fustinoni S, Cirila PE, Martinotti I, Cavallo D, et al. Urinary hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons as biomarkers of exposure in asphalt workers. *Biomarkers*. 2007 May-Jun;12(3):221-39.

Burchiel SW, Luster MI. Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clin Immunol*. 2001 Jan;98(1):2-10.

Burgaz S, Demircigil GC, Karahalil B, Karakaya AE. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. *Chemosphere*. 2002 Apr;47(1):57-64.

Busbee DL, Norman JO, Ziprin RL. Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol*. 1990;64(4):285-90.

Campo L, Fustinoni S, Buratti M, Cirila PE, Martinotti I, Foa V. Unmetabolized polycyclic aromatic hydrocarbons in urine as biomarkers of low exposure in asphalt workers. *J Occup Environ Hyg*. 2007;4(S1):100-10.

Campo L, Rossella F, Fustinoni S. Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;875(2):531-40.

Campo L, Rossella F, Pavanello S, Mielzynska D, Siwińska E, Kapka L, et al. Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers. *Toxicol Lett.* 2010;192(1):72-8.

Campo L, Fustinoni S, Bertazzi P. Quantification of carcinogenic 4- to 6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by solid-phase microextraction gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Aug;401(2):625-34.

Campo L, Vimercati L, Carrus A, Bisceglia L, Pesatori AC, Bertazzi PA, et al. Environmental and biological monitoring of PAHs exposure in coke-oven workers at the Taranto plant compared to two groups from the general population of Apulia, Italy. *Med Lav.* 2012 Sep-Oct;103(5):347-60.

Carta P, Aru G, Cadeddu C, Gigli G, Papi G, Carta F, et al. Mortality for pancreatic cancer among aluminium smelter workers in Sardinia, Italy. *G Ital Med Lav Ergon.* 2004 Apr-Jun;26(2):83-9.

Cavet M, Léonard M. Les expositions aux produits chimiques cancérogènes en 2010. DARES Analyses DARES Indicateurs. 2013; Septembre, n°2013-054: 9 p.

Cavret S, Laurent C, Feidt C, Laurent F, Rychen G. Intestinal absorption of ¹⁴C from ¹⁴C-phenanthrene, ¹⁴C-benzo[a]pyrene and ¹⁴C-tetrachlorodibenzo-para-dioxin: approaches with the Caco-2 cell line and with portal absorption measurements in growing pigs. *Reprod Nutr Dev.* 2003 Mar-Apr;43(2):145-54.

Chakravarti D, Venugopal D, Mailander PC, Meza JL, Higginbotham S, Cavalieri EL, et al. The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat Res-Gen Tox En.* 2008 Jan 8;649(1-2):161-78.

Chen L, Devanesan PD, Higginbotham S, Ariese F, Jankowiak R, Small GJ, et al. Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: their significance in tumor initiation. *Chem Res Toxicol.* 1996 Jul-Aug;9(5):897-903.

Chen YL, Wang CJ, Wu KY. Analysis of N7-(benzo[a]pyrene-6-yl)guanine in urine using two-step solid-phase extraction and isotope dilution with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19(7):893-8.

Chien YC, Yeh CT. Excretion characteristics of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine after dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Mol Mutagen*. 2010 Apr;51(3):243-50.

Chien YC, Yeh CT. Excretion kinetics of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene following dietary exposure to benzo[a]pyrene in humans. *Arch Toxicol*. 2012;86(1):45-53.

Chuang CY, Chang CC. Urinary 1-hydroxypyrene level relative to vehicle exhaust exposure mediated by metabolic enzyme polymorphisms. *J Occup Health*. 2007 Mar;49(2):140-51.

Ciarrocca M, Rosati MV, Tomei F, Capozzella A, Andreozzi G, Tomei G, et al. Is urinary 1-hydroxypyrene a valid biomarker for exposure to air pollution in outdoor workers? A meta-analysis. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2013 Jan 9. Epub.

Cocker J, Mason HJ, Warren ND, Cotton RJ. Creatinine adjustment of biological monitoring results. *Occup Med-Oxford*. 2011 Aug;61(5):349-53.

Cohen GM. Pulmonary metabolism of foreign compounds: its role in metabolic activation. *Environ Health Perspect*. 1990 Apr;85:31-41.

Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Res*. 1982;42(12):4875-917.

Crebelli R, Carta P, Andreoli C, Aru G, Dobrowolny G, Rossi S, et al. Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. *Mutat Res-Gen Tox En*. 2002 Apr 26;516(1-2):63-70.

Dalhoff K, Buus Jensen K, Enghusen Poulsen H. Cancer and molecular biomarkers of phase 2. *Methods Enzymol*. 2005;400:618-27.

DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res-Rev Mutat*. 2004 Nov;567(2-3):447-74.

Demetriou CA, Raaschou-Nielsen O, Loft S, Moller P, Vermeulen R, Palli D, et al. Biomarkers of ambient air pollution and lung cancer: a systematic review. *Occup Environ Med*. 2012 Sep;69(9):619-27.

Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*. 1996 Oct 18;274(5286):430-2.

Devanesan PD, RamaKrishna NV, Todorovic R, Rogan EG, Cavalieri EL, Jeong H, et al. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. *Chem Res Toxicol*. 1992 Mar-Apr;5(2):302-9.

Ding YS, Trommel JS, Yan XJ, Ashley D, Watson CH. Determination of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from domestic cigarettes. *Environ Sci Technol*. 2005 Jan 15;39(2):471-8.

Dipple A. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *IARC Sci Publ*. 1994 (125):107-29.

Dor F, Jongeneelen F, Zmirou D, Empereur-Bissonnet P, Nedellec V, Haguenoer JM, et al. Feasibility of assessing dermal exposure to PAHs of workers on gaswork sites--the SOLEX study. *Sci Total Environ*. 2000 Dec 18;263(1-3):47-55.

Ebert B, Seidel A, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*. 2005;26(10):1754-63.

European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). Percutaneous absorption. Monograph 20. Bruxelles: ECETOC;1993.

Elovaara E, Vaananen V, Mikkola J. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with beta-naphthoflavone induction in the rat. *Arch Toxicol*. 2003 Apr;77(4):183-93.

European Union. Commission Directive 2004/73/EC of 29 April 2004 adapting to technical progress for the 29th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws,

regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Union, 30 April 2004, L152/1.

