HAL
open science

Développement et sélection de métabolites urinaires des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en tant que biomarqueur d'exposition des populations

Simon Lutier

To cite this version:

Simon Lutier. Développement et sélection de métabolites urinaires des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en tant que biomarqueur d'exposition des populations. Chimie analytique. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAS001 . tel-01564471

HAL Id: tel-01564471

https://theses.hal.science/tel-01564471

Submitted on 18 Jul 2017

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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithme en biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Simon LUTIER

Thèse dirigée par **Anne Maître**

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**

Développement et sélection de métabolites urinaires des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en tant que biomarqueur d'exposition des populations

Thèse soutenue publiquement le **16 janvier 2017**,
devant le jury composé de :

Pr Pascal ANDUJAR
Médecin du travail CHI Créteil, Président et Rapporteur

Pr Nancy HOPF
Chercheuse à l'IST de Lausanne, Rapporteur

Dr Stéphane REYNAUD
Responsable de l'équipe P3E du LECA, Examinateur

Dr Gilbert LAFFITTE RIGAUD
Médecin du travail chez Rio Tinto Alcan Aluminium, Examinateur

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

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithme en biologie** Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Simon LUTIER

Thèse dirigée par **Anne Maître**

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**

Développement et sélection de métabolites urinaires des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en tant que biomarqueur d'exposition des populations

Thèse soutenue publiquement le **16 janvier 2017**,
devant le jury composé de :

Pr Pascal ANDUJAR
Médecin du travail CHI Créteil, Président et Rapporteur

Pr Nancy HOPF
Chercheuse à l'IST de Lausanne, Rapporteur

Dr Stéphane REYNAUD
Responsable de l'équipe P3E du LECA, Examinateur

Dr Gilbert LAFFITTE RIGAUD
Médecin du travail chez Rio Tinto Alcan Aluminium, Examinateur

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

Remerciements

En premier lieu, je tenais à remercier **Anne Maître** pour son accueil au sein de l'équipe EPSP et pour avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse.

Merci à la **région Auvergne Rhône-Alpes** pour avoir financé ces trois années de doctorat qui ont permis de terminer mon projet professionnel comme je l'avais souhaité. Je remercie également l'**ANSES** et l'**INSERM** pour avoir accepté de financer les projets de recherche qui ont permis de mener les études cinétiques en entreprise et de financer l'acquisition de l'appareil analytique nécessaire au dosage développé au cours de ce travail.

Damien Barbeau, je tenais à te remercier particulièrement pour ton encadrement. J'ai apprécié travailler à tes côtés pendant ces trois années. Malgré nos quelques désaccords d'ordre scientifique, j'ai toujours aimé discuter « science » avec toi. La qualité de nos échanges m'ont permis d'avancer concrètement dans mon travail. Merci Boïse !

Luc Choisnard, je souhaite te remercier pour le temps que tu m'as accordé. Merci d'avoir accepté de participer à l'optimisation de l'ionisation chimique. Ta pédagogie m'a appris d'apprécier l'approche expérimentale par plan d'expérience.

Renaud Persoons, merci pour ta disponibilité. Merci aussi pour ta patience lors de mes venues répétées dans ton bureau lors de l'écriture des différents articles avec Damien.

Aurélie Augier, merci d'avoir été là ! Tu as été un soutien important durant ces trois années. D'une efficacité massive, tu t'es toujours battu pour avoir nos commandes rapidement. Merci d'avoir facilité toutes les procédures administratives auxquelles j'ai dû faire face. Ta spontanéité et ton énergie font de toi une personne auprès duquel il fait bon vivre !

Claire Hograindleur, je te remercie pour tous ces bons moments passés au labo. Tu as toujours répondu présente en cas de galère, notamment avec notre ASPEC et ses aiguilles tordues. J'ai beaucoup rigolé à tes côtés. N'oublie pas que chaque fontaine a son histoire et que Google peut te la raconter.

Sarah Montlevier, tu as toujours été présente lorsque le besoin s'en ai fait sentir. Tes pâtisseries et notamment ta tarte au citron sont des atouts considérables pour garder un moral d'acier. Tu as également été un compagnon de voyage hors pairs lors des trajets parfois synonymes d'Odyssée.

Marie Marques, je te dois beaucoup quant à la réalisation de ce travail de longue haleine. En plus d'un soutien sans faille lors des différents développements analytiques parfois sans fin, j'ai énormément apprécié ces moments passés devant l'écran en attendant… LE PIC ! En patientant, nous avons refait le monde maintes fois et toujours dans la bonne humeur. J'entends encore ta voix disant « il fera plus chaud qu'aujourd'hui avant que ce dosage fonctionne ! ». Nous avons fini par l'avoir ce Tetraol ! Tes compétences et ta personnalité font de toi une personne avec un encombrement stérique unique !

Etienne Bourgart, ce temps passé dans le bureau, le labo et pendant les pauses déjeuners au rythme de la slack a été un soutien moral inestimable. Je ne compte plus le nombre de crises de rigolades ! Socialement, je ne suis plus le même. Tes phrases pleines d'innocences sur tes aventures pourraient faire un livre sympathique à l'image de ta personne : Un utopiste au grand cœur qui confond montagne et colline. Georges, merci pour tous ces bons moments !

Delphine Bosson, merci pour ton accueil dans la team doctorant. Merci d'avoir démêlé les procédures administratives pour la première inscription. J'ai beaucoup apprécié nos discussions sur le monde de la recherche et les autres… Comme « on n'est pas là pour être ici », The Beast te remercie pour ces pauses déjeuners qui étaient synonymes de bonnes humeurs. Avec nous, il y avait aussi **Marie Delaunay** et **Anthony Bosson** que je remercie pour les parties de Molky d'anthologies, interminables, qui à la fin, s'apparentaient à du lancer de javelot. Merci à **Pascal Petit** pour tes petits tuyaux sur le fonctionnement de ce mystérieux bâtiment qu'est Jean Roget et ce soutien mutuel de fin de thèse.

Franck Balducci merci pour ton accueil. J'attends toujours notre petit tour de vélo ! J'ai beaucoup apprécié nos discussions sur le sport et la montagne. Ton humour a été bon pour le moral, surtout pendant la rédaction !

Sylvette Liaudy, merci pour tes conseils avisés. Tu as toujours été disponible pour répondre à mes questions et tu as toujours réussi à trouver les articles qui m'étaient nécessaires ! Tu as plus d'un tour dans ton sac !

Je tenais à remercier l'ensemble de **l'équipe administrative de TIM**C et plus particulièrement **Nadine Villemazet** qui a été un soutient de taille pour la mise en place de l'appel d'offre pour acquérir la GC-MSMS.

Merci aussi à l'équipe de la BHN ! **Dominique** et **Nicole**, j'admire votre patience pour avoir supporté « cette équipe de garçon ». **Michael** et **Julien** merci pour tous ces moments de partage, drôles et amusants. En tant qu'acteur américain d'entreprise, je vous décerne le pin's de la licorne ! D'un blanc immaculé, cette dernière représente la liberté de travailler dans la joie de vivre pour une meilleure efficacité.

Des remerciements particuliers vont à **ma famille**, notamment à **mes parents** qui m'ont soutenu pendant l'ensemble de ces années d'études. J'en profite aussi pour remercier **mes amis** qui m'accompagnent au fil du temps et qui sont toujours là. Avec vous les mauvais moments sont transformés en bons souvenirs et les bons moments en souvenirs inoubliables. Un grand merci à **Elodie** qui m'a poussé à donner le meilleur de moi-même, « you raise me up ! ». Durant ces trois années, tu es devenue ma femme puis la mère de ma petite fille **Rose** qui est aujourd'hui ma plus belle merveille. La vie est pleine de surprises…

Table des matières

REMERCIEMENTS **1**

TABLE DES MATIERES **4**

LISTE DES ABREVIATIONS **9**

LISTE DES FIGURES **13**

LISTE DES TABLEAUX **16**

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS **17**

I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques **18**

I.1. Généralités 18

I.2. Nomenclature des HAP 21

II. Sources d'émission et exposition des populations **26**

II.1. Sources d'émission 26

II.2. Exposition des populations 29

II.2.1. Expositions de la population générale 29

II.2.2. Expositions professionnelles 31

III. De l'absorption des HAP à leur élimination **33**

III.1. Absorption 33

III.1.1. Voie respiratoire 34

III.1.2. Voie cutanée 38

III.1.3. Voie digestive 41

III.2. Distribution 42

III.3. Métabolisation et mécanismes d'action toxique 43

III.3.1. Voie du diol-époxyde 45

III.3.2. Voie de l'ortho-quinone 48

III.3.3. Voie du radical cation 51

III.3.4. Voie de détoxication 52

III.3.4.1. Phase I : Fonctionnalisation 52

III.3.4.2. Phase II : Conjugaison 52

III.3.4.3. Phase III : Elimination 52

III.3.5. Induction des enzymes de biotransformation par les HAP 53

III.3.5.1. Le récepteur Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) 53

III.3.5.2. Autres récepteurs 55

III.3.6. Polymorphisme et susceptibilité individuelle 56

III.4. Elimination 57

IV. Toxicité 59

IV.1. Mutagénèse - Cancérogénèse 59

IV.2. Fertilité 60

IV.3. Effet cocktail 61

IV.4. Classifications de certains HAP ou de certaines activités professionnelles exposantes à des HAP comme agents cancérogènes 63

V. Surveillance de l'exposition 66

V.1. Surveillance Atmosphérique 68

V.2. Surveillance Biologique 70

V.2.1. Les biomarqueurs 71

V.2.2. Les sources de variabilité des concentrations des biomarqueurs 73

V.2.2.1. La variabilité des conditions d'exposition 74

V.2.2.2. La variabilité analytique 74

V.2.2.3. La variabilité biologique 76

V.2.3. Etudier la variabilité inter- et intra-individuelle 88

V.2.3.1. Le coefficient de corrélation intra-classe 91

V.2.3.2. Les modèles à effets mixtes 91

VI. La surveillance biologique de l'exposition aux HAP 96

VI.1. Biomarqueurs de dose efficace 96

VI.1.1. Adduits à l'ADN 96

VI.1.2. Adduits aux protéines sanguines 99

VI.2. Biomarqueurs urinaires de dose interne aux HAP 101

VI.2.1. Quels biomarqueurs de dose interne utilisés 101

VI.2.1.1. Naphtalène 101

VI.2.1.2. Phénanthrène 104

VI.2.1.3. Fluorène 107

VI.2.1.4. Pyrène 108

VI.2.1.5. Benzo(a)pyrène 112

VI.2.1.6. Synthèse des différents biomarqueurs urinaires 121

VI.2.2. Quantifications des métabolites urinaires des HAP 125

VI.2.2.1. Etape pré-analytique 125

I.1.1.1. Etape analytique 129

VII. Synthèse et objectif du travail de thèse : Utiliser les métabolites urinaires des HAP comme biomarqueurs de l'exposition 132

VII.1. Synthèse 132

VII.2. Objectifs du travail de thèse 133

CHAPITRE 2 : SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DE L'EXPOSITION AUX HAP CANCEROGENES DE LA PHASE PARTICULAIRE 135

I. Contexte 136

II. Influence des concentrations atmosphériques sur les concentrations urinaires 138

II.1. Article 1 138

II.2. Synthèse de l'article 150

II.2.1. Matériel et Méthodes 150

I.1.1. Résultats 150

II.2.2. Conclusion 151

III. Cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP et du 1-OHP et moyen de correction de la diurèse 153

III.1. Article 2 153

III.2. Synthèse de l'article 166

III.2.1. Matériels et Méthodes 166

I.1.1. Résultats 166

III.2.2. Conclusions 167

IV. Conclusions 169

CHAPITRE 3 : SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DE L'EXPOSITION AUX HAP DE LA PHASE GAZEUSE 171

I. Contexte scientifique 172

II. Comparaison de la spécificité des métabolites urinaires du Nap, du Flu et du Phe en tant que biomarqueur d'exposition professionnelle 173

II.1. Article 3 soumis 173

II.2. Synthèse de l'article 200

II.2.1. Matériels et Méthodes 200

I.1.1. Résultats 200

II.2.2. Conclusions 201

III. Conclusions 203

CHAPITRE 4 : DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS URINAIRES D'EXPOSITION AU BAP 205

I. Contexte 206

II. Développement analytique 207

II.1. Matériels et Méthodes 207

II.1.1. Matériels 207

II.1.1.1. Produits chimiques et réactifs 207

I.1.1.1. Appareillage 207

II.1.2. Pré-analytique 207

II.1.3. Analytique 209

II.1.4. Validation de la méthode 210

II.1.5. Dosage du Tétraol-BaP urinaire 211

II.2. Résultats et discussion 212

II.2.1. Pré-analytique 212

II.2.1.1. SPE 212

II.2.1.2. Réaction de dérivatisation 213

II.2.2. Optimisation de l'ionisation chimique négative 214

II.2.3. Performance de la méthode 217

II.2.4. Analyses urinaires 218

III. Conclusions 222

CHAPITRE 5 : CONCLUSION DU TRAVAIL DE THESE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE 223

BIBLIOGRAPHIE 231

Liste des abréviations

%RMSE	Pourcentage de la racine du carré moyen des erreurs
1-Flu	1-hydroxyfluorène
1-Nap	1-hydroxynaphtalène
1-OHP	1-hydroxypyrène
1-Phe	1-hydroxyphenanthrène
2-Flu	2-hydroxyfluorène
2-Nap	2-hydroxynaphtalène
2-OHP	2-hydroxypyrène
2-Phe	2-hydroxyphenanthrène
3-Flu	3-hydroxyfluorène
3-OHBaP	3-hydroxybenzo(a)pyrène
3-OHP	3-hydroxypyrène
3-Phe	3-hydroxyphenanthrène
4,5-diol-BaP	4,5-dihydroxybenzo(a)pyrène
4-Phe	4-hydroxyphenanthrène
6-OHBaP	6-hydroxybenzo(a)pyrène
8-oxo-dGuo	7,8-dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanosine
9-Flu	9-hydroxyfluorène
9-Phe	9-hydroxyphenanthrène
ABC	ATP-binding cassette
ACN	Acétonitrile
ACP	Analyses en composante principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AIC	Critère d'information d'Akaike
AIP	AhR interacting protein

AKR	Aldocéto reductase
Alb	Albumine
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNT	Arhylhydrocarbon receptor nuclear translocator
ATSDR	Agence pour les substances toxiques et les maladies
BaP	Benzo(a)pyrène
BCRP	Breast cancer resistance protein
BPDE	Benzo(a)pyrène-diol-époxyde
BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CQI	Contrôles de qualité interne
CYP	Cytochromes P450
dAdo	2’-desoxyadénosine
DD	Dihydrodiol déshydrogénase
dGuo	2’-désoxyguanosine
DSDP	Début de semaine début de poste
EEQ	Evaluation externe de la qualité
EH	Epoxyde hydrolase
EPI	Equipement de protéction individuel
Flu	Fluorène
FSFP	Fin de semaine fin de poste
FSFP16	Fin de semaine fin de poste plus 16h
GC	Chromatographie gazeuse
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse
GC-MSMS	Chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse en mode tandem
GC-NCI-MSMS	Chromatographie gazeuse avec une ionisation chimique négative couplée à de la spectrométrie de masse en mode tandem

GST	Glutathion transférase
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
Hmg	Hémoglobine
HPLC	Chromatographie liquide
HPLC-FLD	Chromatographie liquide couplée à de la fluorimétrie
HPLC-LFD	Chromatographie liquide couplée à de la fluorescence induite par un laser
HPLC-MSMS	Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en mode tandem
HSP90	Heat shock protein 90
ICC	Coefficient de corrélation intra-classe
IMC	Indice de masse corporelle
INRS	Institut national de recherche et de sécurité
IV	Intraveineuse
LD	Limite de détection
LLE	Extraction liquide-liquide
MeOH	Méthanol
MicroLC-Qtof/MS	Micro-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol
MIP	Polymère d'empreinte moléculaire
MMI	Injecteur multi-mode
MRM	Multiple réaction monitoring
MRP	Multidrug resistance proteins
Nap	Naphtalène
NCI	Ionisation chimique négative
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NQO1	NAD(P)H quinone oxidoreductase 1
OMS	Organisation mondiale de la santé
***p53*RE**	Elément de réponse *p53*
PCI	Ionisation chimique positive

PgP	p-glycoprotéine
Phe	Phenanthrène
PS	Prostaglandine Synthase
PXR	Pregnane X receptor
Reverse-BPDE	Reverse Benzo(a)pyrène-diol-époxyde
ROS	Espèces réactive de l'oxygène
SBE	Surveillance biologique de l'exposition
SBEP	Surveillance biologique de l'exposition en milieu professionnel
SG	Densité urinaire spécifique
SLUT	Sulfotransférase
SMA	Spectrométrie de masse par accélérateur
SPE	Extraction en phase solide
SPME	Microextraction en phase solide
Tetraol-BaP	Tetrahydroxy-benzo(a)pyrène
THF	Tetrahydrofurane
UGT	UDP-glucuronosyltransférase
UICPA	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
US-EPA	Agence environnementale américaine
VLEP	Valeurs limites d’exposition professionnelle
XRE	Xenobiotic Responsive Element

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de HAP nommés à l'aide de la nomenclature de l'UICPA (adaptée de [Ehrenhauser 2015]) 22

Figure 2 : Localisation de la position des différents groupements sur les cycles substitués pour le BaP 23

Figure 3 : Exemple de région K, L et M des HAP 24

Figure 4 : Régions agissant sur la planarité des HAP. En bleue : la région de baie. En vert la région appelée fjord selon [Luch 2004] ou appelée crique selon Ehrenhauser (2015). En rouge : la région fjord selon [Ehrenhauser 2015] 25

Figure 5 : Source d'émission majeures de HAP (d'après [Moorthy 2015]) 27

Figure 6 : Emissions atmosphériques de HAP en France métropolitaine en fonction des différents secteurs (en tonne) (d'après [Serveau 2013]) 28

Figure 7 : HAP mesurés dans différents groupes d'aliments. A : Contribution des 16 HAP de la liste de l'US-EPA parmi les HAP totaux (d'après [Martorell 2010]). B : Pourcentage de la dose totale de BaP ingérées quotidiennement (d'après [IARC 2010]). 30

Figure 8 : Schéma récapitulatif des matières premières dérivés du charbon (gris clair) qui sont produits ou utilisés dans différents secteurs (d'après [IARC 2010]). 32

Figure 9 : Schéma de la pénétration des HAP de l'épithélium jusqu'à la circulation systémique en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. 34

Figure 10 : Schéma de l'épithélium des différentes parties de l'appareil respiratoire 35

Figure 11 : Schéma du dépôt des particules inhalées dans les différentes régions de l'appareil respiratoire [Guney 2016]. 36

Figure 12 : Schéma de l'absorption du BaP au niveau des voies respiratoires [Gerde 2001] 37

Figure 13 : Absorption cutanée des HAP avec la présentation de la structure de l'épithélium cutanée (A) et schéma de l'absorption de trois HAP (B) ayant des propriétés lipophiles différentes (Phe, pyrène et BaP). Les flèches représentent la diffusion passive à travers les différentes couches de la peau. La partie bleue représente la fraction non métabolisée du composé parent qui diffuse pour atteindre la circulation systémique alors que la partie rouge représente la fraction qui a été métabolisée. 39

Figure 14 : Fractions des HAP passées à travers des explants de peau de cochons d'Inde sans fourrure après 24h d'exposition (d'après l[Ng 1991, Ng 1992]). En bleu : Fraction correspondant aux HAP non métabolisés retrouvés dans le milieu de culture. En rouge : Fraction correspondant aux HAP métabolisés retrouvés dans le milieu de culture. 40

Figure 15 : Résumé des différentes voies d'absorption des HAP (adaptée de [Ramesh 2004]). 42

Figure 16 : Résumé des phases du système de détoxication et de la bioactivation des HAP. Les métabolites M1- 4 représentent les métabolites primaires issus d'un même HAP après la phase I alors que les métabolites M1'- 4' représentent les métabolites secondaires issus de la phase II. Les métabolites en bleu représentent des métabolites non toxiques tandis que les rouges ont un pouvoir toxique. 44

Figure 17 : Production des différents isomères du BPDE (adaptée d'après [Xue 2005]) 46

Figure 18 : Exemple d'adduits du BPDE sur les bases puriques 47

Figure 19 : Formation de diol-époxyde et de reverse-diol-époxyde pour le BaP, adaptée de [Hecht 2010]. 48

Figure 20 : Métabolisation des HAP via la voie de l'ortho-quinone, d'après [Penning 2014]..... 49

Figure 21 : Différents dommages à l'ADN causés par la voie de métabolisation de l'orthoquinone, d'après [Penning 2014] 50

Figure 22 : Exemple de la formation du radical cation du BaP, d'après [Xue 2005]. 51

Figure 23 : Schéma de l'induction des enzymes de biotransformation par les HAP via AhR (adaptée d'après [Arenas-Huertero 2011]). 1 : Liaison HAP-AhR ; 2 : Relarguage du complexe HSP90, AIP et p23 et translocation dans le noyau du complexe HAP-AhR ; 3 : Liaison de la protéine ARNT au complexe HAP-AhR ; 4 : Fixation du complexe au niveau de XRE ; 5 : Activation et transcription du gène codant pour les enzymes de biotransformation inductible via AhR (ici CYP1A1) ; 6 : traduction de l'acide ribonucléique messager (ARNm) pour obtenir une enzyme fonctionnelle. 54

Figure 24 : Schéma synthétique du processus pour l'évaluation du risque. 68

Figure 25 : Suite des événements entre l'exposition et la maladie en lien avec l'utilisation de différents types de biomarqueurs, dans le cadre de l'évaluation des risques d'après [Manini 2007]. 72

Figure 26 : Relation entre les concentrations atmosphériques et sanguines au sein d'une population (A) et la distribution des concentrations sanguines pour une concentration atmosphérique de 50 ng/m^3 (B) (adaptée de [Hays 2007]) 73

Figure 27 : Sources de la variabilité des concentrations des biomarqueurs (d'après [Spaan 2010]). 74

Figure 28 : Concentration urinaire d'un biomarqueur en fonction du temps après une seule exposition (exposure event). Sample A et Sample B correspondent à deux prélèvements urinaires réalisés à des temps différents (d'après [Aylward 2014]). ... 78

Figure 29 : Simulation de la concentration d'un biomarqueur en fonction du temps pour des expositions répétées à des intervalles de temps réguliers (τ) pour des ratios demi-vie/τ (HL/ τ) différents (d'après [Aylward 2012]). 79

Figure 30 : Relation entre la vitesse d'élimination ou la concentration urinaire des métabolites et le débit urinaire. En bleu : Un métabolite excrété par filtration glomérulaire ; En rouge : Un métabolite excrété par sécrétion active ; En noir : Un métabolite excrété par diffusion passive. 84

Figure 31 : Impact de la stratégie de prélèvement sur l'estimation de la dose à partir des concentrations d'un biomarqueur dans deux cas distincts. A : la variabilité interindividuelle est large et que l'intra-individuelle est faible. B : la variabilité interindividuelle est faible et que l'intra-individuelle est large (d'après [Sobus 2011]). 90

Figure 32 : Voies métaboliques majoritaires du Nap, adaptée de [IARC 2002]. 102

Figure 33 : Voies métaboliques majoritaires du Phe [Chaturapit 1978, Nordqvist 1981, Hecht 2009]. 105

Figure 34 : Synthèse du métabolisme du pyrène. Les flèches en pointillés indiquent une réaction hypothétique chez les mammifères..... 110

Figure 35 : Stabilité des différents époxydes du BaP, d'après [Barbeau 2013] 112

Figure 36 : Métabolites formés à partir des différents époxydes du BaP..... 114

Figure 37 : Métabolites issus de la formation du radical cation du BaP..... 115

Figure 38 : Cinétiques d'élimination urinaire du 1-OHP et du 3-OHBaP observées après une journée d'exposition professionnelle d'après [Gendre 2004] 117

Figure 39 : Origine des isomères du TetraolBaP issus des deux isomères du BPDE majoritaires et du reverse-BPDE 120

Figure 40 : Différentes étapes de la SPE (source : Gilson) 127

Figure 41 : Dérivatisation du 4,5-diol-BaP (en bleu) et du Tetraol-BaP (en rouge). Le point direct correspond à une solution standard de 130 ng/L et 127 ng/L pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP. Les mêmes solutions ont été utilisées et ont d'abord été évaporées à sec puis reprises dans différentes conditions. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. 213

Figure 42 : Valeurs prédites par le modèle en fonction des valeurs observées lors des expériences selon le plan composite en face centrée (en bleu) et les conditions optimisées (en rouge) pour le 4,5-diol-BaP (A) et le Tetraol-BaP (B). 216

Figure 43 : Courbe de calibration du Tetraol-BaP 218

Figure 44 : Chromatogramme d'un échantillon urinaire prélevé en DSDP (en bleu) et en FSFP (en rouge) pour un même travailleur. Le chromatogramme en noir représente l'étalon interne. 219

Figure 45 : Distribution des concentrations urinaires de 1-OHP (µmol/mol), de 3-OHBaP (nmol/mol) et de Tetraol-BaP (nmol/mol) aux différents moments de prélèvement. En bleu, les prélèvements urinaires réalisés en début de poste du premier jour de la semaine de travail (DSDP). En orange, les prélèvements urinaires réalisés en fin de poste du dernier jour de la semaine de travail (FSFP). En gris, les prélèvements urinaires réalisés en début de poste du dernier jour de la semaine de travail (FSFP16). 221

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des 16 HAP identifiés comme prioritaires selon l'US-EPA 20

Tableau 2 : Classification du CIRC et de l'UE des HAP de la liste de l'US-EPA..... 64

Tableau 3 : Classification du CIRC et de l'UE de mélanges ou de secteurs d'activités émettant des HAP. 65

Tableau 4 : Comparaison des méthodes quantitatives utilisées pour la détection des adduits à l'ADN (adaptée à partir de [Brown 2012])..... 98

Tableau 5 : Concentrations urinaires en nmol/mol des différents biomarqueurs d'exposition (de dose interne) aux HAP en population générale et chez les travailleurs des usines de production d'électrodes de carbone..... 124

Tableau 6 : Résumé des caractéristiques techniques des méthodes de dosage du Tetraol-BaP urinaire (adapté de [Barbeau 2013])..... 131

Tableau 7 : Transitions MRM du 4,5-diol-BaP et du Tetraol-BaP 209

Tableau 8 : Contributions respectives des différents paramètres d'ionisation sur la réponse pour 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP 215

Tableau 9 : Comparaison des réponses expérimentales mesurées avec les conditions optimales d'ionisation chimique négative à celles prédites par le modèle crée à partir des données du plan composite en face centrée 216

Tableau 10 : Concentrations urinaires de 1-OHP, 3-OHBaP et de Tetraol-BaP de travailleurs d'une usine de production d'électrode de carbone. 220

Chapitre 1 :

Introduction générale et présentation des objectifs

I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

I.1. Généralités

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) constituent une famille de molécules composées d'atomes de carbones et d'hydrogènes formant au moins deux cycles benzéniques fusionnés. Ces cycles aromatiques, pouvant être arrangés de manières linéaire, angulaire ou groupé, prmettent d'avoir un grand nombre de structures. De sorte, plusieurs isomères sont possibles, selon la complexité des HAP. Certains cycles peuvent être saturés ou substitués donnant ainsi des alkyl-HAP, nitro-HAP, amine-HAP, ect.

Capables de résister à l'onde de choc suivant la mort d'une supernova [Tappe 2006], les HAP font probablement partie des composés qui ont permis de créer la vie [Joseph 2010]. Les plus petits <50 atomes de carbone sont photosensibles [Tappe 2006]. Ce sont essentiellement eux, les HAP de deux à six cycles aromatiques, qui sont aujourd'hui classés au sein des polluants organiques persistants [UNECE 1998].

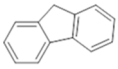
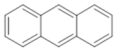
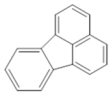
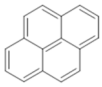
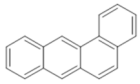
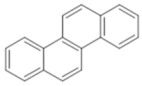
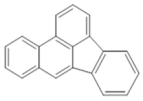
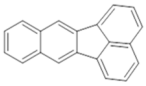
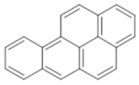
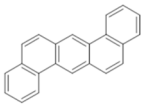
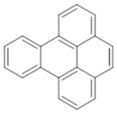
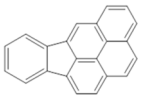
Les HAP sont émis à partir de sources multiples. Ils peuvent être d'origine diagénétique comme les éruptions volcaniques ou encore comme la dégradation microbienne de la matière organique, pyrogénique (combustion incomplète de matières organiques) et pétrogénique (pétrole et dérivé de pétrole) [Ifegwu 2015]. Les quantités relarguées dans l'atmosphère ont largement augmenté depuis le siècle dernier avec notamment l'utilisation des matières fossiles dans l'industrie et le développement des transports [Bostrom 2002].

Lors de leur émission dans l'atmosphère, les HAP sont sous différentes formes en fonction de leur poids moléculaire. Les HAP les plus légers, comportant moins de 4 cycles aromatiques (notamment le naphtalène), sont émis sous forme de gaz alors que les HAP les plus lourds, comportant plus de 4 cycles aromatiques sont adsorbés sur des particules atmosphériques

(notamment le benzo(a)pyrène). Les HAP comportant 4 cycles, sont quant à eux émis sous la forme gazeuse et particulaire (tel le pyrène).

En 1976, l'agence environnementale américaine (US-EPA) a créé une liste de 16 HAP considérés comme polluants prioritaires à étudier (Tableau 1) [Keith 2015]. Cette liste a permis de focaliser les travaux de recherche sur ces composés et de comparer les résultats à travers le monde et le temps. Cette normalisation des analyses des HAP dans différentes matrices (air, eau, sol, etc…) a permis de définir un cadre législatif autour de ces composés. Néanmoins, cette liste, qui n'a pas évoluée depuis sa création, commence à être remise en question. Ainsi, des HAP toxiques couramment émis, tels des alky-HAP (pouvant être plus toxiques que le composé parent) ou encore des composés aromatiques hétérocycliques toxiques retrouvés dans l'environnement, ne sont pas inclus dans la liste [Andersson 2015]. Ces auteurs ne suggèrent pas de supprimer la liste des 16 HAP mais plutôt de l'implémenter avec d'autres composés qui sont actuellement présents dans l'environnement et qui se sont révélés toxiques au cours de ses 40 dernières années de recherche.

Tableau 1 : Liste des 16 HAP identifiés comme prioritaires selon l'US-EPA

	N°CAS	Formule brute	Structure chimique	Masse molaire (g/mol)	Log K_{ow} [a]
Naphtalène (Nap)	91-20-3	$C_{10}H_8$		128	3,30
Acénaphtylène	208-96-8	$C_{12}H_8$		152	4,07
Acénaphtène	83-32-9	$C_{12}H_{10}$		154	3,98
Fluorène (Flu)	86-73-7	$C_{13}H_{10}$		166	4,18
Phénanthrène (Phe)	85-01-8	$C_{14}H_{10}$		178	4,45
Anthracène	120-12-7	$C_{14}H_{10}$		178	4,45
Fluoranthène	206-44-0	$C_{16}H_{10}$		202	4,90
Pyrène	129-00-0	$C_{16}H_{10}$		202	4,88
Benzo(a)anthracène	56-55-3	$C_{18}H_{12}$		228	5,61
Chrysène	218-01-9	$C_{18}H_{12}$		228	5,16
Benzo(b)fluoranthène	205-99-2	$C_{20}H_{12}$		252	6,04
Benzo(k)fluoranthène	207-08-9	$C_{20}H_{12}$		252	6,06
Benzo(a)pyrène (BaP)	50-32-8	$C_{20}H_{12}$		252	6,06
Dibenzo(a,h)anthracène	53-70-3	$C_{22}H_{14}$		278	6,84
Benzo(ghi)pérylène	191-24-2	$C_{22}H_{12}$		276	6,50
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	193-39-5	$C_{22}H_{12}$		276	6,58

[a] : Les valeurs des coefficients de partage octanol-eau (Log K_{ow}) sont issus du rapport de l'Agence pour les substances toxiques et les maladies (ATSDR) [ATSDR 1995].

I.2. Nomenclature des HAP

La diversité des HAP est si importante, qu'une nomenclature a été définie par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (UICPA). Le but est d'avoir une approche systématique pour nommer les composés et ainsi éviter la multiplication des termes pour une seule et même molécule. Cette approche se décompose en plusieurs étapes dont le détail suit (elle est illustrée dans la Figure 1) :

1) A partir d'une soixantaine de structures polycycliques référencées, il faut commencer par identifier la sous-structure polycyclique primaire, c'est-à-dire, celle ayant la plus grande priorité (souvent la plus grande).
2) Il convient ensuite d'identifier les types et nombre de sous-structures polycycliques secondaires fusionnées avec celle identifiée lors de l'étape 1. Le but de cette deuxième étape est de maximiser le nombre d'attachements primaires (sous-structures secondaires fusionnées directement avec la prioritaire) et le nombre de sous-structures identiques. Les noms des structures secondaires sont placés devant la prioritaire et rangés par ordre alphabétique. Il faut préciser qu'en cas de répétition d'une même structure secondaire, des préfixes sont ajoutés (di-, tri-, tetra-, etc.).
3) Enfin, il faut définir les positions des structures secondaires par rapport à la structure primaire. Pour cela, il est nécessaire d'orienter la structure primaire tel qu'il l'a été décrit par l'UICPA pour chaque structure référencée. Les atomes périphériques sont numérotés et les liaisons sont identifiées par les lettres de l'alphabet. Les liaisons fusionnées entre les structures aromatiques doivent être identifiées avec les lettres les plus petites possibles selon l'ordre alphabétique. Dans le cas où une structure secondaire est elle-même fusionnée avec une autre, les atomes et liaisons marqués portent des apostrophes.

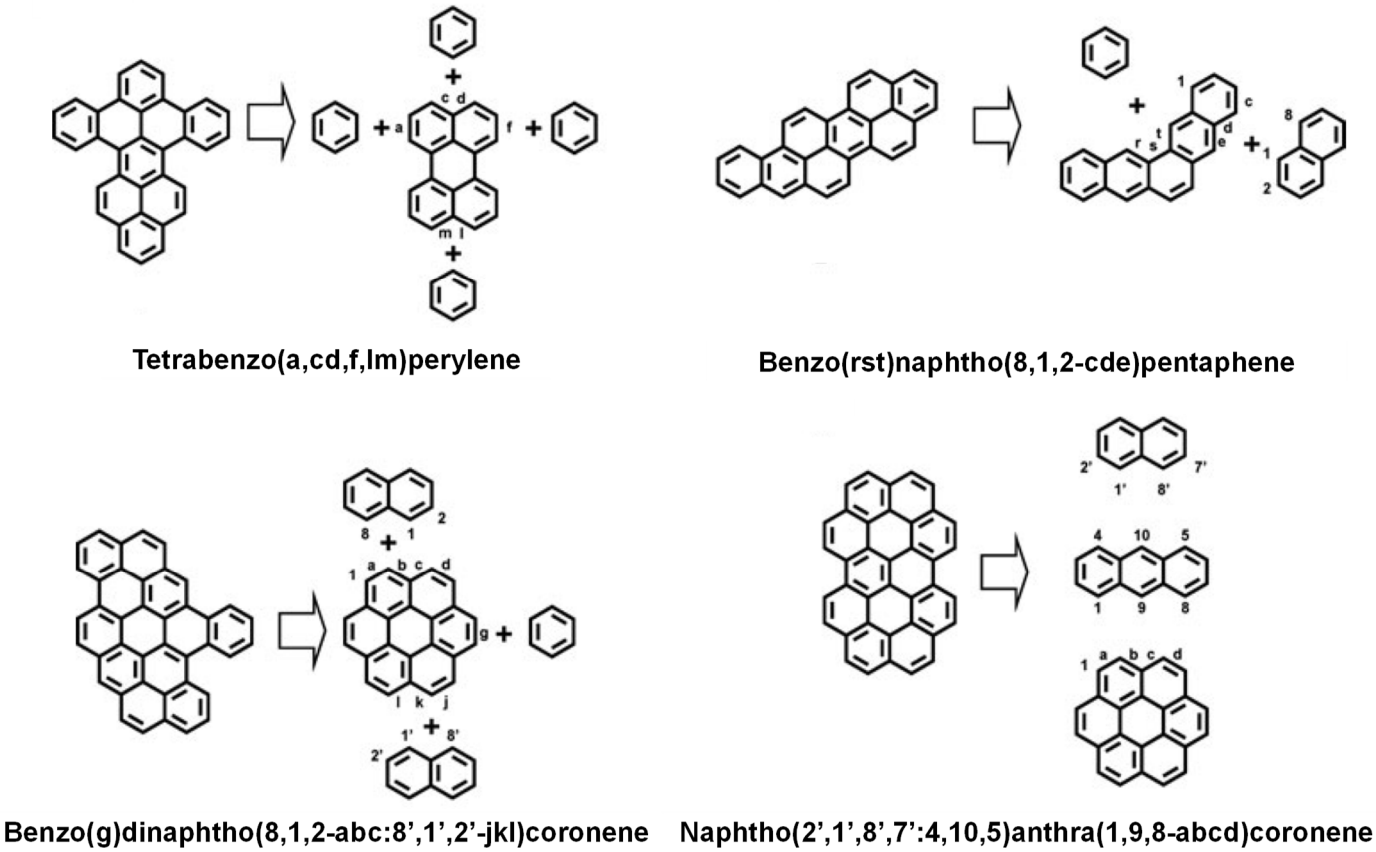


Figure 1 : Exemples de HAP nommés à l'aide de la nomenclature de l'UICPA (adaptée de [Ehrenhauser 2015])

L'approche étudiée ci-dessus permet d'avoir un seul nom pour un composé parent. Il est également nécessaire de pouvoir identifier les HAP sous forme substituée. Ainsi, trois règles ont été définies pour pouvoir localiser la position des groupements comme les alkyls ou les hydroxyles (Figure 2).

1) L'axe horizontal se place de manière à ce qu'un maximum de cycles aromatiques soient alignés.
2) L'axe vertical se place de manière à avoir un maximum de cycles aromatiques dans la partie supérieure droite.
3) Les atomes de carbone périphériques (ou extérieurs) sont numérotés à partir du sommet libre le plus à gauche pris sur le cycle le plus à droite dans le sens antitrigonométrique (sens de l'aiguille d'une montre).

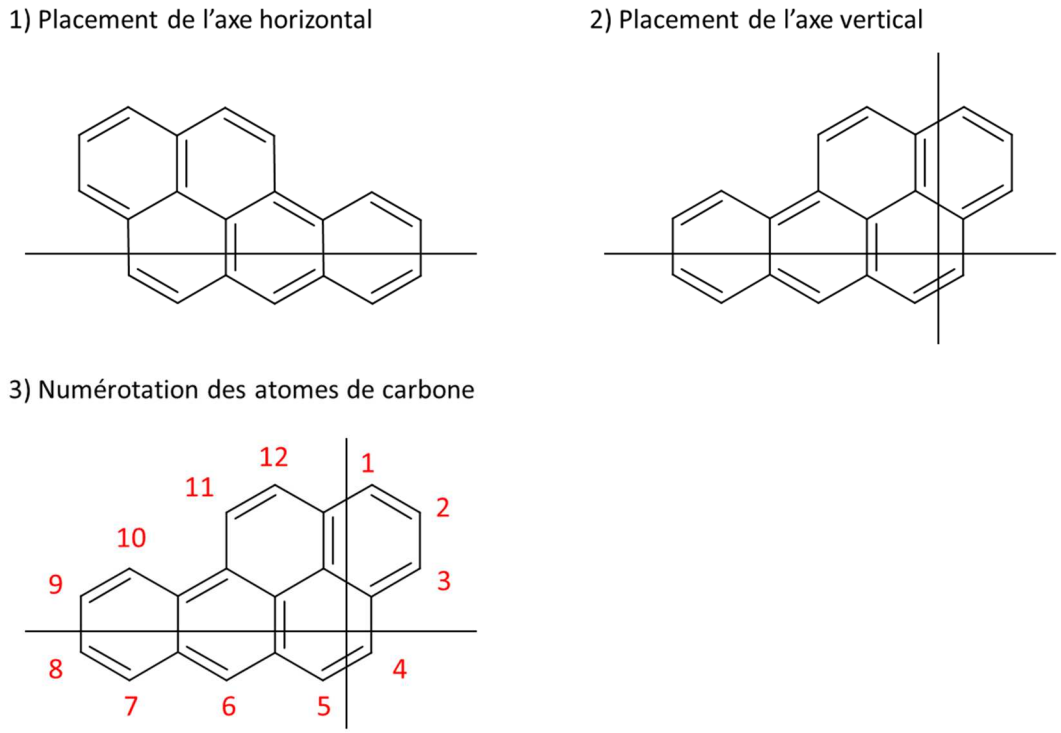


Figure 2 : Localisation de la position des différents groupements sur les cycles substitués pour le BaP

C'est ainsi que la nomenclature de l'UICPA permet une approche globale capable de différencier les HAP. Cependant, elle peut générer des noms très longs. D'autres nomenclatures ont donc été développées en parallèle. Ainsi, sur les 16 HAP de la liste de l'US-EPA, 12 sont nommés selon la nomenclature UICPA. Par exemple, le benzo(pqr)tétraphène (nomenclature UICPA) est plus connu sous le nom de benzo(a)pyrène, nom couramment utilisé.

En outre, pour faciliter la diffusion des savoirs devant la multiplication des termes, il est conseillé d'utiliser, ou de faire apparaître, le numéro unique d'enregistrement de la base de données de l'American Chemical Society, communément appelé numéro CAS [Ehrenhauser 2015].

Le présent travail de thèse portant essentiellement sur les HAP définis comme prioritaires par l'US-EPA, les noms des molécules ou leur abréviation figurant dans le Tableau 1 seront utilisés pour l'ensemble du manuscrit.

Par ailleurs les HAP peuvent aussi être classés en deux catégories. D'un côté, les HAP planaires, qui sont « plats » dans l'espace (dans un même plan) et de l'autre, les HAP non planaires. Ces derniers ont des cycles rabattus hors du plan à cause d'un encombrement stérique trop important. Des régions ont également été définies (Figure 3) en fonction de leurs caractéristiques chimiques [Barbeau 2013] :

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

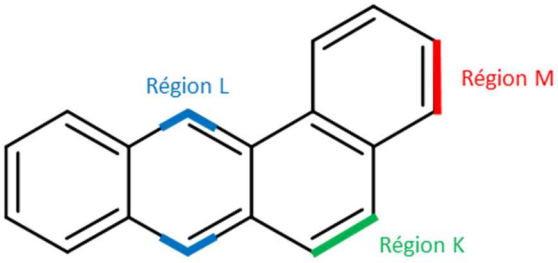


Figure 3 : Exemple de région K, L et M des HAP

Il existe également les régions de crique, de fjord et les régions de baie (Figure 4). Ces dernières, contrairement aux régions de crique et de fjord n'affectent pas la structure planaire des HAP. Tandis que la région de baie est définie de manière similaire dans la littérature, les régions de crique sont couramment appelées régions de fjord dans les articles [Ehrenhauser 2015]. Au cours du présent travail de thèse, les régions de baie correspondront à la région bleue, tandis que le terme région de fjord englobera les régions de fjord (région verte) et de crique (région rouge) décrites dans la Figure 4.

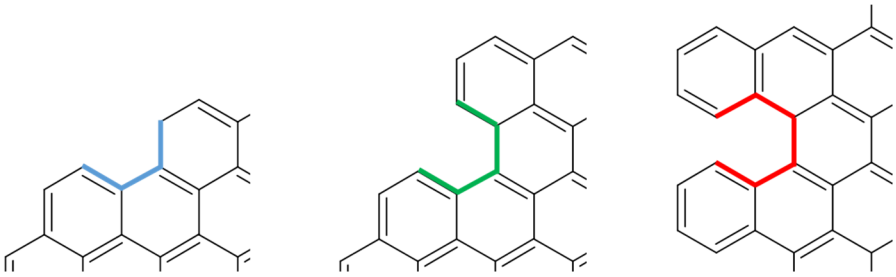


Figure 4 : Régions agissant sur la planarité des HAP. En bleue : la région de baie. En vert la région appelée fjord selon [Luch 2004] ou appelée crique selon Ehrenhauser (2015). En rouge : la région fjord selon [Ehrenhauser 2015]

II. Sources d'émission et exposition des populations

II.1. Sources d'émission

Les HAP sont des produits dérivés de la houille ou du pétrole et sont retrouvés dans de nombreux composés industriels. Ils sont également utilisés en médecine ou pour faire des plastiques, des colorants organiques et des pesticides. Ainsi certains HAP sont produits pour un usage commercial comme le Nap, le Flu, l'anthracène, le Phe et le pyrène [Ravindra 2008, Ifegwu 2015].