Ewing P, Blomgren B, Ryrfeldt A, Gerde P. Increasing exposure levels cause an abrupt change in the absorption and metabolism of acutely inhaled benzo(a)pyrene in the isolated, ventilated, and perfused lung of the rat. *Toxicol Sci.* 2006;91(2):332-40.

Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* 2010 Dec 2;363(23):2233-47.

Fan R, Dong Y, Zhang W, Wang Y, Yu Z, Sheng G, et al. Fast simultaneous determination of urinary 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 May 19;836(1-2):92-7.

Fang JL, Lazarus P. Correlation between the UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) TATAA box polymorphism and carcinogen detoxification phenotype: significantly decreased glucuronidating activity against benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol(-) in liver microsomes from subjects with the UGT1A1*28 variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Jan;13(1):102-9.

Förster K, Preuss R, Rossbach B, Brüning T, Angerer J, Simon P. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occup Environ Med.* 2008 Apr;65(4):224-9.

Foth H, Kahl R, Kahl GF. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1988 Jan;26(1):45-51.

Foth H. Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds--implications for chemically induced toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 1995;25(2):165-205.

Gabrieli J, Vallelonga P, Cozzi G, Gabrielli P, Gambaro A, Sigl M, et al. Post 17th-century changes of European PAH emissions recorded in high-altitude Alpine snow and ice. *Environ Sci Technol.* 2010 May 1;44(9):3260-6.

Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* 1980 Oct;60(4):1107-66.

Gelhaus SL, Gilad O, Hwang WT, Penning TM, Blair IA. Multidrug resistance protein (MRP) 4 attenuates benzo[a]pyrene-mediated DNA-adduct formation in human bronchoalveolar H358 cells. *Toxicol Lett.* 2012 Feb 25;209(1):58-66.

Gendre C, Lafontaine M, Morele Y, Payan JP, Simon P. Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl Aromat Compd.* 2002;22:761-9.

Gendre C, Lafontaine M, Delsaut P, Simon P. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene : Assessment of an appropriate sampling time. *Polycycl Aromat Compd.* 2004;24:433-9.

Gerde P, Muggenburg BA, Hoover MD, Henderson RF. Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. I. The alveolar region. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993a Aug;121(2):313-8.

Gerde P, Muggenburg BA, Sabourin PJ, Harkema JR, Hotchkiss JA, Hoover MD, et al. Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. II. The conducting airways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993b Aug;121(2):319-27.

Gerde P, Muggenburg BA, Henderson RF. Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. III. Mechanisms of the dosimetry. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993c Aug;121(2):328-34.

Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Dahl AR. The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis.* 2001 May;22(5):741-9.

Gibbs GW, Armstrong B, Seigney M. Mortality and cancer experience of Quebec aluminum reduction plant workers. Part 2: mortality of three cohorts hired on or before January 1, 1951. *J Occup Environ Med.* 2007 Oct;49(10):1105-23.

Godschalk RW, Ostertag JU, Moonen EJ, Neumann HA, Kleinjans JC, van Schooten FJ. Aromatic DNA adducts in human white blood cells and skin after dermal application of coal tar. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Sep;7(9):767-73.

Godschalk RW, Moonen EJ, Schilderman PA, Broekmans WM, Kleinjans JC, Van Schooten FJ. Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis.* 2000 Jan;21(1):87-92.

Godschalk RW, Feldker DE, Borm PJ, Wouters EF, van Schooten FJ. Body mass index modulates aromatic DNA adduct levels and their persistence in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Aug;11(8):790-3.

Godschalk RW, Van Schooten FJ, Bartsch H. A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to Polycyclic Aromatic Compounds. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jan 31;36(1):1-11.

Grimmer G, Jacob J, Dettbarn G, Naujack KW. Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 1997;69(4):231-9.

Guignon N, Sandret N. Les expositions aux produits cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques. SUMER. Documents pour le Médecin du Travail. 2005;104:471-83.

Gündel J, Angerer J. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenz[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Jan 28;738(1):47-55.

Gündel J, Schaller KH, Angerer J. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenz(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene. *Int Arch Occup Environ Health.* 2000 May;73(4):270-4.

Gyorffy E, Anna L, Gyori Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, et al. DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and

non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by 32P-postlabelling and immunoassay. *Carcinogenesis*. 2004 Jul;25(7):1201-9.

Hagedorn H, Scherer G, Engl J, Riedel K, Cheung F, Errington G, et al. Urinary excretion of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in nonsmokers and in smokers of cigarettes with different ISO tar yields. *J Anal Toxicol*. 2009;33(6):301-9.

Hansen AM, Mathiesen L, Pedersen M, Knudsen LE. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies--a review. *Int J Hyg Environ Health*. 2008 Oct;211(5-6):471-503.

Harri M, Svoboda P, Mori T, Mutanen P, Kasai H, Savela K. Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine among workers exposed to diesel particulate exhaust: comparison with urinary metabolites and PAH air monitoring. *Free Radic Res*. 2005 Sep;39(9):963-72.

Harvey RG. Activated metabolites of carcinogenic hydrocarbons. *Accounts of chemical research*. 1981;14(7):218-26.

Haufroid V, Lison D. Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: a minireview. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005 Jun;78(5):343-54.

Hecht SS, Grabowski W, Groth K. Analysis of faeces for benzo[a]pyrene after consumption of charcoal-broiled beef by rats and humans. *Food Cosmet Toxicol*. 1979 Jun;17(3):223-7.

Hecht SS, Carmella SG, Villalta PW, Hochalter JB. Analysis of Phenanthrene and Benzo[a]pyrene Tetraol Enantiomers in Human Urine: Relevance to the Bay Region Diol Epoxide Hypothesis of Benzo[a]pyrene Carcinogenesis and to Biomarker Studies. *Chem Res Toxicol*. 2010 May 17;23(5):900-8.

Heikkilä PR, Luotamo M, Riihimäki V. Urinary 1-naphthol excretion in the assessment of exposure to creosote in an impregnation facility. *Scand J Work Environ Health*. 1997 Jun;23(3):199-205.

Hemon-Delsaux J. Evaluation des niveaux d'exposition professionnelle aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et des pathologies cancéreuses associées. Thèse de Médecine. Grenoble: Université Joseph Fourier; 2004: 184 p.

Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res.* 1998;154:47-85.

Heredia-Ortiz R, Bouchard M, Marie-Desvergne C, Viau C, Maître A. Modeling of the internal kinetics of benzo(a)pyrene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene biomarker from rat data. *Toxicol Sci.* 2011 Aug;122(2):275-87.

Hochalter JB, Zhong Y, Han S, Carmella SG, Hecht SS. Quantitation of a Minor Enantiomer of Phenanthrene Tetraol in Human Urine: Correlations with Levels of Overall Phenanthrene Tetraol, Benzo[a]pyrene Tetraol, and 1-Hydroxypyrene. *Chem Res Toxicol.* 2011 Feb 18;24(2):262-8.

Hollender J, Koch B, Dott W. Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene hydroxides. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Feb 28;739(1):225-9.

Hopf NB, Carreon T, Talaska G. Biological markers of carcinogenic exposure in the aluminum smelter industry--a systematic review. *J Occup Environ Hyg.* 2009 Sep;6(9):562-81.

Huang G, Guo H, Wu T. Genetic variations of CYP2B6 gene were associated with plasma BPDE-Alb adducts and DNA damage levels in coke oven workers. *Toxicol Lett.* 2012a Jun 20;211(3):232-8.

Huang M, Liu X, Basu SS, Zhang L, Kushman ME, Harvey RG, et al. Metabolism and distribution of benzo[a]pyrene-7,8-dione (B[a]P-7,8-dione) in human lung cells by liquid chromatography tandem mass spectrometry: detection of an adenine B[a]P-7,8-dione adduct. *Chem Res Toxicol.* 2012b May 21;25(5):993-1003.

Huang M, Blair IA, Penning TM. Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA Adducts in Human Lung Cells. *Chem Res Toxicol*. 2013 May 20;26(5):685-92.

IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphtalene and Styrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 82. Lyon (France): IARC;2002: 601 p.

IARC. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 92. Lyon (France): IARC;2010: 856 p.

IARC. Chemical agents and related occupations A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100 F. Lyon (France): IARC;2012: 599 p.

INSERM. Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles. Expertise collective. Paris: INSERM;2001: 143 p.

ISO. French-Standardized-Technical-Specifications. Standard ISO 15189:2003. Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence. Geneva: ISO; 2003. 39 p.

Jacques C, Jamin EL, Perdu E, Duplan H, Mavon A, Zalko D, et al. Characterisation of B(a)P metabolites formed in an ex vivo pig skin model using three complementary analytical methods. *Anal Bioanal Chem*. 2010a Mar;396(5):1691-701.

Jacques C, Perdu E, Duplan H, Jamin EL, Canlet C, Debrauwer L, et al. Disposition and biotransformation of ¹⁴C-Benzo(a)pyrene in a pig ear skin model: ex vivo and in vitro approaches. *Toxicol Lett*. 2010b Nov 10;199(1):22-33.

Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2007 Sep;20(9):1331-41.

Jongeneelen F, Leijdekkers CM, Henderson PT. Urinary excretion of 3-hydroxy-benzo[a]pyrene after percutaneous penetration and oral absorption of benzo[a]pyrene in rats. *Cancer Lett*. 1984;25(2):195-201.

Jongeneelen FJ, Anzion RB, Leijdekkers CM, Bos RP, Henderson PT. 1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int Arch Occup Environ Health*. 1985;57(1):47-55.

Jongeneelen FJ, Bos RP, Anzion RB, Theuws JL, Henderson PT. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Metabolites in urine. *Scand J Work Environ Health*. 1986 Apr;12(2):137-43.

Jongeneelen FJ, Anzion RB, Scheepers PT, Bos RP, Henderson PT, Nijenhuis EH, et al. 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Ann Occup Hyg*. 1988;32(1):35-43.

Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci Total Environ*. 1997 Jun 20;199(1-2):141-9.

Jongeneelen FJ. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg*. 2001 Jan;45(1):3-13.

Käfferlein HU, Marczynski B, Mensing T, Brüning T. Albumin and hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene in humans--analytical methods, exposure assessment, and recommendations for future directions. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(2):126-50.

Käfferlein HU, Marczynski B, Simon P, Angerer J, Rihs HP, Wilhelm M, et al. Internal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a null result in brief. *Arch Toxicol*. 2012 Aug;86(8):1317-21.

Karahalil B, Burgaz S, Fisek G, Karakaya AE. Biological monitoring of young workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine repair workshops. *Mutat Res-Gen Tox En*. 1998 Feb 13;412(3):261-9.

Katsoyiannis A, Sweetman AJ, Jones KC. PAH molecular diagnostic ratios applied to atmospheric sources: a critical evaluation using two decades of source inventory and air concentration data from the UK. *Environ Sci Technol*. 2011 Oct 15;45(20):8897-906.

Kim J, Koo SI, Noh SK. Green tea extract markedly lowers the lymphatic absorption and increases the biliary secretion of ¹⁴C-benzo[a]pyrene in rats. *J Nutr Biochem*. 2012 Aug;23(8):1007-11.

Kuklenyik Z, Ye X, Needham L, Calafat A. Automated solid-phase extraction approaches for large scale biomonitoring studies. *J Chromatogr Sci*. 2009;47(1):12-8.

Kuljukka-Rabb T, Nylund L, Vaaranrinta R, Savela K, Mutanen P, Veidebaum T, et al. The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2002 Jan-Feb;12(1):81-91.

Kuusimäki L, Peltonen Y, Mutanen P, Peltonen K, Savela K. Urinary hydroxy-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust. *Int Arch Occup Environ Health*.. 2004;77(1):23-30.

Lafontaine M. Recherche de métabolites urinaires chez les ouvriers exposés aux HAP. Paris: INRS; 2000: 10 p.

Lafontaine M, Gendre C, Morele Y, Laffitte-Rigaud G. Excretion of urinary 1-hydroxypyrene in relation to the penetration routes of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl Aromat Compd*. 2002;22(3-4):579-88.

Lafontaine M, Gendre C, Delsaut P, Simon P. Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons : an approach for determining a biological limit value. *Polycycl Aromat Compd*. 2004;24:441-50.

Lafontaine M, Champmartin C, Simon P, Delsaut P, Funck-Brentano C. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers. *Toxicol Lett*. 2006 Apr 10;162(2-3):181-5.

Lan Q, He X, Costa DJ, Tian L, Rothman N, Hu G, et al. Indoor coal combustion emissions, GSTM1 and GSTT1 genotypes, and lung cancer risk: a case-control study in Xuan Wei, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Jun;9(6):605-8.