Les HAP sont émis dans l'atmosphère par une multitude de sources d'émission qui peuvent être catégorisées en 5 types : Les sources naturelles, agricoles, domestiques, mobiles, et industrielles (Figure 5) :

- Les sources d'émission naturelles sont majoritairement des feux de forêts et les éruptions volcaniques. Les sources agricoles correspondent à la combustion de matière organique ou végétale en milieu ouvert. Les sources domestiques sont essentiellement associées à la combustion de charbon, d'huile, de gaz ou de matières organiques comme le tabac ou les grillades. D'une manière générale, les émissions domestiques sont issues des procédés de cuisine (en fonction des régions du monde) et de chauffage. Les émissions dues au chauffage sont une source majeure de pollution atmosphérique qui varie selon les saisons. Les émissions mobiles sont dues aux différents moyens de transport (voiture, train, avion, bateau). Les mélanges émis dépendent également du type de carburant [Bostrom 2002]. Les émissions diesel ont récemment été classées cancérogènes certains pour l'homme [IARC 2014].Les émissions industrielles peuvent être issues de différents secteurs. Parmi eux, les secteurs où l'exposition professionnelle est encore importante sont ceux qui utilisant encore des dérivés de houille tels les

cokeries, la production d'aluminium et de silicium, la production d'électrodes de carbone et les fonderies.

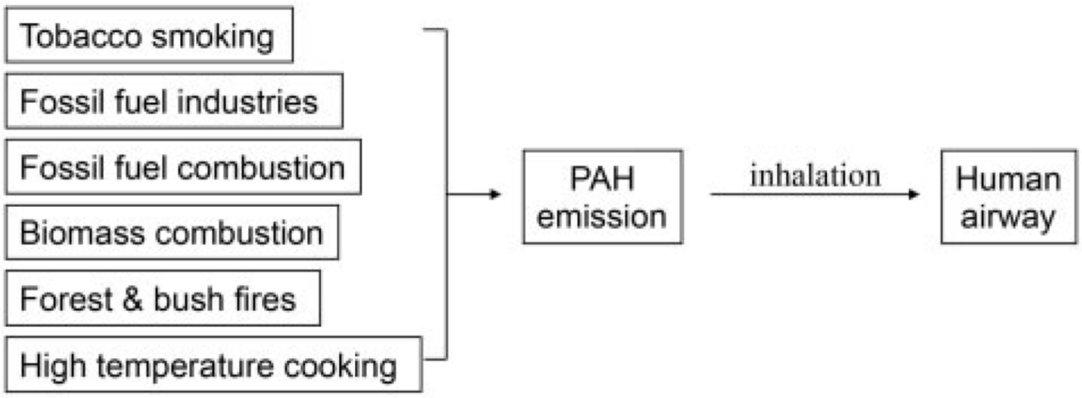


Figure 5 : Source d'émission majeures de HAP (d'après [Moorthy 2015])

La pollution atmosphérique, au sein de laquelle les HAP sont inclus, a récemment été classée cancérogène certain pour l'homme [IARC 2016]. En 2007, il a été estimé que la combustion de biomasse provenant du secteur résidentiel et commerciale contribuait à 60,5% des émissions de HAP (liste des 16 HAP de l'US-EPA). La combustion en milieu ouvert (agricole, déforestation et feux de forêts) contribuait à 13,6% et la consommation de pétrole par les véhicules à moteur à 12,8% [Shen 2013]. Les émissions en France métropolitaine sont suivies au cours du temps et sont résumées dans la Figure 6.

Au sein des mélanges émis, la phase gazeuse est prédominante. Parmi les HAP gazeux, le Nap est le plus abondant et représente 50 à 90% des HAP totaux [Unwin 2006]. Après le Nap, le Flu et le Phe sont également abondamment présents dans les mélanges mesurés en milieux environnementaux [Li 2010a, Nethery 2012] et en milieux professionnels comme dans la production d'électrode de carbone [Angerer 1997b] ou les bitumes [Raulf-Heimsoth 2008].

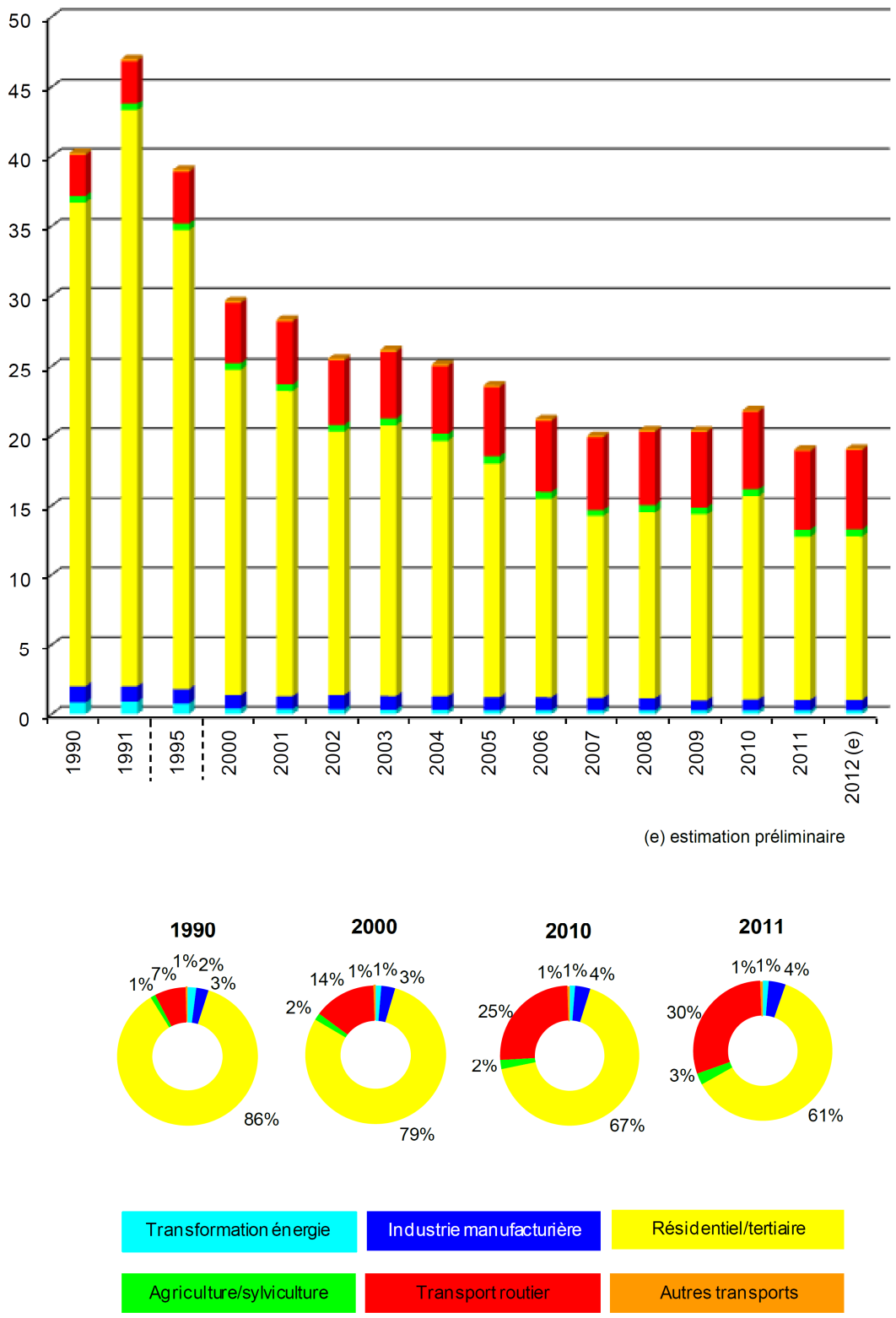


Figure 6 : Emissions atmosphériques de HAP en France métropolitaine en fonction des différents secteurs (en tonne) (d'après [Serveau 2013])

II.2. Exposition des populations

Les HAP sont considérés comme les composés cancérogènes les plus importants dans les mélanges complexes émis dans l'atmosphère. L'ensemble des populations est exposé aux HAP à la pollution atmosphérique par voie respiratoire.

II.2.1. Expositions de la population générale

Chez les fumeurs, c'est la consommation de tabac qui représente la source majeure d'exposition par inhalation. Il est intéressant de rapporter que le BaP est parmi les premiers composés cancérogènes détectés dans la fumée de tabac et que 90% des cancers du poumons sont reliés à la fumée de tabac [Moorthy 2015].

Indépendamment du statut tabagique, l'alimentation est également une source environnementale majeure d'exposition aux HAP [Ibanez 2005, Martorell 2010]. En effet, l'alimentation contribue à 70% de la dose de HAP absorbée pour les individus non-fumeurs, [Falco 2003]. Les aliments peuvent être contaminés par les différents procédés de préparation des aliments comme le fumage, la torréfaction, le mode de cuisson (grillade, friture). Les végétaux peuvent également être contaminés via la pollution environnementale des sols, de l'eau et de l'atmosphère. Les quantités et les mélanges de HAP sont très différents selon les aliments (Figure 7). Les céréales et la viande grillée au barbecue contribuent pour environ 50% de la dose de BaP ingérée quotidiennement via l'alimentation.

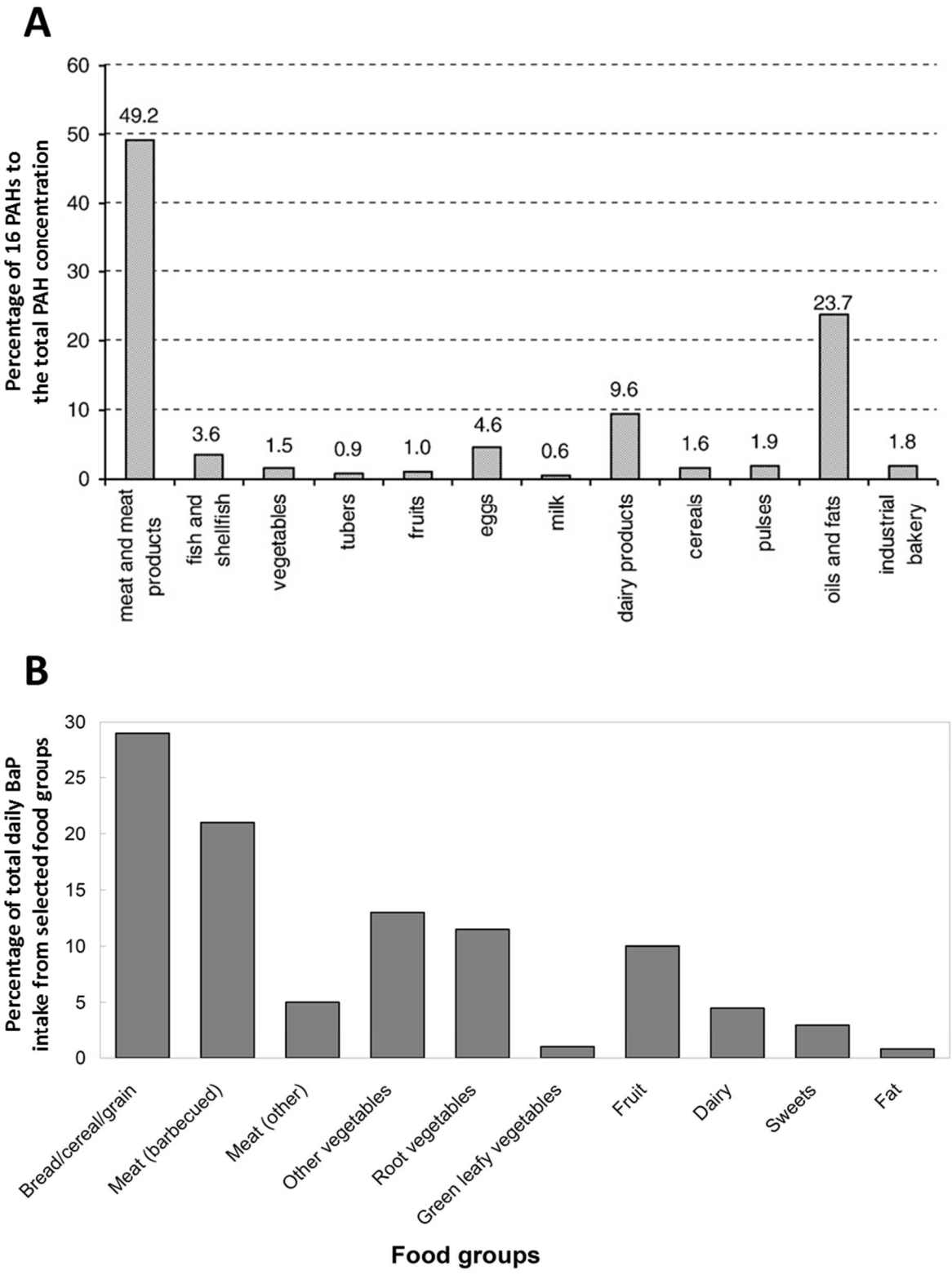


Figure 7 : HAP mesurés dans différents groupes d'aliments. A : Contribution des 16 HAP de la liste de l'US-EPA parmi les HAP totaux (d'après [Martorell 2010]). B : Pourcentage de la dose totale de BaP ingérées quotidiennement (d'après [IARC 2010]).

II.2.2. Expositions professionnelles

Selon les milieux professionnels, les niveaux d'exposition aux HAP peuvent être nettement plus élevés qu'en population générale. En France, l'étude SUMER estimait que plus 1 400 000 travailleurs étaient professionnellement exposés aux HAP en 2003 [Guignon 2005].

La majorité de ces travailleurs, 800 000 en 2010 [Cavet 2013], était exposée aux émissions des moteurs diesel. Les travailleurs qui utilisent des huiles minérales (rôle de lubrifiant ou de liquide de refroidissement) sont exposés aux HAP comme ceux qui appliquent du bitume. Toutefois, ces expositions sont actuellement très faibles car les huiles minérales ont été remplacées par des huiles synthétiques hydrosolubles et car les bitumes contiennent des dérivés pétroliers mais plus de dérivés de houille (goudrons).

Les niveaux de HAP mesurés dans ces secteurs restent néanmoins très inférieurs à ceux rencontrés dans les secteurs industriels produisant ou utilisant des matières premières issus du charbon (Figure 8). Des expositions très élevées sont encore mesurées dans la production de coke, la distillation de la houille et l'imprégnation de bois avec de la créosote [Unwin 2006].

Le secteur de l'électrométallurgie est également concerné par des expositions importantes aux HAP. Le procédé d'électrolyse de l'aluminium requiert l'utilisation dans les fours d'anodes de carbone produites à partir de brai de houille. Ces électrodes précuites sont produites de manière indépendante et ont remplacées depuis de nombreuses années en France le procédé Söderberg. Celui-ci consistait à cuire l'anode au sein même de la cuve d'électrolyse ce qui produisait de grandes quantités de HAP.

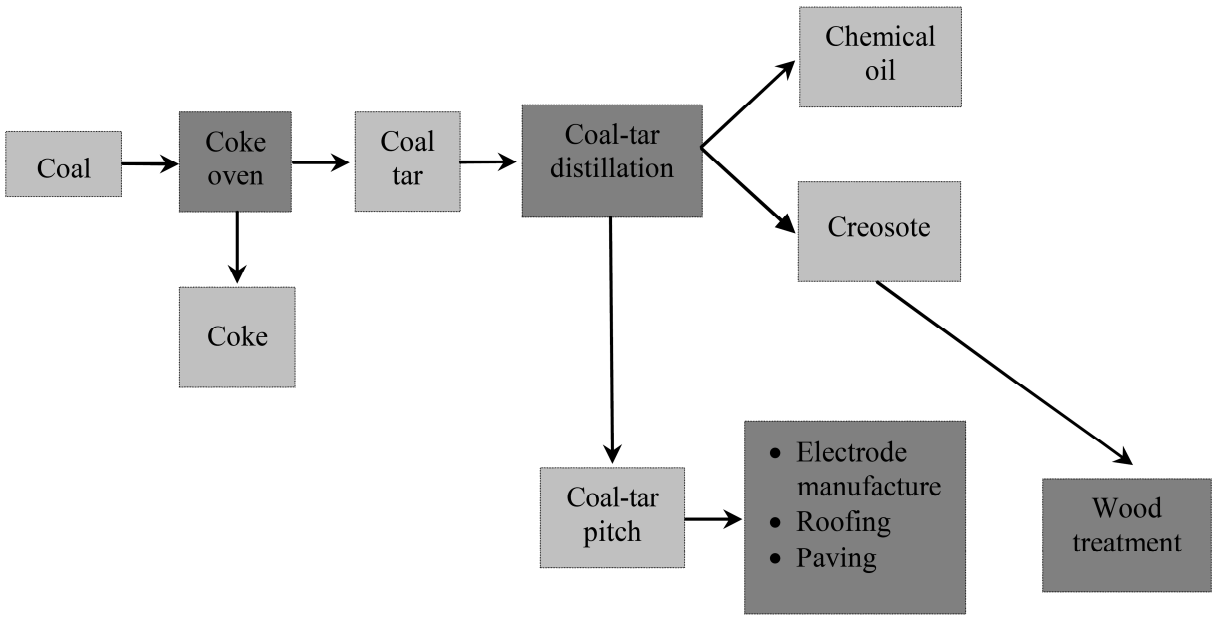


Figure 8 : Schéma récapitulatif des matières premières dérivés du charbon (gris clair) qui sont produits ou utilisés dans différents secteurs (d'après [IARC 2010]).

III. De l'absorption des HAP à leur élimination

Les HAP sont des molécules lipophiles. Cette propriété est mesurée à l'aide du coefficient de partage entre l'eau et l'octanol (log K_{ow}). Plus le nombre d'atomes de carbone est grand, plus la molécule est lipophile. Ainsi, le naphtalène est moins lipophile que le pyrène, qui lui-même, l'est moins que le BaP (Tableau 1). Cette caractéristique est importante car elle permet aux HAP de passer au travers des membranes lipidiques par diffusion passive.

III.1. Absorption

La vitesse de passage des HAP dans la circulation systémique dépend du degré de lipophilie du HAP mais aussi de l'épaisseur de l'épithélium. La diffusion sera plus ou moins lente en fonction de la taille de l'espace inter-membranaire aqueux (Figure 9).Par conséquent, même en cas de faibles expositions, l'épithélium (site d'entrée) peut être exposé pendant quelques heures à de plus fortes concentrations que le reste de l'organisme [Gerde 1993a].

Ainsi les HAP peuvent pénétrer dans l'organisme par voies respiratoire, digestive et cutanée.

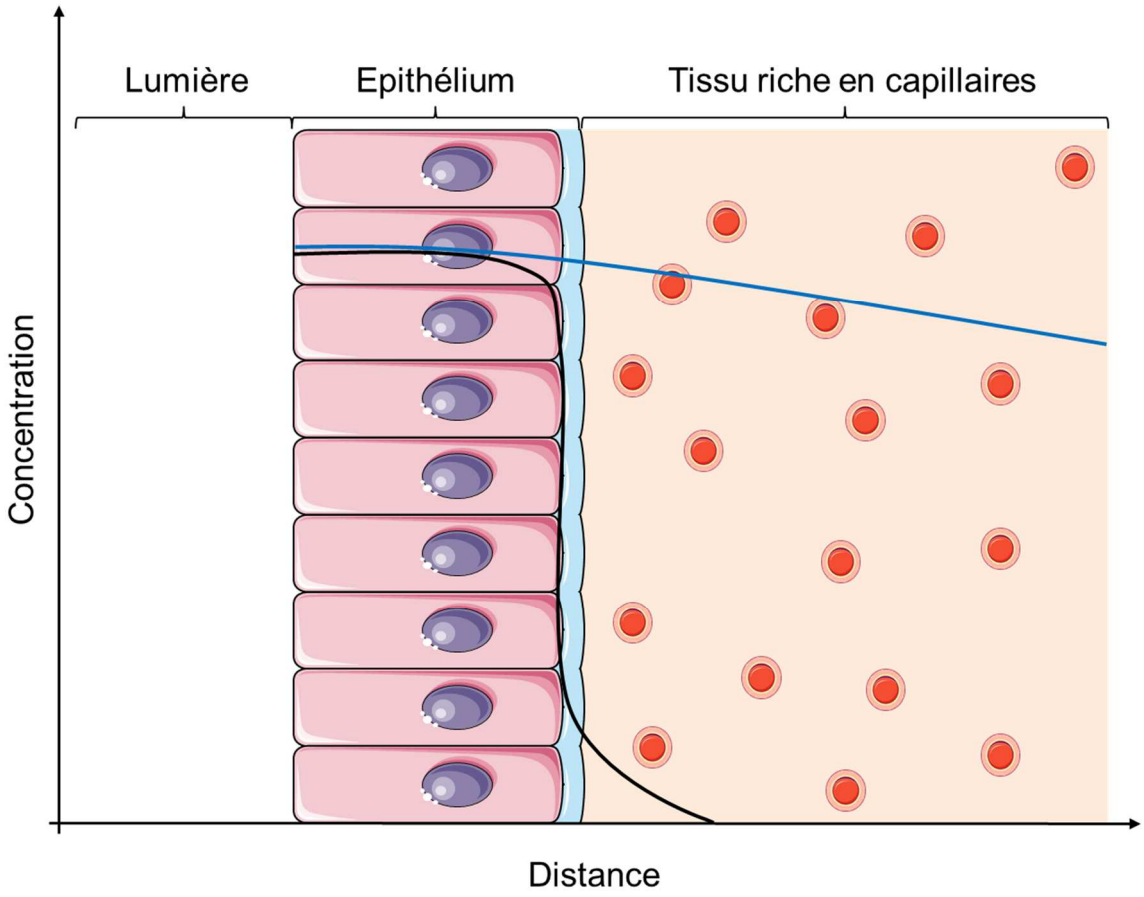


Figure 9 : Schéma de la pénétration des HAP de l'épithélium jusqu'à la circulation systémique en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.
Pour les HAP moyennement lipophiles comme les HAP gazeux tel que le Phe, la diffusion dans le tissu riche en capillaires est rapide et la substance passe dans la circulation systémique en quelques minutes (courbe bleue).
Pour les HAP plus lipophiles tel que le BaP, la diffusion est plus lente et se fait selon un gradient de concentration à partir du site d'entrée et passe dans la circulation systémique par les capillaires situés juste en dessous de l'épithélium (courbe noire). (Figure adapté de [Gerde 1993a])

III.1.1. Voie respiratoire

Les HAP qui sont inhalés pénètrent dans l'organisme par l'épithélium, lequel tapisse l'ensemble de l'appareil respiratoire. L'épaisseur de cet épithélium diminue en fonction de la profondeur des différentes régions du système respiratoire. Pour faciliter les échanges gazeux entre l'air et le sang, l'épithélium le plus fin se trouve au niveau des alvéoles (Figure 10).

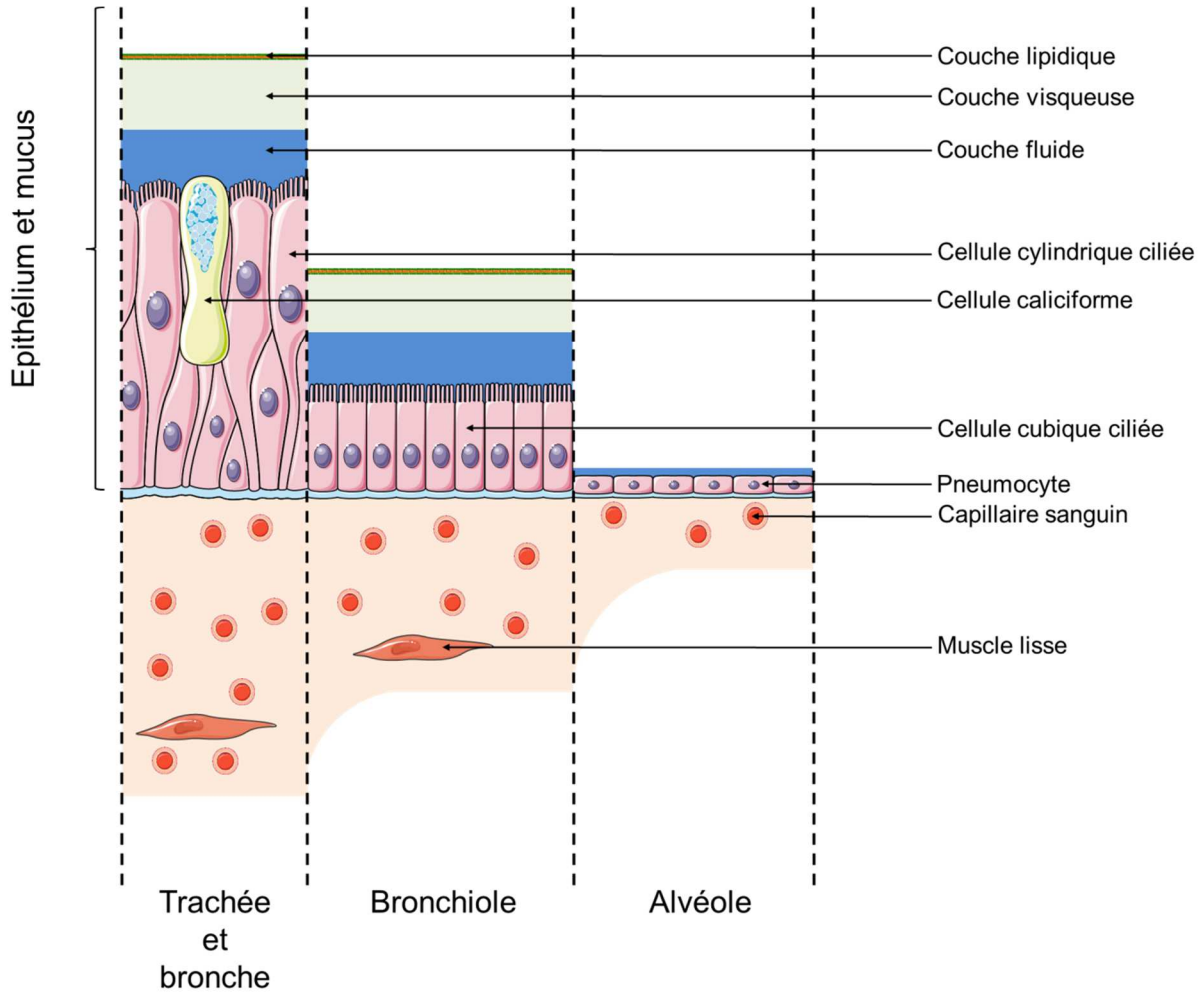


Figure 10 : Schéma de l'épithélium des différentes parties de l'appareil respiratoire

Les HAP gazeux atteignent rapidement et facilement les alvéoles pulmonaires. Le dépôt des HAP particulaires dans le poumon est quant à lui directement lié à la taille des particules sur lesquelles ils sont adsorbés (Figure 11). En effet, seules les particules ayant un diamètre inférieur à 3µm peuvent atteindre le poumon profond et donc les alvéoles [Aubier 2009]. Or, indépendamment de la source d'émission (émissions industrielles ou urbaines), les HAP sont essentiellement adsorbés sur des particules fines ayant un diamètre inférieur à 3µm [Rehwagen 2005, Liaud 2014, Sanchez-Soberon 2016]. Par conséquent, comme les HAP gazeux, les HAP particulaires peuvent atteindre le poumon profond. En plus de la taille des particules, le dépôt de ces dernières dépend de leurs propriétés physico-chimiques et de la structure de l'appareil respiratoire de l'individu [Hussain 2011].

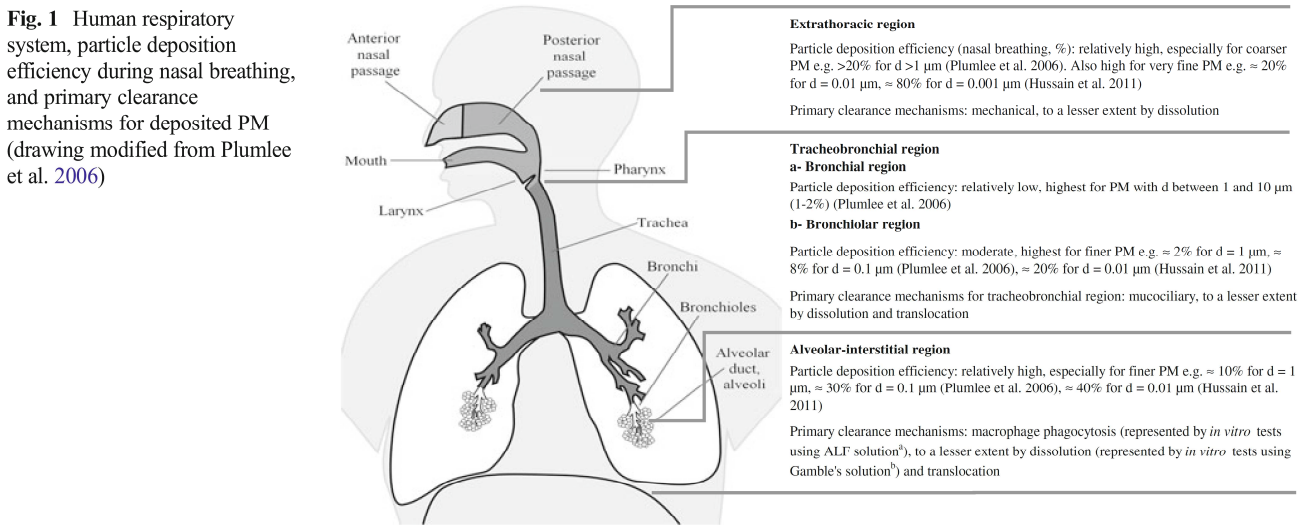


Figure 11 : Schéma du dépôt des particules inhalées dans les différentes régions de l'appareil respiratoire [Guney 2016].

En résumé, le passage des HAP à travers l'épithélium pour atteindre la circulation systémique dépend du type de HAP (gazeux ou particulaire), du caractère lipophile du HAP et de la région de l'appareil respiratoire au niveau de laquelle il va être absorbé.

Pour les HAP gazeux, qui pour rappel font partie des moins lipophiles (comme le Phe), le passage dans la circulation systémique est quasiment instantanée au niveau des alvéoles [Gerde 1993b], et est de l'ordre de la minute au niveau des bronches [Gerde 1993c]. C'est le débit sanguin qui va limiter leur passage dans la circulation systémique.

Pour les HAP particulaires qui sont lipophiles (comme le BaP), les molécules doivent dans un premier temps être désorbées de la particule. La vitesse de cette première étape dépendra de l'affinité entre l'HAP et la particule sur laquelle il est adsorbé [Gerde 2001]. Cette désorption sera facilitée par le mucus [Guney 2016] qui est constitué de trois couches : une première couche de faible viscosité entourant les cils des cellules épithéliales, une deuxième couche de forte viscosité au-dessus des cils et une dernière couche de lipides (Figure 10). C'est essentiellement cette dernière couche lipidique qui facilitera la désorption et permettra de piéger une partie des HAP, lesquels seront alors emmenés vers l'appareil digestif pour y être éliminés

[Gerde 1993c]. La fraction qui n'a pas été éliminée par la clairance muco-ciliaire, va être absorbée par les cellules épithéliales. La majorité des HAP vont être déposés au niveau des alvéoles [Gerde 2001]. Dans cette région, le passage dans la circulation systémique est rapide. Lorsque l'épithélium est plus épais, comme c'est le cas dans les bronches par exemple, la diffusion est ralentie. Ce ralentissement accorde un temps suffisant pour que les HAP soient en partie métabolisés [Gerde 1993a] et puissent exercer leurs actions toxiques (Figure 12).

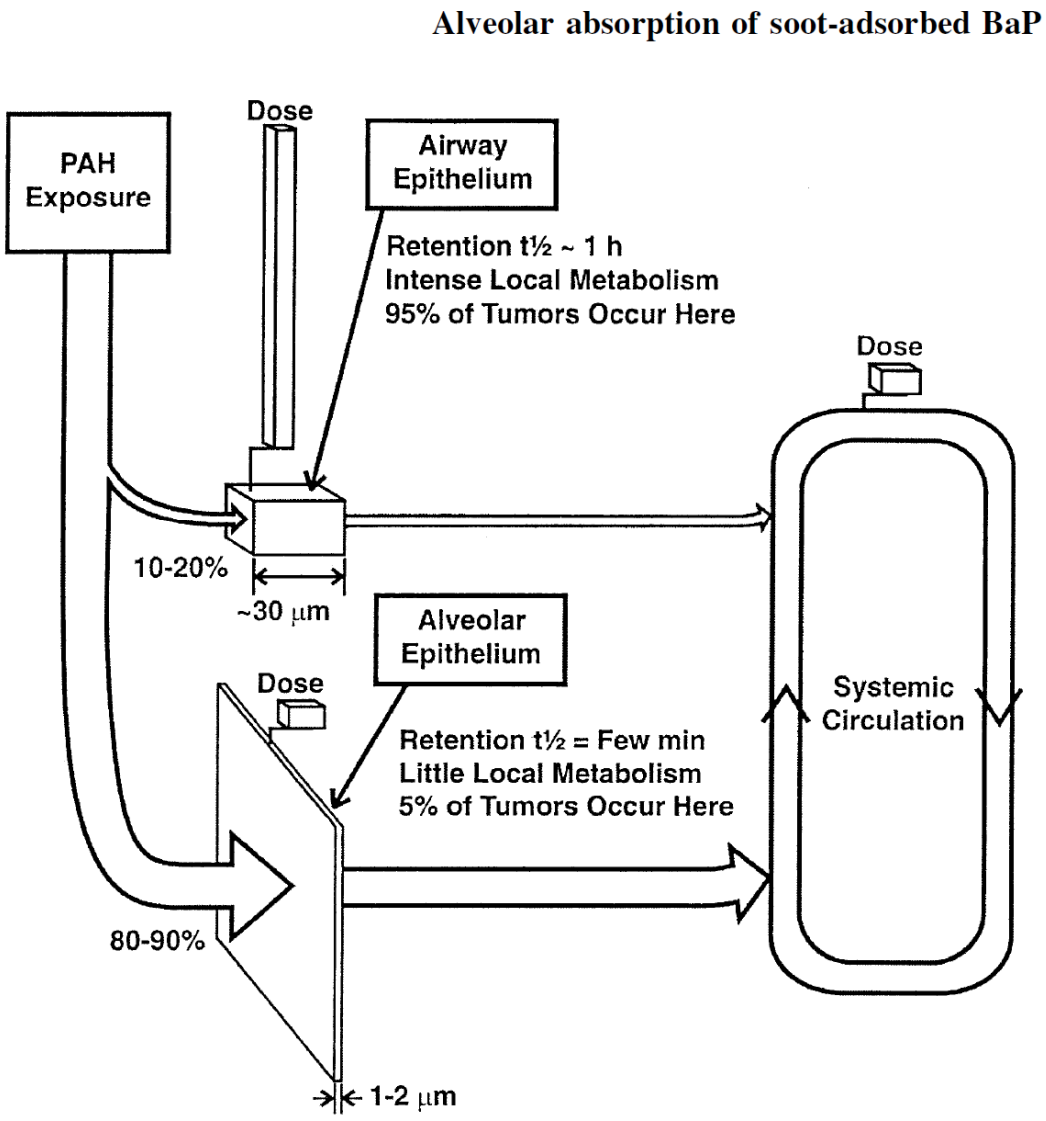


Figure 12 : Schéma de l'absorption du BaP au niveau des voies respiratoires [Gerde 2001]

III.1.2. Voie cutanée

Les HAP peuvent entrer en contact avec la peau de différentes manières. Les HAP gazeux et particulaires sont essentiellement absorbés après un contact direct avec la matière première dans laquelle ils sont contenus. De plus, les HAP particulaires peuvent être absorbés par contact indirect avec les particules atmosphériques qui se déposent sur la peau, les vêtements et les outils de travail.

L'absorption des HAP dépend de la matrice telle que la matière première (huile, fuel, brai…) ou encore du solvant d'application utilisé dans un cadre expérimental [Sartorelli 1999] mais aussi des caractéristiques de la particule sur laquelle sont adsorbés les HAP particulaires [Ruby 2016].

La peau est constituée :

- d'une couche cornée également appelée *stratum corneum* qui est composée de kératinocytes ayant suivi un processus apoptotique. Ces cellules sont anucléées et riches en fibre de kératine. Le *stratum corneum* joue le rôle de barrière physique de la peau.
- de l'épiderme qui est situé juste en dessous du *stratum corneum* et qui constitue une barrière enzymatique car elle possède l'arsenal enzymatique nécessaire à la biotransformation des xénobiotiques [Kao 1990].
- du derme, situé en dessous de l'épiderme, qui est majoritairement constitué de tissu conjonctif contenant des fibroblastes et des capillaires. Ces derniers permettent d'assurer la nutrition de l'épiderme par diffusion (Figure 13-A).

En plus du rôle de barrière, la peau joue un rôle de réservoir pour les composés lipophiles [Miselnicky 1988]. Après diffusion passive à travers le *stratum corneum*, les HAP arrivent au niveau de l'épiderme jusqu'à atteindre un équilibre. En fonction de leur degré de lipophilie, les HAP atteignent plus ou moins rapidement la circulation systémique [Chu 1996] au niveau du

derme. De plus, ils peuvent être métabolisés en composés plus hydrophiles pour pouvoir passer dans le sang (Figure 13-B) par les cellules de l'épiderme (kératinocytes) et les cellules du derme (fibroblastes) [Brinkmann 2013]. Pour les HAP les plus lipophiles, cette biotransformation déséquilibre le gradient de concentration au niveau de l'épiderme et favorise une absorption en plus grande quantité [Jacques 2010]. Pour ces composés (tel que le BaP), l'absorption va ainsi être limitée par les capacités métaboliques de la peau.

Par ailleurs, le nettoyage de la peau avec du savon ou autres agents de nettoyage facilite le passage dans la circulation systémique du BaP, lequel était stocké dans la peau. Ce phénomène est appelé « whashing effect » [Moody 1995].

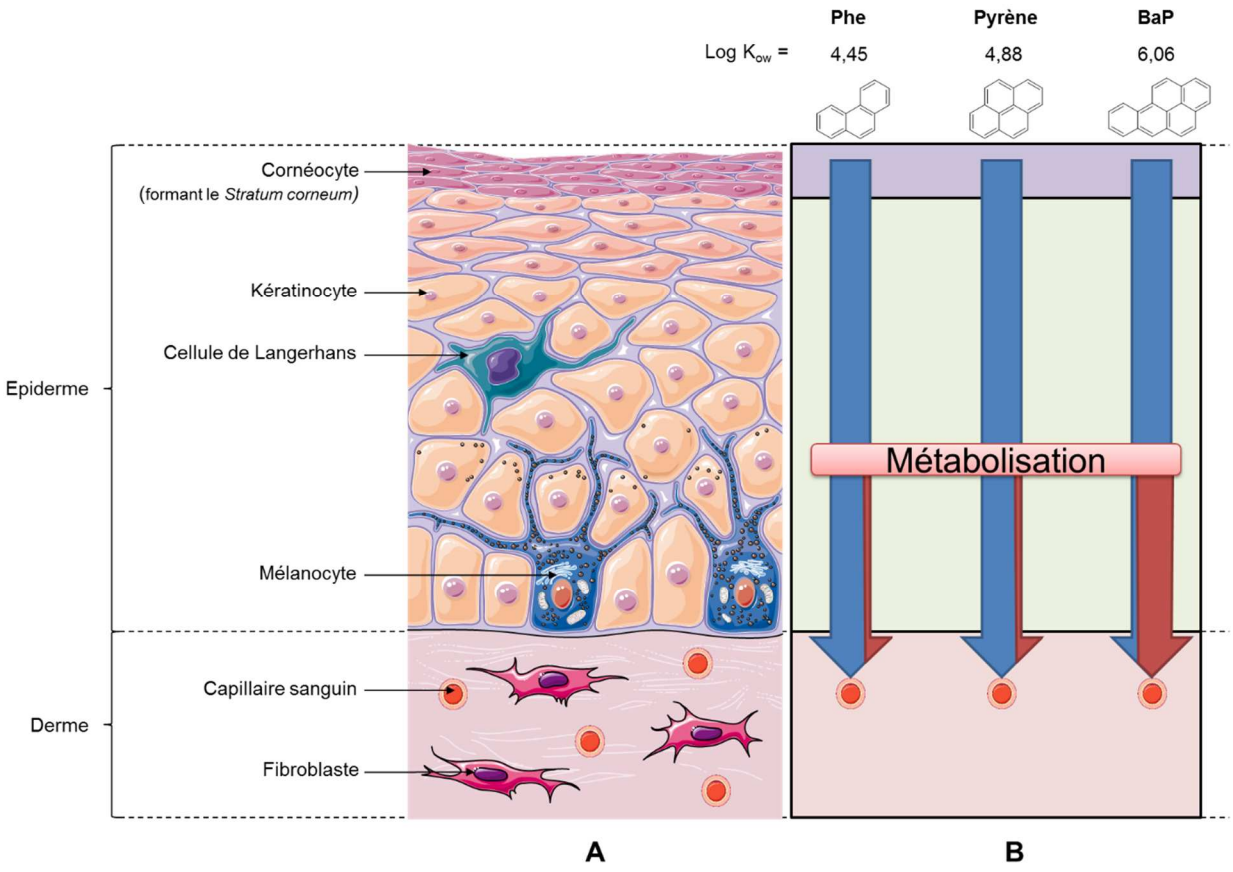


Figure 13 : Absorption cutanée des HAP avec la présentation de la structure de l'épithélium cutanée (A) et schéma de l'absorption de trois HAP (B) ayant des propriétés lipophiles différentes (Phe, pyrène et BaP). Les flèches représentent la diffusion passive à travers les différentes couches de la peau. La partie bleue représente la fraction non métabolisée du composé parent qui diffuse pour atteindre la circulation systémique alors que la partie rouge représente la fraction qui a été métabolisée.

A titre d'exemple, après 24h d'exposition d'explants de peau de cochons d'Inde sans fourrure au Phe, Pyr et BaP, 78%, 57% et 37% de la dose appliquée ont été respectivement retrouvés dans le milieu de culture. Seulement 7% et 15% de la dose était sous forme de métabolites pour le Phe et le pyrène, alors qu'elle atteignait 31% pour le BaP [Ng 1991, Ng 1992] (Figure 14). Par conséquent, il semblerait que les molécules ayant un Log K_{ow} supérieur à 5 nécessitent d'être préalablement métabolisés avant de passer dans la circulation systémique [Ng 1992].

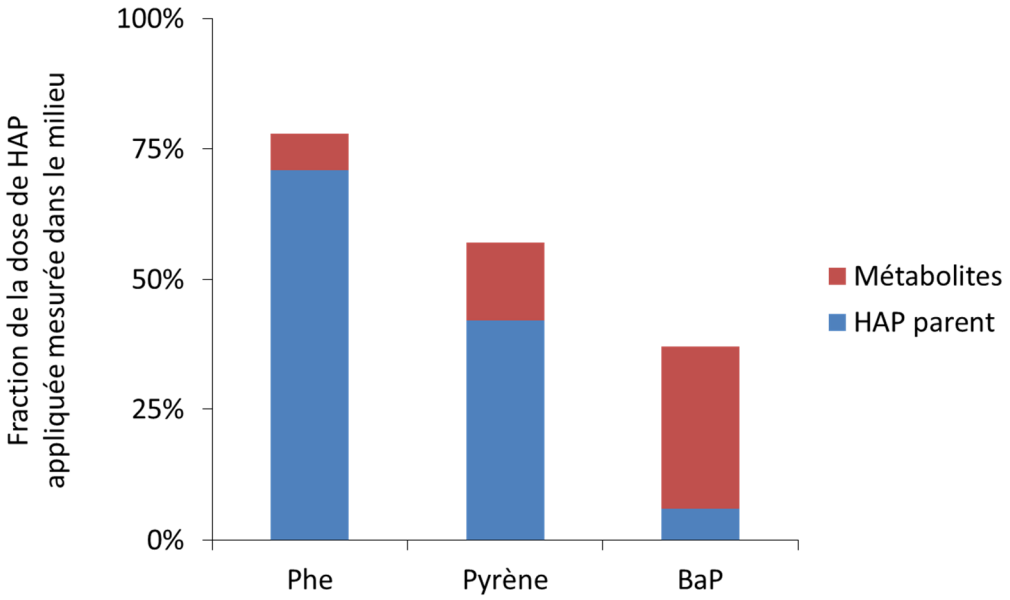


Figure 14 : Fractions des HAP passées à travers des explants de peau de cochons d'Inde sans fourrure après 24h d'exposition (d'après l[Ng 1991, Ng 1992]). En bleu : Fraction correspondant aux HAP non métabolisés retrouvés dans le milieu de culture. En rouge : Fraction correspondant aux HAP métabolisés retrouvés dans le milieu de culture.

Les HAP passent à travers le *stratum corneum* par diffusion passive jusqu'à atteindre un équilibre. La biotransformation des HAP les plus lipophiles, au niveau de l'épiderme, déséquilibre le gradient de concentration de cette diffusion passive et favorise une absorption en plus grande quantité [Jacques 2010]. Pour ces composés (tel que le BaP), l'absorption va être limitée par les capacités métaboliques de la peau.

Par ailleurs, le nettoyage de la peau avec du savon ou autres agents de nettoyage facilite le passage dans la circulation systémique du BaP, lequel était stocké dans la peau. Ce phénomène est appelé « whashing effect » [Moody 1995].

L'absorption cutanée dépend de plusieurs variables. Elle varie selon les espèces mais aussi en fonction de la température, de l'hydratation de la peau et du site anatomique. En effet, la structure de la peau (composition chimique, épaisseur du *stratum corneum*), le nombre de pores de sudation, le nombre de follicules pileux et les capacités métaboliques sont différents selon la partie du corps qui est exposée. Par conséquent, l'absorption est limitée au niveau des mains et des chevilles par rapport à l'épaule ou les avants bras [VanRooij 1993b].