Lan Q, Mumford JL, Shen M, Demarini DM, Bonner MR, He X, et al. Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis*. 2004 Nov;25(11):2177-81.

Laurent C, Feidt C, Lichtfouse E, Grova N, Laurent F, Rychen G. Milk--blood transfer of (14)C-tagged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pigs. *J Agric Food Chem*. 2001 May;49(5):2493-6.

Laurent C, Feidt C, Grova N, Mpassi D, Lichtfouse E, Laurent F, et al. Portal absorption of 14C after ingestion of spiked milk with 14C-phenanthrene, 14C-benzo[a]pyrene or 14C-TCDD in growing pigs. *Chemosphere*. 2002 Sep;48(8):843-8.

Leroyer A, Jeandel F, Maître A, Howsam M, Deplanque D, Mazzuca M, et al. 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. *Sci Total Environ*. 2010 Feb 1;408(5):1166-73.

Levin JO, Rhén M, Sikström E. Occupational PAH exposure: urinary 1-hydroxypyrene levels of coke oven workers, aluminium smelter pot-room workers, road pavers, and occupationally non-exposed persons in Sweden. *Sci Total Environ*. 1995 Feb 24;163(1-3):169-77.

Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey AC. Polymorphisms in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene and small cell lung cancer risk in a UK population. *Lung Cancer*. 2001 Nov;34(2):177-83.

Li X, Feng Y, Deng H, Zhang W, Kuang D, Deng Q, et al. The dose-response decrease in heart rate variability: any association with the metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in coke oven workers? *PLoS One*. 2012a;7(9):e44562.

Li Z, Mulholland JA, Romanoff LC, Pittman EN, Trinidad DA, Lewin MD, et al. Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring. *J Environ Monit*. 2010 May;12(5):1110-18.

Li Z, Romanoff L, Bartell S, Pittman EN, Trinidad DA, McClean M, et al. Excretion profiles and half-lives of ten urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites after dietary exposure. *Chem Res Toxicol*. 2012b Jul 16;25(7):1452-61.

Likhachev AJ, Beniashvili D, Bykov VJ, Dikun PP, Tyndyk ML, Savochkina IV, et al. Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic agents: excretion and carcinogenic risk of benzo[a]pyrene metabolites. *Environ Health Perspect.* 1992 Nov;98:211-4.

Liu AL, Lu WQ, Wang ZZ, Chen WH, Lu WH, Yuan J, et al. Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, lymphocytic micronuclei, and serum glutathione S-transferase in workers exposed to coke oven emissions. *Environ Health Perspect.* 2006 May;114(5):673-7.

Liu M, Chen L, Zhou R, Wang J. Association between GSTM1 polymorphism and DNA adduct concentration in the occupational workers exposed to PAHs: a meta-analysis. *Gene.* 2013 Apr 25;519(1):71-6.

Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C, Akpan V, Fonnesu ML, et al. Benzo(a)pyrene diol-epoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Aug;13(8):1342-8.

Lohmann R, Lammel G. Adsorptive and absorptive contributions to the gas-particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons: state of knowledge and recommended parametrization for modeling. *Environ Sci Technol.* 2004 Jul 15;38(14):3793-803.

Lu D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Quantitation of benzo[a]pyrene metabolic profiles in human bronchoalveolar (H358) cells by stable isotope dilution liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 2011 Nov 21;24(11):1905-14.

Marchand N, Besombes J, Masclet P, Jaffrezo J. Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Two French Alpine Valleys. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D, editors. *Environmental chemistry. Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems.* Berlin. Springer; 2005:409-17.

Marczynski B, Preuss R, Mensing T, Angerer J, Seidel A, El Mourabit A, et al. Genotoxic risk assessment in white blood cells of occupationally exposed workers before and after alteration of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) profile in the production material:

comparison with PAH air and urinary metabolite levels. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005 Mar;78(2):97-108.

Marczynski B, Raulf-Heimsoth M, Spickenheuer A, Pesch B, Kendzia B, Mensing T, et al. DNA adducts and strand breaks in workers exposed to vapours and aerosols of bitumen: associations between exposure and effect. *Arch Toxicol*. 2011 Jun;85 Suppl 1:S53-64.

Marie-Desvergne C, Maître A, Bouchard M, Ravanat JL, Viau C. Evaluation of DNA adducts, DNA and RNA oxidative lesions, and 3-hydroxybenzo(a)pyrene as biomarkers of DNA damage in lung following intravenous injection of the parent compound in rats. *Chem Res Toxicol*. 2010 Jul 19;23(7):1207-14.

Marie C, Maître A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, Guiraud P, et al. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol*. 2008 Jul;28(5):579-90.

Marie C, Ravanat JL, Badouard C, Marquès M, Balducci F, Maître A. Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. *Environ Mol Mutagen*. 2009 Mar;50(2):88-95.

Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, Viau C, Maître A. A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. *J Appl Toxicol*. 2010;30(5):402-10.

Mass MJ, Jeffers AJ, Ross JA, Nelson G, Galati AJ, Stoner GD, et al. Ki-ras oncogene mutations in tumors and DNA adducts formed by benz[j]aceanthrylene and benzo[a]pyrene in the lungs of strain A/J mice. *Mol Carcinog*. 1993;8(3):186-92.

Mastral AM, Lopez JM, Callen MS, Garcia T, Murillo R, Navarro MV. Spatial and temporal PAH concentrations in Zaragoza, Spain. *Sci Total Environ*. 2003 May 20;307(1-3):111-24.

McCoull KD, Rindgen D, Blair IA, Penning TM. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem Res Toxicol*. 1999 Mar;12(3):237-46.

Melikian AA, Bagheri K, Hecht SS. Contrasting disposition and metabolism of topically applied benzo(a)pyrene, trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and 7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene in mouse epidermis in vivo. *Cancer Res.* 1987 Oct 15;47(20):5354-60.

Mensing T, Marczynski B, Engelhardt B, Wilhelm M, Preuss R, Kappler M, et al. DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Hyg Environ Health.* 2005;208(3):173-8.

Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ Sci Technol.* 1992;26(7):1278–84.

Mielyńska D, Braszczyńska Z, Siwińska E, Smolik E, Bubak A, Sokal JA. Exposure of coke-oven workers to polycyclic aromatic hydrocarbons based on biological monitoring results. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1997 Sep;58(9):661-6.

Moir D, Viau A, Chu I, Withey J, McMullen E. Pharmacokinetics of benzo[a]pyrene in the rat. *J Toxicol Environ Health A.* 1998 Apr 10;53(7):507-30.

Mori I. Cancer mortality among man-made graphite electrode manufacturing workers: results of a 38 year follow up. *Occup Environ Med.* 2002 Jul;59(7):473-80.

Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA. Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992 Aug;115(2):216-23.

Nielsen PS, Andreassen A, Farmer PB, Ovrebo S, Autrup H. Biomonitoring of diesel exhaust-exposed workers. DNA and hemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol Lett.* 1996 Jul;86(1):27-37.

Onyemauwa F, Rappaport S, Sobus J, Gajdosová D, Wu R, Waidyanatha S. Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(11-12):1117-25.

Papageorgopoulou A, Manoli E, Touloumi E, Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of Greek towns in relation to other atmospheric pollutants. *Chemosphere*. 1999 Dec;39(13):2183-99.

Park JH, Mangal D, Tacka KA, Quinn AM, Harvey RG, Blair IA, et al. Evidence for the aldoketo reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 May 13;105(19):6846-51.

Park JH, Mangal D, Frey AJ, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldoketo reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J Biol Chem*. 2009 Oct 23;284(43):29725-34.

Pastorelli R, Guanci M, Cerri A, Negri E, La Vecchia C, Fumagalli F, et al. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, and blood protein adducts of benzo(a)pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(8):703-9.

Pavanello S, Favretto D, Brugnone F, Mastrangelo G, Dal Pra G, Clonfero E. HPLC/fluorescence determination of anti-BPDE-DNA adducts in mononuclear white blood cells from PAH-exposed humans. *Carcinogenesis*. 1999 Mar;20(3):431-5.

Pavanello S, Pulliero A, Saia BO, Clonfero E. Determinants of anti-benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct formation in lymphomonocytes of the general population. *Mutat Res-Gen Tox En*. 2006 Dec 10;611(1-2):54-63.

Pavanello S, Pulliero A, Clonfero E. Influence of GSTM1 null and low repair XPC PAT+ on anti-B[a]PDE-DNA adduct in mononuclear white blood cells of subjects low exposed to PAHs through smoking and diet. *Mutat Res-Fund Mol M*. 2008 Feb 1;638(1-2):195-204.

Pavanello S, Lotti M. Internal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage. *Arch Toxicol*. 2013 Mar;87(3):551-3.

Payan JP, Lafontaine M, Simon P, Marquet F, Champmartin-Gendre C, Beydon D, et al. 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol*. 2009 Sep;83(9):873-83.

Pélessier AL, Duffaut F, De Méo MP, Botta A. Le test d'Ames : application aux urines de fumeurs. *Rev Med Interne*. 1996;17(8):635-9.

Peltonen K, Dipple A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. *J Occup Environ Med*. 1995;37(1):52-8.

Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):517-24.

Pesch B, Kappler M, Straif K, Marczynski B, Preuss R, Rossbach B, et al. Dose-response modeling of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with biomarkers of exposure and effect. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Sep;16(9):1863-73.

Petry T, Schmid P, Schlatter C. Airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. *Ann Occup Hyg*. 1996 Jun;40(3):345-57.

Pilger A, Germadnik D, Riedel K, Meger-Kossien I, Scherer G, Rüdiger HW. Longitudinal study of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in healthy adults. *Free Radic Res*. 2001 Sep;35(3):273-80.

Pillière F. Salariés exposés à des génotoxiques : place de la surveillance biologique et des tests de mutagenèse. *Arch Mal Prof*. 2001;62(6):505.

Preuss R, Drexler H, Böttcher M, Wilhelm M, Brüning T, Angerer J. Current external and internal exposure to naphthalene of workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005 Jun;78(5):355-62.

Prevedouros K, Brorström-Lundén E, C JH, Jones KC, Lee RG, Sweetman AJ. Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations: evidence and implications. *Environ Pollut*. 2004;128(1-2):17-27.

Prough RA, Patrizi VW, Okita RT, Masters BS, Jakobsson SW. Characteristics of benzo(a)pyrene metabolism by kidney, liver and lung microsomal fractions from rodents and humans. *Cancer Res*. 1979;39(4):199-206.

Qiu L, Leng S, Wang Z, Dai Y, Zheng Y, Wang Z. Path analysis of biomarkers of exposure and early biological effects among coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jun;16(6):1193-9.

Qu SX, Stacey NH. Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis.* 1996 Jan;17(1):53-9.

Ragin AD, Crawford KE, Etheredge AA, Grainger J, Patterson DG. A gas chromatography-isotope dilution high-resolution mass spectrometry method for quantification of isomeric benzo[a]pyrene diol epoxide hemoglobin adducts in humans. *J Anal Toxicol.* 2008 Nov-Dec;32(9):728-36.

Rahman A, Barrowman JA, Rahimtula A. The influence of bile on the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from the rat intestine. *Can J Physiol Pharm.* 1986 Sep;64(9):1214-8.

Ramesh A, Inyang F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, Nyanda AM. Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp Toxicol Pathol.* 2001a Sep;53(4):275-90.

Ramesh A, Greenwood M, Inyang F, Hood DB. Toxicokinetics of inhaled benzo[a]pyrene: plasma and lung bioavailability. *Inhal Toxicol.* 2001b Jun;13(6):533-55.

Ramesh A, Walker SA, Hood DB, Guillen MD, Schneider K, Weyand EH. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Toxicol.* 2004;23(5):301-33.

Ramond B, Gaillandre A, Gibelin N, Maignan N, Michalski C, Nabet P, et al. Guide de validation des méthodes de dosage biologique. *STP Pharma Pratiques.* 2002;12(6):317-36.

Raulf-Heimsoth M, Angerer J, Pesch B, Marczynski B, Hahn J, Spickenheuer A, et al. Biological monitoring as a useful tool for the detection of a coal-tar contamination in bitumen-exposed workers. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(11-12):746-50.

Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ.* 2008; 42(13):2895-921.

Rehwagen M, Müller A, Massolo L, Herbarth O, Ronco A. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Sci Total Environ.* 2005;348(1-3):199-210.