III.1.3. Voie digestive

Les HAP pénètrent dans l'appareil digestif après ingestion de nourriture, d'eau et/ou de sol contaminés [Ramesh 2004, Ruby 2016]. La biodisponibilité des HAP dépend de la matrice et plus précisément des aliments avec lesquels ils sont ingérés (céréales, viande, lait…). En effet, les lipides de l'alimentation facilitent le passage des HAP à travers l'épithélium [Vasiluk 2008]. Après ingestion de lait surchargé en HAP, le maximum d'absorption a respectivement été observé pour le Phe et le BaP à 5h et 6h. Ce pic d'absorption correspond à celui des lipides [Laurent 2002]. De plus, l'absorption est plus importante pour les HAP les plus légers. Ainsi après ingestion de lait enrichi en HAP par des chèvres, il a été retrouvé 75% de la dose absorbée pour le pyrène et le Phe et seulement 12% pour le BaP [Grova 2002].

Le passage des HAP dans la circulation systémique commence au niveau de l'œsophage mais la majeure partie est absorbée au niveau de l'intestin grêle. Cette absorption est facilitée par les fluides gastro-intestinaux. En effet, la présence de bile dans la lumière intestinale facilite grandement le passage des HAP (notamment ceux ayant 4 ou 5 cycles) car elle permet la formation de micelles. Plus précisément, ce sont ces dernières qui aident à la solubilisation des HAP dans le fluide gastro-intestinal et au passage à travers [Ramesh 2004].

Par ailleurs, la flore intestinale est capable, comme l'épithélium, de métaboliser les HAP et les métabolites monohydroxylés [Van de Wiele 2004]. Ceci favorise la production de composés plus hydrosolubles pouvant passer dans la circulation systémique, et augmente ainsi la biodisponibilité des HAP.

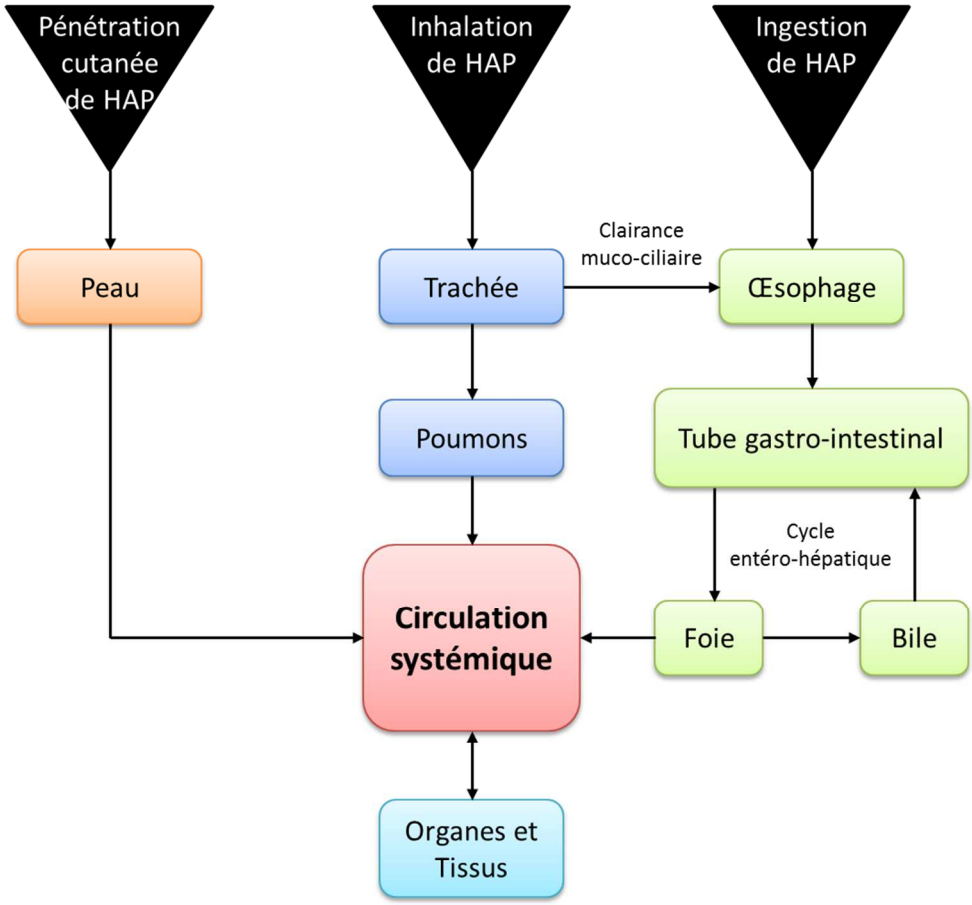


Figure 15 : Résumé des différentes voies d'absorption des HAP (adaptée de [Ramesh 2004]).

III.2. Distribution

D'une manière générale, les HAP sont transportés par des lipoprotéines et sont largement distribués dans la majorité des organes et tissus, avec une tendance à rapidement se stocker dans le tissu adipeux [IARC 2010]. Le rôle des lipoprotéines a notamment été démontré pour le transport du BaP dans les différents organes et tissus, mais aussi à l'intérieur des cellules [Busbee 1990].

En effet, le volume de distribution des HAP est bien plus grand que le volume plasmatique ce qui atteste d'une importante distribution dans les organes et les tissus. Ainsi, alors que le volume sanguin moyen est de 18ml chez le rat, le volume de distribution estimé pour le pyrène, le BaP et le Phe est respectivement de 238 ml, 250 ml et 385 ml après une injection intraveineuse (IV) à des doses respectives de 50, 40 et 5 µmol/kg [Bouchard 1998, Pu 2004, Marie 2010].

Le stockage du Nap, du pyrène et du BaP après une injection IV se fait majoritairement dans le tissu adipeux et est expliqué par les caractéristiques lipophiles des HAP [Bouchard 1998, Kilanowicz 1999, Marie 2010]. Cependant, après une IV de BaP, le stockage dans le poumon est supérieur à celui du tissu adipeux du fait de la position des poumons par rapport au cœur. Les poumons, étant les premiers organes après le cœur, reçoivent la totalité du débit sanguin et sont donc les premiers organes en contact avec la dose de HAP injectée [Moir 1998]. A l'inverse, après une exposition par voie orale au BaP, le stockage se fait majoritairement dans le tissu adipeux et il n'y a pas de stockage dans les poumons [Ramesh 2001]. Par ailleurs, un cycle entéro-hépatique a été observé pour le pyrène et le BaP retardant ainsi l'élimination via les fèces [van Schooten 1997, Bouchard 1998].

En plus d'être retrouvé dans les tissus adipeux et dans les organes responsables de la métabolisation tels que le foie ou les reins, les HAP et leurs métabolites ont également été mesurés dans le cerveau et dans les tissus reproducteurs tels que les testicules, l'épididyme et les vésicules séminales [Ramesh 2001, Grova 2011].

III.3. Métabolisation et mécanismes d'action toxique

Une fois dans la cellule, les HAP sont difficilement éliminés de cette dernière de par leurs propriétés lipophiles. Le système de détoxication est un arsenal enzymatique dont le but est de prendre en charge les xénobiotiques tels que les HAP pour les rendre plus hydrophiles, afin de faciliter leur élimination. Ce système est constitué de trois phases : la fonctionnalisation (phase I), la conjugaison (phase II) et l'élimination (phase III).

Cependant, ce système de détoxication peut également produire des métabolites ayant un effet toxique sur la cellule. Alors que les HAP sous forme non métabolisés, appelé aussi HAP parents, ne présentent aucune toxicité, ce sont les réactions de biotransformations, notamment de phase I, qui produisent des métabolites réactifs capables de se lier à des macromolécules de la cellule telle que l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ainsi, les HAP nécessitent d'être bioactivés pour exercer un effet toxique et sont donc classés parmi les procarcinogènes et progénotoxiques [Gelboin 1980](Figure 16).

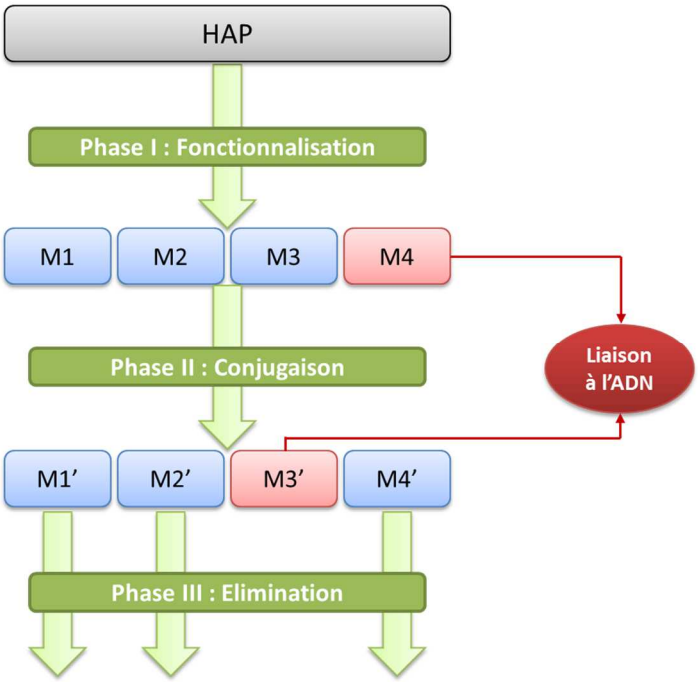


Figure 16 : Résumé des phases du système de détoxication et de la bioactivation des HAP. Les métabolites M1- 4 représentent les métabolites primaires issus d'un même HAP après la phase I alors que les métabolites M1'- 4' représentent les métabolites secondaires issus de la phase II. Les métabolites en bleu représentent des métabolites non toxiques tandis que les rouges ont un pouvoir toxique.

Les principaux organes de métabolisation sont le foie et les reins et sont riches en enzymes de biotransformation. Ces dernières sont également retrouvées dans la plupart des tissus, même si elles sont moins efficaces. En effet, lors de l'absorption via les différentes voies, la peau, les poumons et l'intestin grêle métabolisent déjà une partie des HAP [Foth 1995, Ramesh 2004, Jacques 2010]. Le métabolisme au niveau ce ces organes est appelé effet de premier passage. D'une part, il facilite le passage des HAP et de leurs métabolites dans la circulation systémique,

et d'autre part, il engendre une plus grande exposition de ces organes aux HAP et à leurs métabolites réactifs.

Les HAP sont métabolisés par différents types d'enzymes de biotransformation. Tandis que la phase I est essentiellement assurée par les cytochromes P450 (CYP), la phase II est assurée par plusieurs enzymes tels que l'époxyde hydrolase (EH), la glutathion transférase (GST), la UDP-glucuronosyltransférase (UGT), la sulfotransférase (SLUT), la NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) et l'aldocéto reductase (AKR) [Shimada 2006]. A partir de cet ensemble d'enzymes, trois voies de métabolisation qui produisent des métabolites réactifs ont été décrites : la voie du diol-époxyde, la voie de l'ortho-quinone et la voie du radical cation. En parallèle, les voies de détoxication agissent pour neutraliser ces métabolites qui sont toxiques pour la cellule.

III.3.1. Voie du diol-époxyde

La voie du diol-époxyde est la voie de toxication pour de nombreux HAP car elle engendre, au niveau des régions de baie et de fjord des HAP, la formation de diol-époxydes qui sont capables de se lier à l'ADN. Avant la formation d'un diol-époxyde, trois étapes de métabolisation sont nécessaires. Un CYP va tout d'abord former un époxyde au niveau de la région de baie du HAP qui, s'il ne s'hydrolyse pas spontanément, va être pris en charge par une EH pour former un diol, toujours en conformation de type *trans*- [Xue 2005]. Enfin, un CYP va de nouveau venir greffer un atome d'oxygène pour former un époxyde à côté du diol formé précédemment.

Dix-sept familles de CYP ont été identifiées chez l'humain mais ce sont surtout les familles CYP1, 2 et 3 qui jouent un rôle dans la bioactivation des cancérogènes environnementaux [Shimada 2004]. Les principaux CYP impliqués dans cette voie métabolique sont CYP1A1, 1B1, 1A2, 3A4. Ces derniers ont une activité et une répartition tissulaire différente. CYP1A1 et 1B1 ont une localisation majoritairement extra-hépatique tandis que 1A2 et 3A4 sont trouvés majoritairement dans le foie. Parmi les différents HAP étudiés (BaP, diméthyl-

benzo(a)anthracène, dibenzo(a,l)pyrène, 5-methyl-chrysène et benzo(a)anthracène), la famille des CYP1 est la plus efficace. Au sein de cette dernière, CYP1A1 et 1B1 ont une activité oxydative similaire alors que 1A2 a une activité plus faible [Shimada 2006].

Les enzymes de biotransformation ont une stéréosélectivité. En prenant l'exemple du BaP (Figure 17), le 7,8-epoxyBaP, formé lors de l'étape 1 par le CYP, va essentiellement être sous la forme de 7R,8S-epoxyBaP (95%) par rapport à la forme 7S,8R-epoxyBaP. Lors de l'étape 2, EH convertit le 7R,8S-epoxyBaP en 7R,8R-diol à 95% et donc le diol-époxyde majoritaire du BaP (BPDE) est le 7R,8S,9S,10R-diol-epoxydeBaP [Xue 2005].

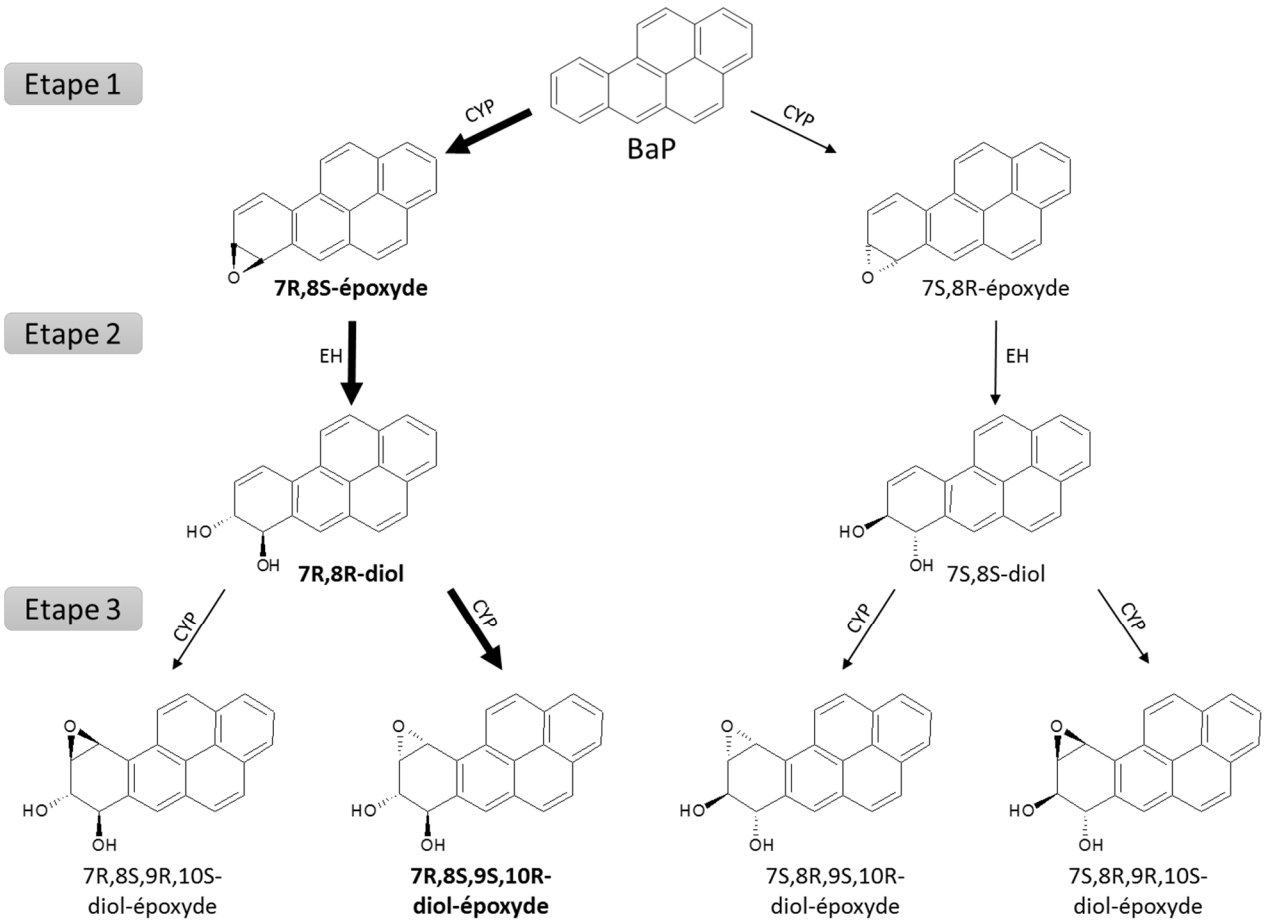


Figure 17 : Production des différents isomères du BPDE (adaptée d'après [Xue 2005])

Les diol-époxydes formés vont ensuite pouvoir se lier à l'ADN. La réactivité des différents isomères de diol-époxyde-HAP avec l'ADN a été étudiée. Parmi les HAP étudiés, l'isomère ayant la plus grande capacité de liaison avec l'ADN est de configuration R,S,S,R [Xue 2005].

Le cycle qui contient l'époxyde va s'ouvrir pour créer une liaison covalente avec les groupes aminoexocyclique des bases puriques de l'ADN : 2'-désoxyguanosine (dGuo) et 2'-desoxyadénosine (dAdo) (Figure 18). Tandis que les diol-époxydes issus de HAP planaires forment majoritairement des adduits avec la dGuo, ceux issus de HAP non planaires forment majoritairement des adduits avec la dAdo. La formation de cette liaison entre le diol-époxyde-HAP et la base purique, peut garder ou inverser la conformation du métabolite et ainsi, engendrer la production d'adduit de type *cis* ou *trans*. Par conséquent, à partir d'une même base et des 4 isomères de diol-époxyde, 4 paires de diastéréoisomères donnent 8 isomères d'adduits.

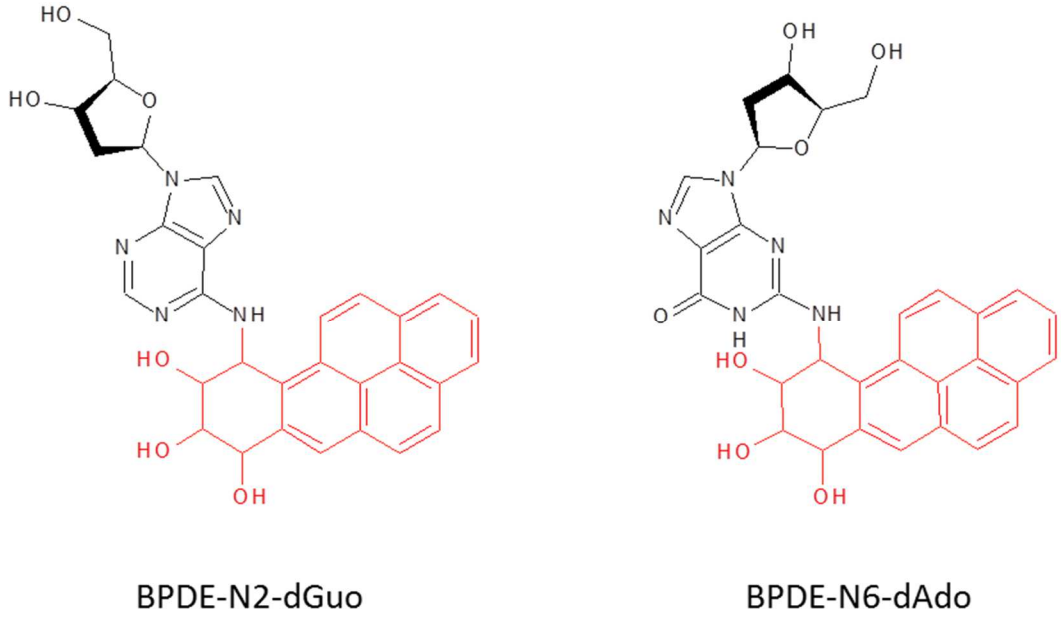


Figure 18 : Exemple d'adduits du BPDE sur les bases puriques

Les diol-époxydes sont considérés comme cancérogènes lorsque l'époxyde est situé au niveau de la région de baie du HAP ce qui est le cas du BPDE. Toutefois, via cette voie de métabolisation, des diol-époxydes « inverses » (reverse-diol-époxyde) peuvent être formés (Figure 19). A l'inverse des diols-époxydes réactifs, ces derniers sont considérés comme non-

cancérogènes car rapidement pris en charge par les GST, ils ne peuvent pas réagir avec l'ADN [Hecht 2008, Upadhyaya 2010].

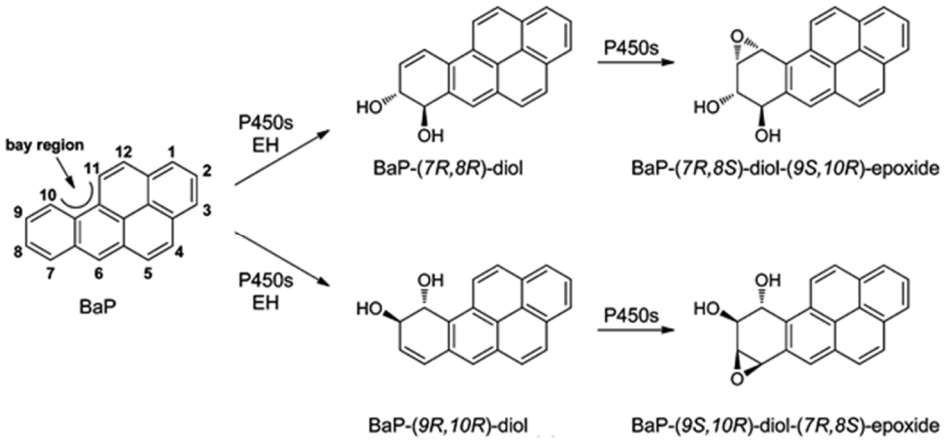


Figure 19 : Formation de diol-époxyde et de reverse-diol-époxyde pour le BaP, adaptée de [Hecht 2010]. P450s : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde Hydrolase

III.3.2. Voie de l'ortho-quinone

La voie de métabolisation de l'ortho-quinone dépend des enzymes dihydrodiol déshydrogénase (DD) qui appartiennent à la famille des AKR. Elles sont présentes dans la grande majorité des tissus humains, notamment dans le poumon.

Cette voie de métabolisation débute comme celle des diol-époxydes, avec la formation d'un diol après la lyse d'un époxyde par une EH (Figure 20). Ce diol, toujours de type *trans*, va soit être pris en charge par un CYP et suivre la voie des diol-époxydes décrite ci-dessus, ou alors, il va être transformé en catéchol par une AKR. Les AKR ne prennent en charge que les diols-HAP qui ne sont pas sur une région K. Ainsi, le 4,5-dihydroxy-BaP (4,5-diol-BaP), ne peut être transformé en catéchol par les AKR [Burczynski 2000a].

Le catéchol nouvellement formé va subir deux oxydations spontanées pour former successivement une o-semiquinone-HAP puis une o-quinone-HAP. La formation de cette

dernière engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) lors de la première réaction d'oxydation et les anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) lors de la seconde. Les ROS sont responsables d'un stress oxydant qui peut générer des dommages à l'ADN, telle la formation de 7,8-dihydro-8-oxo-2'-desoxyguanosine (8-oxo-dGuo) pouvant aboutir à des transversions guanine-thymine [Penning 2014]. *In vitro*, la quantité de 8-oxo-dGuo produites par différentes o-quinone-HAP diminuerait selon l'ordre suivant : la 1,2-dione-Nap > la 3,4-dione-benzo(a)anthracène > 3,4-dione-diméthylbenzo(a)anthracène > 7,8-dione-BaP [Park 2005]. La o-quinone-HAP est ensuite retransformée en catéchol, via NQO1 ou AKR, assurant ainsi un cycle d'oxydo-réduction producteur de ROS [Zhang 2012].

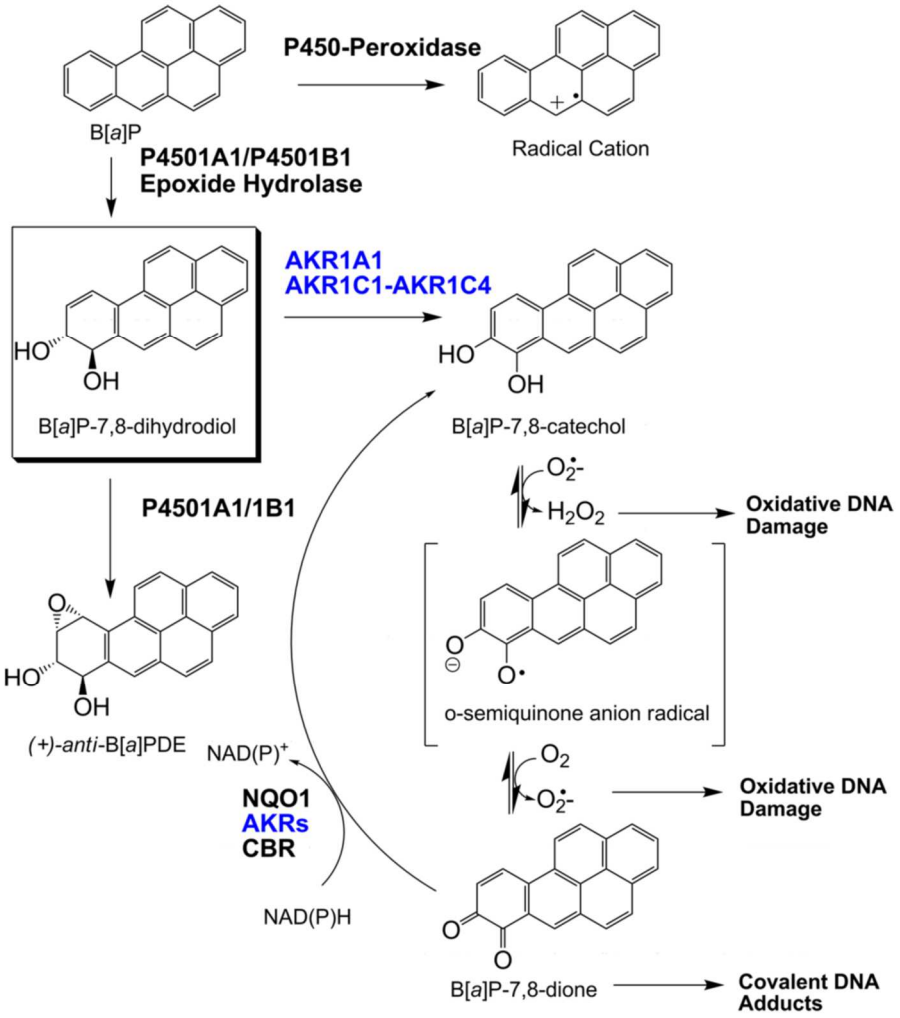


Figure 20 : Métabolisation des HAP via la voie de l'ortho-quinone, d'après [Penning 2014]. P450 : Cytochrome P450 ; AKR : Aldocéto réductase ; NQO1 : NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 ; CBR : Carbonyl reductase

En plus des dommages à l'ADN liés à la production de ROS, les o-quinone-HAP peuvent former des adduits stables ou dépurinants (Figure 21). En condition acide, les o-quinone-HAP réagissent avec la dGuo et engendrent la rupture de la liaison glycosidique, formant ainsi, un adduit dépurinant. Parmi les métabolites testés, la réactivité diminuerait selon l'ordre suivant : la 1,2-dione-Nap > 1,2-dione-Phe > 7,8-dione-BaP [McCoull 1999]. De plus, des adduits stables à la dGuo et à la dAdo ont été mesurées dans des cellules pulmonaires humaines [Huang 2013].

Le cycle d'oxydo-réduction des o-quinone-HAP pourrait augmenter production de composés issus de la peroxydation lipidique tel que le 4-oxo-2-nonelal, qui est capable de former des adduits à l'ADN. Cependant, aucune étude n'a encore expérimenté cette hypothèse [Penning 2014].

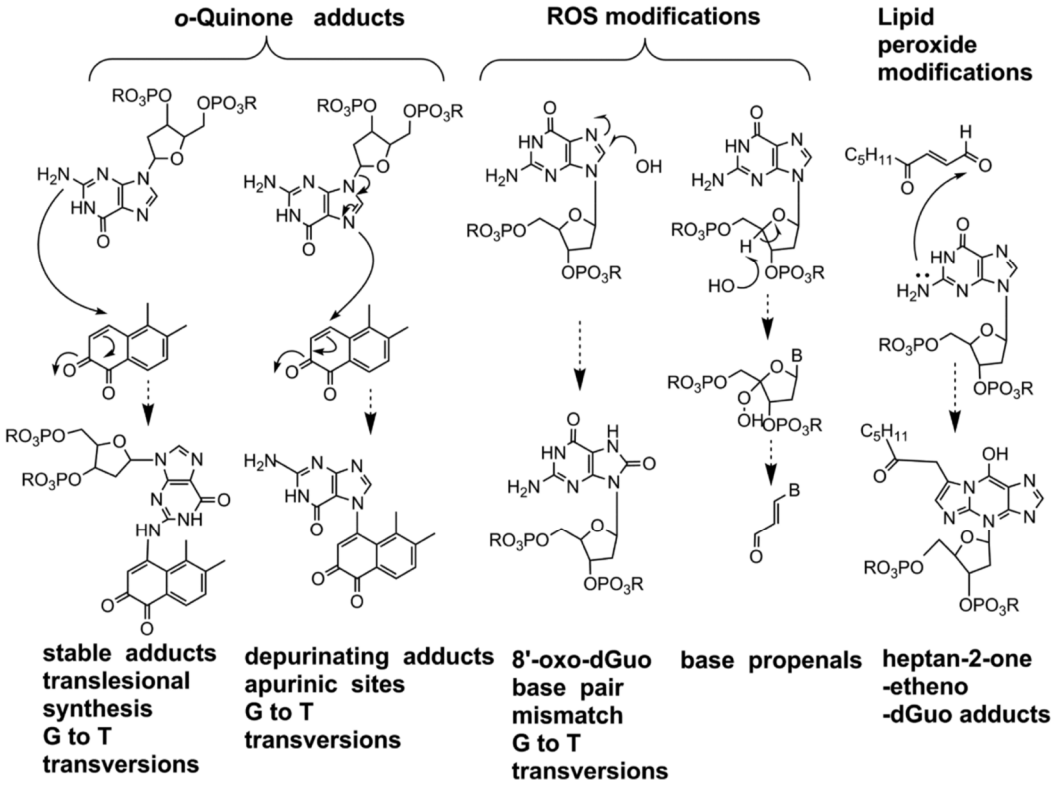


Figure 21 : Différents dommages à l'ADN causés par la voie de métabolisation de l'orthoquinone, d'après [Penning 2014]

III.3.3. Voie du radical cation

Au sein de la famille des CYP, certaines peuvent avoir une activité de type peroxydase [Hrycay 2012] et engendrer une peroxydation du squelette carboné du HAP en arrachant un électron au système de liaison π (Figure 22). La possibilité de perdre un électron pour former un radical cation dépend du potentiel d'ionisation du composé. Ceux-ci sont respectivement de 7,23, 7,50 et 8,19 eV pour le BaP, le pyrène et le Phe [Xue 2005]. Le potentiel d'ionisation du HAP doit être inférieur à 7,35 eV pour que le radical cation produit soit assez stable pour causer des dommages à l'ADN [Cavalieri 1992]. Les adduits à l'ADN qui sont formés sont des adduits instables dépurinants. Cependant, même en ayant un faible potentiel d'ionisation, comme le BaP, le radical cation reste une espèce chimique instable qui ne pourra former des adduits à l'ADN que s'il est produit dans le noyau cellulaire [IARC 2010]. Ainsi, *in* vivo, la voie du radical cation est un mécanisme mineur dans la formation d'adduits à l'ADN [Xue 2005].

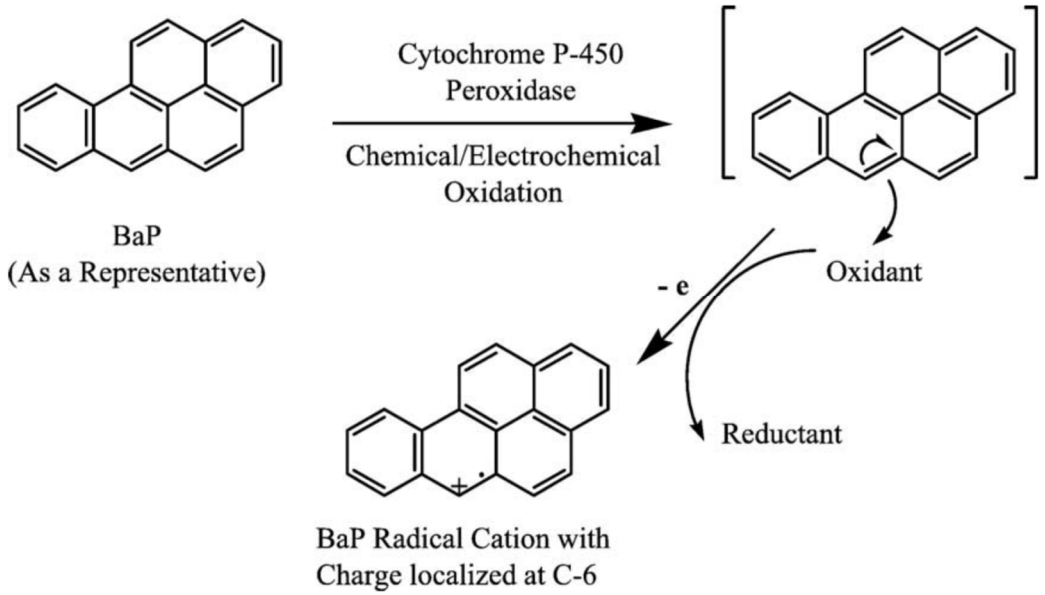


Figure 22 : Exemple de la formation du radical cation du BaP, d'après [Xue 2005].

III.3.4. Voie de détoxication

III.3.4.1. Phase I : Fonctionnalisation

Bien que les CYP engendrent la production de métabolites nucléophiles, ils assurent également la grande majorité de la phase I du système de détoxication [Moorthy 2015]. Les époxydes formés par les CYP, peuvent être pris en charge par les EH pour former des *trans*-diols, comme c'est le cas dans la voie des diol-époxydes ou de l'ortho-quinone mais peuvent également subir une hydrolyse spontanée pour former un monohydroxy-HAP.

III.3.4.2. Phase II : Conjugaison

La phase II du système de détoxication a pour but de faciliter l'élimination de métabolites non toxiques en augmentant le caractère hydrophile du composé, mais aussi de neutraliser les métabolites nucléophiles ayant un pouvoir toxique. Généralement, ces derniers sont conjugués à un acide glucuronique ou à un sulfate par les UGT et les SLUT. Les GST sont efficaces surtout au niveau des régions K, mais sont également très actives au niveau des régions de baie et de fjord où elles greffent du glutathion au niveau des arènes oxydes [Luch 2004].

III.3.4.3. Phase III : Elimination

Après la phase de conjugaison, les métabolites des HAP, devenus plus hydrophiles, ne peuvent plus passer par diffusion passive au travers des membranes cellulaires. Pour être éliminés de la cellule, ils passent par des transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC), tels la p-glycoprotéine (PgP), les multidrug resistance proteins (MRP) et la breast cancer resistance protein (BCRP). Tandis que PgP transporte surtout les composés non métabolisés, les MRP (MRP1 et MRP2) transportent activement les composés conjugués au glutathion, à l'acide glucuronique et au sulfate [Schinkel 2003]. Le MRP2 est capable d'éliminer le BPDE conjugué au glutathion [Srivastava 2002] et le MRP4 est capable d'effluer le 7,8-diol-BaP non conjugué avant son entrée dans la voie du diol-époxyde ou de l'ortho-quinone [Gelhaus 2012]. La BCPR

joue un rôle dans l'efflux des métabolites monohydroxylés glucurono- ou sulfo-conjugués tel que le 3-hydroxyBaP (3-OHBaP) et le 1-hydroxypyrène (1-OHP) [Ebert 2005, Hessel 2013].

III.3.5. Induction des enzymes de biotransformation par les HAP

Après que les HAP soient entrés dans la cellule, ils sont pris en charge par les enzymes de biotransformation. Cependant, ils sont capables de faire varier l'expression des gènes codant pour ces enzymes de biotransformation et modifient ainsi les capacités de métabolisation au niveau de la cellule. Ainsi, les HAP ayant montré des propriétés cancérogènes chez l'animal (BaP, benzo(k)fluorantène, benzo(b)fluorantène…) sont capables d'induire les CYP1A1, 1A2 et 1B1 tandis que les non cancérogènes tels que le Phe ou le pyrène n'induisent pas significativement les CYP [Shimada 2006]. Cette tendance se retrouve pour l'ensemble du système de détoxication (enzyme phase I et phase II). En effet, le potentiel d'induction d'enzymes de phase I et de phase II des différents HAP suivrait l'ordre suivant : Nap < Phe < Pyrène << Chrysène < BaP [Elovaara 2007].

III.3.5.1. Le récepteur Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)

Le récepteur AhR, qui se lie à une large variété de composés endogènes et exogènes, est considéré comme un médiateur de l'induction des gènes codant pour les enzymes de biotransformation [Arenas-Huertero 2011]. Ce dernier est exprimé dans la plupart des tissus, et de manière importante dans le foie, le tissu adipeux et les cellules de l'épithélium bronchique [Tsay 2013].

L'AhR, situé dans le cytoplasme, est lié à la heat shock protein 90 (HSP90), à la AhR interacting protein (AIP aussi appelé XAP2 ou ARA9) et à la protéine co-chaperonne p23 pour favoriser son interaction avec les xénobiotiques tel que les HAP. Lorsqu'un HAP va venir se lier avec l'AhR, la HSP90 est relarguée pour permettre au complexe HAP-AhR de pénétrer dans le noyau. Au sein de l'espace intranucléaire, Arhylhydrocarbon receptor nuclear translocator

(ARNT) va s'ajouter au complexe pour permettre la liaison avec le Xenobiotic Responsive Element (XRE) (Figure 23).

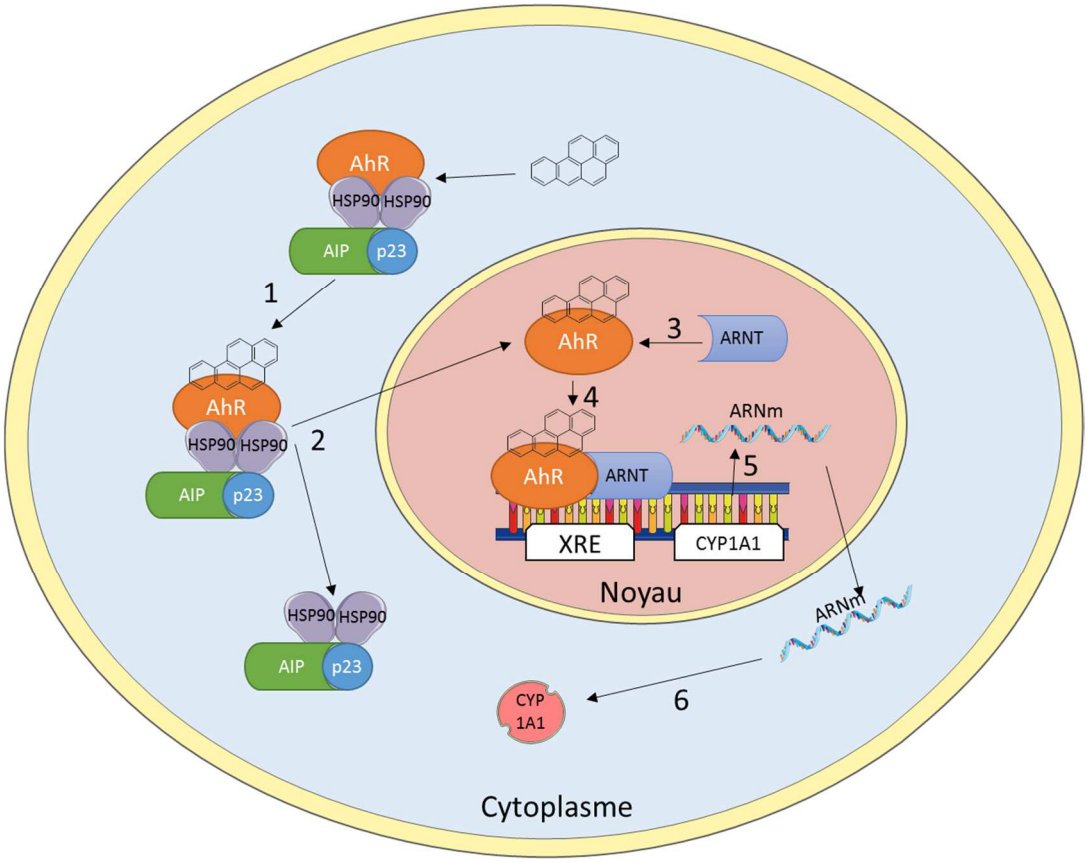


Figure 23 : Schéma de l'induction des enzymes de biotransformation par les HAP via AhR (adaptée d'après [Arenas-Huertero 2011]). 1 : Liaison HAP-AhR ; 2 : Relarguage du complexe HSP90, AIP et p23 et translocation dans le noyau du complexe HAP-AhR ; 3 : Liaison de la protéine ARNT au complexe HAP-AhR ; 4 : Fixation du complexe au niveau de XRE ; 5 : Activation et transcription du gène codant pour les enzymes de biotransformation inductible via AhR (ici CYP1A1) ; 6 : traduction de l'acide ribonucléique messager (ARNm) pour obtenir une enzyme fonctionnelle.

L'AhR peut modifier l'ensemble de l'activité du système de détoxication de par sa capacité d'induction d'expression de gènes codant pour des enzymes de phase I (CYP1A1, 1A2 et 1B1), de phase II (NQO1, GST1A1, GSTA2, UGT1A1 et UGT1A6) et aussi de protéines d'efflux (phase III) tels que MRP4 et BCRP [Ebert 2005, Xu 2010, Arenas-Huertero 2011, IARC 2012].

Cependant, tous les HAP n'ont pas la même affinité avec AhR. Celle-ci dépend de la planéité du composé qui peut être définie par la profondeur et par le ratio surface/profondeur². Une faible profondeur et un ratio surface/profondeur² élevé permettent une bonne capacité de liaison à AhR [Pushparajah 2008]. Ainsi, les HAP de moins de 4 cycles (Nap, Flu, Phe) ne peuvent pas

se lier à AhR alors que ceux possédant 4 cycles ou plus peuvent induire l'expression des gènes des enzymes de détoxication dépendant de AhR en fonction de leur capacité de liaison au récepteur [Machala 2001, Genter 2006, Murahashi 2007].

Ceci permet d'expliquer la faible capacité d'induction des HAP de moins de 4 cycles pour les enzymes de biotransformation dépendant de AhR tel que CYP1A1 et 1B1, en condition *in vitro* et *in vivo* [Bosveld 2002, Lampen 2004, Shimada 2006, Pathiratne 2010]. Bien que l'expression des gènes codant pour CYP1A2 dépende de l'AhR, les HAP de 3 cycles sont capables d'induire CYP1A2 de manière indépendante à CYP1A1 [Chaloupka 1994, Chaloupka 1995].

III.3.5.2. Autres récepteurs

L'AhR est le récepteur le plus connu quant à l'induction des enzymes de biotransformation. Cependant, d'autres récepteurs sont capables d'induire les enzymes de biotransformation des phases I, II et III tels que le Constitutive Androstane Receptor (CAR) et le Pregnane X receptor (PXR) [Xu 2005].

En effet, le pyrène pourrait induire CYP1A2 et SULT 1A1 via le récepteur CAR. Ainsi, l'induction de CYP1A2 observé pour les HAP à 3 cycles pourrait également se faire via ce récepteur [Lee 2007].

Les HAP sont également capable d'induire CYP3A4 via PXR. Comme AhR, PXR est situé dans le cytoplasme. En plus de son rôle d'inducteur du système de détoxication, il est également un récepteur important pour des composés endogènes et joue un rôle dans le métabolisme du glucose ou des lipides par exemple [Ihunnah 2011]. En revanche, PXR est capable de se lier a des HAP planaires (BaP) mais aussi non planaires (benzo(c)phénanthrène), contrairement à AhR [Luckert 2013].

Le BaP est également capable d'induire CYP1A1 via *p53* qui se lie à l'élément de réponse *p53* (*p53*RE). *p53*RE serait également capable d'induire d'autres enzymes de phase I telle que CYP3A4 mais aussi de phase II telles que des UGT [Krais 2016, Wohak 2016].

Enfin, il a aussi été montré que les métabolites des HAP tel que le BPDE ou les o-quinones, notamment celles du BaP, du benzo(a)anthracène et du chrysène pouvaient induire les gènes des enzymes de biotransformation, mais les mécanismes d'induction restent méconnus [Burczynski 2000b, Spink 2008, Bekki 2012, Luckert 2013].

III.3.6. Polymorphisme et susceptibilité individuelle

Le polymorphisme est une variation de la séquence nucléotidique d'un gène au sein d'une population. Pour qu'un gène soit considéré comme polymorphe, les différents allèles (version du gène) doivent représenter au moins 1% de la population.

Bien qu'un polymorphisme génétique ne mène pas systématiquement à une modification de l'expression ou de l'activité catalytique de l'enzyme, il peut dans certains cas, notamment au niveau des enzymes de biotransformation, contribuer à une susceptibilité individuelle au cancer par une différence des capacités de métabolisation.

En effet, il existe un polymorphisme génétique pour la majorité des enzymes de biotransformation, notamment celles en jeu dans la métabolisation des HAP tels que les CYP (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2C9 et 3A4), les EH, les GST, les UGT, les SULT, les NQO1 et les AKR [Shimada 2006]. Ainsi, les individus ayant une déficience pour les enzymes produisant des métabolites réactifs auraient un risque plus faible de cancérogénèse chimique, alors que ceux présentant une déficience au niveau des enzymes qui désactivent les métabolites réactifs présenteraient un risque plus élevé [IARC 2010].

De plus, il existe également un polymorphisme au niveau du gène codant pour AhR pouvant engendrer des différences de capacités d'induction des enzymes de biotransformation entre les

individus. Le polymorphisme d'AhR peut aboutir à des différences d'excrétion des métabolites urinaires tel que le 1-OHP chez des travailleurs de cokerie ou à une susceptibilité individuelle différente au cancer tel que le gliome [Bin 2008, Gu 2012].

Cependant, les nombreuses études épidémiologiques qui ont cherché à établir un lien entre le polymorphisme génétique, le métabolisme des HAP et une susceptibilité au cancer ne trouvent pas systématiquement un lien. Le nombre important de gènes et de protéines mis en jeu dans le métabolisme complexe des HAP, croisé en plus, aux différences ethniques, aux différences dues à l'âge, au sexe et aux facteurs environnementaux (pouvant moduler l'activité métabolique du système de détoxication) expliquent les difficultés à conclure de ces études épidémiologiques [IARC 2010]. Par exemple, le génotypage n'est pas un moyen efficace pour prédire le métabolisme des HAP notamment celui du Phe et de son ratio tetrahydroxy-Phe/somme des monohydroxyPhe [Hecht 2006].

Pour prendre en considération l'ensemble de ces facteurs, l'étude de la susceptibilité au cancer des individus pourrait se faire à partir du phénotype en regardant les proportions de différents métabolites issus de voie de métabolisation différentes.

III.4. Elimination

Pour être éliminé de l'organisme, les HAP passent par la bile et donc les fèces ou par les urines dans des proportions différentes. D'une manière générale, plus le HAP possède de cycles aromatiques, plus il est éliminé via les fèces tandis que les HAP les plus légers sont majoritairement éliminés via les urines.

Ainsi, le Nap est majoritairement éliminé via les urines. Chez le rat après une injection intrapéritonéale de Nap radioactif, 20% de la dose a été excrétée via les fèces et 68% via les urines [Kilanowicz 1999]. Le pyrène est également majoritairement éliminé dans les urines avec 57% de la dose éliminée dans les urines contre 18% dans les fèces [Bouchard 1998].

Contrairement aux deux précédents, le BaP est majoritairement éliminé via les fèces [Marie 2010]. En effet, selon la voie d'absorption, la quantité retrouvée dans les fèces est de 4 à 20 fois supérieure à celle retrouvée dans les urines [Foth 1988]. Après une injection IV de BaP radioactif, 50% de la radioactivité a été retrouvée dans les fèces contre 6% dans les urines [Moir 1998].

IV. Toxicité

Bien qu'une toxicité aigüe ait été observée à de forte dose notamment pour le BaP et le Nap, le risque majeur des HAP est dû à leur cancérogénicité lors d'exposition chronique [IARC 2002, IARC 2010]. Les effets sur la fertilité sont également une problématique majeure de santé publique.

IV.1. Mutagénèse - Cancérogénèse

Les métabolites réactifs des HAP peuvent former des adduits à l'ADN qui peuvent engendrer des erreurs lors de la réplication de l'ADN, altérer la méthylation des promoteurs et/ou leur liaison au brin d'ADN, causant ainsi, des mutations ou une modification de l'expression des gènes [Yang 2012]. De plus, ces métabolites réactifs peuvent se lier aux protéines et altérer l'activité de ces dernières. Enfin, le métabolisme des HAP induits une production de ROS pouvant réagir avec l'ADN, les lipides et les protéines [Moorthy 2015].

L'ensemble de ces effets toxiques génère un stress au niveau de la cellule pouvant aboutir à l'apoptose. Parfois, la bioactivation des HAP peut également engendrer un processus de cancérogénèse en trois étapes. Après l'initiation qui correspond à l'apparition de mutations suite aux dommages à l'ADN, la promotion des cellules mutées se fait en présence d'un agent promoteur. Les cellules filles vont accumuler d'autres mutations. Enfin, la phase de progression qui correspond au passage des lésions précancéreuses à une tumeur maligne est cliniquement détectable. Les HAP sont capables d'initier une cellule mais peuvent également induire la promotion [Rubin 2001].

La plupart des mutations se font au niveau de régions non codantes et n'ont aucune conséquence. Cependant, les mutations peuvent toucher des gènes impliqués dans la cancérogénèse codant pour des protéines telles que *p53* ou *Ras*.

La protéine *p53* appartient aux protéines suppresseurs de tumeurs. Elle intervient dans la régulation du cycle cellulaire, peut induire l'apoptose ou initier la réparation de l'ADN. Des mutations sont observée sur le gène codant pour la p53 (TP53) dans plus de 50% des tumeurs humaines [Olivier 2010]. *In vitro*, il a été montré sur des cellules humaines exposées au BaP une formation importante et sélective d'adduits ADN-BPDE au niveau des guanines des codons 157, 248 et 273 de TP53. Des mutations sur les mêmes codons ont été observées pour des cas de cancers pulmonaires dus à la consommation de tabac permettant d'établir le rôle du BaP dans l'étiologie du cancer [Denissenko 1996].

La production de ROS issus des cycles d'oxydo-réduction des quinones du BaP engendre également des transversions guanine-thymine au niveau du gène codant pour la protéine p53 de cellules de poumons humaines [Sen 2012, Penning 2014]. En revanche, l'induction de NQO1 via le stress oxydant issu de la voie de l'ortho-quinone a été observée après une exposition au Nap. NQO1 a un rôle d'antioxydant et permet aussi de stabiliser p53 [Elovaara 2007].

En plus d'un potentiel mutagène au niveau des gènes codants pour la *p53* et *Ras*, les ROS peuvent activer la protéine kinase C qui favorise la promotion de la tumeur [Penning 1999, Xue 2005].

IV.2. Fertilité

Les études animales ont permis de détecter des HAP et leurs métabolites dans les testicules, l'épididyme et les vésicules séminales. Le BaP et le benzo(b)fluoranthène induisent l'apoptose des cellules de Sertoli de rat et affectent ainsi le développement des spermatozoïdes [Raychoudhury 2003]. En plus des dommages à l'ADN, les HAP peuvent diminuer la qualité du sperme. AhR est également présent dans la tête des spermatozoïdes et interagit avec le système endocrine. Une liaison des HAP avec ce récepteur peut ainsi perturber la mobilité, la concentration et la morphologie des spermatozoïdes. Les ROS altèrent les lipides membranaires et diminuent la fluidité et la flexibilité de cette membrane. De plus les ROS inhibent l'activité

enzymatique comme celle du NADPH qui est en lien avec la production d'énergie et permet le mouvement des cellules [Jeng 2013].

Chez l'homme, la quantité d'adduits à l'ADN (mesurée avec la méthode du post-marquage de l'ADN au ^{32}P) est associée à une diminution de la qualité du sperme de manière non significative [Jeng 2015] ou significative [Horak 2003b, Horak 2003a, Hsu 2006]. Les concentrations urinaires de 1-OHP, de 2-Flu sont corrélées à la qualité du sperme [Hsu 2006, Xia 2009a, Xia 2009b]. Une autre étude a cependant démontré un lien entre les métabolites urinaires et les dommages à l'ADN dans les spermatozoïdes mais pas avec la qualité du sperme [Han 2011].

Les HAP ont également été mesurés dans le liquide folliculaire. Les concentrations de BaP sont plus élevées chez les femmes fumeuses que non fumeuses et chez les femmes où la fécondation *in vitro* n'a pas abouti. Le BaP apparait comme un composé ayant des effets sur le développement des follicules et la fertilité [Neal 2008].

IV.3. Effet cocktail

Les HAP sont émis en mélanges complexes de toxicité variable. Une exposition combinée aux HAP peut affecter le métabolisme de ces derniers et ainsi, modifier la quantité de métabolites réactifs avec l'ADN produits [Mahadevan 2007].

Les métabolites produits comme les quinones, qui peuvent être issus du métabolisme de HAP cancérogènes et non cancérogènes, sont capables d'induire des effets génotoxiques en modulant le métabolisme par un effet combiné du stress oxydant et d'une déplétion énergétique. En effet le cycle d'oxydo-réduction de la voie de l'ortho-quinone (voir III.3.2) consomme du NADPH cellulaire qui n'est ainsi plus disponible pour d'autres voies de métabolisation comme celle du glucose [Gurbani 2013].

L'induction des différents CYP par les HAP et leurs métabolites peuvent affecter le métabolisme et la bioactivation d'autres HAP et ainsi, moduler la toxicité et le potentiel cancérogène des différents HAP contenu dans les mélanges [Spink 2008]. Ainsi, le métabolisme du pyrène est induit par le pyrène lui-même (par l'induction de CYP1A2 via CAR) mais aussi par d'autres HAP tel que le BaP ou le benzo(k)fluoranthène [Hessel 2013]. De plus, la génotoxicité du BaP peut être modulée en cas d'exposition à des mélanges binaires avec d'autres HAP cancérogènes [Tarantini 2011].

Après une exposition à plusieurs HAP, la relation dose-effet apparait comme non linéaire avec l'observation d'effets additifs plus importants à de faibles doses qu'à de fortes doses. Ce paradoxe résulte probablement d'une compétition au niveau des enzymes de biotransformation suite à leur saturation qui engendre une diminution des quantités de métabolites réactifs produits [Jarvis 2014].

De plus, d'autres types de molécules organiques (autres que les HAP) contenues dans les mélanges émis peuvent modifier la génotoxicité des HAP [Jamin 2013, Libalova 2014]. A titre d'exemple, des effets synergiques ont été observés pour le PXR humain suite à l'exposition à des composés pharmaceutiques et environnementaux [Delfosse 2015]. Le PXR régule l'expression de gènes codants pour les enzymes de biotransformation (voir III.3.5.2).

Les effets combinés des HAP au niveau cellulaire sont encore mal définis. Des effets additifs ou antagonistes sont observés suite à l'exposition à des mélanges binaires ou complexes de HAP. La mesure des adduits à l'ADN est un mauvais marqueur pour évaluer les effets d'un mélange de HAP [Jarvis 2014]. Récemment, la mesure de l'activité enzymatique EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) est un marqueur qui reflète bien les effets génotoxiques après l'exposition à un mélange de HAP [Genies 2016].

IV.4. Classifications de certains HAP ou de certaines activités professionnelles exposantes à des HAP comme agents cancérogènes

En plus des cancers des poumons, de la peau et de la vessie qui sont reconnus comme pathologie professionnelle, d'autres cancers ont été rapportés en lien avec l'exposition aux HAP tels le cancer colorectal, pancréatique et de la prostate [IARC 2010].

Le CIRC évalue 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 :

- 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.

La classification du CIRC n'ayant aucune valeur réglementaire, l'union européenne a mis en place sa classification qui est issue du règlement Européen 1272/2008 CE [Cadou 2012].

- Catégorie 1A : agent dont le potentiel cancérogène est avéré pour l'homme (basé sur des données humaines)
- Catégorie 1B : agent devant être assimilé à des agents cancérogènes pour l'homme (basé sur des données animales)
- Catégorie 2 : agent suspecté d'être cancérogène pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles (preuves insuffisantes pour être classé dans les catégories supérieures).

Les HAP contenus dans la phase particulaire sont classés potentiellement cancérogènes par ces classifications alors que ceux de la phase gazeuse sont considérés comme non cancérogènes, excepté le Nap (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification du CIRC et de l'UE des HAP de la liste de l'US-EPA

HAP	CIRC	UE
Nap	2B	2
Acénaphtylène		
Acénaphtène	3	
Flu	3	
Phe	3	
Anthracène	3	
Fluoranthène	3	
Pyrène	3	
Benzo(a)anthracène	2B	1B
Chrysène	2B	1B
Benzo(b)fluoranthène	2B	1B
Benzo(k)fluoranthène	2B	1B
BaP	1	1B
Dibenzo(a,h)anthracène	2A	
Benzo(ghi)pérylène	3	
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	2B	

Devant l’importance de certains niveaux d’exposition aux HAP dans certains secteurs professionnels ou suite à l’utilisation de certaines matières premières, le CIRC et l’UE ont également procédé à leur évaluation en terme de cancérogénicité (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification du CIRC et de l'UE de mélanges ou de secteurs d'activités émettant des HAP.

Mélanges et secteurs d'activités	CIRC	UE
Emission diesel	1	2
Emission essence	2B	1B
Huile minérales et de schiste	1	1A
Goudron de houille	1	1A
Brai de houille	1	1B
Suies	1	
Créosotes	2A	1B
Cokerie	1	1A
Production d'aluminium	1	1A
Fonderies fer et acier	1	
Gazéification de charbon	1	
Fabrication d'électrode de carbone	2A	
Raffinage du pétrole	2A	
Bitumes	2B	

V. Surveillance de l'exposition

Les HAP sont ubiquitaires et l'ensemble des populations est exposé à des mélanges complexes d'HAP (voir II.2II.). Leur potentiel cancérogène (voir IV.1) engendre un risque sanitaire important qui doit être évalué. Cette évaluation permet d'identifier les facteurs qui augmentent les niveaux d'exposition tels que le descriptif précis des activités professionnelles et environnementales.

De plus, il est possible de définir des facteurs de susceptibilité, lesquels correspondent à des caractéristiques qui induisent à un excès de risque pour un individu ou une population ; Parmi eux se retrouvent l'âge, le genre, le polymorphisme génétique (voir III.3.6), l'état de santé, les statuts socioéconomiques et les expositions passées.

Selon l'USEPA, toute évaluation du risque se base sur le concept suivant :

Risque = Exposition x Danger [Araujo 2009].

En résumé, l'évaluation du risque se fait en quatre étapes :

- **L'identification et la caractérisation du danger** qui correspond à caractériser les effets toxiques des composés chimiques identifiés.
- **L'évaluation de la relation dose-réponse** qui permet d'établir de manière quantitative l'effet en fonction d'une dose donnée.
- **L'évaluation de l'exposition** qui a pour objectif de quantifier la dose elle-même dépendant de l'intensité, la durée, la fréquence et les voies d'exposition d'un toxique et des moyens de protection.
- **La caractérisation du risque** qui permet d'estimer la probabilité de survenue de l'effet en fonction des niveaux d'exposition mesurés.

L'évaluation de l'exposition fait ainsi partie intégrante du processus d'évaluation du risque. Pour cette évaluation de l'exposition des populations, il est possible de mesurer d'une part la dose externe et d'autre part la dose interne (Figure 24).

L'évaluation de la dose externe consiste à évaluer la quantité de HAP présente dans l'environnement (eau, aliments, air) et l'évaluation de l'exposition consiste à estimer la quantité de HAP présente dans l'environnement au plus proche de l'individu. Il s'agit essentiellement de mesures atmosphériques qui peuvent être réalisées en milieu professionnel ou environnemental. De plus, il est possible de mesurer la quantité de HAP qui se dépose sur la peau. Bien qu'il n'y ait pas encore de méthode standardisée, le patch cutané ou le lavage des mains sont utilisés [VanRooij 1993a, Vaananen 2005, Kammer 2011]. Lors de la comparaison des méthodes, des résultats différents sont observés qui peuvent être dus pour une part à la variabilité du site d'exposition. En effet, la quantité qui se dépose sur le poignet (site d'application des patchs cutanés) peut différer de celles des mains [Cavallari 2012]. De plus, la quantité absorbée estimée est biaisée par l'importance de la variabilité intra- et interindividuelle [VanRooij 1993b].

A côté de l'évaluation de la dose externe, la surveillance biologique de l'exposition (SBE), permet de mesurer la dose interne qui correspond à la quantité de HAP ayant pénétrée dans l'organisme. Elle permet de prendre en compte l'ensemble des sources d'exposition et toutes les voies d'absorption mais également l'efficacité des moyens de protection individuelle et les facteurs physiopathologiques de chaque individu. Elle est par conséquent plus proche du risque sanitaire que la métrologie atmosphérique [Lauwerys 2007].

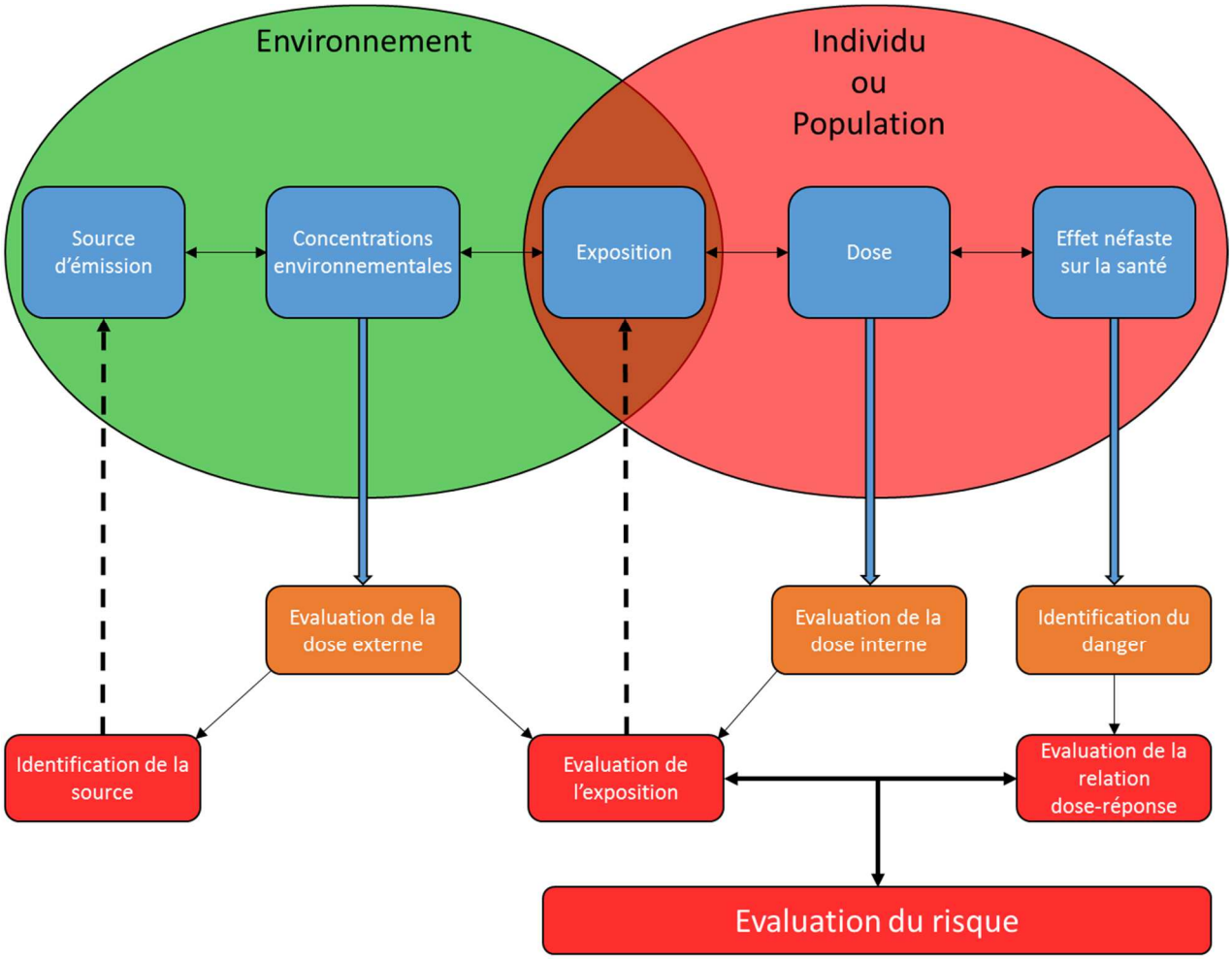


Figure 24 : Schéma synthétique du processus pour l'évaluation du risque.

V.1. Surveillance Atmosphérique

Contrairement aux mesures d'exposition cutanée, les mesures atmosphériques sont standardisées, notamment en France, où elles sont décrites dans les normes AFNOR. Celle correspondant au prélèvement et à l'analyse des HAP en milieu professionnel est la norme NF X 43-294 [AFNOR 1995]. Le dispositif est composé de deux supports montés en série, un filtre en fibres de quartz et une résine de type XAD2 piégeant respectivement les HAP particulaires et les HAP gazeux. Ils sont reliés à une pompe aspirant l'air à un débit constant de 1 L/min.

Après prélèvement, les HAP sont extraits des supports avec du dichlorométhane puis sont analysés soit en chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur fluorimétrique (HPLC-FLD) soit en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

Les prélèvements peuvent être de deux types, un dispositif de prélèvement d'air pouvant être placé à côté d'une source d'émission (prélèvement d'ambiance) ou directement placé sur un salarié (prélèvement individuel). Seuls les niveaux mesurés au niveau individuel peuvent être comparés aux valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP).

L'avantage des prélèvements atmosphériques est la caractérisation des sources et des pics d'exposition. En plus de mesurer la quantité de chacun des HAP, il est possible de déterminer leurs abondances relatives, de calculer des ratios HAP gazeux/HAP particulaires et les ratios diagnostiques (ratio de deux HAP pour tenter de caractériser une source d'émission). Toutefois, ces ratios diagnostiques doivent être utilisés avec précaution car il est souvent difficile de différencier les différentes sources d'émission. De plus, ils peuvent être altérés par des différences de stabilité ou de réactivité, comme par exemple avec certains composés de l'atmosphère tels que l'ozone ou les oxydes d'azote [Ravindra 2008, Katsoyiannis 2011].

Les analyses en composante principale (ACP) restent le moyen le plus ancien et le plus utilisé pour la caractérisation de sources. Dans le cas des HAP, il est conseillé de faire des ACP différentes, une sur la phase gazeuse et une sur la phase particulaire [Ravindra 2008].

Les mélanges et les concentrations de HAP émis en milieu industriel vont dépendre à la fois du nombre et de la proximité de sources d'émission, du type d'activité (fonction de la matière première utilisée et du procédé de fabrication) et de l'existence ou non de moyens d'aspiration ou de filtration. Les mesures atmosphériques sont ainsi utilisées en hygiène industrielle pour caractériser les émissions et procéder, le cas échéant aux améliorations techniques requises. Pour cela, il existe des valeurs de référence : une VLEP -8heures de 50mg/m3 a été définie pour

le Nap et la Caisse Nationale d'Assurance Maladie a publié une VLEP - 8 heures indicative de 150 ng/m3 pour le BaP. Ces VLEP sont en cours d'évaluation par le Comité d'Expert Spécialisé sur les VLEP de l'ANSES.

La surveillance atmosphérique en milieu professionnel permet donc d'identifier et de caractériser les sources d'émission des HAP. Cependant, elle ne prend pas en compte l'efficacité des équipements de protection individuelle (EPI) tels que les masques et ne permet d'évaluer que la dose absorbée par voie respiratoire.

V.2. Surveillance Biologique

Les avancées techniques en chimie analytique et l'importante prise de conscience des incertitudes liées à l'évaluation de l'exposition via l'estimation de la dose externe, ont conduit à une utilisation préférentielle de la SBE pour évaluer les expositions humaines aux différents polluants [Hays 2007]. Les composés chimiques ou leurs métabolites peuvent être analysés dans différentes matrices biologiques comme le sang, les urines, les cheveux, le lait, le liquide séminal ou d'autres échantillons biologiques. Cette approche présente l'avantage de prendre en compte l'efficacité des EPI mais aussi toutes les sources d'exposition et toutes les voies d'absorption. La SBE permet également d'intégrer les différences inter-individuelles au niveau de l'absorption et du métabolisme des substances. Cette approche est de plus en plus utilisée par les médecins du travail et une recommandation vient d'être publiée sous l'égide de la Société Française de Médecine du Travail pour les aider dans sa mise en œuvre [SFMT 2016].

V.2.1. Les biomarqueurs

Les indicateurs biologiques utilisés pour la SBE sont appelés biomarqueurs. En écotoxicologie, la définition d'un biomarqueur est la suivante [Lagadic 1998] :

« Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. »

Cette définition s'applique très bien dans le cadre de la SBE humaine et est proche de la définition donnée par le Conseil National de Recherche Américain. Selon ce Conseil, le but de ces biomarqueurs est d'étudier la relation entre l'exposition à un xénobiotique et les effets de celui-ci sur la santé [Council 1987]. En fonction du temps de résidence dans l'organisme d'un biomarqueur, ce dernier est capable de tracer des expositions passées depuis plus ou moins longtemps. C'est ainsi qu'un biomarqueur de court terme persiste dans l'organisme de quelques heures à 1 jour. Un biomarqueur de terme intermédiaire persiste quant à lui dans l'organisme de plusieurs jours. Et un biomarqueur de long terme a une durée de persistance dans l'organisme de l'ordre de grandeur du mois [Lin 2005].

Indépendamment de leur temps de résidence, il existe trois types de biomarqueurs (Figure 25) :

- **Les biomarqueurs d'exposition** sont des indicateurs qui permettent d'identifier un xénobiotique ayant pénétré dans l'organisme. Les biomarqueurs d'exposition peuvent être séparés en deux sous-groupes. D'une part, il y a les mesures du xénobiotique ou de ses métabolites dans une matrice biologique permettant d'estimer la dose interne. D'autre part il y a les adduits à l'ADN ou aux protéines qui estiment la dose efficace, c'est-à-dire celle ayant un effet toxique au niveau du site d'action.
- **Les biomarqueurs d'effet** sont des indicateurs qui, suite à une exposition, permettent de mesurer un effet ou une réponse de l'organisme. Ces biomarqueurs ne sont pas

spécifiques d'un seul composé chimique. Par exemple, la 8-oxo-dGuo urinaire est utilisée comme un biomarqueur du stress oxydant.

- **Les biomarqueurs de susceptibilité** sont des indicateurs qui permettent de mettre en évidence les différences de réponses biologiques entre les individus ou les populations, et ce, indépendamment de l'intensité de l'exposition.

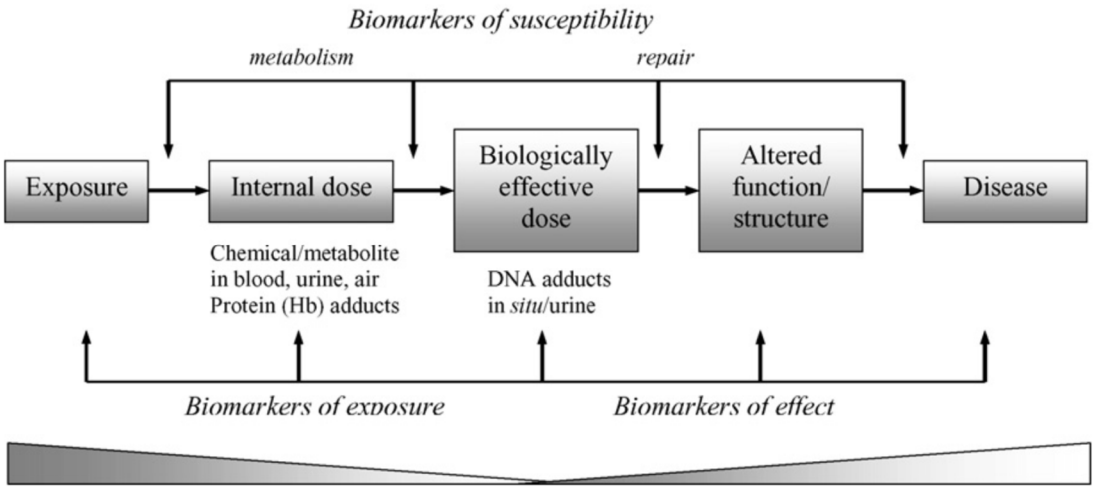


Figure 25 : Suite des événements entre l'exposition et la maladie en lien avec l'utilisation de différents types de biomarqueurs, dans le cadre de l'évaluation des risques d'après [Manini 2007].

En milieu professionnel, l'employeur a le devoir de protéger la santé de ses salariés. Les salariés ou les candidats lors d'un recrutement, ont quant à eux un droit de protection de leurs données personnelles. Ainsi, le génotypage des salariés d'une entreprise n'est éthiquement et juridiquement pas acceptable. [The European Group on Ethics in Science and New Technologies 2003] et seuls les biomarqueurs d'exposition (dose interne surtout) et les biomarqueurs d'effet sont couramment utilisés en milieu professionnel, [Jakubowski 2005].

Le but premier de la SBE est de pouvoir évaluer l'exposition à partir des biomarqueurs. Idéalement, les concentrations de ces derniers varient en fonction de l'intensité de l'exposition et de manière importante même pour de faibles expositions [Manini 2007]. Cependant et à côté de l'intensité de l'exposition, il existe de nombreux facteurs qui influencent les variations de

concentrations des biomarqueurs [Aylward 2014]. Cette variabilité peut s'illustrer par l'étude de la relation qui existe entre les concentrations atmosphériques d'un polluant et les concentrations de ce même polluant, ou de ses métabolites dans les milieux biologiques d'une population (Figure 26). Ainsi, à partir d'une même concentration atmosphérique, différentes concentrations sanguines ou urinaires peuvent être mesurées au sein de la population. Par exemple, le coefficient de variation des quantités de 1-OHP excrétées dans les urines de volontaires ayant ingéré une même quantité de pyrène était compris entre 50 et 76% [Viau 2002b].

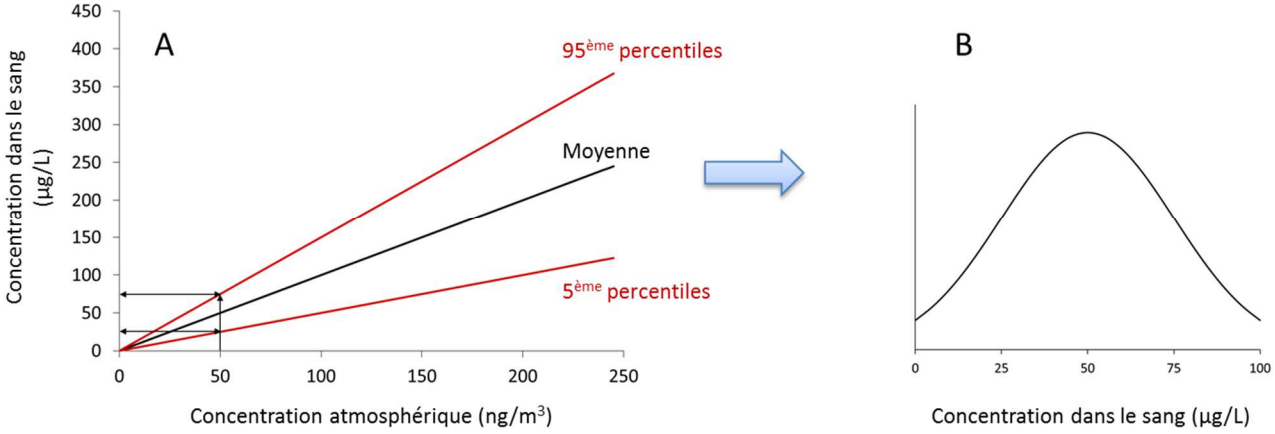


Figure 26 : Relation entre les concentrations atmosphériques et sanguines au sein d'une population (A) et la distribution des concentrations sanguines pour une concentration atmosphérique de 50 ng/m³ (B) (adaptée de [Hays 2007])

V.2.2. Les sources de variabilité des concentrations des biomarqueurs

Les concentrations d'un biomarqueur peuvent varier entre les individus (variabilité interindividuelle) et au sein d'un même individu (variabilité intra-individuelle) en fonction du temps. Lorsqu'une population est étudiée, les deux types de variabilités (inter- et intra-) sont reflétés. Les sources de variabilité des concentrations des biomarqueurs peuvent être catégorisées en trois parties : La variabilité des conditions d'exposition, la variabilité analytique et la variabilité biologique (Figure 27).

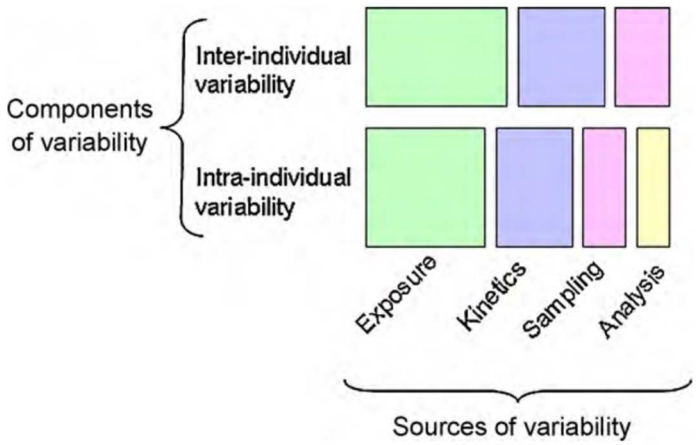


Figure 27 : Sources de la variabilité des concentrations des biomarqueurs (d'après [Spaan 2010]).

V.2.2.1. La variabilité des conditions d'exposition

Les conditions d'exposition varient selon différentes dimensions qui sont l'individu, l'espace et le temps [Loomis 2004]. Ainsi, la variabilité des conditions d'exposition influence la variabilité inter- et intra-individuelle. En plus des conditions environnementales comme le taux d'humidité, la température, la luminosité, d'autres sources de variation peuvent être ajoutés au sein de cette catégorie. La quantité absorbée via les différentes voies d'absorption peut varier d'un individu à l'autre en fonction du secteur professionnel, de son poste ou de ses activités, mais également d'un jour à l'autre pour un même individu. La fréquence et la durée des expositions sont également variables. En effet, sur une même journée, il est possible d'être exposé à une même quantité de polluant mais à des fréquences variées (une seule exposition contre une multitude de petites expositions cumulées).

V.2.2.2. La variabilité analytique

Par le passé, la variabilité des analyses était semblable à la variabilité biologique du fait d'une faible précision des analyses. Pour éviter une mauvaise interprétation des résultats biologiques, une méthode analytique doit être reproductible et suffisamment précise. Dans le but de limiter cette variabilité analytique, des procédures de qualité permettant de vérifier les performances des méthodes de dosages ont été mises en place. Le contrôle de qualité des analyses rendues,

se fait une première fois au moment du développement de la méthode analytique au sein du laboratoire, mais également est répétée au cours du temps afin de pouvoir détecter d'éventuelles dérives qui nuisent à la qualité des résultats.

En France, les analyses de biologie médicale sont soumises à la norme NF EN ISO 15189 [AFNOR 2012]. Son importance n'est pas des moindres puisque la loi du 30 mai 2013 ratifiant l'ordonnance du 13 janvier 2010 spécifie expressément qu'aucun laboratoire de biologie médicale non accrédité au sens de l'article L 6221-1 du Code de la Santé Publique ne peut fonctionner après le 1er novembre 2013 sans avoir justifié son entrée effective dans une démarche d'accréditation [Reifenberg 2014]. Cette norme régie l'ensemble du fonctionnement d'un laboratoire de biologie médicale et encadre toutes les étapes de gestion des échantillons du laboratoire en passant par le management et le compte rendu des résultats tout en intégrant des procédures pré-analytiques et analytiques [Long 2013].

En ce qui concerne la validation des méthodes analytiques il existe des paramètres de validation initiale. Après cette validation initiale, une procédure continue de vérification des bonnes performances de la méthode est effectuée au cours du temps, par le biais des contrôles de qualité interne (CQI). Ces CQI sont des solutions commerciales de référence, qui permettent de suivre la précision de la méthode, à l'aide de réplicats indépendants d'analyses. S'il n'existe pas de CQI dans le commerce, le laboratoire peut les produire lui-même [Manini 2007]. Les CQI permettent ainsi de vérifier la bonne reproductibilité des analyses.

La reproductibilité se divise en deux parties :

- **La répétabilité** qui correspond à l'injection répétée d'un même échantillon au cours d'une même série d'analyse. Cela sous-entend que l'opérateur, le lot de réactif, l'instrument et l'étalonnage soient identiques.

- **La fidélité intermédiaire** qui correspond à l'injection répétée d'un même échantillon pour des séries d'analyses différentes. Ici l'opérateur, le lot de réactif, l'instrument et / ou l'étalonnage peuvent différer.

A côté des contrôles internes de qualité et lorsqu'elles existent, les laboratoires peuvent aussi participer à des évaluations externes de la qualité (EEQ). Les EEQ sont des campagnes auxquelles les laboratoires participent pour tester la performance de leurs méthodes d'analyses. Elles consistent à analyser un échantillon standard de concentration inconnue (par le laboratoire participant) et de rendre un résultat à l'organisme organisateur. Ce résultat permet alors d'évaluer la justesse de la méthode et d'assurer la comparabilité des résultats issus des autres laboratoires ayant participé.

En plus des avancées techniques, la mise en place de ces procédures de contrôle qualité a permis d'améliorer significativement la précision des mesures. Ces progrès ont ainsi conduit à faire diminuer la variabilité des analyses, laquelle est aujourd'hui inférieure à la variabilité biologique [Jakubowski 2005].

Pour les HAP, il existe des CQI et des EEQ pour les dosages urinaires du 1-OHP et des métabolites monohydroxylés du Nap.

V.2.2.3. La variabilité biologique

Alors que la variabilité analytique peut être contrôlée par les procédures de contrôle de qualité, les différences inter-individuelles en termes d'absorption, de biotransformation, de mécanisme d'action, de susceptibilité de dommage et de capacité de réparation peuvent aboutir à des relations dose-réponse différentes selon les individus. En outre et pour ces mêmes variables, il existe également des différences intra-individuelles.

Les facteurs influençant la variabilité biologique peuvent être divisés en trois catégories : Les variations dues au moment de prélèvement par rapport à l'exposition, les variations dues aux

caractéristiques physiologiques de la matrice biologique utilisée (sang, urine…) et les variations dues aux différences de toxicocinétique du xénobiotique.

V.2.2.3.1. Moment de prélèvement

Dans le cadre de la SBE, les prélèvements sont réalisés à un moment spécifique. C'est la concentration du prélèvement collecté à un instant t, qui va servir à évaluer l'exposition de l'individu. Il est nécessaire de prendre en considération les variations temporelles des concentrations en biomarqueurs dans la matrice qui sont dues à la toxicocinétique du polluant (absorption, distribution, métabolisation et élimination).

La Figure 28 représente la cinétique d'élimination urinaire d'un biomarqueur. Après l'exposition, deux prélèvements sont réalisés à des moments différents (prélèvement A et prélèvement B). Les interprétations quant à l'exposition seront complètement différentes en fonction du moment de prélèvement. En effet, la concentration du prélèvement A correspond au maximum d'excrétion et permettra de conclure à une exposition significative par rapport au niveau de base. La concentration du prélèvement B est quant à lui similaire à ce même niveau de base et ne permettra donc pas de conclure de manière pertinente en ce qui concerne la dernière exposition. Cette différence illustre parfaitement la nécessité de connaître avec précision le moment de la dernière exposition et la toxicocinétique du polluant d'intérêt.

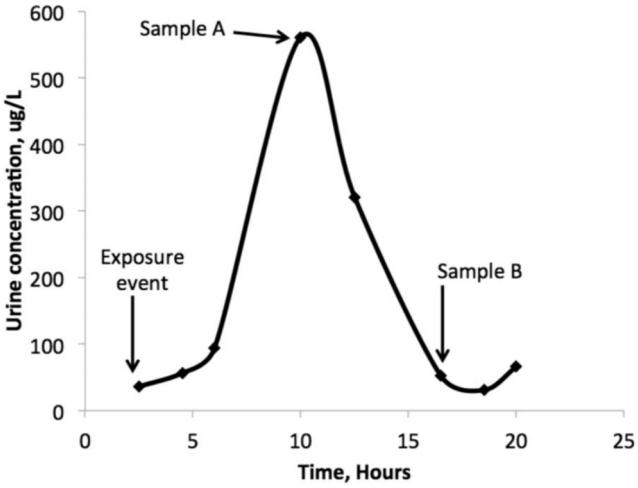


Figure 28 : Concentration urinaire d'un biomarqueur en fonction du temps après une seule exposition (exposure event). Sample A et Sample B correspondent à deux prélèvements urinaires réalisés à des temps différents (d'après [Aylward 2014]).

En milieu professionnel, les expositions sont plus ou moins caractérisées (activités polluantes, fréquence de l'exposition, durée de l'exposition et évaluation de la dose externe). Ainsi, en ayant une approximation du moment de la dernière exposition il est possible de déterminer les moments de prélèvement. Toutefois, d'un point de vue pragmatique, il est important de prendre en considération les contraintes de terrain lors de l'élaboration des campagnes de prélèvements. En général, pour les biomarqueurs de court terme, les prélèvements sont effectués en début ou/et en fin de poste car ce sont les prélèvements les plus faciles à être collectés par les Services de Santé au Travail [SFMT 2016].

Pour la SBE environnementale, il est plus difficile de connaître le moment de la dernière exposition. La détermination du moment optimal de prélèvement est par conséquent plus difficile à définir.

En plus du délai qui sépare le pic d'excrétion de la dernière exposition, il est nécessaire de connaître la fréquence de l'exposition et le temps de demi-vie (Figure 29). Ce dernier correspond au temps nécessaire pour que la concentration initiale soit divisée par 2. Dans les

urines, cette concentration initiale utilisée pour le calcul de la demi-vie d'élimination urinaire correspond à la concentration maximale observée au moment du pic d'excrétion.

La relation entre la dernière exposition et le temps de demi-vie d'élimination, influence la variabilité inter- et intra-individuelle [Aylward 2012]. Lorsque la demi-vie d'élimination est inférieure à la moitié de l'intervalle de temps, la variabilité des concentrations prédites à partir de prélèvements effectués de manière aléatoire dans le temps, est davantage due à la cinétique d'élimination qu'à l'intensité de l'exposition (dose absorbée) [Aylward 2014].

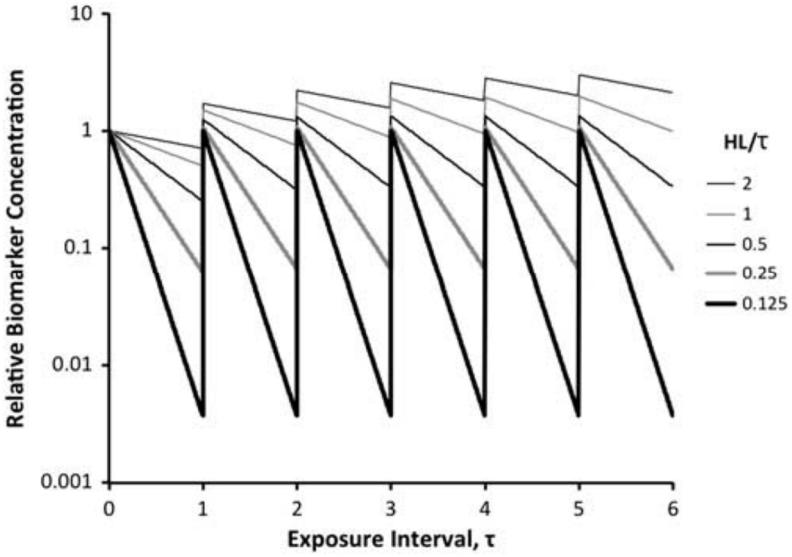


Figure 29 : Simulation de la concentration d'un biomarqueur en fonction du temps pour des expositions répétées à des intervalles de temps réguliers (τ) pour des ratios demi-vie/τ (HL/ τ) différents (d'après [Aylward 2012]).

En milieu professionnel, il est possible d'anticiper ce type de variabilité. L'intervalle de temps entre les expositions est connu et correspond à peu près à l'intervalle entre 2 périodes de travail. Si les expositions sont constantes, la connaissance des demi-vies d'excrétion urinaire permet de prédire le comportement des niveaux urinaires au cours de la semaine de travail (accumulation, constant, erratique). Par exemple, dans la Figure 29, un ratio HL/ τ de 2 pourrait illustrer une tendance à l'accumulation. La connaissance de cette demi-vie, en lien avec les expositions précédentes, permet d'affiner de manière non négligeable les stratégies mises en

place lors des campagnes de prélèvements. Si les concentrations s'accumulent tout au long de la semaine, le prélèvement sera alors réalisé en fin de poste du dernier jour de travail.

Au niveau de la SBE environnementale, la variabilité liée à la demi-vie par rapport à l'intervalle de temps entre les expositions est difficilement contrôlable, surtout pour les biomarqueurs ayant une demi-vie courte. Dans ce cas, un seul prélèvement n'est donc pas suffisant pour évaluer l'exposition puisque trop soumis à la variabilité intra-individuelle liée à la cinétique d'élimination. Pour plus de précisions, il est donc nécessaire d'effectuer plusieurs mesures sur une plus longue période [Aylward 2014].