Rogan EG, RamaKrishna NV, Higginbotham S, Cavalieri EL, Jeong H, Jankowiak R, et al. Identification and quantitation of 7-(benzo[a]pyren-6-yl)guanine in the urine and feces of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chem Res Toxicol.* 1990 Sep-Oct;3(5):441-4.

Rojas M, Alexandrov K, Auburtin G, Wastiaux-Denamur A, Mayer L, Mahieu B, et al. Anti-benzo[a]pyrene diolepoxide--DNA adduct levels in peripheral mononuclear cells from coke oven workers and the enhancing effect of smoking. *Carcinogenesis.* 1995 Jun;16(6):1373-6.

Rojas M, Alexandrov K, Cascorbi I, Brockmöller J, Likhachev A, Pozharisski K, et al. High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 MspI/Msp-GSTM1*0/*0 genotypes. *Pharmacogenetics.* 1998 Apr;8(2):109-18.

Romanoff LC, Li Z, Young KJ, Blakely NC, Patterson DG, Sandau CD. Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 May 1;835(1-2):47-54.

Ross J, Nelson G, Kligerman A, Erexson G, Bryant M, Earley K, et al. Formation and persistence of novel benzo(a)pyrene adducts in rat lung, liver, and peripheral blood lymphocyte DNA. *Cancer Res.* 1990 Aug 15;50(16):5088-94.

Rosbach B, Preuss R, Letzel S, Drexler H, Angerer J. Biological monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by determination of monohydroxylated metabolites of phenanthrene and pyrene in urine. *Int Arch Occup Environ Health.* 2007 Nov;81(2):221-9.

Rossella F, Campo L, Pavanello S, Kapka L, Siwińska E, Fustinoni S. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers. *Occup Environ Med.* 2009 Aug;66(8):509-16.

Rossi C, Poli P, Buschini A, Cassoni F, Cattani S, DeMunari E. Comparative investigations among meteorological conditions, air chemical-physical pollutants and airborne particulate mutagenicity: a long-term study (1990-1994) from a northern Italian town. *Chemosphere*. 1995 May;30(10):1829-45.

Ruchirawat M, Mahidol C, Tangjarukij C, Pui-ock S, Jensen O, Kampeerawipakorn O, et al. Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand - particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers. *Sci Total Environ*. 2002;287:121-32.

Ruggeri B, DiRado M, Zhang SY, Bauer B, Goodrow T, Klein-Szanto AJ. Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Feb 1;90(3):1013-7.

Sajous L, Botta A, Sari-Minodier I. Dosage de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine dans les urines : un biomarqueur du stress oxydatif d'origine environnementale ? *Ann Biol Clin*. 2008;66(1):19-29.

Saldivar SJ, Wang Y, Zhao H, Shao L, Lin J, Spitz MR, et al. An association between a NQO1 genetic polymorphism and risk of lung cancer. *Mutat Res-Gen Tox En*. 2005 Apr 4;582(1-2):71-8.

Salines G. Biosurveillance humaine, biomarqueurs et biosurveillance environnementale. *Ann Pharm Fr*. 2012 Jul;70(4):199-203.

Sarkar M, Liu J, Koval T, Wang J, Feng S, Serafin R, et al. Evaluation of biomarkers of exposure in adult cigarette smokers using Marlboro snus. *Nicotine Tob Res*. 2010 Feb;12(2):105-16.

Scherer G, Frank S, Riedel K, Meger-Kossien I, Renner T. Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Apr;9(4):373-80.

Sen S, Bhojnagarwala P, Francey L, Lu D, Penning TM, Field J. p53 Mutagenesis by benzo[a]pyrene derived radical cations. *Chem Res Toxicol*. 2012 Oct 15;25(10):2117-26.

Shen YM, Troxel AB, Vedantam S, Penning TM, Field J. Comparison of p53 mutations induced by PAH o-quinones with those caused by anti-benzo[a]pyrene diol epoxide in vitro: role of reactive oxygen and biological selection. *Chem Res Toxicol*. 2006 Nov;19(11):1441-50.

Shimada T, Oda Y, Gillam EM, Guengerich FP, Inoue K. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab Dispos*. 2001 Sep;29(9):1176-82.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006 Aug;21(4):257-76.

Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Jan 18;97(2):779-82.

Shin HS, Lim HH. Simultaneous determination of 2-naphthol and 1-hydroxy pyrene in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011 Mar 1;879(7-8):489-94.

Simon P, Lafontaine M, Delsaut P, Morele Y, Nicot T. Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000 Oct 10;748(2):337-48.

Simpson CD, Wu MT, Christiani DC, Santella RM, Carmella SG, Hecht SS. Determination of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in human urine by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2000 Apr;13(4):271-80.

Siwińska E, Mielżyńska D, Kapka L. Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers. *Occup Environ Med*. 2004 Mar;61(3):e10.

Sjögren M, Ehrenberg L, Rannug U. Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. *Mutat Res-Fund Mol M.* 1996 Oct 28;358(1):97-112.

Somorovská M, Szabová E, Vodická P, Tulinská J, Barancoková M, Fábry R, et al. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat Res-Gen Tox En.* 1999 Sep 30;445(2):181-92.

Sram RJ, Binkova B, Beskid O, Milcova A, Rossner P, Rossner P, et al. Biomarkers of exposure and effect-interpretation in human risk assessment. *Qual Atmos Health.* 2011;4(3-4):161-7.

Srivastava SK, Watkins SC, Schuetz E, Singh SV. Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Mol Carcinog.* 2002 Mar;33(3):156-62.

Stavric B, Klassen R. Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. *Food Chem Toxicol.* 1994 Aug;32(8):727-34.

Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, et al. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis.* 1998 Mar;19(3):433-6.

Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, Targosz D. Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environ Health Perspect.* 1994 Mar;102(3):302-4.

Taioli E, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Garte S, et al. Biomarkers of exposure to carcinogenic PAHs and their relationship with environmental factors. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2007 Jul 1;620(1-2):16-21.

Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S, et al. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res.* 2001 Sep 15;61(18):6708-12.

Tarantini A, Maître A, Lefebvre E, Marquès M, Marie C, Ravanat JL, et al. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2009 Dec 1;671(1-2):67-75.

Tarantini A, Douki T, Personnaz M, Besombes J, Jafrezzo J, Maître A. Effect of the chemical composition of organic extracts from environmental and industrial atmospheric samples on the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures. *Toxicol Environ Chem.* 2011a;93(5):941-54.