V.2.2.3.2. Matrice biologique

Différentes matrices biologiques sont utilisées pour effectuer des études de SBE. Les matrices retenues pour la SBE des populations générales sont le sang et l'urine [Health Canada 2015, NHANES 2015].

Le sang a l'avantage d'être en contact avec tous les tissus. De ce fait, il permet d'estimer au mieux la concentration des polluants au niveau des organes cibles [Aylward 2014]. En revanche, les prélèvements de sang ont le désavantage d'être invasifs et donc plus difficile à obtenir de la part des participants, surtout lorsque des mesures répétées sont requises.

L'urine est quant à elle un prélèvement non invasif et donc facile à obtenir. Elle est la matrice biologique la plus utilisée pour la SBE aux polluants chimiques surtout en ce qui concerne les substances ayant de courtes demi-vies [Smolders 2009].

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ne font état que de prélèvements urinaires. Par conséquent, seule la variabilité des concentrations des biomarqueurs urinaires sera ici présentée.

Le débit urinaire (aussi appelé diurèse) peut faire varier les concentrations des biomarqueurs. Il correspond au volume d'urine produit par unité de temps et varie en fonction du statut d'hydratation de chaque individu mais aussi, au sein d'un même individu. En effet, le débit urinaire varie de manière importante selon les jours mais aussi au sein d'une même journée [Aylward 2014]. De plus, il varie en fonction de l'âge et du sexe de l'individu [van Haarst 2004]. Ainsi, la diurèse affecte à la fois la variabilité inter- et intra-individuelle.

Outre le débit urinaire, les concentrations urinaires d'un biomarqueur peuvent varier en fonction du temps qui existe entre le prélèvement et le moment de la dernière miction. En effet, la vessie joue le rôle de réservoir et de ce fait moyenne le taux d'excrétion du biomarqueur dans les urines. La concentration observée dans une miction correspondra donc à la moyenne du taux d'excrétion du rein sur la période de temps entre les deux dernières mictions [Aylward 2014].

Par ailleurs, d'autres paramètres peuvent influencer la concentration urinaire des biomarqueurs comme certaines caractéristiques physiques telles que l'indice de masse corporelle (IMC), lequel est négativement corrélé au débit urinaire.

Enfin, la stratégie de prélèvement peut également avoir un impact sur les concentrations urinaires d'un biomarqueur. Par exemple, le débit urinaire de la première urine du matin est particulier et diffère de ceux du reste de la journée.

Idéalement, il est souhaitable que la récupération des urines se fasse sur 24h surtout pour les biomarqueurs ayant un temps de demi-vie court. D'un point de vue logistique de terrain, cette stratégie est difficilement réalisable, c'est pourquoi la première urine du matin est souvent préférée dans les études. Ce prélèvement a en plus deux avantages, il est très concentré et représente une fenêtre d'accumulation plus large (généralement supérieur à 8h). Cependant, il n'est pas toujours adapté selon la cinétique d'élimination urinaire [Barr 2005] et n'est pas adapté à une surveillance de routine en milieu professionnel.

Pour le cas des HAP, il a été montré que la récupération des urines sur 24h était le mode de prélèvement à privilégier puisqu'il présentait le moins de variabilité intra-individuelle due à la diurèse. Si une telle stratégie n'est réalisable que dans le cadre d'une étude spécifique, il est en général conseillé de collecter les premières urines du matin ou celles de début et de fin de poste par rapport à un échantillonnage aléatoire. Le but étant de limiter au maximum la variabilité intra-individuelle, et ainsi diminuer le nombre de mesure à effectuer [Li 2010b].

Pour pallier cette variabilité des concentrations due à la fluctuation du débit urinaire, les concentrations mesurées dans les urines sont corrigées. Pour ajuster les concentrations urinaires en fonction de cette diurèse, il faut adapter les modes de correction en fonction des mécanismes d'excrétion rénale du biomarqueur. L'ajustement des concentrations urinaires en fonction de la diurèse peut se faire avec la créatinine urinaire ou la densité urinaire spécifique (SG) [Smolders 2009]. La correction de la diurèse pour l'évaluation de l'exposition reste aujourd'hui un challenge [Weaver 2016].

a. Différents mécanismes d'excrétion des xénobiotiques

Les xénobiotiques sont éliminés dans les urines via trois mécanismes d'excrétion rénale qui sont : la filtration, la sécrétion active et la diffusion passive [Boeniger 1993].

La filtration correspond au passage des petits solutés contenus dans le plasma vers la capsule de Bowman en traversant la membrane glomérulaire, grâce à l'augmentation de la pression oncotique au niveau du glomérule. Certains composés ne peuvent pas être filtrés par le glomérule car la membrane de ce dernier est chargé négativement.

Pour être éliminés les composés qui ne sont pas filtrés au niveau du glomérule sont éliminés par une sécrétion active qui se fait au niveau du tube proximal. Elle consiste à transporter activement (contre un gradient électrochimique) des molécules contenues dans le plasma à l'intérieur des cellules du tube proximal qui ensuite les secréteront dans la lumière du tube

proximal. Ainsi, les composés organiques glucurono- ou sulfo-conjugués sont généralement éliminés par sécrétion active. Les taux d'élimination des xénobiotiques excrétés par sécrétion active sont indépendants du débit urinaire. En revanche, la concentration urinaire mesurée varie de manière inversement-proportionnelle au volume d'urine. Ainsi, le débit urinaire n'influence pas la masse excrétée du biomarqueur en fonction du temps mais sa concentration (Figure 30).

Les molécules capables de passer à travers les membranes biologiques sont éliminées par diffusion passive. En fonction du gradient de concentration, ces composés peuvent passer dans la lumière du tube ou être réabsorbés. La vitesse d'excrétion des biomarqueurs éliminés par diffusion passive est directement liée à la diurèse, et ainsi, de la quantité de fluide qui passe du rein à la vessie. A titre d'exemple, les solvants tels que l'acétone ou le méthanol sont éliminés par diffusion passive.

Les mécanismes d'excrétion rénale sont différents selon les biomarqueurs. L'influence du débit urinaire sur les concentrations mesurées est directement liée à ces mécanismes (Figure 30). La diurèse étant une composante importante de la variabilité des concentrations urinaires mesurées, il est nécessaire de la prendre en compte. Cette dernière doit être corrigée de manière adaptée, en fonction des mécanismes d'élimination. Seules les concentrations de composés excrétés par diffusion passive n'ont pas besoin d'être ajustée car leurs concentrations varient indépendamment de la diurèse.

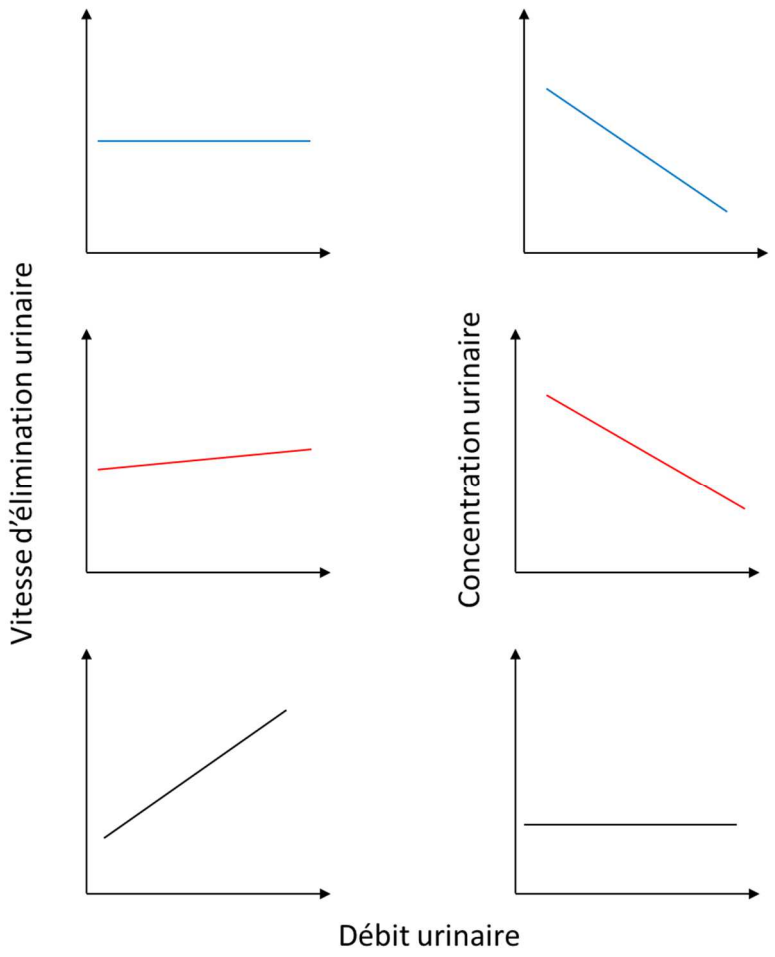


Figure 30 : Relation entre la vitesse d'élimination ou la concentration urinaire des métabolites et le débit urinaire. En bleu : Un métabolite excrété par filtration glomérulaire ; En rouge : Un métabolite excrété par sécrétion active ; En noir : Un métabolite excrété par diffusion passive.
(Adaptée de [Boeniger 1993]).

b. La créatinine

La créatinine est un composé endogène issu de la dégradation de la créatine. Elle est éliminée de manière relativement constante dans les urines. C'est pour cela qu'elle est utilisée pour prendre en compte la diurèse dans l'interprétation des concentrations urinaires des biomarqueurs. Les concentrations du biomarqueur sont divisées par les concentrations urinaires de créatinine et sont donc exprimées en mol/mol de créatinine.

Différents facteurs influencent l'excrétion de la créatinine comme la consommation de viande rouge ou un entrainement physique constant qui peuvent engendrer une augmentation des

concentrations urinaires excrétés. En revanche une activité physique intense peut les réduire. L'excrétion de la créatinine suit également un cycle circadien avec une élimination plus importante le matin que l'après-midi [Truchon 2014].

Les mécanismes rénaux d'excrétion de la créatine sont majoritairement la filtration glomérulaire (~80%) et la sécrétion active mais la proportion excrétée par sécrétion active peut être très variable selon les individus [Heavner 2006].

Dans le cadre de la SBE en milieu professionnel (SBEP), l'Organisation Mondial de la Santé (OMS) a défini des valeurs de créatinine pour déterminer la validité des échantillons récoltés. Ainsi, les échantillons ayant une créatinine qui est supérieure à 3 g/L sont écartés car cette valeur indique un état de déshydratation qui peut perturber les mécanismes d'excrétion rénale et engendrer une réabsorption du biomarqueur. La concentration mesurée ne reflète donc pas l'exposition. A l'inverse, les échantillons ayant une créatinine inférieure à 0,3 g/L sont considérés comme trop dilués. Une urine trop diluée peut abaisser les concentrations du biomarqueur en dessous de la LQ et gêner l'interprétation quant à l'exposition de l'individu [WHO 1996]. Cependant, la sensibilité des méthodes analytiques permet de détecter des concentrations de 1-OHP pour des urines diluées ayant une créatinine inférieure à 0,3 g/L [Viau 2004]. Toutefois, le lien avec l'exposition n'a pas été vérifié pour ces échantillons.

c. La densité urinaire spécifique

La SG peut être définie comme « le rapport du poids d'un volume donné d'urine sur le poids d'un même volume d'eau pure, pour une même température » [Truchon 2014]. Comme la SG augmente avec la concentration de solutés dissous contenu dans l'urine, cette dernière a été proposée pour prendre en compte la diurèse selon l'équation suivante [Levine 1945] :

$$C_{SG}(mol/L) = \frac{C \times (SG_{ref} - 1)}{(SG - 1)}$$

où C est la concentration urinaire non corrigée du biomarqueur (mol/L), SG la densité spécifique urinaire du même échantillon et SG_{ref} la densité spécifique de référence.

Le choix de la densité spécifique de référence est comprise entre 1,016 et 1,024 [Levine 1945, Lee 1996, Heavner 2006]. La valeur de référence de 1,020 est utilisée dans plusieurs études [Goldberger 1995, Vij 1998] mais il a récemment été recommandé d'utiliser la moyenne des SG des échantillons de la population suivie [Truchon 2014].

Comme pour la créatinine, des valeurs ont été définies pour éviter l'interprétation de concentrations de biomarqueur mesurées dans des urines trop diluées ou trop concentrées. Seuls les échantillons ayant une SG comprise entre 1,010 et 1,030 peuvent être interprétés [WHO 1996].

La justesse de la correction par la SG peut varier en fonction de la taille ou la masse moléculaire des solutés présents (protéine ou glucose). Ainsi la mesure de la SG peut être perturbée en cas de pathologie au niveau du rein ou de diabète sucré [Truchon 2014].

d. Quel mode de correction pour les HAP ?

Le mode de correction dépend des mécanismes rénaux d'excrétion. En effet, la correction à la créatinine est recommandée uniquement pour les composés suivant les mêmes mécanismes d'excrétion que la créatinine, soit une élimination effectuée majoritairement par filtration glomérulaire sans réabsorption [Boeniger 1993]. Pour les composés éliminés essentiellement par sécrétion active ou ceux qui sont réabsorbés la correction à la SG est recommandée [Truchon 2014]. Lorsque les mécanismes d'excrétion sont inconnus, il a récemment été recommandé de privilégier la SG car elle est moins coûteuse et moins influencée par les caractéristiques des individus [Sauvé 2015].

En effet, la SG est moins influencée par l'âge, le sexe, l'ethnicité et la masse musculaire que la créatinine et ainsi, impacte moins la variabilité interindividuelle. Les moyens de correction

influencent aussi la variabilité intra-individuelle. Des études portant sur l'excrétion de la créatinine sur une période de 24h ont estimé un coefficient de variation intra-individuelle compris entre 5 et 24% et un coefficient de variation interindividuelle compris entre 3 et 30% [Truchon 2014].

Les métabolites urinaires des HAP ont un certain profil d'excrétion au cours de la journée en cas d'expositions environnementales. C'est ainsi que les concentrations les plus élevées sont retrouvées en début et fin de journée par rapport aux concentrations de milieu de journée. Or, les moyens de correction des concentrations urinaires par rapport à la diurèse permettent d'effacer ou de réduire ce profil d'excrétion. Ceci indique que les fluctuations observées avant ajustement des concentrations sont majoritairement dues aux fluctuations de la diurèse [Li 2010b].

Pour les biomarqueurs urinaires d'exposition aux HAP, la créatinine est classiquement utilisée pour les métabolites urinaires et la SG n'a jamais été utilisée. La créatinine s'est révélée pertinente pour la normalisation des concentrations urinaires du 1-OHP [Viau 2004]. De plus, l'utilisation de la créatinine urinaire comme variable indépendante est systématiquement significative pour les métabolites monohydroxylés des HAP gazeux [Sobus 2009a, Sobus 2009b, Sobus 2010, Smith 2012, Rodrigues 2014]. Par ailleurs, les concentrations des HAP gazeux urinaires (non métabolisés) sont également influencées par la créatinine alors qu'ils sont éliminés par diffusion passive. Ainsi, les concentrations urinaires de Nap et de Phe ne devraient pas être dépendantes du débit urinaire [Sobus 2009b].

V.2.2.3.3. Variabilité des paramètres toxicocinétiques

Toutes les étapes faisant partie de la toxicocinétique, à savoir l'absorption, la distribution, la métabolisation puis l'élimination influencent les concentrations d'un biomarqueur. Celles-ci sont soumises à des variations entre les différents individus du fait des paramètres physiologiques de chacun. Par exemple, le polymorphisme génétique affecte le métabolisme et

certaines caractéristiques telles l'âge, le poids, et la masse graisseuse font varier considérablement le volume de distribution entre les différents individus. Les mécanismes d'excrétion au niveau des reins ont également une efficacité variable en fonction des individus [Aylward 2014].

D'autres facteurs influencent la toxicocinétique :

- L'induction des enzymes de biotransformation (voir III.3.5) suite aux expositions précédentes ou à l'exposition aux mélanges (voir IV.3) peuvent modifier le métabolisme.
- Les différents aliments ingérés par l'individu peuvent également moduler le métabolisme et notamment celui des HAP ingérés, en altérant les niveaux d'enzymes de phase II [Ramesh 2004].
- Les différentes voies d'absorption peuvent elles aussi affecter les demi-vies d'élimination urinaire [Payan 2008].

Ces paramètres impactent directement les demi-vies d'élimination urinaire, lesquelles peuvent alors varier d'un individu à l'autre mais également au sein d'un même individu. Or, il a été montré l'importance des paramètres toxicocinétiques pour élaborer des stratégies de prélèvements (voir V.2.2.3.1). Par conséquent et pour pouvoir réaliser une évaluation pertinente de l'exposition, il est absolument nécessaire d'étudier au préalable la variabilité des demi-vies d'élimination du biomarqueur utilisé. En fonction de la stratégie adoptée pour l'étude, il est possible que la variabilité intra-individuelle des demi-vies soit négligeable par rapport à la variabilité inter-individuelle [Spaan 2010].

V.2.3. Etudier la variabilité inter- et intra-individuelle

Pour interpréter les niveaux de concentration des biomarqueurs et pouvoir relier une exposition à un effet sur la santé, il est indispensable de prendre en compte les différentes sources de

variabilités détaillées ci-dessus. Cependant, il est difficile de quantifier l'effet de ces sources sans mesurer dans le temps les concentrations d'un biomarqueur. Les études longitudinales qui correspondent à répéter des mesures chez un même individu, permettent de différencier la variabilité inter- de la variabilité intra-individuelle. Dans le cadre de la SBE, l'estimation respective de ces deux composantes de la variance, informe de l'importance des différents éléments pouvant impacter la variabilité des concentrations (comme la toxicocinétique) [Sobus 2011].

La Figure 31 illustre comment les composantes de la variance jouent un rôle dans la qualité d'interprétation des concentrations d'un biomarqueur. Chaque exemple représente une régression de la dose estimée à partir de concentrations issues de stratégies de prélèvement différentes. L'exemple 1 correspond à des prélèvements réalisés de manière aléatoire. L'exemple 2 correspond à des prélèvements réalisés à un moment précis de la journée (identique pour tous les individus). L'exemple 3 correspond à la moyenne de 3 échantillons aléatoire. Lorsque la variabilité provient essentiellement de la variabilité interindividuelle, la stratégie de prélèvement a peu d'impact (pentes de la droite de régression et R^2 similaires pour les 3 exemples). Ainsi la dose peut être estimée de manière précise indépendamment de la stratégie de prélèvement. En revanche, lorsque la variabilité provient essentiellement de la variabilité intra-individuelle, la stratégie de prélèvement a un fort impact (pentes de la droite de régression et R^2 différents pour les 3 exemples). Dans ce cas-là, il est important de réaliser des mesures répétées pour pouvoir estimer précisément la dose [Sobus 2011].

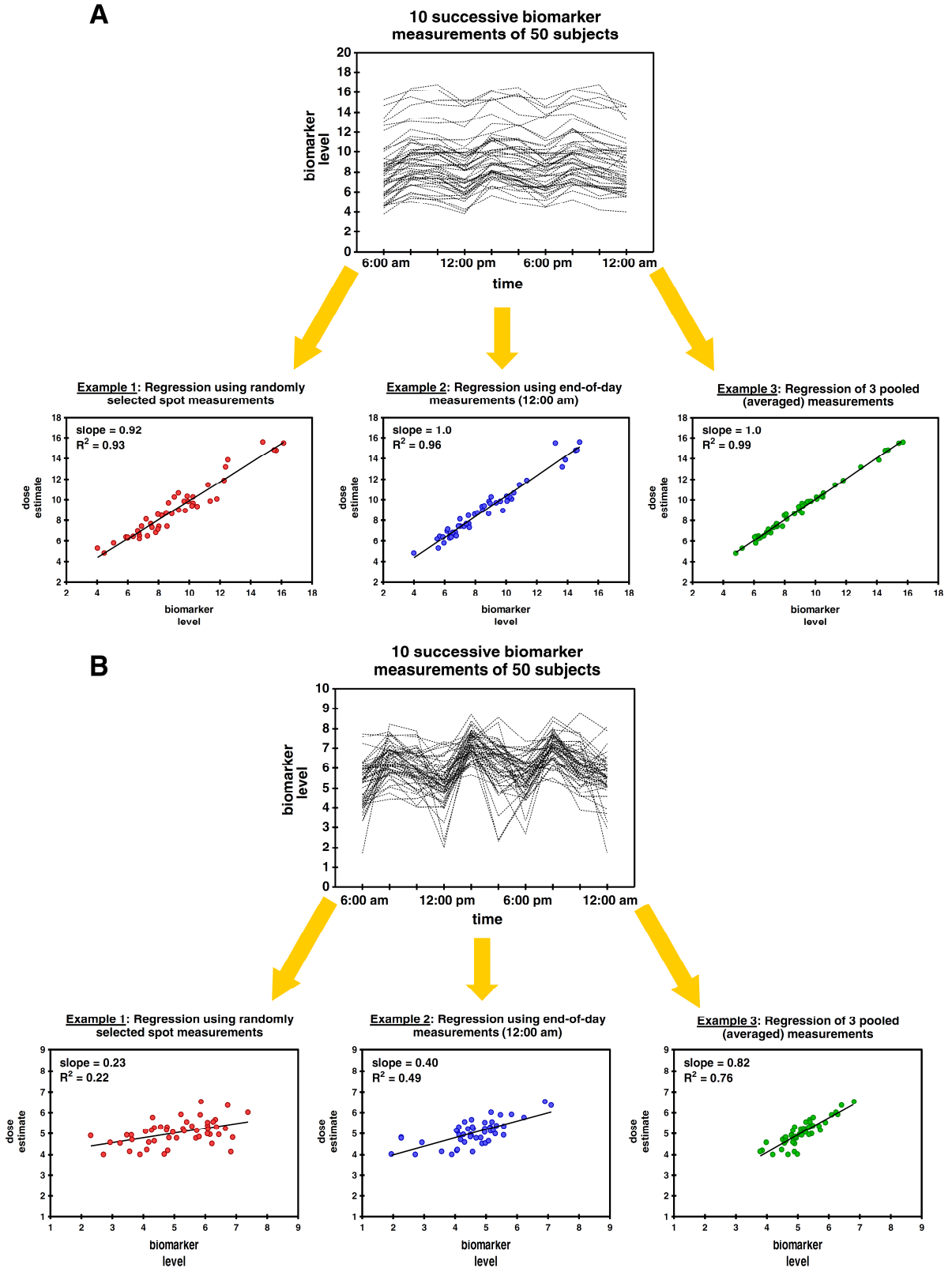


Figure 31 : Impact de la stratégie de prélèvement sur l'estimation de la dose à partir des concentrations d'un biomarqueur dans deux cas distincts. A : la variabilité interindividuelle est large et que l'intra-individuelle est faible. B : la variabilité interindividuelle est faible et que l'intra-individuelle est large (d'après [Sobus 2011]).

V.2.3.1. Le coefficient de corrélation intra-classe

Le coefficient de corrélation intra-classe (ICC) est le ratio de la variance interindividuelle divisée par la variance totale (somme de la variance inter- et intra-individuelle). L'ICC mesure la reproductibilité des mesures répétées au sein du même sujet. Ainsi, un ICC inférieur à 0,4 indique une variabilité provenant majoritairement de la variance intra-individuelle, soit une mauvaise reproductibilité des mesures répétées. Un ICC compris entre 0,4 et 0,75 indique une bonne reproductibilité et un ICC supérieur à 0,75 indique une excellente reproductibilité [Rosner 2011].

Pour un biomarqueur ayant une demi-vie longue (biomarqueur de long terme), la valeur de l'ICC sera proche de 1 et les mesures répétées ne sont pas pertinente. Dans le cas de biomarqueurs de court terme, l'ICC est difficilement prédictible. Lors des grandes études d'exposition en population générale comme le National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), des milliers de personnes sont recrutés à chaque cycle. Ne recruter qu'une centaine d'individus avec 3 prélèvement ou plus, permettrait de calculer l'ICC et de définir les composantes de la variance. Ainsi, il est possible de discerner les composantes de la variance et d'affiner les distributions de concentrations au sein de la population [Pleil 2013].

V.2.3.2. Les modèles à effets mixtes

Pour mesurer la variance inter- et intra-individuelle, il faut utiliser des méthodes statistiques capables de discerner les composantes de la variance avec des données dépendantes (corrélé entre elles). Pour estimer uniquement les composantes de la variance, sans intégrer d'autres variables explicatives, un modèle à effet aléatoire est utilisé.

Dans le cas de la surveillance de l'exposition, c'est l'individu (pour lequel plusieurs prélèvements ont été réalisés) qui sera défini comme effet aléatoire. Ainsi, en plus de l'erreur

du modèle (équivalent à la variance intra-individuelle), la variance correspondant à l'hétérogénéité des réponses selon les individus sera estimée (variance interindividuelle).

Ce type de modèle a été utilisé pour comparer les composantes de la variance de prélèvements atmosphériques à celles de prélèvements biologiques. L'étude a permis de montrer un effet lissant des prélèvements biologiques avec une diminution de la variabilité intra-individuelle par rapport aux prélèvements atmosphériques. Néanmoins, ce phénomène a surtout été observé pour les biomarqueurs de long terme où la toxicocinétique a un impact moins important sur la variabilité biologique [Symanski 2007].

V.2.3.2.1. Modèle linéaire à effet mixte

Un modèle linéaire à effet mixte est une généralisation des modèles linéaires. Ainsi, une variable dépendante (variable à expliquer) est associée à des variables indépendantes (variables explicatives quantitatives ou qualitatives). Dans le cas des effets mixtes, le modèle va comporter un ou plusieurs effets aléatoires et des effets fixes. Comme décrit ci-dessus, un effet aléatoire intervient sur la variance du modèle tandis qu'un effet fixe intervient sur la moyenne du modèle [Wikistat 2016].

Dans le cas des études longitudinales, les différentes mesures effectuées chez un même individu sont corrélées entre elles. Il existe plusieurs types de dépendance des mesures répétées qui conduisent à choisir une structure de covariance/corrélation adaptée pour bien intégrer cette dépendance au modèle [Peretz 2002]. Il est possible de considérer que les mesures répétées chez un même individu sont indépendantes (structure d'indépendance). Cette structure n'étant pas réaliste elle présente peu d'intérêt [Wikistat 2016]. D'une manière générale deux structures sont souvent testées avant d'être choisit pour un modèle. Ces dernières sont détaillées ci-dessous :

- **La structure symétrie composée** est souvent utilisée malgré le fait qu'elle ne soit pas très réaliste en pratique [Wikistat 2016]. Cependant, cette structure est intéressante parce qu'elle assume que chaque individu est indépendant des autres et que la corrélation entre deux mesures, chez un même individu, a un coefficient de corrélation correspondant à l'ICC (voir V.2.3.1) [Lin 2005].
- **La structure autorégressive d'ordre 1** permet de considérer que le coefficient de corrélation, entre les mesures répétées (chez un même individu), dépend de l'intervalle de temps qui les sépare. Cette structure est préconisée pour les études longitudinales qui comportent plus de 5 individus avec plus de 5 mesures répétées et un délai entre deux prélèvements inférieurs à la demi-vie du biomarqueur étudié [Symanski 2002]. Attention cependant, à adapter le calcul de l'ICC qui diffère de celui indiqué précédemment (voir V.2.3.1) [Symanski 2007].

Les modèles linéaires à effets mixtes permettent d'identifier les facteurs influençant les différentes composantes de la variance. Pour identifier l'impact des facteurs, il faut, en premier lieu, faire un modèle aléatoire comportant uniquement une variable aléatoire (souvent la variable individu). Ce modèle permet d'obtenir la variance des données qui est, bien entendu, divisé en deux composantes (variance inter- et intra-individuelle). En second lieu, des effets fixes vont être ajoutés. Ceux-ci vont expliquer, en partie, la variance des données et, en fonction de leur nature, ils peuvent avoir un effet plus ou moins important sur l'une ou l'autre des composantes de la variance. Ensuite, il sera possible de calculer le pourcentage de variance expliquée par les effets fixes [Burstyn 2000].

Cette méthodologie a été utilisée dans différentes études dans le but d'expliquer la variabilité des concentrations atmosphériques et des biomarqueurs [Egeghy 2005], notamment de biomarqueurs urinaires pour des polluants comme le styrène [Symanski 2001] ou les HAP [Sobus 2010, Smith 2012, Rodrigues 2014]. Par conséquent, il est possible de mesurer l'impact

du moment de prélèvement ou des concentrations environnementales (par des mesures de la dose externe) sur la variabilité des concentrations du biomarqueur. A titre d'exemple, pour des urines prélevées en fin de poste (de travail), la dose externe (atmosphérique et cutanée) et la diurèse permettent d'expliquer 66% de la variabilité de la somme des concentrations urinaires des métabolites monohydroxylés du Phe [Sobus 2009a].

V.2.3.2.2. Modèle non linéaire à effet mixte

Les modèles non linéaires à effets mixtes ressemblent en de nombreux points aux modèles linéaires à effets mixtes. A partir de données répétées dans un même groupe, l'objectif est de décrire une variable dépendante à partir de variables indépendantes en intégrant la corrélation des données au sein d'un même groupe grâce à l'effet aléatoire. Une des différences majeures est la nécessité de définir des valeurs de départ pour les coefficients [Pinheiro 2000].

Dans le cadre de la SBE, les modèles non linéaires à effets mixtes peuvent être utilisés pour étudier la cinétique d'élimination urinaire des biomarqueurs tout en estimant la variabilité des paramètres estimés au sein des populations. Après la fin de l'exposition, la cinétique d'élimination d'ordre 1 (mono-exponentielle) est souvent utilisée pour le suivi des concentrations sanguines dans le temps. Le passage en logarithme des concentrations permet de faire une régression linéaire. Toutefois, cette méthode, qui est aussi utilisée pour les concentrations urinaires, n'est pas adaptée pour les polluants environnementaux comme les HAP. En effet, cette méthode engendre un biais quant à l'estimation des paramètres toxicocinétiques comme la demi-vie d'élimination car elle ne prend pas en compte l'élimination continue du biomarqueur due à l'exposition constante aux polluants de ce type. La prise en compte de ces niveaux de base nécessite l'utilisation de modèle non linéaire [Bartell 2012].

Ce type de modèle a été utilisé pour modéliser l'élimination de métabolites monohydroxylés de HAP après consommation de poulet grillé au barbecue. Les demi-vies ont été calculées avec ou sans prise en compte des niveaux de base (due aux expositions environnementales aux HAP).

Lorsque les niveaux de base ne sont pas intégrés au modèle, les demi-vies estimées augmentent, en fonction des métabolites, de 18% à 147 [Li 2012b]. De plus, ces auteurs ont opté pour un modèle non linéaire à effet mixte pour permettre une analyse simultanée de l'ensemble des données. Une seconde étude utilisant le même modèle a été utilisé pour étudier la cinétique d'élimination de métabolites monohydroxylés de HAP après consommation de saumon fumé [Motorykin 2015].

Cette analyse simultanée permet d'obtenir une estimation plus précise des paramètres plutôt que de déterminer une demi-vie par individu et de faire la moyenne de ces demi-vies. En effet, calculer une demi-vie par individu pour ensuite faire la moyenne du groupe engendre une surestimation de la variabilité (de la demi-vie). Ce phénomène est appelé paradoxe de Stein [Efron 1977].

VI. La surveillance biologique de l'exposition aux HAP

Les HAP pouvant être absorbées par voie respiratoire, cutanée et digestive, l'évaluation de l'exposition par la dose externe est moins pertinente que celle par dose interne (SBE). La SBE aux HAP se fait essentiellement avec des biomarqueurs d'exposition (dose efficace et dose interne) mais il existe aussi quelques biomarqueurs d'effet.

VI.1. Biomarqueurs de dose efficace

Parmi les biomarqueurs d'exposition, des biomarqueurs de dose efficace ont été développés comme les adduits à l'ADN ou aux protéines.

VI.1.1. Adduits à l'ADN

Différentes méthodes existent pour le dosage des adduits à l'ADN tel que le marquage au ^{32}P, les méthodes immunologiques, la spectroscopie à fluorescence synchronisée (SFS) et la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) [Angerer 1997a].

Le post-marquage de l'ADN au ^{32}P est une méthode extrêmement sensible avec une limite de quantification (LQ) pouvant atteindre 1 adduit pour 10^{10} nucléotides (soit 1 adduit par génome) mais elle ne permet pas d'identifier la structure chimique de l'adduit [Pfohl-Leszkowicz 1995]. Le manque de spécificité de cette méthode induit d'importantes variations de la quantité d'adduit mesurée dans les populations étudiées. Ainsi, il est parfois difficile de distinguer les concentrations mesurées en population générale (exposées à de faibles concentrations atmosphériques de HAP) de celles d'une population professionnellement exposée (fortes concentrations atmosphériques de HAP) [Angerer 1997a]. En revanche, ce manque de spécificité pourrait permettre d'évaluer l'exposition aux mélanges complexes contenant des génotoxiques connu ou inconnu [Jones 2012].

Les méthodes immunologiques utilisent un test ELISA (plus précisément Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) contenant des anticorps spécifiques des adduits aux HAP fixés dans

une phase solide. Les adduits sont déposés simultanément avec une enzyme qui entre en compétition pour se lier aux anticorps. Le substrat de l'enzyme est ensuite ajouté pour produire un composé coloré qui permet de quantifier la quantité d'adduit. Le substrat peut également être radio marqué (test USERIA) ou marqué avec un lanthanide (test DELFIA ou TRFIA). Comme pour la méthode du post-marquage de l'ADN au ^{32}P, ces tests sont des techniques sensibles avec des LQ comprises entre 0.1 to 1 adduits pour 10^9 nucléotides ce qui permet de détecter les adduits dans les cellules ou les tissus [Pratt 2011]. Cependant les anticorps utilisés ne sont pas spécifiques d'un seul type d'adduit [Brown 2012]. Par exemple, les anticorps anti ADN-BPDE peuvent se lier à d'autres adduits ADN-HAP. Ainsi, les tests immunologiques permettent de mesurer les adduits de plusieurs HAP et manque de spécificité.

La SFS consiste à enregistrer simultanément le spectre d'excitation et d'émission d'une molécule ce qui permet d'améliorer la spécificité et de diminuer les interférences. Cette technique est notamment utilisée pour doser les HAP dans les aliments [Li 2012a]. Dans le cas du dosage des adduits ADN-HAP, la méthode n'est pas assez spécifique malgré une LQ de 1 adduit pour 10^8 nucléotides [Angerer 1997a].

Les méthodes HPLC utilisées pour le dosage des adduits ADN-HAP peuvent être couplées à de la détection par fluorimétrie (HPLC-FLD) [Alexandrov 1992], à de la SFS ou à de la spectrométrie masse en mode tandem (HPLC-MSMS) [Beland 2005, Tarantini 2009]. Il existe également des méthodes en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS) [Boysen 2003]. Ces techniques analytiques seront détaillées ci-dessous (Chapitre 1 :I.1.1.1). Après hydrolyse acide des adduits ADN-BPDE dans des leucocytes, les différents diastéréoisomères de Tetraol-BaP sont séparer et quantifier. Indépendamment du mode de détection, ces méthodes permettent de détecter des adduits ADN-BPDE avec une LQ comprise entre 0,5 et 2 adduits pour 10^8 nucléotides. Cette sensibilité a été suffisante pour comparer des travailleurs de cokerie à une population générale (moyenne d'adduit ADN-BPDE

respectivement de 15,7 et 2 adduits pour 10^8 nucléotides) [Rojas 1995] mais aussi pour détecter des adduits en population générale [Grova 2014].

La méthode la plus sensible et la plus spécifique pour détecter les adduits est la spectrométrie de masse par accélérateur (SMA). Cette dernière permet de détecter 1 adduit ADN-BPDE pour 10^{12} nucléotides [Goldman 2000]. En revanche, le coût important de synthèse des composés radiomarqués d'intérêt et la rareté de ce type d'appareil dans les laboratoires sont les principaux désavantages de cette méthode [Brown 2012]. Par conséquent, la SMA est une technique difficilement utilisable pour de la SBE.

Les différentes techniques énumérées ci-dessus présentent chacune, des avantages et de inconvénients qui sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Comparaison des méthodes quantitatives utilisées pour la détection des adduits à l'ADN (adaptée à partir de [Brown 2012])

Méthode	Sensibilité maximale (adduits/nucléotides)	Quantité d'ADN requise (µg)	Avantages	Limites
post-marquage de l'ADN au ^{32}P	~$1/10^{10}$	1-10	Sensibilité et possibilité de screning	Fort niveau de radioactivité et manque de spécificité (pas d'informations structurelles
Test immunologique	~$1/10^{9}$ [a]	1-200	Spécificité et localisation des adduits	Besoin d'anticorps et réactivité croisée
SFS	~$1/10^{8}$ [b]	100 [b]	Plus spécifique que la fluorimétrie standard [c]	Uniquement pour adduits fluorescent et purification échantillon nécessaire
HPLC-FLD	~$1/10^{8}$	1-100	Simplicité	Uniquement pour adduits fluorescent et besoin de standard
Spectrométrie de masse	~$1/10^{8}$	10-100	Plus grande spécificité et informations structurelles	Besoin de standard
SMA	~$1/10^{12}$	1-2000	Meilleur sensibilité et spécificité des radiomarqués	Besoin de composé contenant $^{14}C/^{13}H$, rareté de l'appareillage et coût

[a] : [Pratt 2011]
[b] : [Weston 1991]
[c] : [Li 2012a]

Au total, les dosages des adduits effectués à partir de méthodes séparatives (chromatographie), ont permis de détecter des adduits dans 40% des analyses sur les 705 répertoriées. Le pourcentage de détection est de 34% sur les 177 analyses pour les expositions environnementales et de 39% sur les 224 analyses pour les expositions professionnelles. Par conséquent, des méthodes plus sensibles sont requises pour évaluer le rôle des adduits ADN-BaP dans l'induction des cancers [Boysen 2003].

De plus, l'ensemble de ces méthodes permettent une quantification des adduits à l'ADN dans les tissus, les cellules, le sang et la salive [Brown 2012]. Ainsi la majeure partie des matrices utilisées pour le dosage spécifique des adduits à l'ADN nécessite un prélèvement invasif alors que les prélèvements non invasifs, comme les frottis buccaux ou les cellules de la vessie récupérées dans les urines, sont analysés à l'aide de la méthode post-marquage de l'ADN au ^{32}P (méthode sensible mais non spécifique) [Pfohl-Leszkowicz 1995, Talaska 2014]. Dans le cadre de la SBE, les prélèvements invasifs peuvent engendrer certains problèmes de faisabilité (voir V.2.2.3.2).

VI.1.2. Adduits aux protéines sanguines

A l'inverse des adduits à l'ADN qui ont une durée de vie limité par les capacités de réparation de l'ADN, les adduits aux protéines ont une durée de vie équivalente à la durée de vie de la protéine. L'hémoglobine (Hmg) a une durée de vie de 120 jours et l'albumine (Alb) de 24 jours. Ainsi, les concentrations d'adduits attendues peuvent être plus élevées et permettraient d'augmenter la sensibilité [Angerer 1997a]. De plus, les adduits aux protéines permettent d'évaluer la dose efficace sur une fenêtre de temps plus large (équivalent à la durée de vie de la protéine) [Ragin 2008]. Ainsi, les adduits Hmg-HAP et Alb-HAP sont utilisés par certains auteurs comme biomarqueur de dose efficace [Boysen 2003]. Chez le rat, la quantité d'adduits Hmg-HAP est corrélée à la quantité d'adduits à l'ADN dans différents tissus (poumons, foie et reins) [Kwack 2014].

Le BaP se lie à Hmg par une alkylation d'un acide carboxylique de la protéine et forme un ester stable. Principalement analysé en HPLC, l'adduit est d'abord hydrolysé pour libérer des Tetraol-BaP. D'abord dosé en HPLC-FLD, c'est une méthode développée en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS) qui a permis de différencier les différents diastéréoisomères de Tetraol-BaP [Ragin 2008]. Ces méthodes sont assez sensibles pour détecter des adduits Hmg-BPDE et leurs diastéréoisomères chez des sujets non-fumeurs non exposés professionnellement. Chez les salariés d'une usine de production d'électrodes de carbone, la quantité d'adduits était significativement corrélée bien que faiblement (coefficient de corrélation de 0,26), avec les mesures atmosphériques (somme des 13 HAP analysés) [Ferreira Junior 1994].

Comme pour Hmg, les diols époxyde se lient à Alb par une alkylation d'un acide carboxylique. La liaison de fait préférentiellement au niveau de l'histidine146 ou de la lysine137 dans le sous-domaine IB de Alb. Comme pour les adduits Hmg-HAP, le dosage des adduits peut se faire par HPLC-FLD et par GC-MS [Boysen 2003]. De plus, une méthode a été développée en HPLC couplée à de la fluorescence induite par un laser (HPLC-LFD) [Ozbal 2000].

Pour l'ensemble des méthodes développées, les adduits aux protéines ont été détectés dans 59% des analyses sur les 772 répertoriées. Le pourcentage de détection est de 44% sur les 432 analyses pour les expositions environnementales et de 77% sur les 60 analyses pour les expositions professionnelles [Boysen 2003].

Comme pour les adduits à l'ADN, les adduits aux protéines nécessitent des prélèvements invasifs pouvant engendrer certains problèmes de faisabilité dans le cadre de la SBE (voir V.2.2.3.2) et nécessitent encore d'être validés.

VI.2. Biomarqueurs urinaires de dose interne aux HAP

Dans le cadre de la SBE, la dose interne est majoritairement évaluée à partir des métabolites excrétés dans les urines. Cette stratégie rend l'évaluation de l'exposition complexe car les HAP sont des mélanges complexes de composition variable et car chaque composé du mélange est métabolisé en plusieurs métabolites. De plus, la matrice urinaire est privilégiée pour des raisons de faisabilité alors que les métabolites des HAP les plus lourds (HAP particulaires potentiellement cancérogènes) sont majoritairement éliminés dans les fèces. Il est donc nécessaire d'identifier les HAP et leurs métabolites pouvant avoir un intérêt en tant que biomarqueurs urinaires de dose interne. Ainsi, ce choix de matrice biologique implique d'avoir, en premier lieu, des méthodes analytiques suffisamment sensibles c'est-à-dire capables de détecter des concentrations de l'ordre du µg/L ou même du ng/L selon les biomarqueurs [Angerer 1997a]. En deuxième lieu, il est indispensable de prendre en compte les mécanismes d'excrétion rénale de ces métabolites pour ajuster les concentrations excrétées en fonction de ces derniers.

VI.2.1. Quels biomarqueurs de dose interne utilisés

VI.2.1.1. Naphtalène

VI.2.1.1.1. <u>Métabolisme du Nap</u>

Le métabolisme du Nap est résumé en Figure 32. La première étape de la voie de métabolisation principale du Nap, est la formation du 1,2-époxy-Nap, qui entraîne la formation de 1-hydroxyNap (1-Nap) après hydrolyse spontanée, ou est conjugué au glutathion, ou est transformé en diol par une EH. Ce diol peut soit être glucurono- ou sulfo-conjugué, soit passer sous forme de 2-hydroxyNap (2-Nap), soit être transformé en catéchol par une AKR. Ce catéchol peut être directement glucurono- ou sulfo-conjugué pour être éliminé ou entrer dans la voie de l'ortho-quinone pour former une 1,2-dione-Nap induisant la production de ROS via le

cycle d'oxydo-réduction. Le catéchol peut également passer sous forme de 1,4-diol-Nap passant lui-même en 1,4-dione-Nap [IARC 2002].

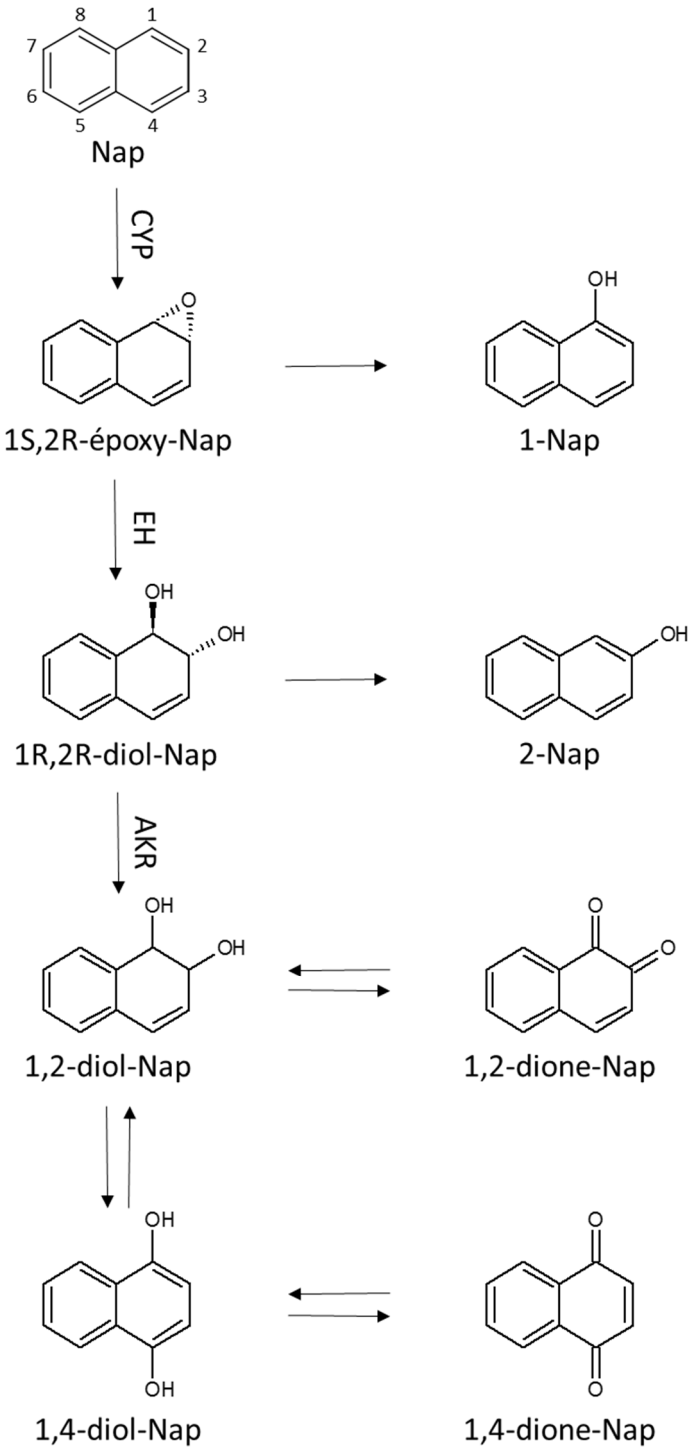


Figure 32 : Voies métaboliques majoritaires du Nap, adaptée de [IARC 2002].
Nap : Naphtalène ; CYP : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde hydrolase ;
AKR : Aldocéto reductase

Dans les urines de rats, les composés retrouvés étaient, par ordre d'abondance décroissante : Nap > 1-Nap > 2-Nap > 1,2-diol-Nap > métabolites sous forme d'acide mercapturique [Kilanowicz 1999].

VI.2.1.1.2. Biomarqueurs d'exposition au Nap

Le 1-Nap et le 2-Nap sont les biomarqueurs d'expositions au Nap les plus utilisés en environnement et en milieu professionnel. Le Nap étant majoritairement éliminé via les urines, en plus d'être le HAP le plus abondant dans la majorité des mélanges, ces métabolites majoritaires sont abondamment retrouvés dans les urines (Tableau 5).

En environnement général, les concentrations urinaires de 1- et 2-Nap sont corrélés aux Nap mesurés dans l'air de manière indépendante à la consommation d'aliments contenant des HAP. Ainsi, cette corrélation indique que le Nap est essentiellement absorbé par voie respiratoire [Li 2010a]. En effet, le 1- et 2-Nap semblent spécifiques de l'exposition atmosphérique et sont donc influencés par le statut tabagique [Yang 1999]. Alors que le 2-Nap est plus spécifique de l'exposition au tabac [Nethery 2012, St Helen 2012], le 1-Nap est également un métabolite issu de la biotransformation du carbaryl qui est un insecticide couramment utilisé [Meeker 2007].

Par contre, le 1- et 2-Nap ne sont pas corrélés aux HAP cancérogènes qui sont essentiellement des HAP particulaires comme le BaP [Aquilina 2010]. Ainsi, ce manque de corrélation, font de ces métabolites des biomarqueurs non adaptés pour le suivi de l'exposition aux HAP particulaires cancérogènes. Bien qu'intéressants pour évaluer l'exposition environnementale au Nap [Bieniek 1997], le 1- et 2-Nap apparaissent comme de mauvais biomarqueurs en milieu professionnel car l'estimation de l'exposition professionnelle est compliquée par le statut tabagique des individus, qui constitue un facteur de confusion important [Sobus 2009b].

Les diols du Nap peuvent également être utilisés comme biomarqueurs d'exposition au Nap car ce sont les précurseurs des napthoquinones (1,2- et 1,4-dione-Nap) qui sont les métabolites

cancérogènes ultimes du Nap. Les diols du Nap, tel que le 1,4-diol-Nap et surtout le 1,2-diol-Nap (métabolite urinaire majoritaire), sont des biomarqueurs plus proches de l'effet toxique que les 1- et 2-Nap. Excrété en quantité similaire aux 1- et 2-Nap en population générale, les niveaux retrouvés en milieu professionnel sont 10 fois supérieurs. Bien que nécessitant des précautions supplémentaires au niveau de mode opératoire du fait de l'instabilité des solutions standards, le 1,2-diol-Nap apparait comme un biomarqueur sensible et proche de l'effet toxique du Nap [Klotz 2011].

VI.2.1.2. Phénanthrène

VI.2.1.2.1. Métabolisme du Phe

Le métabolisme du Phe est résumé dans la Figure 33. Le Phe est pris en charge par les CYP pour former le 1,2-époxy-Phe, le 3,4-époxy-Phe ou le 9,10-époxy-Phe. A partir de ces 3 époxydes, 5 monohydroxy Phe sont produits après une hydrolyse spontanée : le 1-, 2-, 3-, 4- et 9-hydroxyPhe (1- , 2-, 3-, 4- et 9-Phe) ; et 3 diols après l'action de l'EH : le 1,2-diol-Phe, le 3,4-diol-Phe et le 9,10-diol-Phe [Chaturapit 1978]. Tandis que le 9,10-diol-Phe est majoritairement produit sous la forme [S,S], le 1,2-diol-Phe et le 3,4-diol-Phe sont majoritairement produit sous la forme [R,R] [Nordqvist 1981, Shou 1994].Dans des microsomes de foie, le 9,10-diol-Phe est le diol majoritaire [Nordqvist 1981].Des diol-époxydes sont formés à partir du 1,2-diol-Phe et du 3,4-diol-Phe. Le diol-époxyde issu du 3,4-diol-Phe est moins abondant que le reverse-diol-époxyde issu du 1,2-diol-Phe [Hecht 2009]. Les diols époxydes, surtout le reverse-diol-époxyde, peuvent ensuite soit être conjugués à un glutathion, soit subir une hydrolyse spontanée aboutissant à la formation des tetrahydroxy-Phe (Tetraol-Phe).

Chez le poisson, tandis que les monohydroxy et les diols du Phe sont majoritairement éliminés sous forme glucurono- et sulfo-conjuguée dans la bile, les monohydroxy sont éliminés entre 36 et 100% sous forme non conjuguée [Solbakken 1980, Leonard 2001].

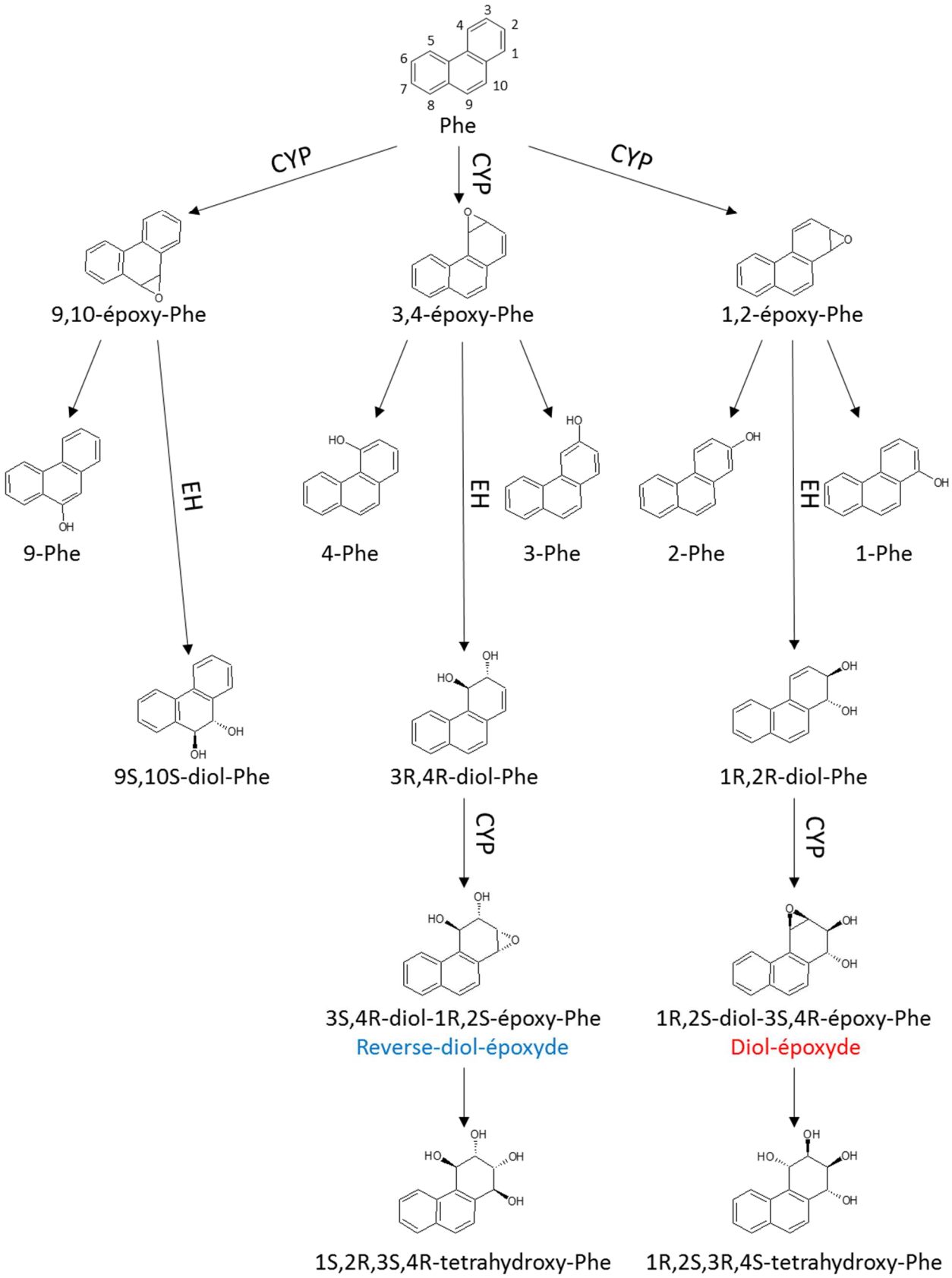


Figure 33 : Voies métaboliques majoritaires du Phe [Chaturapit 1978, Nordqvist 1981, Hecht 2009].
Phe : Phenanthrène ; CYP : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde hydrolase

VI.2.1.2.2. Biomarqueurs d'exposition au Phe

Malgré le métabolisme complexe du Phe, les métabolites sont abondamment retrouvés dans les urines, de par leur élimination majoritairement urinaire [Chu 1992] et de par l'abondance de ce dernier au sein des mélanges émis dans l'atmosphère. Ainsi, différents métabolites urinaires pourraient être utilisés comme biomarqueurs d'exposition (Tableau 5). Les métabolites monohydroxylés du Phe sont les métabolites urinaires les plus utilisés en tant que biomarqueurs d'exposition au Phe.

En environnement général, les métabolites monohydroxylés peuvent être corrélés avec les concentrations atmosphériques de Phe, mais ils sont également fortement influencés par la consommation d'aliments contaminés (exposition par voie orale) [Li 2010a, Alghamdi 2015]. En revanche, ces métabolites ne sont pas de bons marqueurs de la consommation de tabac [St Helen 2012]. Ainsi, en milieu professionnel, le statut tabagique des travailleurs n'est pas un facteur de confusion pour les métabolites monohydroxylés du Phe [Sobus 2009b] ce qui en font de bons biomarqueurs [Sobus 2009a].

Les diols du Phe ont également été proposés comme biomarqueur d'exposition. Le 1,2-diol-Phe, le 3,4-diol-Phe et le 9,10-diol-Phe ont été analysés, en plus des métabolites monohydroxylés du Phe, chez des travailleurs exposés. Le 1,2-diol-Phe, métabolite urinaire majoritaire du Phe, est également un biomarqueur intéressant pour la SBEP car il est bien corrélé aux concentrations atmosphériques de Phe [Seidel 2008].

Le Tetraol-Phe urinaire a été initialement considéré comme un biomarqueur d'exposition proche de l'effet toxique du BaP car il est issu de la voie du diol-époxyde, voie de métabolisation responsable de la cancérogénicité de ce dernier. Toutefois, la voie de métabolisation du diol-époxyde du Phe diffère de celle du BaP. Tandis que 96% du Tetraol-Phe provient du reverse-diol-époxyde, 78% du Tetraol-BaP est issu du BPDE [Hecht 2010]. Par conséquent, le Tetraol-Phe ne reflète pas la voie d'activation métabolique toxique.

VI.2.1.3.Fluorène

VI.2.1.3.1. Métabolisme du Fluorène

Très peu de données sont disponibles dans la littérature quant au métabolisme du Flu et les connaissances n'ont pas évolué depuis la première évaluation du CIRC en 1983 [IARC 2010]. Une étude dans des microsomes de foie de rat a permis de détecter 3 métabolites du Flu : le 1-hydroxyFlu (1-Flu), le 9-hydroxyFlu (9-Flu) et le 9-céto-Flu [IARC 1983].

Les métabolites monohydroxylés du Flu sont majoritairement éliminés sous forme glucurono-conjugués dans la bile de poisson. [Leonard 2001]. Dans l'urine humaine, le 1-Flu, le 2-hydroxyFlu (2-Flu), le 3-hydroxyFlu (3-Flu) et le 9-Flu ont pu être quantifiés[St Helen 2012, NHANES 2015].

VI.2.1.3.2. Biomarqueurs d'exposition au Flu

Comme le Nap et le Phe, le Flu est un HAP gazeux abondamment retrouvé dans les mélanges. En plus d'être non cancérogène, son métabolisme a été peu étudié. Cependant les métabolites monohydroxylés (1-, 2-, 3- et 9-Flu) peuvent être utilisés comme biomarqueurs urinaires d'exposition au Flu.

En environnement général, les niveaux urinaires des métabolites monohydroxylés sont similaires à ceux du Phe (Tableau 5). Les concentrations de ces métabolites sont corrélées aux niveaux atmosphériques de Flu lorsque les aliments consommés ne sont pas trop riches en HAP [Li 2010a]. Parmi les différents métabolites urinaires analysés, les métabolites monohydroxylés du Flu, et plus particulièrement le 1-Flu, apparaissent comme les biomarqueurs les plus spécifiques de la consommation de tabac [St Helen 2012].

En milieu professionnel, les métabolites du Flu ont été peu étudiés. Malgré une forte influence du statut tabagique, le 2-Flu s'est révélé être un biomarqueur pouvant être utilisé pour évaluer

l'exposition au fuel dans des études conduites dans l'US Air Force ou chez les couvreurs [Serdar 2012, Rodrigues 2014].

VI.2.1.4.Pyrène

VI.2.1.4.1. Métabolisme du Pyrène

Le métabolisme du pyrène est résumé dans la Figure 34. Ce dernier a été étudié à partir de microsome de foie de rats prétraités ou non avec des inducteurs enzymatiques [Jacob 1982]. Le pyrène subit une oxydation au niveau de la région K pour donner le 4,5-époxy-pyrène. Il est ensuite pris en charge par une EH pour former le 4,5-diol-pyrène. La première oxydation peut également se faire au niveau des carbones 1 et 2 pour former le 1,2-époxy-pyrène. Ce dernier subit une hydrolyse spontanée pour former du 1-OHP, métabolite majoritaire du pyrène. A partir du 1-OHP, une seconde oxydation est possible pour former des époxydes au niveau des carbones 6 et 7 ou 7 et 8. Ces derniers s'hydrolysent spontanément pour former respectivement le 1,6-diol-pyrène et le 1,8-diol-pyrène.

Dans *Penicillium janthinellum*, le 1,6-diol-pyrène et le 1,8-diol-pyrène peuvent respectivement être transformés en 1,6-dione pyrène et en1,8-dione-pyrène [Launen 1995]. Cependant, ces deux derniers métabolites n'ont pas été détectés dans les microsomes de foie de rats [Jacob 1982]. Détectés dans les urines de rat et de lapin, ils seraient dus à une oxydation au contact de l'air des diols puisqu'ils n'ont été observés qu'après hydrolyse des métabolites conjugués [Boyland 1964].

Il est intéressant de noter que le 2-hydroxypyrène (2-OHP) et le 4-hydroxypyrène (4-OHP) ont été détectés dans les urines de fumeurs [Gmeiner 1998]. Ceci laisse penser que le 4,5-diol-pyrène peut aussi s'hydrolyser spontanément pour donner du 4-OHP. Le 1,2-époxy-pyrène peut aussi donner du 2-OHP après son hydrolyse, bien qu'en quantité moindre par rapport au 1-OHP.

Le 1-OHP est majoritairement excrété sous forme conjugué [Jongeneelen 1987]. Dans les urines de rats et de lapins, le 1-OHP, 1,6-diol-pyrène, le 1,8-diol-pyrène et le 4,5-diol-pyrène ont été détectés sous forme glucurono- et sulfo-conjugués. Le 4,5-diol-pyrène peut également être conjugué au glutathion [Boyland 1964].

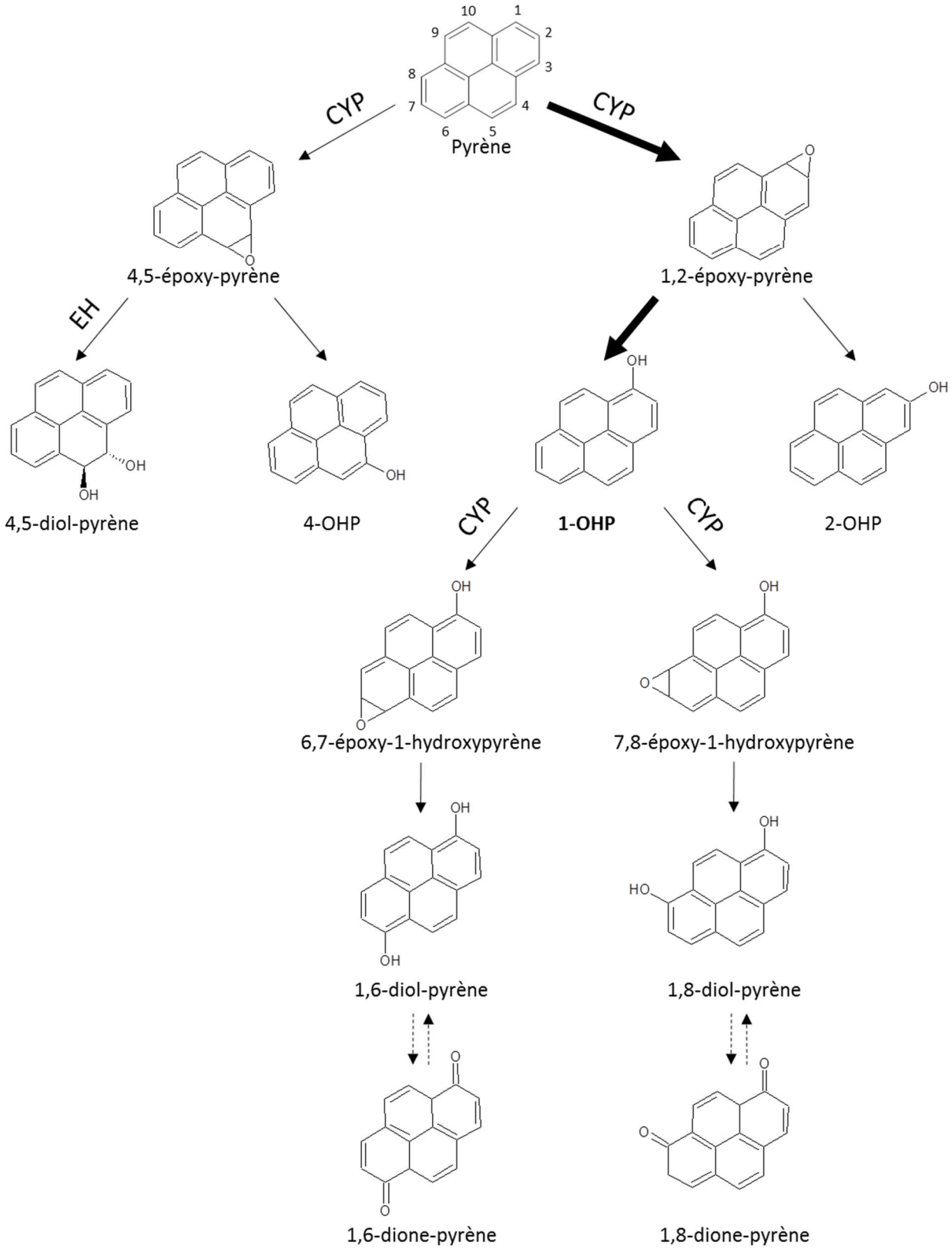


Figure 34 : Synthèse du métabolisme du pyrène. Les flèches en pointillés indiquent une réaction hypothétique chez les mammifères.
CYP : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde hydrolase

VI.2.1.4.2. Biomarqueurs d'exposition au pyrène

Le 1-OHP, qui est le métabolite urinaire majoritaire du pyrène, a été le premier biomarqueur proposé pour évaluer l'exposition aux HAP [Jongeneelen 1985]. En plus d'avoir un métabolisme simple, le pyrène est abondant dans les mélanges émis dans l'atmosphère où il se trouve à la fois sous forme gazeuse et particulaire. Ainsi le 1-OHP est le métabolite le plus abondant dans l'urine qui provient d'un HAP particulaire (Tableau 5).

Le 1-OHP urinaire a ainsi été largement utilisé pour estimer l'exposition aux HAP tant en environnement qu'en milieu professionnel. En 2008, [Hansen 2008] ont recensé 132 publications utilisant le 1-OHP pour évaluer les expositions environnementales et professionnelles. Les niveaux les plus élevés ont été retrouvés chez les travailleurs des fours de cokerie. En milieu environnemental, la consommation de tabac, l'alimentation, le pays et le style de vie influencent les niveaux urinaires de 1-OHP. Ainsi, c'est pour ce biomarqueur qu'il a le plus de recul et il est aujourd'hui considéré comme le « gold standard » [Ciarrocca 2013].

D'autres métabolites ont été utilisés comme biomarqueur d'exposition au pyrène. La 1,6-dione- et 1,8-dione-pyrène ont été analysées dans les urines des populations générales et professionnellement exposées [Ruzgyte 2005]. En milieu environnemental, les concentrations urinaires observées sont similaires à celles du 1-OHP mais avec une variabilité intra-individuelle plus importante [Bouchard 2009]. En revanche, en milieu professionnel, les concentrations de 1-OHP étaient supérieures à celles des diones [Seidel 2008]. Toutefois, des études supplémentaires sont encore requises pour valider les diones du pyrène en tant que biomarqueur d'exposition.

VI.2.1.5. Benzo(a)pyrène

VI.2.1.5.1. Métabolisme du BaP

Le métabolisme du BaP a été le plus étudié. Ce dernier est complexe et une multitude de métabolites en découlent. En effet, le BaP suit toutes les voies de métabolisation décrites ci-dessus (diol-époxyde, ortho-quinone et radical cation).

Cinq époxydes différents sont produits à partir du BaP. Suivant leur stabilité, ils vont s'hydrolyser spontanément pour donner des métabolites monohydroxylés, ou alors, être pris en charge par une EH pour former un diol (Figure 35).

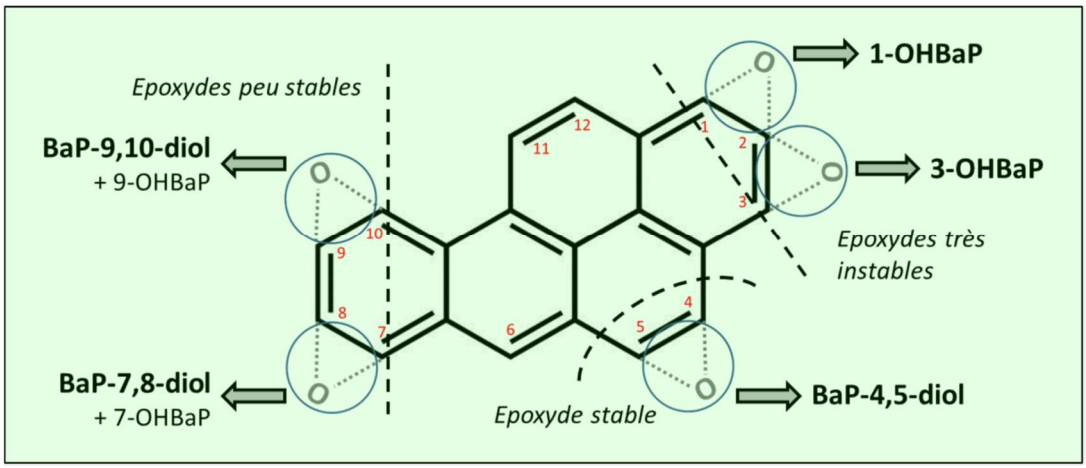


Figure 35 : Stabilité des différents époxydes du BaP, d'après [Barbeau 2013]

L'ensemble des diols et des monohydroxys formés peuvent être glucurono- ou sulfo-conjugués pour être éliminés. Le 7,8-diol-BaP et le 9,10-diol-BaP peuvent également entrer dans la voie du diol époxyde. Tandis que le 7,8-diol-BaP va aboutir à la formation d'un diol époxyde capable de former des adduits stables à l'ADN (BPDE), le 9,10-diol-BaP va donner un reverse-diol-époxyde (rev-BPDE) qui sera rapidement conjugué à un glutathion [Upadhyaya 2010]. Le BPDE de conformation 7R,8S,9S,10R-diol-époxy-BaP (anti-BPDE) est la forme de BPDE la plus produite [Xue 2005]. C'est également le métabolite le plus mutagène selon le test d'Ames et causant le plus de tumeur chez des souris nouveaux nés [Malaveille 1977, Kapitulnik 1978].

Les diol-époxydes peuvent également subir une hydrolyse spontanée pour produire du 7,8,9,10-tetrahydroxy-BaP (Tetraol-BaP).

Les proportions de 7,8-diol-BaP transformés en BPDE sont identiques à celles transformés en catéchol chez le rat [Penning 1999]. En effet, le 7,8-diol-BaP peut également entrer dans la voie de l'ortho-quinone pour donner la 7,8-dione-BaP (Figure 36). En plus de la capacité de cette dernière à former des adduits, la mise en place du cycle d'oxydo-réduction va produire des ROS. La grande majorité des ROS sont produits via la voie des ortho-quinones [Sen 2012]. La production de ces ROS engendre plus de transversions guanine-thymine que le BPDE au niveau du gène codant pour la protéine p53 de cellules de poumons humaines [Penning 2014]. La protéine p53 joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (voir IV.1).

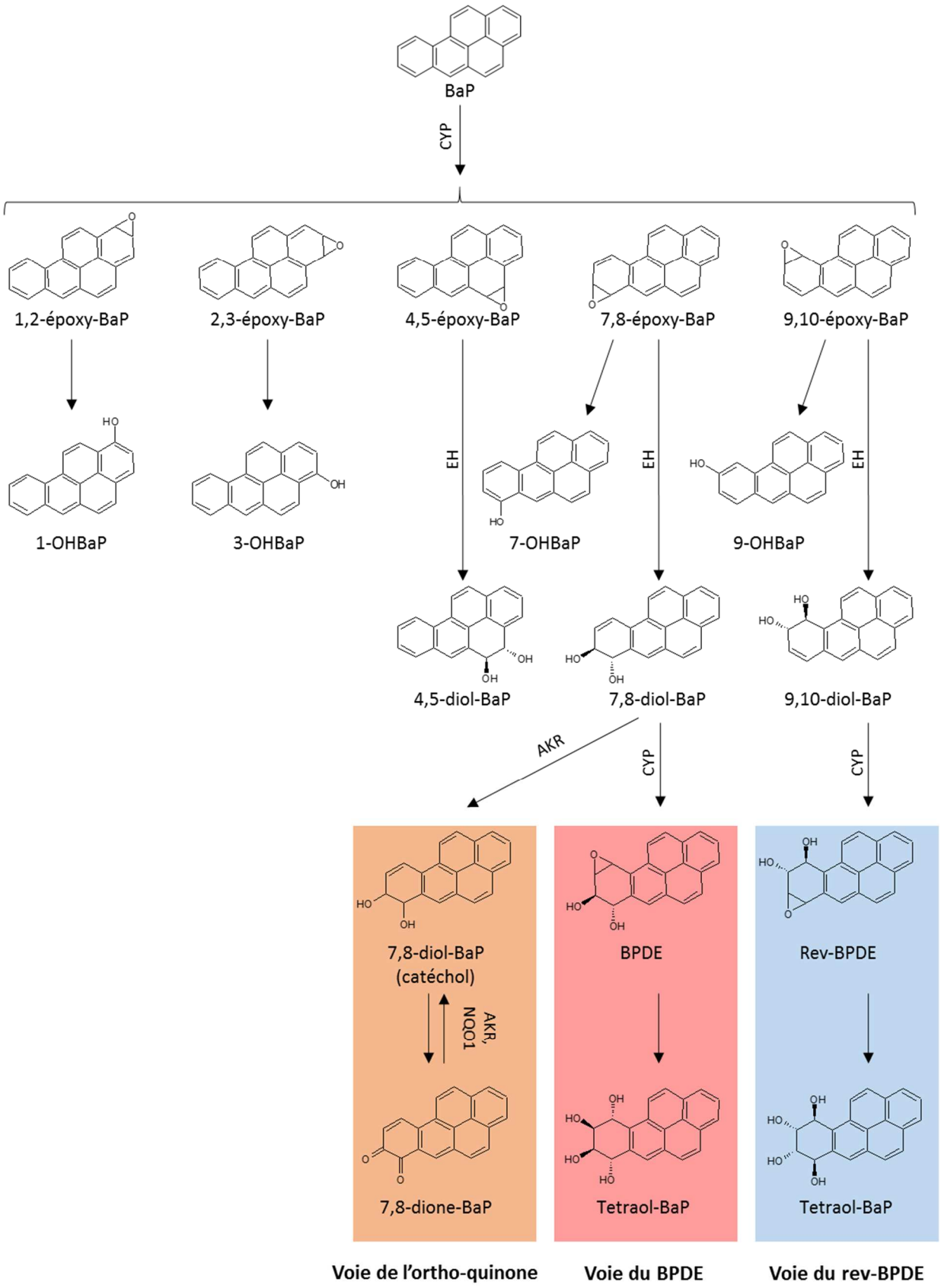


Figure 36 : Métabolites formés à partir des différents époxydes du BaP. BaP : Benzo(a)pyrène ; CYP : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde hydrolase ; AKR : Aldocéto reductase ; NQO1 : NAD(P)H quinone oxydoreductase 1

Le BaP peut aussi subir une peroxydation aboutissant à la formation d'un radical cation au niveau du C6 (Figure 37). Le 6-hydroxyBaP (6-OHBaP), issu de l'hydrolyse spontanée de ce radical cation, peut être métabolisé par les CYP ou être transformé en diones (1,6-dione-BaP, 3,6-dione-BaP et 6,12-dione-BaP) par la prostaglandine H synthase (PS). Des ROS peuvent être produits par un cycle oxydo-réducteur par transformation des diones en hydroquinones par NQO1 [Luch 2004]. La 1,6-dione-BaP et la 3,6-dione-BaP peuvent également produire un dérivé dicarboxylique.

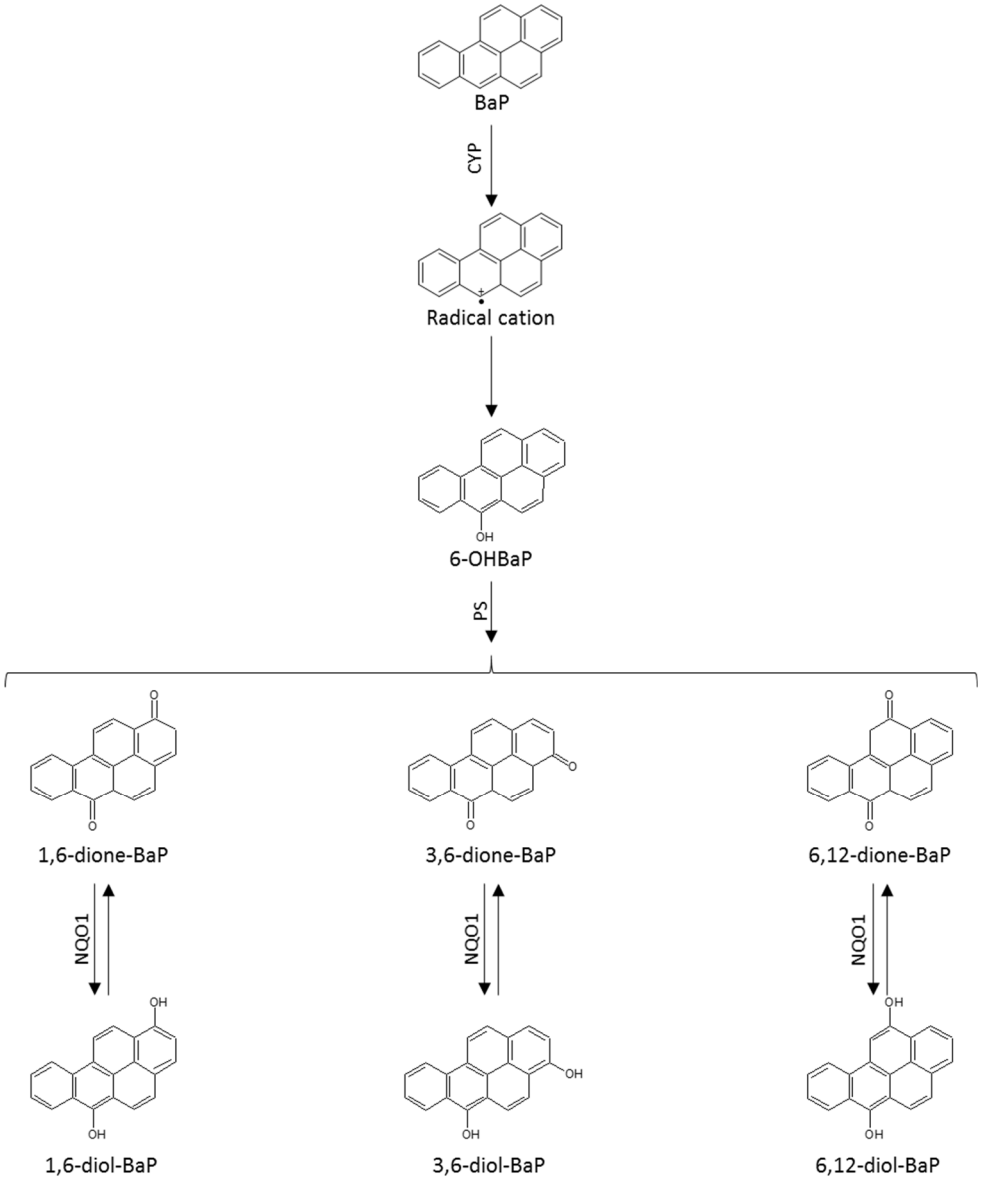


Figure 37 : Métabolites issus de la formation du radical cation du BaP. BaP : Benzo(a)pyrène ; CYP : Cytochrome P450 ; PS : Prostaglandine synthase ; NQO1 : NAD(P)H quinone oxydoreductase 1

VI.2.1.5.2. Biomarqueurs d'exposition au BaP

Le BaP étant le seul HAP classé cancérogène certain pour l'Homme par le CIRC, l'utilisation de ces métabolites urinaires en tant que biomarqueur d'exposition est intéressante pour l'évaluation de l'exposition aux HAP cancérogènes. La difficulté de leur utilisation réside dans la capacité des méthodes analytiques à pouvoir détecter de très faibles concentrations. En effet, croisé à sa faible abondance dans les mélanges émis, le métabolisme complexe du BaP générant une multitude de métabolites qui sont majoritairement éliminés dans les fèces [Peltonen 1995] engendre des concentrations urinaires de l'ordre du 10^{-2} nmol/mol (Tableau 5).

Le BaP suivant toutes les voies de métabolisation des HAP, les métabolites urinaires utilisés comme biomarqueur d'exposition peuvent être issus de voie de détoxication ou de toxication comme celle du diol-époxyde.

a. Biomarqueurs des voies de détoxication

Le 3-OHBaP a été le premier métabolite urinaire du BaP à être utilisé en tant que biomarqueur d'exposition. Parmi les métabolites monohydroxylés du BaP, le 3-OHBaP est l'isomère majoritairement retrouvé dans les urines chez le rat [Bouchard 1997] et le seul détecté chez des sujets non-fumeurs non exposés professionnellement [Toriba 2003]. Etant capable de différencier des non-fumeurs de fumeurs, en population générale [Lafontaine 2006], le 3-OHBaP apparaissait comme un biomarqueur pertinent pour estimer l'exposition aux HAP cancérogènes [Boogaard 2008].

L'étude de la cinétique élimination urinaire du 3-OHBaP chez le rat a révélé un retard d'excrétion par rapport au 1-OHP. La métabolisation des HAP n'est pas l'étape limitante et ne peut pas expliquer ce retard d'excrétion qui a été observé uniquement pour les métabolites monohydroxylés du BaP, mais pas pour les métabolites d'autres HAP tel que le 1-OHP ou d'autres métabolites du BaP tel que le 4,5-diol-BaP [Bouchard 1996, Moreau 2015]. Il semble

que les métabolites monohydroxylés du BaP s'accumulent dans le rein avant d'être excrétés. Cette accumulation pourrait être expliquée par une sécrétion tubulaire au niveau du tube proximal du néphron [Marie 2010]. Elle pourrait également être expliquée par une réabsorption tubulaire due au différent niveau de conjugaison. La fraction non glucurono-conjuguée des métabolites monohydroxylés du BaP serait plus facilement réabsorbée de par leur plus grande hydrophobicité [Moreau 2015].

Ce retard d'excrétion du 3-OHBaP a également été observé chez l'homme (Figure 38). A partir de cette étude, le moment de prélèvement recommandé pour le 3-OHBaP a été le début de poste du dernier jour travaillé de la semaine [Gendre 2004]. Cependant, dans le secteur de la métallurgie, les concentrations urinaires de 3-OHBaP en début de poste du dernier jour de la semaine de travail n'étaient pas significativement plus élevées que celles de fin de poste de l'avant dernier jour [Barbeau 2014]. Suite à cette étude, il a été proposé de prélever les urines de fin de poste du dernier jour de travail lorsque les expositions sont constantes tout au long de la semaine. La première étude comparant différents secteurs industriels datant de 2008 [Forster 2008], le dosage du 3-OHBaP a beaucoup moins de recul que celui du 1-OHP et peu de données sont aujourd'hui disponibles.

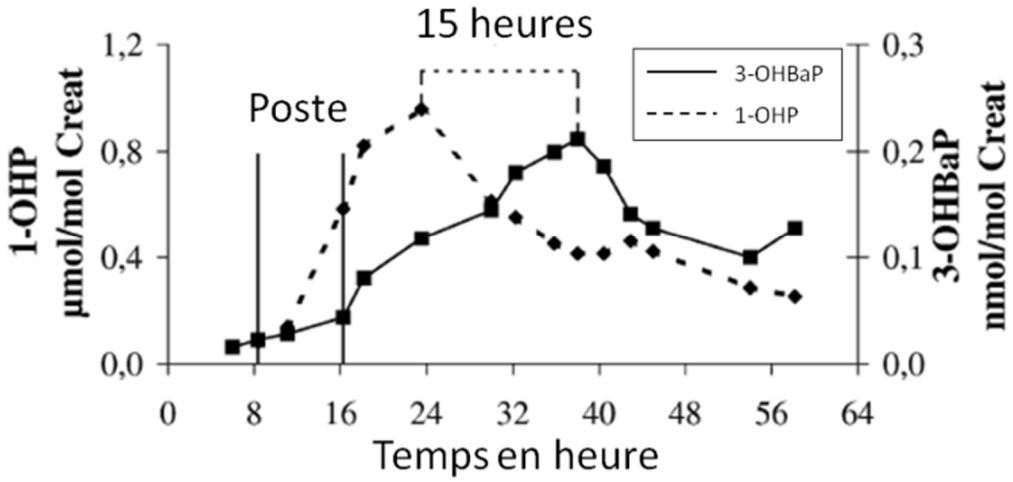


Figure 38 : Cinétiques d'élimination urinaire du 1-OHP et du 3-OHBaP observées après une journée d'exposition professionnelle d'après [Gendre 2004]

Contrairement aux métabolites monohydroxylés du BaP, le 4,5-diol-BaP n'est pas accumulé dans le rein et est éliminé en quantité similaire au 3-OHBaP chez le rat [Moreau 2015]. Le 4,5-diol-BaP n'a pas encore été utilisé comme biomarqueur d'exposition chez l'homme mais pourrait constituer un biomarqueur intéressant.

Le 3-OHBaP et le 4,5-diol-BaP étant issus des voies de détoxication du BaP, le Tetraol-BaP urinaire a été proposé comme biomarqueur d'exposition spécifique de la voie de métabolisation du diol-époxyde, voie de toxification du BaP.

b. Biomarqueur de la voie du diol-époxyde

Le Tetraol-BaP est issu de l'hydrolyse spontanée du BPDE et la quantification de ce métabolite indique la proportion de BaP ayant suivi la voie de métabolisation du diol-époxyde [Simpson 2000a]. Le Tetraol-BaP est également issu, dans une quantité moindre, de l'hydrolyse spontanée des adduits à l'ADN et aux protéines [Barbeau 2013]. Lors de cette hydrolyse spontanée, des diastéréoisomères qui diffèrent par l'agencement tridimensionnel des atomes de carbones asymétriques (C_7, C_8, C_9 et C_{10}) sont produits.

Les diastéréoisomères du Tetraol-BaP produits, dépendent de la conformation initiale du BPDE dont ils sont issus. En prenant les deux isomères du BPDE majoritairement produits, soit le RSRS (syn-BPDE) et le RSSR (anti-BPDE), 4 paires d'énantiomères sont produits (Figure 39). Tandis que l'hydrolyse spontanée de l'anti-BPDE donne majoritairement du trans-anti-Tetraol-BaP (RSRS) [Lin 1998], celle du syn-BPDE donne essentiellement du cis-syn-Tetraol-BaP [Grova 2014].

Des urines de travailleurs d'une fonderie ont été analysées à partir d'une méthode capable de séparer et détecter le cis-syn-, le cis-anti- et le trans-anti-TetraolBaP. Seul le trans-anti-Tetraol-BaP, qui correspond au tetraol majoritairement issu du BPDE majoritaire (anti-BPDE), a été

détecté et quantifié [Simpson 2000a]. Par conséquent, le trans-anti-Tetraol-BaP apparait comme l'isomère le plus intéressant pour être utilisé comme biomarqueur urinaire d'exposition.

Cependant, le trans-anti-Tetraol-BaP peut également être produit à partir du reverse-BPDE. En effet, deux diastéréoisomères sont produits après l'hydrolyse spontanée du reverse-BPDE qui sont le trans-anti-Tetraol-BaP et le trans-syn-Tetraol-BaP [Zhong 2011].

Ainsi, le dosage des énantiomères du trans-anti-Tetraol-BaP est un marqueur de la voie du diol-époxyde et du reverse diol-époxyde. Tandis que l'hydrolyse du BPDE aboutit à la formation du 7R,8S,9R,10S-Tetraol-BaP ((+)trans-anti-TetraolBaP), celle du reverse-BPDE produit du 7S,8R,9S,10R-Tetraol-BaP ((-)trans-anti-TetraolBaP) (Figure 39). Chacun des énantiomères est donc un biomarqueur respectif de la voie du diol-époxyde et du reverse-diolépoxyde. A partir d'une méthode capable de séparer ces deux énantiomères dans les urines, la variabilité interindividuelle quant à l'expression de ces deux voies métaboliques a pu être estimée. Pour les fumeurs et les non-fumeurs, les concentrations urinaires du 7R,8S,9R,10S-Tetraol-BaP (marqueur de la voie du diol-époxyde) est significativement plus élevé que celles du 7S,8R,9S,10R-Tetraol-BaP (marqueur de la voie du reverse-diol-époxyde). Le pourcentage de trans-anti-Tetraol-BaP issu de la voie du diol-époxyde varie de 46 à 78% sur l'ensemble de la population étudiée (fumeurs et non-fumeurs) [Hecht 2014].