Tarantini A, Maître A, Lefebvre E, Marquès M, Rajhi A, Douki T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology.* 2011b Jan 11;279(1-3):36-44.

Tas S, Buchet JP, Lauwerys R. Determinants of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to albumin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health.* 1994;66(5):343-8.

Tjoe Ny E, Heederik D, Kromhout H, Jongeneelen F. The relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons in air and in urine of workers in a Söderberg potroom. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1993 Jun;54(6):277-84.

Topinka J, Sevastyanova O, Binkova B, Chvatalova I, Milcova A, Lnenickova Z, et al. Biomarkers of air pollution exposure--a study of policemen in Prague. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2007 Nov 1;624(1-2):9-17.

Toriba A, Nakamura H, Chetianukornkul T, Kizu R, Makino T, Nakazawa H, et al. Method for determining monohydroxybenzo[a]pyrene isomers using column-switching high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2003 Jan 1;312(1):14-22.

Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:581-616.

Tzekova A, Thuot R, Viau C. Correlation between biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and electrophilic tissue burden in a rat model. *Arch Toxicol*. 2004 Jun;78(6):351-61.

Unwin J, Cocker J, Scobbie E, Chambers H. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Ann Occup Hyg*. 2006 Jun;50(4):395-403.

Upadhyaya P, Hochalter JB, Balbo S, McIntee EJ, Hecht SS. Preferential glutathione conjugation of a reverse diol epoxide compared with a bay region diol epoxide of benzo[a]pyrene in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2010 Sep;38(9):1397-402.

Vaananen V, Hameila M, Kalliokoski P, Nykyri E, Heikkilä P. Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among road pavers. *Ann Occup Hyg*. 2005 Mar;49(2):167-78.

Van Delft JH, Steenwinkel MJ, van Asten JG, van Es J, Kraak A, Baan RA. Monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a carbon-electrode manufacturing plant. *Ann Occup Hyg*. 1998 Feb;42(2):105-14.

Van Rooij JG, Bodelier-Bade MM, De Loeff AJ, Dijkmans AP, Jongeneelen FJ. Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among primary aluminium workers. *Med Lav*. 1992 Sep-Oct;83(5):519-29.

Van Rooij JG, De Roos JH, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons through human skin: differences between anatomical sites and individuals. *J Toxicol Environ Health*. 1993a Apr;38(4):355-68.

Van Rooij JG, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *Br J Ind Med*. 1993b Jul;50(7):623-32.

Van Rooij JG. Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among workers. Luxembourg:European Commission, unit V/F/5;1997: 180 p.

Van Schooten FJ, Jongeneelen FJ, Hillebrand MJ, van Leeuwen FE, de Looft AJ, Dijkmans AP, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cell DNA and 1-hydroxypyrene in the urine from aluminum workers: relation with job category and synergistic effect of smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995 Jan-Feb;4(1):69-77.

Vasiluk L, Pinto LJ, Tsang WS, Gobas FA, Eickhoff C, Moore MM. The uptake and metabolism of benzo[a]pyrene from a sample food substrate in an in vitro model of digestion. *Food Chem Toxicol.* 2008 Feb;46(2):610-8.

Verma N, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics.* 2012 Jun;12(11):1731-55.

Viau C, Vyskocil A, Bouchard M, Carrier G. La surveillance biologique de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Travail et santé.* 1995a;11(2):S-7.

Viau C, Carrier G, Vyskocil A, Dodd C. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *Sci Total Environ.* 1995b Feb 24;163(1-3):179-86.

Walker A, Kohli A, Syed A, Eisen E, Noth E, Pratt B, et al. Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons is associated with higher levels of total IgE, decreased function of T regulatory cells and an increase of asthma occurrence in children *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2S).

Wang H, Chen W, Zheng H, Guo L, Liang H, Yang X, et al. Association between plasma BPDE-Alb adduct concentrations and DNA damage of peripheral blood lymphocytes among coke oven workers. *Occup Environ Med.* 2007 Nov;64(11):753-8.

Wang H, Wilson WB, Campiglia AD. Using gold nanoparticles to improve the recovery and the limits of detection for the analysis of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples. *J Chromatogr A.* 2009 Jul 31;1216(31):5793-9.

Wang JJ, Frazer DG, Law B, Lewis DM. Identification and quantification of urinary benzo[a]pyrene and its metabolites from asphalt fume exposed mice by microflow LC coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analyst.* 2003a Jul;128(7):864-70.

Wang JJ, Frazer DG, Stone S, Goldsmith T, Law B, Moseley A, et al. Urinary benzo[a]pyrene and its metabolites as molecular biomarkers of asphalt fume exposure characterized by microflow LC coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003b Nov 1;75(21):5953-60.

Wang Y, Zhang W, Dong Y, Fan R, Sheng G, Fu J. Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem.* 2005 Nov;383(5):804-9.

Watanabe J, Shimada T, Gillam EM, Ikuta T, Suemasu K, Higashi Y, et al. Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer. *Pharmacogenetics.* 2000 Feb;10(1):25-33.

Wei SJ, Chang RL, Merkler KA, Gwynne M, Cui XX, Murthy B, et al. Dose-dependent mutation profile in the c-Ha-ras proto-oncogene of skin tumors in mice initiated with benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis.* 1999 Sep;20(9):1689-96.

Weston A, Bowman ED, Carr P, Rothman N, Strickland PT. Detection of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *Carcinogenesis.* 1993 May;14(5):1053-5.

Whitlock JP. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:103-25.

Whiton RS, Witherspoon CL, Buckley TJ. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995 Mar 24;665(2):390-4.

WHO. Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 202: Geneva:WHO;1998: 883 p.

Withey JR, Shedden J, Law FC, Abedini S. Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *J Appl Toxicol.* 1993 May-Jun;13(3):193-202.

Wolff RK, Griffith WC, Henderson RF, Hahn FF, Harkema JR, Rebar AH, et al. Effects of repeated inhalation exposures to 1-nitropyrene, benzo[a]pyrene, Ga₂O₃ particles, and SO₂ alone and in combinations on particle clearance, bronchoalveolar lavage fluid composition, and histopathology. *J Toxicol Environ Health*. 1989;27(1):123-38.

Wu MT, Simpson CD, Christiani DC, Hecht SS. Relationship of exposure to coke-oven emissions and urinary metabolites of benzo(a)pyrene and pyrene in coke-oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Mar;11(3):311-4.