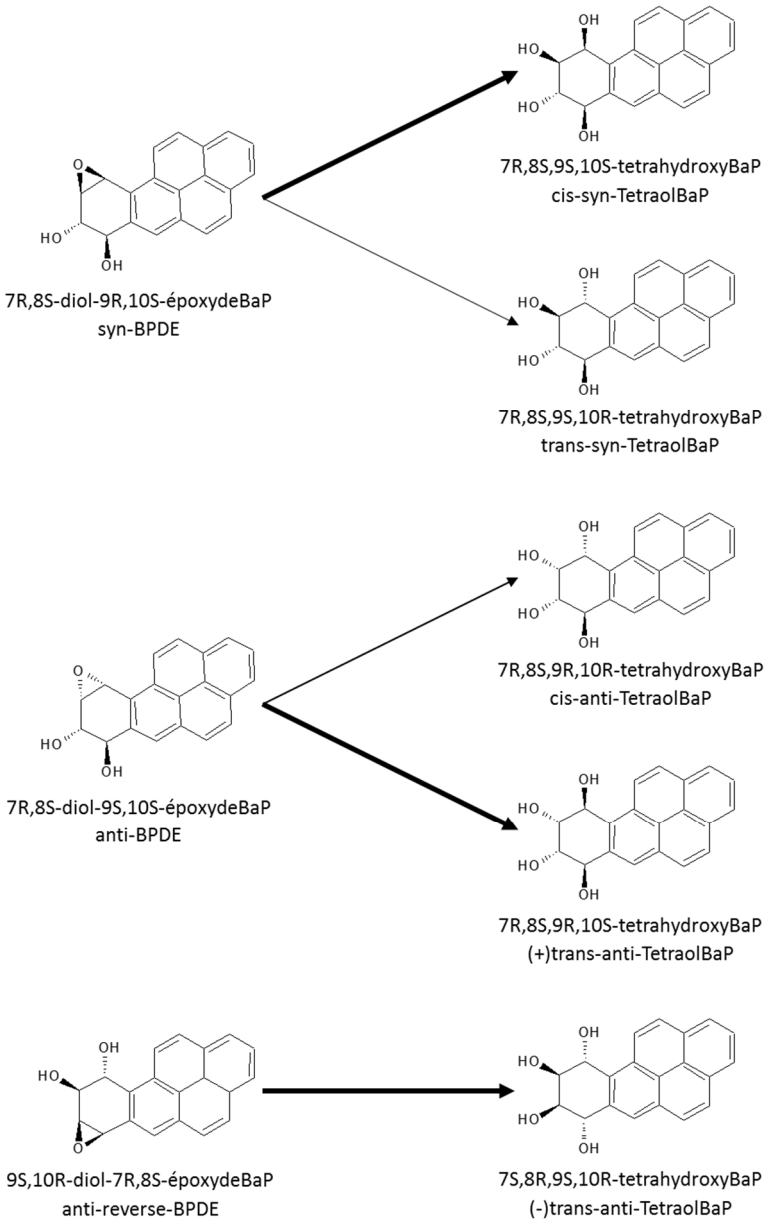


Figure 39 : Origine des isomères du TetraolBaP issus des deux isomères du BPDE majoritaires et du reverse-BPDE

Le BPDE peut être directement conjugué à un glutathion. Le glutathion sera transformé en acide mercapturique avant d'être éliminé dans les urines. Tandis que le reverse-BPDE est facilement conjugué au glutathion, le BPDE l'est difficilement de part un encombrement stérique plus important [Upadhyaya 2010]. Ces derniers n'ont jamais été utilisés chez l'homme.

VI.2.1.6.Synthèse des différents biomarqueurs urinaires

Différents HAP sont utilisés pour suivre l'exposition des populations. Le 1-OHP est considéré comme le « gold standard » pour évaluer l'exposition aux HAP car le pyrène est abondant dans les mélanges et car son élimination urinaire est importante. En revanche, le 1-OHP est peu associé au risque cancérogène puisqu'il est issu d'un HAP non cancérogène et ne suit pas une des voies de métabolisation toxique des HAP [Onyemauwa 2009, Ifegwu 2016]. De plus, les niveaux urinaires de 1-OHP sont faiblement corrélés aux niveaux atmosphériques de BaP ou à ceux des HAP cancérogènes. De par la variation du ratio BaP/Pyrène selon les mélanges émis, le 1-OHP ne reflète pas l'exposition aux HAP cancérogènes ou au BaP [Barbeau 2013].

Par conséquent, l'utilisation de métabolites urinaires du BaP comme biomarqueurs d'exposition apparaît comme plus adaptée à l'estimation du risque cancérogène. Cependant, leurs dosages nécessitent des méthodes très sensibles. La faible abondance du BaP dans les mélanges, croisée à la complexité de son métabolisme et à son élimination essentiellement dans les fèces, engendre des concentrations urinaires très faibles. Ainsi, le 3-OHBaP est un biomarqueur d'exposition spécifique au BaP mais est peu utilisable pour les expositions environnementales et les faibles expositions professionnelles [Leroyer 2010]. Bien que le 4,5-diol-BaP soit éliminé dans les urines en quantité similaire au 3-OHBaP chez le rat il n'a jamais été analysé chez l'homme. Toutefois, contrairement aux métabolites monohydroxylés du BaP, il possède une cinétique d'élimination plus classique car il n'est pas accumulé au niveau du rein [Moreau 2015]. Enfin, le Tetraol-BaP, issu de l'hydrolyse spontanée du BPDE, métabolite cancérogène ultime du BaP, a été quantifié dans les urines de travailleurs d'une fonderie [Simpson 2000a]. [Simpson 2000a]. Par conséquent, il apparait être un biomarqueur urinaire d'exposition intéressant car reflétant la voie de toxification du BaP.

Des méthodes analytiques ont été développées pour analyser les métabolites monohydroxylés du benzo(a)anthracène et du chrysène dans les urines [Onyemauwa 2009]. Des concentrations urinaires (moyenne) de 5 nmol/mol et 0,55 nmol/mol ont respectivement été mesurées pour le 3-hydroxybenzo(a)anthracène et le 3-OHBaP en population générale de Chine [Zhang 2015]. Toutefois, les concentrations urinaires de 3-OHBaP observées dans cette étude sont 50 fois supérieures à celles mesurées chez des non-fumeurs en France [Lafontaine 2006]. Les méthodes analytiques des métabolites urinaires des HAP particulaires ne sont encore pas assez sensibles pour détecter des concentrations urinaires en population générale, notamment dans les populations américaines ou canadiennes [Bouchard 2009, Nethery 2012, Health Canada 2015].

Pour pallier ce problème de sensibilité, les métabolites monohydroxylés issus des HAP gazeux sont largement utilisés pour estimer l'exposition des populations faiblement exposées [Seidel 2008] car les HAP gazeux sont plus abondants dans les mélanges et car ils sont majoritairement éliminés via les urines. Cependant, le Phe et le Flu sont non cancérogènes et seul le Nap est classé cancérogène possible par le CIRC [IARC 2002, IARC 2010]. Récemment, l'utilisation des métabolites hydroxylés des HAP gazeux s'est révélée pertinente pour estimer l'exposition des pompiers alors que le 3-OHBaP n'a pas pu être quantifié [Oliveira 2016]. Les diols pourraient également être une bonne alternative aux métabolites monohydroxylés, notamment la 1,2-dione-Nap et le 1,2-diol-Phe qui sont les plus abondants.

Le dosage urinaire des HAP non métabolisés a également été développé pour permettre d'évaluer cette exposition aux mélanges. Le pyrène urinaire se retrouve en plus faible quantité que le 1-OHP et ne constitue pas une bonne alternative. Le BaP est retrouvé à des concentrations similaires au 3-OHBaP et pourrait constituer pour certains auteurs une alternative au dosage du 3-OHBaP [Campo 2014]. Le Nap et le Phe urinaire sont également de bons biomarqueurs potentiels pour évaluer l'exposition professionnelle aux mélanges de HAP [Sobus 2009c]. En

revanche, les HAP urinaires représentent la fraction non métabolisée de la dose absorbée qui correspond à la part ne présentant pas d'effet toxique.

De par la variabilité des mélanges de HAP émis, la phase gazeuse et particulaire sont analysés séparément pour l'estimation de la dose externe [Ravindra 2008]. En SBEP, il serait également intéressant de mesurer des biomarqueurs de l'exposition aux HAP gazeux et aux HAP particulaires. Evaluer l'exposition aux mélanges de HAP permettrait ainsi de mieux définir le risque sanitaire [Campo 2014].

En parallèle, il a été proposé d'étudier la susceptibilité phénotypique individuelle à partir des concentrations urinaires de plusieurs métabolites d'un même HAP mais issus de voies de métabolisation différentes. Ainsi en complément des métabolites monohydroxylés du Phe , le Tetraol-Phe, issu de la voie du diol-époxyde, avait été initialement proposé comme métabolite représentant la voie de toxification du Phe. En fait, ceci n'est pas le cas car il suit essentiellement la voie du reverse-diol-époxyde contrairement au BaP [Hecht 2010]. Le Tetraol-BaP, qui nécessite des méthodes beaucoup plus sensibles que le Tetraol-Phe, semble être le biomarqueur le plus intéressant à développer car représentant la voie de toxification du BaP. En comparant ses niveaux avec ceux du 3-OHBaP, la susceptibilité phénotypique pourrait ainsi être approchée au niveau individuel [Simpson 2000a].

Tableau 5 : Concentrations urinaires en nmol/mol des différents biomarqueurs d'exposition (de dose interne) aux HAP en population générale et chez les travailleurs des usines de production d'électrodes de carbone.

Métabolite nmol/mol	Population générale (N)		Production éléctrode de carbonne (N)
	Non-fumeurs	Fumeurs	
1-Nap	1075 (1323) [a]	8239 (890) [a]	1962 (34 NF) et 12083 (47 F) [h]
2-Nap	2895 (890) [a]	12162 (1323) [a]	2746 (34 NF) et 13809 (47 F) [h]
1,2-diol-Nap	2166 (20) [b]	8051 (9) [b]	Pas de niveaux publiés
1-Flu	21 (76) [c]	554 (98) [c]	Pas de niveaux publiés
2-Flu	118 (1323) [a]	782 (890) [a]	Pas de niveaux publiés
3-Flu	42 (1319) [a]	411 (890) [a]	Pas de niveaux publiés
9-Flu	149 (1323) [a]	413 (890) [a]	Pas de niveaux publiés
1-Phe	78 (1323) [a]	126 (890) [a]	2342 (67) [i]
2-Phe	36 (1320) [a]	72 (889) [a]	1873 (67) [i] *
3-Phe	33 (1322) [a]	89 (890) [a]	3044 (67) [i]
4-Phe	21 (1319) [a]	12 (879) [a]	176 (67) [i]
9-Phe	10 (NP) [d]	34 (NP) [d]	1873 (67) [i] *
Tetraol-Phe	163 (10) [e]	423 (12) [e]	Pas de niveaux publiés
1-OHP	50 (1321) [a]	138 (889) [a]	960 (26) [j]
3-OHBaP	0,011 (24) [f]	0,023 (27) [f]	0.25 (26) [j]
Tetraol-BaP	0,033 (30) [g]	0,064 (30) [g]	<LD [k]

N : Nombre d'individus ; NP : Non précisé ; NF : non-fumeurs ; F : fumeurs ; LD : limite de détection

[a] : Moyenne géométrique mesurée au sein de la population américaine [NHANES 2015]

[b] : Médiane [Klotz 2011]. Les concentrations présentées en µg/L ont été ajustées à la créatinine.

[c] : Moyene géométrique [St Helen 2012]

[d] : Moyenne géométrique des moindres carrés [Li 2008]. Les concentrations présentées en ng/L ont été ajustées à la créatinine.

[e] : Moyenne géométrique [Hecht 2005]

[f] : Médiane [Lafontaine 2006]

[g] : Médiane [Zhong 2011]

[h] : Médiane [Preuss 2005]

[i] : Médiane [Angerer 1997b]. * signifie que la concentration écrite correspond à la somme des deux métabolites puisque la méthode analytique ne permet pas de séparer ces deux métabolites.

[j] : Médiane [Barbeau 2014]

[k] : LD de 0,02 nmol/L pour une prise d'essai de 10 ml [Bentsen-Farmen 1999]

Lorsque les concentrations n'étaient pas ajustées à la créatinine, la valeur de référence de 1,5 g/L de créatinine a été appliquée [Truchon 2014].

VI.2.2. Quantifications des métabolites urinaires des HAP

La matrice urinaire est une matrice contenant de nombreux composés qui peuvent interférer lors de l'analyse. Pour être en mesure de quantifier les concentrations de métabolites en lien avec des expositions environnementales, les méthodes analytiques doivent être spécifiques et sensibles. Pour ces raisons, les méthodes de dosages urinaires des biomarqueurs de dose interne aux HAP nécessitent, dans la plupart des cas, une étape pré-analytique en amont de la partie analytique.

VI.2.2.1. Etape pré-analytique

L'objectif de l'étape pré-analytique peut être de purifier l'échantillon, de le concentrer, de le changer de phase (de solide à liquide, d'aqueux à organique…) ou les trois en même temps. La nature des analytes et la complexité de la matrice déterminent le niveau de difficulté pour réussir une extraction. Pour les biomarqueurs urinaires de dose interne aux HAP, il existe principalement trois techniques qui sont l'extraction liquide-liquide (LLE), l'extraction en phase solide (SPE) et la micro-extraction en phase solide (SPME).

VI.2.2.1.1. <u>LLE</u>

La LLE consiste à mélanger différents solvants pour former deux phases non miscibles. Ce sont les caractéristiques lipophiles/hydrophiles des composés d'intérêt qui entrent en considération. Dans le cas des biomarqueurs urinaires des HAP, les analytes sont essentiellement des composés hydrophobes en matrice aqueuse. Ainsi, une phase organique est ajoutée à l'urine pour former deux phases. C'est le choix de cette phase organique qui va déterminer le coefficient de partition entre les deux phases. En effet, les composés contenus dans la matrice urinaire vont se partager entre la phase aqueuse et la phase organique jusqu'à atteindre un équilibre. Deux extractions sont souvent nécessaires pour obtenir de bon rendement d'extraction.

En plus d'un changement de matrice, la LLE permet de concentrer l'échantillon lorsqu'elle est suivie d'une évaporation à sec. Cette technique nécessite peu de matériel pour être mise en place. Cependant, elle est peu spécifique et consomme des quantités importantes de solvants. De plus, avec les échantillons aqueux, une émulsion peut se créer entre les deux phases ce qui peut compliquer l'extraction des analytes. Enfin, la LLE est difficilement automatisable [Thurman 1998].

L'extraction des métabolites mono- ou dihydroxylés des HAP a été réalisée à l'aide d'une LLE avec du *n*-hexane [Lee 2003, Bouchard 2009, Truchon 2014] mais du fait de la toxicité de ce solvant, cette méthode est difficilement recommandable.

VI.2.2.1.2. SPE

Contrairement à la LLE, la SPE est une méthode automatisable qui offre la possibilité de changer de matrice, de purifier et de concentrer l'échantillon en une seule étape. Le nombre important de choix de phases stationnaires permet de purifier l'échantillon. En effet, il est possible de jouer sur différentes caractéristiques physico-chimiques de la molécule autres que le caractère lipophile/hydrophile du ou des analytes. Différents mécanismes de rétention sont utilisés tels que la phase normale (qui retient les composés hydrophiles), la phase inverse (qui retient les composés hydrophobes) et la phase échangeuse d'ions [Thurman 1998]. Il existe également des phases capables de former des liaisons covalentes avec les analytes [Simpson 2000b]. La SPE a récemment été comparée à la LLE pour l'extraction des pesticides à partir de cheveux. La SPE est capable d'extraire plus de composés (pesticide et métabolites) avec un meilleur rendement que la LLE. De plus la SPE a permis de diminuer le bruit de fond analytique [Duca 2014].

Le principe de cette technique consiste à faire passer un échantillon (une matrice liquide) dans une cartouche contenant une phase stationnaire. C'est l'affinité des composés avec la phase

stationnaire ou la phase mobile qui va permettre de purifier le ou les analytes. La SPE se déroule en 4 étapes distinctes [Thurman 1998] (Figure 40) :

- **Le conditionnement** de la cartouche SPE : cette étape consiste à faire passer un solvant dans la cartouche afin d'activer la phase stationnaire. Le solvant doit être miscible avec la matrice contenant les analytes.
- **Le chargement** de l'échantillon sur la cartouche SPE : pendant cette étape, l'échantillon est en contact avec la phase stationnaire. Cette étape permet d'éliminer les interférents n'ayant pas d'affinité avec la phase stationnaire.
- **Le ou les lavages** : cette étape a pour but de faire passer une phase mobile dans la cartouche afin d'éliminer un maximum d'interférents sans perdre les analytes.
- **L'élution** : l'objectif est de décrocher l'analyte de la phase stationnaire à l'aide d'une phase mobile pour laquelle l'affinité de l'analyte est plus importante que celle de la phase stationnaire.

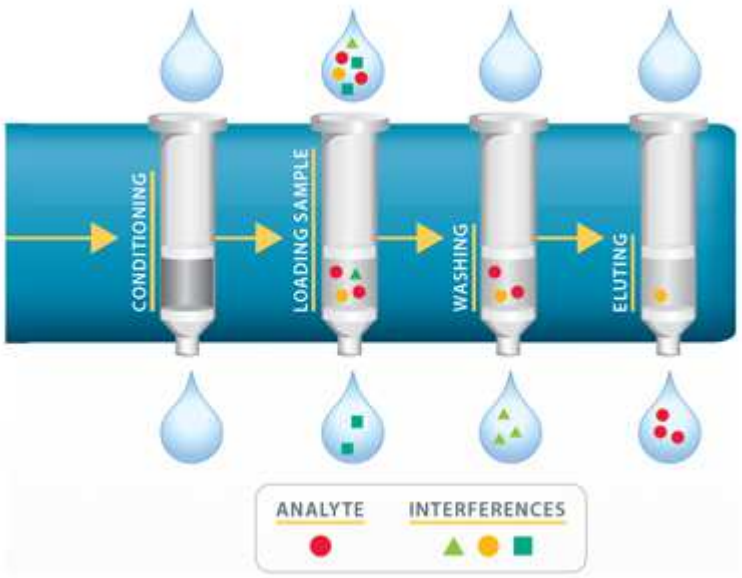


Figure 40 : Différentes étapes de la SPE (source : Gilson)

De plus, des cartouches contenant un polymère d'empreinte moléculaire (MIP) peut être spécifiquement conçu pour une molécule ou d'un groupe de molécule. Par rapport à la SPE classique, ces cartouches ont un meilleur rendement d'extraction et de purification grâce à leur forte spécificité [Yi 2013]. Ces cartouches MIP ont déjà été utilisées pour quantifier les HAP dans la fumée de cigarette [Ho 2010] et il est possible de trouver des cartouches MIP commercialisées pour les HAP [Supelco 2009].

Pour l'analyse des métabolites urinaires des HAP, la SPE reste la méthode la plus utilisée.

VI.2.2.1.3. SPME

La SPME, qui est également automatisable, a été développée dans le but de faciliter la préparation des échantillons avant la partie analytique.

Le principe de la SPME est de placer une petite quantité de phase permettant l'extraction sur un support solide. L'association de la phase et du support est appelée fibre. Cette fibre est plongée directement dans la matrice contenant les analytes. Basée sur le principe d'adsorption, la fibre va être laissée au contact de la matrice jusqu'à atteindre l'équilibre des concentrations entre la matrice (liquide) et la phase stationnaire de la fibre [Pawliszyn 2000].

Ensuite, la désorption dépendra de la technique analytique utilisée. Pour l'HPLC, la fibre sera plongée dans une phase liquide avec laquelle les analytes auront une plus grande affinité qu'avec la phase stationnaire. Pour la GC, la fibre sera chauffée jusqu'à atteindre la température d'évaporation des analytes.

Souvent couplé à de la GC-MS, la SPME est surtout utilisé pour l'analyse des HAP non métabolisés dans les urines car, étant assez volatile, ils ne nécessitent pas d'être dérivatisés avant injection [Campo 2014].

I.1.1.1. Etape analytique

Après l'étape pré-analytique des échantillons, ceux-ci sont analysés à l'aide de méthodes séparatives comme la chromatographie en liquide (HPLC) ou gazeuse (GC) couplée à différentes méthodes de détection tel que la fluorimétrie (FLD) ou la spectrométrie de masse (SM).

L'HPLC-FLD est une technique répandue, peu onéreuse et sensible mais elle manque souvent de spécificité ce qui engendre un bruit de fond élevé, notamment en matrice urinaire, et empêche d'atteindre les LD nécessaires pour estimer les expositions environnementales. Pour les métabolites urinaires qui sont abondants comme le 1-OHP ou les métabolites monohydroxylés des HAP gazeux, cette méthode analytique convient parfaitement [Jongeneelen 1988, Elovaara 2003, Chetiyanukornkul 2006]. Le large choix de phase stationnaire couplé à la diversité des phases mobiles utilisables permet d'optimiser la séparation des composés interférents avec l'analyte. De plus, le montage en série de plusieurs colonnes séparatives permet aussi d'améliorer la séparation. Ainsi, à partir de la technique du « heart-cut » [Campins-Falco 1993], une méthode de routine très sensible (LQ de 0,05 nL) a été développée en HPLC-FLD pour doser le 3-OHBaP tant chez les sujets professionnellement exposés que chez les sujets fumeurs [Barbeau 2011]. Une méthode de dosage du 1-Nap et du 2-Nap a été développée en HPLC-FLD en 3 dimensions qui permet de s'affranchir du pré-analytique [Preuss 2004].

Pour pallier ce manque de spécificité, le couplage à la spectrométrie de masse en mode tandem est utilisé par certains auteurs. Toutefois ce gain de spécificité requiert une dérivatisation chimique et la LC-MSMS ne permet pas d'obtenir une aussi bonne sensibilité pour le dosage du 3-OHBaP que la HPLC-FLD [Sarkar 2010, Zhang 2015, Hu 2016]. La grande spécificité de la LC-MSMS permet d'être moins exigeant au niveau de la séparation chromatographique et cette technique est plus encline à développer des méthodes multi-analytes lorsque les transitions MRM (Multiple Reaction Monitoring) sont différentes entre les métabolites. Ainsi, une

méthode capable de doser 16 métabolites monohydroxylés de différents HAP a été développée en LC-MSMS avec des limites de quantification (LQ) comprises entre 1 et 10 ng/L [Onyemauwa 2009].

La chromatographie gazeuse est une méthode séparative également spécifique qui offre une meilleure résolution des pics chromatographiques que la chromatographie liquide. De plus, l'importante spécificité de la spectrométrie de masse est indépendante de la technique séparative à laquelle elle est couplée. L'inconvénient majeur de la GC-MS est que seuls les composés volatiles non polaires peuvent être directement analysés. Pour les analytes polaires ou non volatiles, il est nécessaire de procéder à une réaction de dérivatisation en amont de l'analyse [Grova 2014]. Ainsi, après dérivatisation, les métabolites urinaires des HAP les plus abondants sont analysés en GC-MS [Serdar 2003, Bravo 2005, Campo 2008, Shin 2011]. Couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem, la GC permet l'analyse simultanée de plusieurs métabolites. Plus de 50 métabolites monohydroxylés de HAP ont été analysés en GC-MSMS dans le cerveau et les poils de rats. La méthode a respectivement permis de détecter 28 et 20 métabolites dans chacune des deux matrices [Grova 2011, Grova 2013]. La méthode de dosage du Tetraol-BaP urinaire la plus sensible (LQ de 0,01 ng/L) a été développée en GC-MSMS avec une ionisation chimique négative (NCI) [Zhong 2011]. Les méthodes de dosage de ce métabolite sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Résumé des caractéristiques techniques des méthodes de dosage du Tetraol-BaP urinaire (adapté de [Barbeau 2013])

Référence	Analytes	Etapes pré-analytique	Etapes analytique	Sensibilité (ng/l)
[Hecht 2014]	(-) *trans-anti*-BaP-tétraol (RSRS) (+) *trans-anti*-BaP-tétraol (SRSR)	Double SPE : - polymère Strata-X - Oasis MAX Séparation chirale par HPLC Dérivatisation (BSTFA)	GC-NCI-MSMS	
[Zhong 2011]	(±) *trans-anti*-BaP-tétraol	Double SPE : - polymère Strata-X - acide phénylboronique Dérivatisation (BSTFA)	GC-NCI-MSMS	LQ = 0,01
[Hecht 2010]	(-) *trans-anti*-BaP-tétraol (RSRS) (+) *trans-anti*-BaP-tétraol (SRSR)	Double SPE : - polymère Strata-X - acide phénylboronique Séparation chirale par HPLC Dérivatisation (BSTFA)	GC-NCI-MSMS	LD = 3
[Wang 2003a, Wang 2003b]	(±) *trans-anti*-BaP-tétraol	SPE cartouches EnvirElut PAH	MicroLC-Qtof/MS	
[Wu 2002]	(±) *trans-anti*-BaP-tétraol	Double SPE : - tC18 - acide phénylboronique Perméthylation Extraction liquide	GC-NCI-MS	LD = 0,2
[Simpson 2000a]	(±) *trans-anti*-BaP-tétraol (±) *cis-anti*-BaP- tétraol (±) *cis-syn*-BaP-tétraol	Double SPE : - tC18 - acide phénylboronique Perméthylation Extraction liquide Séparation des isomères par HPLC	GC-NCI-MSMS	LQ = 0,96 LD = 0,32
[Bentsen-Farmen 1999]	(±) *trans-anti*-BaP-tétraol	SPE cartouches C18	Double HPLC : - immuno-affinité - phase inverse FLD	LD = 0,64
[Bowman 1997]	(±) *trans-anti*-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-NCI-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 : spectroscopie à fluorescence synchronisée.

VII. Synthèse et objectif du travail de thèse : Utiliser les métabolites urinaires des HAP comme biomarqueurs de l'exposition.

VII.1. Synthèse

Les HAP sont une famille de molécules ubiquitaires appartenant au groupe des polluants organiques persistants. Emis dans l'atmosphère sous forme de mélanges complexes issus de sources multiples, les HAP sont sous forme de gaz ou adsorbés sur des particules fines en suspension.

Ainsi, l'ensemble des populations sont exposées aux HAP par voie respiratoire et digestive. En plus des expositions environnementales, les travailleurs de certains secteurs professionnels sont exposés à des niveaux plus élevés de HAP par voie respiratoire mais aussi cutanée.

Après absorption dans l'organisme, les HAP vont se distribuer préférentiellement dans le tissu adipeux de par leur caractéristique lipophile. Pour être éliminés par voie biliaire (fèces) ou via les urines, les HAP vont être métabolisés par les enzymes de biotransformation.

Toutefois, lors de cette biotransformation, les HAP peuvent être bioactivés ce qui engendre la production de métabolites réactifs capables de former des adduits à l'ADN et aux protéines. La métabolisation des HAP va également augmenter la production de ROS qui exercent eux aussi des effets toxiques au niveau cellulaire.

Ces différents dommages à l'ADN engendrent des mutations. A long terme, les expositions professionnelles peuvent aboutir à des cancers qui sont majoritairement situés au niveau des poumons, de la peau et de la vessie. Emis en mélanges complexes de composition variable, les effets cocktails des HAP au niveau de l'organisme sont encore méconnus. Ainsi, en plus d'avoir déterminé le potentiel cancérogène de certains HAP de manière individuelle, le CIRC et l'UE

ont également classé certains mélanges et certains secteurs professionnels comme cancérogènes certains ou probables pour l'homme.

Du fait de leurs effets toxiques, la surveillance de l'exposition des populations aux HAP est nécessaire pour estimer le risque sanitaire. Bien que les mesures atmosphériques permettent de caractériser les sources d'émission, la SBE apparait comme plus pertinente car plus proche de l'effet toxique. Celle-ci nécessite cependant des études préliminaires pour choisir des biomarqueurs adaptés avant d'être utilisés pour l'estimation du risque sanitaire.

Plusieurs types de biomarqueurs existent pour la SBEP aux HAP. Les plus utilisés restent les biomarqueurs urinaires d'exposition qui mesurent la dose interne, notamment le 1-OHP, métabolite du pyrène. Toutefois, sa seule utilisation pour estimer l'exposition aux mélanges de HAP est aujourd'hui controversée. Le 3-OHBaP a récemment été développé car il est issu du BaP, le seul HAP classé cancérogène certain pour l'homme et car il apparait comme plus adapté pour estimer l'exposition aux HAP cancérogènes. D'autres métabolites urinaires sont également utilisés pour la SBEP comme les métabolites monohydroxylés des HAP gazeux, comme le Nap, le Flu et le Phe, car ils sont les plus abondants dans les mélanges environnementaux.

VII.2. Objectifs du travail de thèse

Ce travail a pour objectif de développer et de valider un ensemble de biomarqueurs permettant une surveillance biologique pertinente et efficace de l'exposition aux HAP tant au niveau professionnel qu'environnemental, mais aussi, d'approcher les éventuels effets cocktails sur la métabolisation du BaP résultant de cette multi-exposition.

Pour remplir cet objectif, une population de sept travailleurs non-fumeurs d'une usine de production d'électrode de carbone a été étudiée. Les urines ont été collectées en début et fin de

poste pendant une semaine complète de travail. A la fin de cette dernière, toutes les urines émises ont été récupérées, dans leur intégralité, pendant le week-end (48h).

La première partie du travail de thèse a été d'étudier les facteurs de variabilité des niveaux urinaires de 3-OHBaP et du 1-OHP et de comparer la cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP à celle du 1-OHP. A partir des urines collectées pendant la semaine de travail, la relation entre les niveaux atmosphériques et les concentrations urinaires aux différents moments de prélèvement a été étudiée. Les paramètres de la cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP et du 1-OHP ont été estimés à partir des urines du week-end. Les modes de correction de la diurèse (créatinine et SG) ont également été comparés.

La deuxième partie de ce travail a été de développer, au sein du laboratoire, une méthode de dosage des métabolites monohydroxylés du Nap, du Flu et du Phe en GC-MS. A partir de cette méthode de dosage, les mêmes urines ont été analysées. L'objectif étant d'étudier les différents métabolites urinaires des trois HAP gazeux les plus abondants pour sélectionner les métabolites les plus intéressants en tant que biomarqueur d'exposition professionnelle.

Enfin, la troisième partie du travail de thèse a été de développer une méthode de dosage du Tetraol-BaP urinaire en GC-MSMS permettant d'atteindre une LD de 0,05 ng/L d'urine, afin de pouvoir estimer les expositions en milieu professionnel et en milieu environnemental. Les urines des mêmes salariés ont également été analysées afin de valider l'utilisation possible du Tetraol-BaP en tant que biomarqueur d'exposition.

Ce travail devrait permettre l'utilisation de différents biomarqueurs d'exposition pour évaluer l'exposition dans les différents milieux professionnels. Le but étant de pouvoir un jour effectuer une SBEP plus pertinente qui prend en compte l'exposition aux mélanges de HAP, afin de mieux évaluer les risques sanitaire.

Chapitre 2 :

Surveillance biologique de l'exposition aux HAP cancérogènes de la phase particulaire

I. Contexte

Le 1-OHP urinaire est aujourd'hui considéré comme le « gold standard » des biomarqueurs d'exposition aux HAP. Il est issu de la métabolisation du pyrène, un HAP non cancérogène émis sous forme gazeuse et particulaire. De ce fait, le 1-OHP semble peu adapté pour le suivi de l'exposition aux HAP cancérogènes qui sont majoritairement contenus dans la phase particulaire.

Le 3-OHBaP a ainsi été proposé pour le suivi de l'exposition au BaP et aux HAP cancérogènes. Bien que moins abondant dans les urines, des dosages ont été réalisés dans différents secteurs professionnels [Forster 2008]. Le 3-OHBaP reste encore peu utilisé notamment parce qu'il nécessite une méthode de dosage très sensible. De plus, sa cinétique d'élimination urinaire a été peu étudiée chez l'homme. Alors qu'un prélèvement en début de poste du dernier jour travaillé de la semaine (équivalent à un fin de poste plus 16h) avait été préconisé par l'institut national de recherche et de sécurité (INRS) du fait d'un retard d'excrétion du 3-OHBaP par rapport au 1-OHP [Gendre 2004], aucune différence significative n'avait été observée entre les concentrations urinaires de 3-OHBaP en début de poste du dernier jour de la semaine de travail et celles de fin de poste de l'avant dernier jour après une semaine d'exposition professionnelle [Barbeau 2014].

L'objectif de cette partie est d'étudier les sources de variabilités des niveaux urinaires de 3-OHBaP et du 1-OHP :

- La première partie consiste à étudier la variation des niveaux urinaires des 2 biomarqueurs en début de poste et en fin de poste en fonction des niveaux atmosphériques en HAP parents contenus dans la phase gazeuse et particulaire (article 1).

- La deuxième partie consiste à étudier les cinétiques d'élimination urinaire des deux biomarqueurs après une semaine d'exposition professionnelle pour apporter des données supplémentaires afin de déterminer le moment optimal de prélèvement des urines. En parallèle, les moyens de correction à la diurèse (créatinine et SG) ont été comparés pour déterminer lequel était le plus adapté (article 2).

II. Influence des concentrations atmosphériques sur les concentrations urinaires

II.1. Article 1

Int Arch Occup Environ Health
DOI 10.1007/s00420-015-1042-1

ORIGINAL ARTICLE

Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: relations between atmospheric mixtures, urinary metabolites and sampling times

Damien Barbeau · Simon Lutier · Vincent Bonneterre · Renaud Persoons · Marie Marques · Claire Herve · Anne Maitre

Received: 14 October 2014 / Accepted: 25 February 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract
Purpose Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can be assessed by either air monitoring or biomonitoring using urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) or 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP). The aim of this study was to understand the links between atmospheric PAHs and urinary metabolites, in order to improve the biomonitoring strategy for assessing carcinogenic risk.
Methods Personal air sampling for pyrene and BaP measurements, and urines for 1-OHP and 3-OHBaP analyses of seven workers from electrode production plant were collected every day of the working week.
Results High variability of atmospheric levels between activities and between days was observed, especially for gaseous pyrene. No correlation was found between urinary metabolites: 1-OHP maximum levels occurred for "electrode extrusion" activity; those of 3-OHBaP occurred for "raw materials dispatcher." Sixty percentage of 3-OHBaP maximum levels were observed in urines collected at the beginning of shift the last workday. Those of 1-OHP occurred at different sampling times, depending on the gaseous pyrene levels (not stopped by P3 respirators). Dermal absorption of PAHs was confirmed by significant effect of particulate pyrene on 1-OHP in the samples collected the morning of the following day ($p < 0.02$, $n = 25$).
Conclusions Lack of correlation between metabolites concentrations emphasizes the non-relevance of 1-OHP, from a non-carcinogenic gaseous and particulate compound, and the great interest of 3-OHBaP, from carcinogenic BaP. Its slower urinary elimination prevents the risk of exposure underestimation, and urinary analysis should be performed at the beginning of shift the end of working week, especially in case of high exposure variability.

Keywords Polycyclic aromatic hydrocarbons · Occupational exposure · Biomonitoring · 1-hydroxypyrene (CAS: 5315-79-7) · 3-hydroxybenzo(a)pyrene (CAS: 13345-21-6)

D. Barbeau · S. Lutier · V. Bonneterre · M. Marques · A. Maitre (✉)
Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, Université Joseph Fourier – Grenoble 1, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France
e-mail: anne.maitre@ujf-grenoble.fr

D. Barbeau · R. Persoons · C. Herve · A. Maitre
Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, DBTP, IBP, CHU de Grenoble, CS 10217, Grenoble 38043, France

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants emitted during incomplete combustion of organic matter and coal or petroleum distillation. They are found in the atmosphere as complex gaseous and particulate mixtures, whose composition varies considerably according to the emission source. Within this chemical family, benzo(a)pyrene (BaP) is classified as carcinogenic to humans (group 1) by the International Agency for Research on Cancer (IARC 2010). Humans are exposed through tobacco consumption, diet, urban pollution and industrial emissions. Occupational exposures occurring during coal-tar distillation, paving and roofing with coal-tar pitch or aluminum production are responsible for lung, skin and bladder cancers (IARC 2012).

To assess occupational health risk, the monitoring of PAHs exposure includes the measurement of airborne

Published online: 06 March 2015

concentrations and biological monitoring using biomarkers. In the industrial sector of carbon electrode production, BaP median concentrations range from 0.4 μg/m^3 for maintenance activities to 1.1 μg/m^3 for cathode impregnation with liquid pitch, and in coke plants levels up to 6.2 μg/m^3 (Angerer et al. 1997; Van Delft et al. 1998; Van Schooten et al. 1995). These studies showed the great variability of atmospheric levels of PAHs between and within industries. However, air monitoring only assesses potential inhalation exposure and does not take into account skin absorption and the wearing of personal protection equipment (Van Rooij et al. 1993).

Quantification of the internal dose is indeed the best way to assess occupational exposure and health risks. Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), a metabolite of pyrene, has been proposed by Jongeneelen for the biomonitoring of PAHs exposure (Jongeneelen et al. 1985). The analysis is simple and reliable, urinary levels are frequently measured in the range of μmole/mole of creatinine (μmol/mol), but it assesses pyrene absorption, a non-carcinogenic PAH. Urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP), a metabolite of BaP, would be a more appropriate biomarker to assess carcinogenic PAHs exposure, because urinary concentrations are correlated with DNA adducts in the lungs of rats after intravenous injection of BaP (Marie-Desvergne et al. 2010). However, to perform biomonitoring of occupational carcinogenic PAHs exposure using this metabolite, a highly sensitive routine analytical method is necessary, because urine levels are 1000 times lower than those of 1-OHP (Barbeau et al. 2011). Animal studies have shown that urinary concentrations of 3-OHBaP represent only 0.1–0.2 % of the BaP dose, due to a complex metabolism producing several different metabolites that are mainly excreted in feces (Marie et al. 2010; Payan et al. 2009). Maximum urinary levels found in workers were 5 nmol/mol and 19.5 μmol/mol for 3-OHBaP and 1-OHP, respectively, in carbon anode production; 5.3 nmol/mol and 7 μmol/mol in carbon cathode production; and 1.1 nmol/mol and 2.9 μmol/mol in silicon production (Barbeau et al. 2014). Mean end-of-shift levels of urinary 3-OHBaP were as low as 0.2 nmol/mol in coke production workers and 0.5 nmol/mol for workers on a graphite electrode production line (Forster et al. 2008).

Knowledge of the elimination kinetics of the urinary metabolite, used as an exposure biomarker, is essential in order to define the urine sampling strategy. Levels of urinary 1-OHP reach maximum values 3–9 h after the end of work (Bouchard and Viau 1999), while the excretion peak of 3-OHBaP occurs on average 15 h following occupational exposure, with a range of 3–24 h post-shift, depending on the tasks considered (Gendre et al. 2002, 2004). The delay in urinary elimination of 3-OHBaP is partly explained by the storage of BaP in organism and the retention of its metabolite in kidneys (Marie et al. 2010). However, absorption routes and exposure frequency also influence biomarker elimination. The mean urinary half-life of 1-OHP reached 3.9 h in the case of ingestion of barbecued chicken, compared with 6 h after cigarette smoke (Li et al. 2012; St Helen et al. 2012). This value increased to 13 h after occupational exposure if the pyrene entered the organism via the skin, such as during creosote or asphalt application (Sobus et al. 2009b; Viau et al. 1995; Viau and Vyskocil 1995). A pre-shift sample on Monday and a pre-shift or post-shift sample on Friday should be collected to analyze 1-OHP when the main route of exposure is via the skin or pulmonary absorption, respectively (Bouchard and Viau 1999). However, it is difficult to discriminate between the major absorption routes, because pyrene is emitted into the atmosphere in gaseous form which is mainly absorbed through the lungs and in particulate form which can be absorbed both via a pulmonary route and a dermal route after deposition of particles on the skin (Sobus et al. 2009a). Although the elimination kinetics of 3-OHBaP has less been studied than the one of 1-OHP, Gendre et al. (2004) proposed to collect urinary samples at the beginning of shift the day after occupational exposure, to take into account its excretion delay. However, no difference was observed between the 3-OHBaP levels found at the end of the penultimate workday shift and those at the beginning of the last workday shift, among more than 100 workers exposed consecutively throughout the working week (Barbeau et al. 2014). In this last study, BaP exposure occurred over several consecutive days, while, in the study of Gendre et al. (2004), workers were exposed for a single day.

The aim of the present work was to better understand the factors affecting the variability of urinary levels of 3-OHBaP and 1-OHP among workers during a whole working week, in order to select the best biomarker and to set the best sampling time for assessing carcinogenic risk. Pre-shift and post-shift urine samples were collected every day of the working week as well as individual air samples. Urinary levels of the two metabolites measured at different sampling times were compared to determine the relative importance of cutaneous and respiratory absorption routes. Urinary concentrations were also compared with daily airborne concentrations of BaP and pyrene (both gaseous and particulate pyrene) in order to study the influence of the chemical composition of the aerosol, and in particular the gaseous to particulate PAHs ratio.

Materials and methods

Study population

The subjects were seven non-smoking, healthy, male volunteers, between 30- and 60-year old, working in a pre-baked

Table 1 Activities and protective equipment for each worker, each day (D) of the working week

Day of the working week	Activity	Collective protection	Respiratory protection	Skin protection
Carbon sector				
Worker 1 (W1)				
D1	Installation cleaning Carbon electrode extrusion	Air curtain	P3 non-powered	None
D2–D3	Carbon electrode extrusion		None	
D4	Installation cleaning Carbon electrode extrusion			
Worker 2 (W2)				
D1	Installation cleaning	None	None	Handling gloves
D2			P3 powered	
D3	Overhead crane operator		None	
D4			P3 powered	
Worker 3 (W3)				
D1–D4	Mobile raw material dispatcher	None	P3 non-powered	Handling gloves
Worker 4 (W4)				
D1–D5	Non-mobile raw material dispatcher	None	P3 non-powered	Handling gloves
Graphite sector				
Worker 5 (W5)				
D1	Mobile raw material dispatcher	None	None	Handling gloves
D2–D5			P3 non-powered (paper)	
Worker 6 (W6)				
D1–D4	Safety rounds in the installations	None	P3 powered	None
D5	Administrative tasks			
Worker 7 (W7)				
D1	Forklift driver	None	P3 non-powered	Handling gloves
D2	Graphite electrode extrusion			
D3	Outdoor painting		None	
D4	Graphite electrode extrusion		P3 non-powered	
D5	Installation cleaning Graphite electrode extrusion			

electrode production plant. Workers 1–4 and 5–7 were involved in carbon and graphite sectors, respectively. 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 and daily tasks performed, as well as the collective and personal protective equipment (Table 1).

While activities of workers 3–5 were relatively unchanged, those of workers 1, 2, 6 and 7 varied during the week. Installation cleaning consists of sweeping and air blowing deposited particulate matter. Electrode extrusion refers to carbon or graphite electrode molding with a hot press. The overhead crane operator and the forklift driver move and store the electrodes. Dispatchers supply the press with raw materials from different places (mobile dispatcher) or from one workstation (non-mobile dispatcher). Safety rounds of the installations correspond to checking the proper functioning of technical facilities, while administrative tasks are performed in an office.

There was no collective protective equipment in the workplaces except for worker 1 (W1) who was in a cabin, where PAHs emissions were confined by an air curtain during carbon electrode extrusion. Respirators were consistently of type P3. W5 wore a disposable paper mask, while the other workers wore reusable respirators, either non-powered rubber half masks (W1, W3, W4, W7) or hoods powered with cartridges worn at the belt (W2 and W6). Handling gloves were worn by all workers, except for W1 and W6.

Urine and atmospheric sample collection

All samples were collected under the responsibility of the occupational health physician of the company as part of the routine follow-up of workers. Urine samples were collected

at the beginning (BS) and at the end of shift (ES) every day of the working week. Three subjects (W1, W2 and W3) worked 4 days and provided eight samples while four subjects (W4, W5, W6 and W7) worked 5 days and provided ten samples. Samples were collected in 50-mL propylene bottles and stored at −20 °C until analysis.

For each worker, personal samples were collected every workday, over 7 h, according to the methods recommended in France (AFNOR 1995). An opaque polypropylene cassette holding a 37-mm-diameter quartz filter from Whatman (Clifton, USA) was connected in series to an ORBO 43 Supelpak-20 XAD2 tube from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Air sample squeezed through filter, where BaP and pyrene present in the particulate phase (pPyr) were trapped, before to reach the XAD2 cartridge where gaseous pyrene (gPyr) was adsorbed. Filters are designed to retain particles with a diameter less than 1 µm. This sampling device was connected to a pump whose flow rate was regulated at 1 l/min. The stability of the air flow during sampling was checked by comparing rates at the beginning and the end of sampling and a variation greater than 5 % resulted in the exclusion of the sample. Afterward, the sample material was stored at −20 °C until analysis.

Urinary analyses

After thawing the urine overnight, the 3-OHBaP analysis was conducted using the method previously described by Barbeau et al. (2011). Briefly, a 10 mL aliquot of urine was diluted in acetate buffer before enzymatic hydrolysis by β-glucuronidase/arylsulfatase from Roche (Mannheim, Germany). The sample was purified and concentrated by automated solid phase extraction from Gilson (Villiers-le-Bel, France) using Sep-Pak C18, 500 mg with a capacity of 6 mL from Waters (Guyancourt, France). Urinary 3-OHBaP was quantified by high-pressure liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FLD) from Waters. The "heart-cut" technique was used, with a first sample separation performed on a Supelcosil LC-18 purification column (50 mm × 4 mm, 5 µm) from Sigma-Aldrich and a second separation performed on a PAH-C18 analytical column (250 mm × 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. (1988). Briefly, a 2 mL aliquot of urine was diluted in acetate buffer before enzymatic hydrolysis and directly injected into a HPLC-FLD system from Waters. Online 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 (Billerica, USA). 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. All metabolites' concentrations were adjusted to urinary creatinine (mol/mol).