Wu MT, Pan CH, Huang YL, Tsai PJ, Chen CJ, Wu TN. Urinary excretion of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and 1-hydroxypyrene in coke-oven workers. *Environ Mol Mutagen*. 2003;42(2):98-105.

Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Aug 1;206(1):73-93.

Yang SK, McCourt DW, Roller PP, Gelboin HV. Enzymatic conversion of benzo(a)pyrene leading predominantly to the diol-epoxide r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene through a single enantiomer of r-7, t-8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976 Aug;73(8):2594-8.

Yang Y, Sjövall J, Rafter J, Gustafsson JA. Characterization of neutral metabolites of benzo[a]pyrene in urine from germfree rats. *Carcinogenesis*. 1994 Apr;15(4):681-7.

Yang Y, Rafter J, Gustafsson JA, Sjövall J, Griffiths WJ. Analysis of the major mercapturic acid pathway metabolites of benzo[a]pyrene found in rat urine by nano-electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1998;12(8):465-71.

Yang Y, Griffiths WJ, Midtvedt T, Sjövall J, Rafter J, Gustafsson JA. Characterization of conjugated metabolites of benzo[a]pyrene in germ-free rat urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 1999 Dec;12(12):1182-9.

Yang Y, Griffiths WJ, Nordling M, Nygren J, Möller L, Bergman J, et al. Ring opening of benzo[a]pyrene in the germ-free rat is a novel pathway for formation of potentially genotoxic metabolites. *Biochemistry-Moscow*. 2000 Dec 19;39(50):15585-91.

Yu D, Berlin JA, Penning TM, Field J. Reactive oxygen species generated by PAH o-quinones cause change-in-function mutations in p53. *Chem Res Toxicol*. 2002 Jun;15(6):832-42.

Yun CH, Shimada T, Guengerich FP. Roles of human liver cytochrome P4502C and 3A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene. *Cancer Res*. 1992;52(7):1868-74.

Zhang L, Huang M, Blair IA, Penning TM. Detoxication of benzo[a]pyrene-7,8-dione by sulfotransferases (SULTs) in human lung cells. *J Biol Chem*. 2012a Aug 24;287(35):29909-20.

Zhang L, Jin Y, Huang M, Penning TM. The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones. *Front Pharmacol*. 2012b;3:193.

Zheng Z, Fang JL, Lazarus P. Glucuronidation: an important mechanism for detoxification of benzo[a]pyrene metabolites in aerodigestive tract tissues. *Drug Metab Dispos*. 2002 Apr;30(4):397-403.

Zhong Y, Carmella SG, Hochalter JB, Balbo S, Hecht SS. Analysis of r-7,t-8,9,c-10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in Human Urine: A Biomarker for Directly Assessing Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Plus Metabolic Activation. *Chem Res Toxicol*. 2011a;24(1):73-80.

Zhong Y, Carmella SG, Upadhyaya P, Hochalter JB, Rauch D, Oliver A, et al. Immediate Consequences of Cigarette Smoking: Rapid Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Diol Epoxides. *Chem Res Toxicol*. 2011b;24(2):246-52.

TITRE : Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène urinaire en tant qu'indicateur biologique de l'exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

RESUME :

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont responsables de cancers du poumon, de la vessie et de la peau. Parmi eux, seul le benzo(a)pyrène (BaP) est classé cancérigène certain pour l'homme. La surveillance biologique de leur exposition passe par le dosage du 1-hydroxypyrene urinaire (1-OHP), métabolite du pyrène non cancérigène. L'objectif de cette thèse était de développer un nouveau biomarqueur plus proche du risque cancérigène. Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHBaP) est apparu comme le meilleur candidat car c'est le métabolite majoritaire du BaP, car ses concentrations sont liées aux taux d'adduits à l'ADN mesurés dans le poumon de rat et car son dosage est réalisable dans les urines de sujets exposés. Nous avons développé une méthode analytique de routine associant l'extraction en phase solide à la chromatographie liquide avec une détection en fluorescence, qui nous a permis d'atteindre une limite de détection 0,02 ng/L. La médiane des concentrations de 3-OHBaP dans les urines de sujets fumeurs atteignait 0,02 nmole/mole de créatinine et était deux fois plus élevée que chez les non-fumeurs. Dans les secteurs de production du silicium, des cathodes et des anodes, de 30 à 70% des niveaux étaient supérieurs à la valeur recommandée en France, ce qui confirme le risque sanitaire lié à ces activités professionnelles. Lors d'une exposition répétée aux HAP pendant une semaine de travail, le prélèvement des urines doit être réalisé en fin de semaine fin de poste, du fait de l'atteinte d'un équilibre entre les doses de BaP absorbées et celles de 3-OHBaP éliminées. La corrélation entre les niveaux urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP est variable en fonction du secteur et des activités professionnelles. Ceci démontre la difficulté d'établir une seule valeur limite professionnelle en lien avec le risque cancérigène des HAP pour le 1-OHP et souligne tout l'intérêt de doser le 3-OHBaP.

ABSTRACT :

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are responsible for lung, skin and bladder cancers. Among them, only benzo(a)pyrene (BaP) is classified as carcinogenic to humans. Their biomonitoring is performed by the determination of urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), a metabolite of the non-carcinogenic pyrene. The aim of this thesis was to develop a new biomarker closest carcinogenic risk. The 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) seemed to be the best candidate because it is the major metabolite of BaP, these urinary levels are related to the rate of DNA adducts measured in the lung of rats and its analysis is achievable in the urine of exposed subjects. We have developed a simple analytical method combining solid phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, which achieved a detection limit of 0.02 ng/L. The median concentrations of 3-OHBaP in the urine of smokers reached 0.02 nmol/mol of creatinine and was two times higher than among non-smokers. In the industries of silicon, cathodes and anodes, from 30 to 70 % of levels were above the recommended value in France, which confirms the health risk associated with these occupational activities. In case of repeated exposure to PAH during a workweek, urine sampling should be performed at the end of the shift the last workday, due to a balance between the amounts of BaP absorbed and those of 3-OHBaP eliminated. The correlation between urinary levels of 3-OHBaP and 1-OHP is variable depending on the sector and occupational activities. This demonstrates the difficulty of establishing a single limit value in connection with the carcinogenic risk of PAH for 1-OHP and highlights the interest of the 3-OHBaP.