Atmospheric sample analysis

Fifteen milliliters of HPLC grade dichloromethane was added to each filter. After ultrasonic extraction for 30 min, the filter was removed, and the solvent was evaporated using a rotary evaporator at 30 °C. The dry residue was taken up in 1 mL of HPLC grade acetonitrile and filtered through a 0.22-µm filter before analysis. The XAD2 tube was eluted with 2 mL acetonitrile. PAHs were measured by HPLC-FLD using a HPLC Alliance 2695 separation module and a 2475 Multi λ Fluorescence Detector from Waters. Chromatographic separation was performed by injecting 30 µL on a PAH-C18 column (250 mm × 3 mm, 5 µm) from Waters and elution with an acetonitrile/water gradient. The column oven temperature was set at 32 °C. The wavelengths (excitation–emission) used were 333–390 and 296–405 nm for Pyr and BaP, respectively. The LQ was 0.25 pmol/tube (0.05 ng/tube) for gPyr, 0.25 and 0.20 pmol/filter (0.05 ng/filter) for pPyr and BaP, respectively.

Data analyses

Concentrations of metabolites and atmospheric PAHs lower than the LQ were assigned a value equal to half the LQ for graphics and statistical analyses. Total pyrene (tPyr) was the sum of gPyr and pPyr levels. Ratios between urinary concentrations of 3-OHBaP at the end of shift +16 h (ES16) and 1-OHP at ES (ES16/ES), or between urinary concentrations of the two metabolites obtained at the same sampling time, at ES (ES/ES) or ES16 (ES16/ES16), were calculated. Nonparametric Wilcoxon test and Spearman coefficient (rhô) were performed with SPSS Statistics 22 software (IBM) to compare paired samples and to study correlations, respectively. Due to the repeated measures sampling design, linear mixed effects models were performed with R 3.1.2 software (R Foundation for Statistical Computing) to estimate relations between urinary metabolites concentrations and atmospheric PAHs levels, using the "lme" function from "nlme" package (Pinheiro and Bates 2000). Log-transformed values of atmospheric PAHs levels and urinary metabolites concentrations at different sampling times were included as fixed effects. Workdays,

i.e., the repetitions, were included as random effect. For all tests, p values below 0.05 were considered significant.

Results

Atmospheric PAHs measurements

All BaP analyses from elution of XAD2 tubes were below the LQ, showing that BaP was trapped on filters.

Individual levels of gPyr, pPyr and BaP and concentrations ratios of gPyr/pPyr, BaP/gPyr, BaP/pPyr and BaP/tPyr are shown in Table 2.

Levels of gPyr ranged from 10.3 to 876.3 ng/m^3 in the carbon sector and from 0.9 to 143.4 ng/m^3 in the graphite sector, over the 5 days. The highest levels were found in carbon electrode extrusion (W1) and the lowest levels during raw material dispatching in the graphite sector (W5). pPyr levels were less variable than those of gPyr and ranged from 27.1 to 289.8 ng/m^3 in the carbon sector and from 7.2 to 239.3 ng/m^3 in the graphite sector. The highest level was found in carbon sector raw material dispatching (W4) and the lowest during safety rounds in the graphite sector (W6). Pyrene levels also varied between days of the working week for a given worker. The highest variability of gPyr was found for W7, with a relative standard deviation (RSD) close to 140 %, while that of pPyr was found for W2, with a RSD_{max} equal to 95 %. pPyr levels were higher than those of gPyr ($p < 0.05$), with mean gPyr/pPyr ratios lower than 0.5, except for W4 and W1. Indeed, carbon electrode extrusion (W1) was responsible for the emission of significant amounts of gaseous PAHs, with an average gPyr/pPyr ratio close to 3.8. This ratio was highly variable between days of the working week, especially for W3 in the carbon sector (RSD > 110 %) and for W6 and W7 in the graphite sector (RSD ≈ 140 %).

The variability of BaP airborne concentrations was similar to that of pPyr and ranged from 26.9 to 425 ng/m^3 in the carbon sector and from 8.8 to 231.7 ng/m^3 in the graphite sector. For the two sectors, the highest levels were found for dispatching tasks. Levels of BaP were less variable than those of gPyr and pPyr between days of the working week, with a RSD_{max} lower than 80 % for W7. While BaP/gPyr ratios were very variable from one task to another (from 0.23 to 49.03) and between days (with RSD greater than 80 %, except for W3), BaP/pPyr ratios were much more homogenous between different tasks and days (RSD ranged from 14 to 54 % depending on the worker). Finally, average BaP/tPyr ratios were close to one, revealing an amount of BaP similar to that of tPyr ($p > 0.05$), except for carbon electrode extrusion (W1) where BaP was six times lower than tPyr.

Correlations were nonsignificant between atmospheric concentrations of gPyr and pPyr (rhô = 0.24, $p > 0.05$, $n = 32$) and between gPyr and BaP (rhô = 0.18, $p > 0.05$, $n = 32$), while pPyr and BaP concentrations were well correlated (rhô = 0.78, $p < 0.05$, $n = 32$). Thus, correlation between tPyr and BaP was significant but poor (rhô = 0.48, $p < 0.05$, $n = 32$).

Urinary concentrations of 3-OHBaP and 1-OHP

Only three out of 64 samples were below the LQ for 3-OHBaP and none for 1-OHP. Levels were higher in urine collected at the end of shift the end of week (ESEW) than at the beginning of shift the beginning of week (BSBW) for 1-OHP ($p < 0.02$) and 3-OHBaP ($p < 0.02$; Table 3).

3-OHBaP levels ranged from 0.02 to 0.80 nmol/mol. W1 had very low levels throughout the week, while the highest level was measured for W6 at the end of the working week. Maximum 3-OHBaP levels were observed at the beginning of the last workday shift (BSEW) for four out of seven workers (W2, W3, W4 and W6) and on ES for the other workers (W1, W5 and W7). No significant difference was found between the urinary concentrations in samples obtained at BSEW and those from ES on the day before ($p > 0.05$, $n = 7$).

Urinary concentrations of 1-OHP were more variable and ranged between 0.08 and 2.08 µmol/mol. The lowest levels were found for W2 and W4. W1 had a very high level (higher than 2 µmol/mol) at the end of the second workday. The maximum always occurred at ES, for four workers on the second day (W1, W3, W4 and W7), for two at the end of the week (W5 and W6), for one on the third (W2) and another on the fourth day (W4). The concentrations of 1-OHP were significantly lower in urine samples taken at BSEW than in those from ES the day before ($p < 0.02$, $n = 7$).

Median values of 3-OHBaP/1-OHP ratios were close for ES16/ES, ES/ES and ES16/ES16, for a given worker. W1 showed the lowest values, from 0.03 to 0.04, while those of the others ranged from 0.23 (W2) to 0.47 (W3). Ratios were also variable between days of the working week: RSD ranged from 14 % (W2) to 66 % (W6) for ES16/ES, from 31 % (W5) to 81 % (W6) for ES/ES and from 20 % (W3) to 62 % (W6) for ES16/ES16.

Urinary concentrations of the two metabolites and corresponding atmospheric pyrene and BaP levels during the working week are summarized in Fig. 1. There was no regular increase in urinary concentrations throughout the working week, and levels found at the ES the second day were close to those at ESEW. Only W5 for 1-OHP and W6 for the two metabolites showed highest biomarkers levels at the end of the working week. Conversely, the 1-OHP level of W1 was three times higher at ES-D2 than at ESEW. After the first significant day of exposure, the urinary concentrations

Table 2 Airborne PAHs data for each day of the working week

	Daily levels (ng/m^3)			Concentration ratios (median [min–max])			
	gPyr	pPyr	BaP	gPyr/pPyr	BaP/gPyr	BaP/pPyr	BaP/tPyr
Carbon sector							
W1							
D1	623.6	227.6	92.4	**3.51** [1.32–6.84]	**0.16** [0.10–0.51]	**0.55** [0.41–1.19]	**0.13** [0.08–0.29]
D2	876.3	205.0	85.7				
D3	314.8	46.0	54.7				
D4	143.7	109.0	73.6				
W2							
D1	41.1	271.5	218.3	**0.30** [0.09–0.54]	**4.30** [2.20–17.33]	**1.31** [0.80–1.78]	**0.93** [0.68–1.49]
D2	12.2	27.1	26.9				
D3	30.8	56.9	101.2				
D4	10.3	109.7	178.5				
W3							
D1	34.2	139.0	248.6	**0.29** [0.25–0.47]	**6.16** [2.82–7.28]	**1.72** [1.33–1.91]	**1.37** [0.90–1.44]
D2	39.9	122.9	234.4				
D3	52.7	206.3	339.0				
D4	46.3	97.9	130.4				
W4							
D1	64.5	289.8	425.0	**0.51** [0.22–3.59]	**3.50** [0.51–6.59]	**1.77** [1.32–1.84]	**1.18** [0.40–1.21]
D2	114.6	32.0	58.8				
D3	74.3	147.0	260.2				
D4	66.2	133.8	241.1				
D5	122.4	83.4	110.1				
Graphite sector							
W5							
D1	7.7	67.5	70.2	**0.08** [0.01–0.16]	**17.52** [7.32–139.30]	**1.04** [0.56–1.47]	**0.96** [0.56–1.36]
D2	0.9	120.1	67.8				
D3	9.2	109.9	161.5				
D4	1.7	239.3	231.7				
D5	12.5	76.2	91.4				
W6							
D1	10.9	50.3	72.7	**0.22** [0.05–1.52]	**6.66** [0.80–22.65]	**1.22** [0.69–1.52]	**1.00** [0.48–1.24]
D2	11.0	7.2	8.8				
D3	4.9	106.4	110.9				
D4	22.3	110.9	76.9				
D5	8.9	39.7	60.3				
W7							
D1	9.4	50.1	55.9	**0.17** [0.10–1.41]	**5.92** [0.44–12.84]	**0.91** [0.50–1.33]	**0.79** [0.26–1.20]
D2	143.4	101.9	63.4				
D3	7.9	54.8	49.8				
D4	29.5	173.7	86.6				
D5	17.9	173.1	230.0				

Bold values indicate medians

W worker, *D* day

of both biomarkers did not come back to their basal levels the following morning. This was observed for both metabolites after the first workday for W1 to W6 and after the second workday for W7, and for 3-OHBaP, after the penultimate day for W3 and W4 and also after the penultimate day of W6 although he had been previously exposed.

Table 3 Urinary concentrations and ratios of 3-OHBaP and 1-OHP in pre-shift and post-shift urine samples during the working week

	BSBW–ESEW; **max** (sampling time)		3-OHBaP/1-OHP ratios (**median** [min–max])		
	3-OHBaP (nmol/mol)	1-OHP (µmol/mol)	ES16/ES	ES/ES	ES16/ES16
W1	0.02–0.05 **0.05** *(ES-D2/D3/EW)*	0.11–0.70 **2.08** *(ES-D2)*	**0.04** [0.02–0.07]	**0.03** [0.02–0.07]	**0.04** [0.02–0.07]
W2	0.04–0.14 **0.15** *(BSEW)*	0.08–0.35 **0.46** *(ES-D3)*	**0.30** [0.25–0.33]	**0.23** [0.07–0.40]	**0.23** [0.22–0.40]
W3	0.06–0.23 **0.40** *(BSEW)*	0.11–0.58 **0.72** *(ES-D2)*	**0.47** [0.28–0.54]	**0.34** [0.03–0.41]	**0.40** [0.28–0.41]
W4	0.08–0.12 **0.19** *(BSEW)*	0.12–0.40 **0.43** *(ES-D2/D4)*	**0.26** [0.23–0.46]	**0.26** [0.14–0.46]	**0.24** [0.14–0.30]
W5	0.09–0.16 **0.24** *(ES-D2)*	0.20–0.73 **0.73** *(ESEW)*	**0.45** [0.25–0.89]	**0.45** [0.22–0.51]	**0.39** [0.22–0.51]
W6	<LQ–0.64 **0.80** *(BSEW)*	0.1–0.86 **0.86** *(ESEW)*	**0.44** [0.20–0.86]	**0.30** [0.04–0.74]	**0.31** [0.20–0.74]
W7	0.07–0.29 **0.29** *(ESEW)*	0.22–0.69 **0.83** *(ES-D2)*	**0.41** [0.31–0.58]	**0.34** [0.18–0.54]	**0.35** [0.18–0.54]

Bold values indicate maximum urinary concentrations

D day, *BSBW* beginning of shift, beginning of week, *BSEW* beginning of shift, end of week, *ESEW* end of shift, end of week, *BS* beginning of shift, *ES* end of shift, *ES16* end of shift + 16 h

Relations between atmospheric levels and urinary concentrations

Atmospheric levels of gPyr, pPyr and BaP during the first workday were not correlated with urinary concentrations of 1-OHP and 3-OHBaP in samples collected at ES-D1 and BS-D2. Considering all measurements throughout the working week, significant positive effects of 1-OHP in BS urines and atmospheric gPyr levels were observed on 1-OHP concentrations in ES samples. However, 1-OHP concentrations on ES16 were linked only with 1-OHP concentrations on ES and pPyr levels (Table 4). On the other hand, no significant effect of atmospheric BaP was observed on urinary concentration of 3-OHBaP, regardless of the sampling time, but 3-OHBaP levels on ES were linked with those on BS (Table 5).

Discussion

Atmospheric levels of PAHs are higher in the carbon sector than in the graphite sector, with nearly 50 % of BaP values exceeding 150 ng/m^3 which is the occupational exposure limit (OEL) recommended by the French health insurance agency. This is probably due to the disrepair of facilities in the carbon sector compared with the graphite sector and the use of different raw materials. However, these levels are lower than those previously reported in the same industrial sector (Petry et al. 1996), due to improvements in industrial processes and changes in the raw materials used in the last 20 years.

The high variability of PAHs is due to occupational activities that were very different from one individual to another and also from one day to another for the same worker. While the levels of the particulate phase (pPyr and BaP) correlate well, their variations are very different and lower than those of the gas phase (the RSD of gPyr is three times higher than that of pPyr and BaP). This difference has been already reported for workers exposed to creosote during one working week (Elovaara et al. 1995) and is due to the different sources of emission. Indeed, the maximum levels of particulate PAHs had been measured at the raw material dispatchers, while those of gPyr were measured during the "electrode extrusion" process in both sectors (every day for W1 and D2 for W7). At the dispatchers, the handling of raw carbon material containing coal-tar pitch generates a large amount of particulate PAHs, whereas during extrusion, the heat requested for electrode molding leads to the release of high amounts of gaseous PAHs. Similarly, levels of BaP and pPyr vary by one order of magnitude between two consecutive days of facility cleaning and safety checks (D1 and D2 for W2 and W6, respectively), while they are very close for gPyr. These results explain the large variability in gPyr/pPyr ratios depending on the workers activity and the day of the week, which had already been reported in this sector (Petry et al. 1996) or in an artificial shooting target factory (Lafontaine et al. 2000). Bentsen et al. (1998) study, conducted during the production of electrodes, is the only one to show a good correlation between the levels of BaP and tPyr because the proportion of pPyr in the mixture was greater. These results illustrate the various sources of variability of the chemical composition of atmospheric aerosols and highlight the difficulty of finding a pollutant tracer other than BaP to estimate the carcinogenic risk resulting from these mixtures.

In order to assess the real occupational exposures, biological monitoring that takes into account dermal absorption is essential. Urinary 3-OHBaP is an accurate biomarker to evaluate carcinogenic exposure. Recently, a reliable and specific analytical method was developed

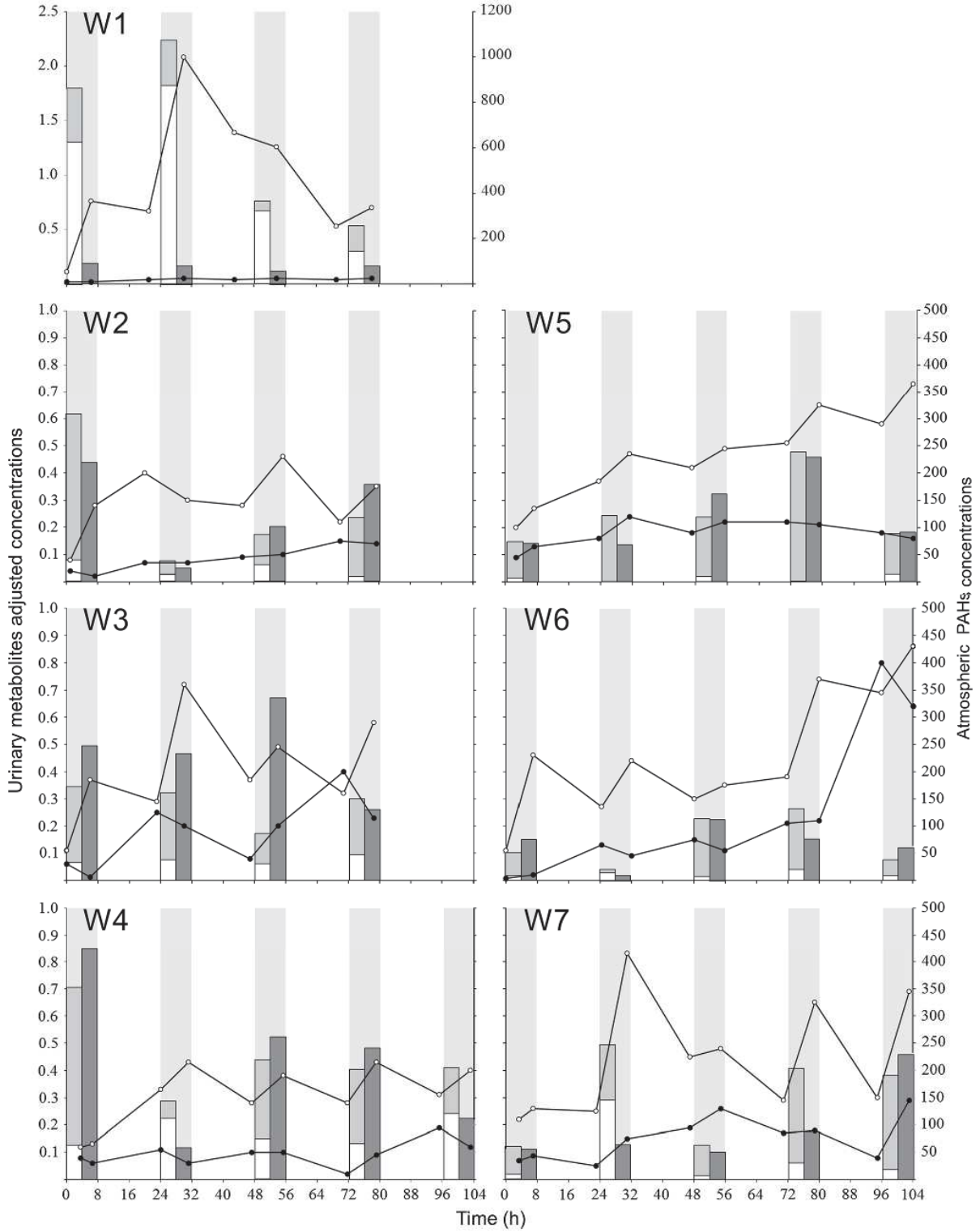


Fig. 1 Urinary concentrations of 3-OHBaP (nmol/mol) (*closed circles*) and 1-OHP (μmol/mol) (*open circles*) and daily atmospheric levels (ng/m^3) of gPyr (*white histograms*), pPyr (*light gray*) and BaP (*dark gray*) for every worker (W) during the working week. *Shaded zones* correspond to working hours

Table 4 Results from linear mixed effects models for 1-OHP

	1-OHP ES ($n = 32$)		1-OHP ES16 ($n = 25$)	
	Estimate (SE)	*p* value	Estimate (SE)	*p* value
Intercept	−0.793 (0.398)	0.058	−1.354 (0.361)	**0.002**
gPyr	0.114 (0.044)	**0.015**	−0.003 (0.040)	0.944
pPyr	0.086 (0.090)	0.346	0.197 (0.072)	**0.014**
1-OHP BS	0.554 (0.113)	**<0.001**	0.144 (0.137)	0.306
1-OHP ES			0.438 (0.150)	**0.010**

SE standard error

Significant *p* values are in bold

Table 5 Results from linear mixed effects models for 3-OHBaP

	3-OHBaP ES ($n = 32$)		3-OHBaP ES16 ($n = 25$)	
	Estimate (SE)	*p* value	Estimate (SE)	*p* value
Intercept	−0.798 (0.683)	0.254	−1.525 (1.001)	0.145
BaP	0.015 (0.132)	0.912	0.062 (0.188)	0.747
3-OHBaP BS	0.651 (0.117)	**<0.001**	0.051 (0.287)	0.861
3-OHBaP ES			0.309 (0.277)	0.279

SE standard error

Significant *p* values are in bold

especially for routine monitoring (Barbeau et al. 2011). The lower 3-OHBaP levels were observed at BSBW for all employees [<LOQ-0.09 nmol/mol] as well as for 1-OHP [0.08–0.22 µmol/mol] and were quite comparable to those reported in non-occupationally exposed subjects (Lafontaine et al. 2006). 3-OHBaP concentrations of mobile raw material dispatchers (W3) and safety rounds in the facility (W6) were above 0.4 nmol/mol, the recommended value proposed by Lafontaine et al. (2004), at BSEW. In contrast, 1-OHP levels were higher than 1 µmol/mol, as considered by some authors as the value that should not be exceeded (Siwinska et al. 2004), for the "carbon electrode extrusion" position only (W1). These differences between the two exposure biomarkers were confirmed by the high intra-individual variability of ratios 3-OHBaP/1-OHP. Previously, strong correlations had been found when the two metabolites were analyzed on the same sample collected at ESEW (Barbeau et al. 2014; Forster et al. 2008). These current results are explained by variable PAHs aerosol combined with respiratory uptake of gPyr through P3 respirators, and also by an important cutaneous absorption of particulate PAHs which can penetrate into the organism via unprotected wrist or neck, but also through skin areas covered by contaminated work clothes (Van Rooij et al. 1992). Indeed, it is well established that PAHs absorption process strongly influences the kinetics of urinary excretion of the various metabolites (Lafontaine et al. 2002; Li et al. 2012; Payan et al. 2009; Sobus et al. 2009b; St Helen et al. 2012; Viau et al. 1995; Viau and Vyskocil 1995).

Urinary levels of the two metabolites showed no progressive increase over the working week, except for W5 and W6, contrary to what was previously reported for 1-OHP in carbon electrode production (Petry et al. 1996). This can be explained by lower exposures in our study combined with high day-to-day variations. It is interesting to note that, during the first major occupational exposure of the working week, metabolite concentrations were high the following morning, while they came back to beginning of shift levels the other days of the week. This finding could probably be explained by the absence of accumulation of PAHs in organisms that were non-exposed since the previous weekend, promoting their distribution to different tissues and slowing their elimination. With regard to the end of the working week, 3-OHBaP concentrations were not significantly different between ES of the penultimate day and BSEW, unlike those of 1-OHP, as previously seen in 129 employees from different industrial sectors (Barbeau et al. 2014). However, in the current study, more than half (60 %) of the maximum urinary concentrations of 3-OHBaP were obtained at BSEW. The lack of 3-OHBaP accumulation in the organism from the fluctuating BaP exposure promotes the 3-OHBaP distribution to different tissues and slows its elimination, in the same way as the first working day with an occupational exposure. Thus, sampling for 3-OHBaP analysis should be carried out on BSEW as proposed by Gendre et al. (Gendre et al. 2004). On the other hand, the maximum levels of urinary 1-OHP always appeared at ES, but only 30 % were obtained at ESEW. In addition, this metabolite has a greater variation than 3-OHBaP due to faster elimination kinetics and simultaneous uptake of pPyr and gPyr through skin and respiratory tract, respectively. Significant positive effect of atmospheric gPyr levels on urinary 1-OHP concentrations on ES was shown by linear mixed effects models. Similar model was used to study effects of work assignments on the levels of PAHs in urines collected over three consecutive days in a group of workers exposed to hot asphalt (Sobus et al. 2009b). Thus, high levels of 1-OHP for W1 on the first and second days and for W7 on the second day are mainly due to atmospheric exposure to gPyr, and urine samples for the determination of 1-OHP should be taken at ES on the day of greatest exposure and not systematically at ESEW as previously suggested (Bouchard and Viau 1999). No significant effect of particular PAHs levels (BaP and pPyr) was observed on urinary metabolite concentrations. These results were similar to those previously obtained in a factory producing carbon electrodes (Bentsen et al. 1998). Indeed, the amount of 1-OHP eliminated in 24 h was not correlated with the level of atmospheric pPyr among employees producing creosote (Elovaara et al. 1995). These results are due to the wearing

of P3 mask that is designed to stop particulate phase (Rengasamy et al. 2009), and especially skin absorption of the compounds both by direct contact with the raw materials and through indirect contact via the particles deposited on work clothes and skin (Lafontaine et al. 2000). The importance of this absorption route delayed urinary excretion of metabolites due to PAHs skin retention (Sobus et al. 2009b; Viau et al. 1995; Viau and Vyskocil 1995). That is shown by significant effect of pPyr on urinary 1-OHP in ES16 samples. Sobus et al. (2009a) had also found that concentrations of 1-OHP measured in urine collected in the morning after the shift were related to dermal exposure to pyrene, measured using patches. As 3-OHBaP elimination is delayed by approximately 15 h compared with that of 1-OHP, as a result of kidney retention (Gendre et al. 2002, 2004; Marie et al. 2010), it is normal not to find any statistical link between urinary 3-OHBaP and atmospheric levels of BaP. The extent of dermal absorption of particulate PAHs restricts the relevance of proposing OEL for BaP and emphasizes the need for a biological limit value based on health effects and not derived from correlations with OEL.

Conclusions

This study demonstrates the advantage of biomonitoring for PAHs health risk assessment. Significant variations in the chemical composition of atmospheric aerosols and also different absorption pathways for gaseous and particulate PAHs preclude the use of 1-OHP instead of 3-OHBaP in order to assess exposure to PAHs carcinogenic mixtures. Although several authors have proposed an algorithm to adjust the urinary concentration of 1-OHP to the atmospheric pyrene/BaP ratio (Bouchard and Viau 1999; Jongeneelen 2014), this approach is of limited use. Indeed, it does not take into account either the differences between gPyr, pPyr and BaP absorption routes or urinary 1-OHP and 3OHBaP elimination kinetics. Urinary 3-OHBaP is the most relevant biomarker for estimating carcinogenic risk in subjects exposed to complex mixtures of PAHs. It has the advantage of assessing exposure to BaP, the only PAH classified as being clearly carcinogenic to humans. Furthermore, 3-OHBaP is more slowly eliminated in urine than 1-OHP, thus preventing underestimation of risk (Lin et al. 2005; Sobus et al. 2010). Urine samples should be collected at the beginning of the shift the end of working week for the 3-OHBaP quantification, especially in case of high exposure variability. Nevertheless, this study shows that the quantification of 1-OHP, in addition to 3OHBaP, in urine collected at different sampling times provides valuable information on absorption pathways and thus will contribute to improving the efficiency of protection measures.

Acknowledgments This study was funded by the «Agence nationale de sécurité sanitaire de l'environnement, de l'alimentation et du travail (ANSES)». We thank Pascal Petit and Dr. Alison Foote for editing the manuscript and Sylvette Liaudy, information specialist, for her work.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

AFNOR (1995) Workplace air. Sampling and analysis of the polycyclic aromatic hydrocarbons. Standard NF X43-294. AFNOR, La Plaine Saint Denis, France. http://www.boutique.afnor.org/norme/nf-x43-294/workplace-air-sampling-and-analysis-of-the-polycyclic-aromatic-hydrocarbons/article/625508/fa038887

Angerer J, Mannschreck C, Gundel J (1997) 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 69:323–331

Barbeau D, Maitre A, Marques M (2011) Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. Analyst 136:1183–1191

Barbeau D, Persoons R, Marques M, Herve C, Laffitte-Rigaud G, Maitre A (2014) Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. Ann Occup Hyg 58:579–590

Bentsen RK, Noto H, Halgard K, Ovrebo S (1998) 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 42:135–144

Bouchard M, Viau C (1999) Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. Biomarkers 4:159–187

Elovaara E, Heikkila P, Pyy L, Mutanen P, Riihimaki V (1995) Significance of dermal and respiratory uptake in creosote workers: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of 1-hydroxypyrene. Occup Environ Med 52:196–203

Forster K, Preuss R, Rossbach B, Bruning T, Angerer J, Simon P (2008) 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. Occup Environ Med 65:224–229

Gendre C, Lafontaine M, Morele Y, Payan JP, Simon P (2002) Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Polycycl Aromat Compd 22:761–769

Gendre C, Lafontaine M, Delsaut P, Simon P (2004) Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene: assessment of an appropriate sampling time. Polycycl Aromat Compd 24:433–439

IARC (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum vol 92. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

IARC (2012) Chemical agents and related occupations: a review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum vol 100. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

Jongeneelen FJ (2014) A guidance value of 1-hydroxypyrene in urine in view of acceptable occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicol Lett 231:239–248

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

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

Lafontaine M, Payan JP, Delsaut P, Morele Y (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in an artificial shooting target factory: assessment of 1-hydroxypyrene urinary excretion as a biological indicator of exposure. Ann Occup Hyg 44:89–100

Lafontaine M, Gendre C, Morele Y, Laffitte-Rigaud G (2002) Excretion of urinary 1-hydroxypyrene in relation to the penetration routes of polycyclic aromatic hydrocarbons. Polycycl Aromat Compd 22:579–588

Lafontaine M, Gendre C, Delsaut P, Simon P (2004) Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limit value. Polycycl Aromat Compd 24:441–450

Lafontaine M, Champmartin C, Simon P, Delsaut P, Funck-Brentano C (2006) 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers. Toxicol Lett 162:181–185

Li Z, Romanoff L, Bartell S et al (2012) Excretion profiles and half-lives of ten urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites after dietary exposure. Chem Res Toxicol 25:1452–1461

Lin YS, Kupper LL, Rappaport SM (2005) Air samples versus biomarkers for epidemiology. Occup Environ Med 62:750–760

Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, Viau C, Maitre A (2010) 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 30:402–410

Marie-Desvergne C, Maitre A, Bouchard M, Ravanat JL, Viau C (2010) 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 23:1207–1214

Payan JP, Lafontaine M, Simon P et al (2009) 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. Arch Toxicol 83:873–883

Petry T, Schmid P, Schlatter C (1996) Airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. Ann Occup Hyg 40:345–357

Pinheiro JC, Bates DM (2000) Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer, New York

Rengasamy S, Eimer BC, Shaffer RE (2009) Comparison of nanoparticle filtration performance of NIOSH-approved and CE-marked particulate filtering facepiece respirators. Ann Occup Hyg 53:117–128

Siwinska E, Mielzynska D, Kapka L (2004) Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers. Occup Environ Med 61:e10

Sobus JR, McClean MD, Herrick RF et al (2009a) Comparing urinary biomarkers of airborne and dermal exposure to polycyclic aromatic compounds in asphalt-exposed workers. Ann Occup Hyg 53:561–571

Sobus JR, McClean MD, Herrick RF et al (2009b) Investigation of PAH biomarkers in the urine of workers exposed to hot asphalt. Ann Occup Hyg 53:551–560

Sobus JR, Pleil JD, McClean MD, Herrick RF, Rappaport SM (2010) Biomarker variance component estimation for exposure surrogate selection and toxicokinetic inference. Toxicol Lett 199:247–253

St Helen G, Goniewicz ML, Dempsey D, Wilson M, Jacob P, Benowitz NL (2012) Exposure and kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cigarette smokers. Chem Res Toxicol 25:952–964

Van Delft JH, Steenwinkel MJ, van Asten JG, van Es J, Kraak A, Baan RA (1998) Monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a carbon-electrode manufacturing plant. Ann Occup Hyg 42:105–114

Van Rooij JG, Bodelier-Bade MM, De Looff AJ, Dijkmans AP, Jongeneelen FJ (1992) Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among primary aluminium workers. Med Lav 83:519–529

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

Van Schooten FJ, Jongeneelen FJ, Hillebrand MJ et al (1995) 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 Biomark 4:69–77

Viau C, Vyskocil A (1995) Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. Sci Total Environ 163:187–190

Viau C, Carrier G, Vyskocil A, Dodd C (1995) Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. Sci Total Environ 163:179–186

II.2. Synthèse de l'article

II.2.1. Matériel et Méthodes

Des prélèvements atmosphériques individuels ont été réalisés chaque jour travaillé chez 7 salariés d'une usine de production d'électrodes de carbone pendant une semaine de travail. En parallèle, le 1-OHP et le 3-OHBaP ont été mesurés dans les urines de début de poste et fin de poste. L'ensemble des analyses a été effectuée en HPLC-FLD.

Les travailleurs ne portent que des masques de type P3 qui filtrent uniquement la phase particulaire.

Pour étudier la relation entre les niveaux atmosphériques et les concentrations urinaires de 1-OHP et de 3-OHBaP en fin de poste et fin de poste plus 16h, une régression linéaire à effet mixte a été réalisée. Les prélèvements de fin de poste et/ou de début de poste ont été intégrés comme des effets fixes. Les niveaux atmosphériques du HAP parent contenu dans la phase particulaire et dans la phase gazeuse ont également été intégrés comme effets fixes. Un effet aléatoire jour a été appliqué.

I.1.1. Résultats

Les prélèvements atmosphériques ont mis en évidence une quantité de pyrène particulaire généralement supérieure à celle de pyrène gazeux. Ce dernier est non corrélé ni au pyrène particulaire ni au BaP tandis que le pyrène particulaire est corrélé au BaP. Une forte variabilité des niveaux atmosphériques est observée entre les travailleurs mais aussi en fonction des jours pour un même travailleur notamment au niveau du ratio pyrène particulaire/ pyrène gazeux.

Les concentrations urinaires de 1-OHP en fin de semaine fin de poste et de 3-OHBaP en fin de semaine début de poste, sont significativement plus élevées qu'en début de semaine début de poste. Les concentrations urinaires de 1-OHP sont significativement supérieures en fin de poste de l'avant dernier jour par rapport à celles de début de poste du dernier jour (équivalent au fin

de poste plus 16h) alors que les niveaux de 3-OHBaP sont comparables. Les concentrations maximales de 3-OHBaP sont observées dans 60% des cas en début de poste du dernier jour. Celles du 1-OHP sont observées en fin de semaine fin de poste dans 30% des cas seulement. Généralement, les concentrations urinaires n'augmentent pas au fil des jours travaillés pour les deux métabolites.

L'étude de la relation entre les niveaux atmosphériques et les concentrations urinaires a montré :

- Une relation significative entre les niveaux atmosphériques de pyrène gazeux et les concentrations urinaires de 1-OHP en fin de poste
- Une relation significative entre les niveaux atmosphériques de pyrène particulaire et les concentrations urinaires de 1-OHP en fin de poste plus 16h.
- Pas de relation significative entre les niveaux atmosphériques de BaP et les concentrations urinaires de 3-OHBaP.

II.2.2. Conclusion

La variabilité inter- et intra-individuelle de la composition des mélanges et donc des concentrations atmosphériques en HAP auxquels les sujets ont été exposés tout au long de la semaine de travail met en évidence la difficulté d'utiliser le métabolite d'un HAP non cancérogène appartenant aux phases gazeuse et particulaire pour estimer le risque cancérogène. En effet, les niveaux de 1-OHP urinaire mesuré en fin de poste reflètent l'absorption respiratoire du pyrène gazeux qui est rapide mais pas du pyrène particulaire car cette phase qui contient les HAP cancérogènes est arrêtée par le masque P3. En revanche, les concentrations urinaires de 1-OHP mesurées en fin de poste plus 16h sont influencées par l'absorption cutanée du pyrène particulaire qui a une cinétique d'élimination plus lente à cause de l'effet réservoir de la peau (voir Chapitre 1 :III.1.2).

Ainsi, le 3-OHBaP apparaît comme le biomarqueur le plus approprié pour estimer l'exposition aux HAP cancérogènes particulaires, et surtout au BaP. Les concentrations urinaires de 3-OHBaP ne sont pas influencées par les niveaux atmosphériques de BaP quel que soit le moment de prélèvement ce qui est expliqué par le port de masque P3. Ceci permet de mettre en évidence que l'exposition professionnelle aux HAP particulaires se fait majoritairement par voie cutanée. La majorité des concentrations maximales de 3-OHBaP sont observées en début de poste du dernier jour du fait d'une accumulation tout au long de la semaine de travail indiquant que ce moment de prélèvement semble le plus approprié pour la surveillance de l'exposition en milieu professionnel quand celle-ci est variable tout au long de la semaine (cas le plus fréquemment rencontré en santé travail).

III. Cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP et du 1-OHP et moyen de correction de la diurèse

III.1. Article 2

Environmental Research 147 (2016) 469–479

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Urinary elimination kinetics of 3-hydroxybenzo(*a*)pyrene and 1-hydroxypyrene of workers in a prebake aluminum electrode production plant: Evaluation of diuresis correction methods for routine biological monitoring

Simon Lutier [a], Anne Maître [a,b], Vincent Bonneterre [a,b], Dominique J. Bicout [a], Marie Marques [a], Renaud Persoons [b], Damien Barbeau [a,b,*]

[a] *EPSP-TIMC (CNRS UMR 5525), Université Grenoble Alpes, TIMC-IMAG, F-38000 Grenoble, France*
[b] *Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, DBTP, CHU de Grenoble, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 December 2015
Received in revised form
10 February 2016
Accepted 26 February 2016

Keywords:
Biomonitoring
Toxicokinetic
Diuresis
1-hydroxypyrene
3-hydroxybenzo(*a*)pyrene

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous carcinogenic pollutants emitted in complex mixtures in the ambient air and contribute to the incidence of human cancers. Taking into account all absorption routes, biomonitoring is more relevant than atmospheric measurements to health risk assessment, but knowledge about how to use biomarkers is essential. In this work, urinary elimination kinetic of 1-hydroxypyrene (1-OHP) and 3-hydroxybenzo(*a*)pyrene (3-OHBaP) were studied in six electrometallurgy workers after PAHs exposure. Spot samples were collected on pre- and post-shift of the last workday then the whole urinations were separately sampled during the weekend. Non-linear mixed effects models were built to study inter- and intra-individual variability of both urinary metabolites toxicokinetic and investigate diuresis correction ways. Comparison of models confirmed the diuresis correction requirement to perform urinary biomonitoring of pyrene and BaP exposure. Urinary creatinine was found as a better way than specific gravity to normalize urinary concentrations of 1-OHP and as a good compromise for 3-OHBaP. Maximum observed levels were 1.0 μmol/mol creatinine and 0.8 nmol/mol creatinine for 1-OHP and 3-OHBaP, respectively. Urinary 1-OHP concentrations on post-shift were higher than pre-shift for each subject, while 3-OHBaP levels were steady or decreased, and maximum urinary excretion rates of 3-OHBaP was delayed compared to 1-OHP. These results were consistent with the sampling time previously proposed for 3-OHBaP analysis, the next morning after exposure. Apparent urinary half-life of 1-OHP and 3-OHBaP ranged from 12.0 h to 18.2 h and from 4.8 h to 49.5 h, respectively. Finally, inter-individual variability of 1-OHP half-life seemed linked with the cutaneous absorption extent during exposure, while calculation of 3-OHBaP half-life required the awareness of individual urinary background level. The toxicokinetic modeling described here is an efficient tool which could be used to describe elimination kinetic and determine diuresis correction way for any other urinary biomarkers of chemicals or metals exposure.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous pollutants emitted during incomplete combustion of organic matter and distillation of coal or petroleum. They are found in the atmosphere as complex gaseous and particulate mixtures, whose composition varies according to the emission sources. Within this chemical family, benzo(*a*)pyrene (BaP) is classified as a proven human carcinogen while several other PAHs are classified as possible or probable human carcinogens (IARC, 2010). By contrast, pyrene is a non-carcinogenic PAH, extensively studied due to its abundance in mixtures. Environmental exposure occurs by tobacco consumption, diet, and atmospheric pollution. In addition, high occupational exposure levels are reported in some industries using products derived from coal (Unwin et al., 2006). In France,

Abbreviations: PAHs, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; 3-OHBaP, 3-hydroxybenzo(*a*)pyrene; 1-OHP, 1-hydroxypyrene; SG, Urinary specific gravity

* Correspondence to: Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, Université Joseph Fourier – Grenoble 1, UFR de Médecine, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France.
E-mail address: DBarbeau@chu-grenoble.fr (D. Barbeau).

http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.035
0013-9351/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1.6 million workers are exposed to PAHs with 93,000 worked in the metallurgy industry (Guignon and Sandret, 2005) including carbon electrode manufacturing, which is classified as probably carcinogenic to humans (IARC, 2010). In this sector, the mean levels reported for BaP and pyrene were 4.9 μg/m^3 and 11.2 μg/m^3, respectively (Forster et al., 2008). These levels were largely higher than the French recommended value for BaP, equal to 150 ng/m^3. However, atmospheric measurement cannot assess human exposure: wearing respiratory mask can generate an over-estimation of exposure and dermal uptake, which is the main absorption way of PAHs for numerous tasks, can lead to an under-estimation of exposure (Elovaara et al., 1995; VanRooij et al., 1993).

For assessing health risk, biomonitoring is more relevant than air monitoring because it allows the evaluation of the internal dose of chemicals. Urinary analyses are widely used, because exposure biomarkers accumulate in the bladder between two urinations and it is very easy to collect urine samples. To take into account the variation of diuresis, urinary concentrations stated in mass per volume unit need to be corrected. Normalization by urinary creatinine is mainly used although age, sex, ethnicity and muscular mass influence its excretion and can change the interpretation of urinary biomarkers levels (Truchon et al., 2014). Furthermore, this correction is valuable only if metabolites undergo the same excretion mechanisms than the creatinine, *ie* via glomerular filtration (Boeniger et al., 1993). To overcome these difficulties, normalization by specific gravity (SG) has been proposed to take into account fluctuations in urine dilution (Sauvéet al., 2015). Nowadays, research on the optimal approach to adjustment of urinary concentrations in spot urine samples, in order to perform biomonitoring, is still an important challenge (Weaver et al., 2015).

Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), the main metabolite of pyrene, was proposed as the first biomarker of PAHs exposure by Jongeneelen in 1985 (Jongeneelen et al., 1985). It is the most commonly used biomarker to perform PAH biomonitoring (Strickland et al., 1996) and many exposure data are available (Hansen et al., 2008). 1-OHP was correlated with genotoxic effect in some studies (Siwińska et al., 2004; Talaska et al., 2014), but not systematically (Marczynski et al., 2011), probably due to the high variability of the BaP/pyrene ratio according to industrial sectors and activities of workers (Barbeau et al., 2015; Lafontaine et al., 2004). Thus, 1-OHP might be not the most appropriate biomarker to assess carcinogenic PAHs exposure. Urinary 3-hydroxybenzo(*a*) pyrene (3-OHBaP) is more appropriate to evaluate carcinogenic exposure because it is an urinary metabolite of BaP (Boogaard, 2008). Due to a complex BaP metabolism with production of many metabolites (Gelboin, 1980) and elimination predominantly via the feces, urinary 3-OHBaP represented only 0.21% of BaP dose injected in rats (Marie et al., 2010). A high sensitive and reliable analytical method has recently been developed to use urinary 3-OHBaP as biomarker for occupational biomonitoring (Barbeau et al., 2011). The maximum urinary 3-OHBaP concentration of workers involved in an electrode manufacturing plant was found at 5.27 nmol/mol creatinine, while maximum of 1-OHP was higher by three orders of magnitude, reaching 6.99 μmol/mol creatinine (Barbeau et al., 2014).

In order to set the best sampling time representing the exposure and being convenient to implement, biomonitoring requires knowledge about elimination kinetic and related influencing factors. The different absorption routes affect considerably the urinary elimination rate of 1-OHP. In human, the maximum urinary excretion took place between 2.2 h and 9.7 h after a dietary exposure (Buckley and Lioy, 1992; Chien and Yeh, 2010; Li et al., 2012), while this maximum appeared 1–2 h after the post-shift for a respiratory absorption (Lafontaine et al., 2002) and 10–15 h for a dermal uptake (Viau and Vyskocil, 1995). In the same way, the urinary half-life of 1-OHP ranged from 3.0 to 5.7 h (Li et al., 2012), from 3.7 to 9.9 h (St Helen et al., 2012) and from 11.5 to 15 h (Viau and Vyskocil, 1995) after oral, inhalation and dermal absorption, respectively. Thus, in addition to individual characteristics, differences of exposure conditions in workplaces, especially the cutaneous absorption extent, could explain the important variability of apparent 1-OHP half-lives observed in occupational studies, as well in different industrial sectors (Lafontaine et al., 2004), as in the same sector for several tasks (Buchet et al., 1992; Sobus et al., 2009). Pre-shift urine sample collected at the end of the workweek is considered as the best sampling time to analyse 1-OHP when the main route of exposure is skin uptake, while post-shift sample collected at the end of the workweek remains the best if inhalation is the main way of absorption (Bouchard and Viau, 1999). However, there is still no consensus and ACGIH recommends only post-shift at end of workweek as sampling time for 1-OHP (ACGIH, 2015). For 3-OHBaP, maximum urinary excretion appeared between 10 and 17 h after the post-shift (Gendre et al., 2002) and the only apparent urinary half-life calculated in humans for this metabolite was 8.8 h (Lafontaine et al., 2004). But urinary 3-OHBaP concentrations measured in the urine collected at the post-shift of the penultimate workday were not statistically different than those found at the pre-shift of the last workday, when the exposure is relatively constant over the workweek (Barbeau et al., 2014). Conversely, when occupational exposure is variable during the workweek, 60% of the maximum urinary 3-OHBaP concentrations were found on pre-shift, versus 17% on post-shift of the last workday (Barbeau et al., 2015). Currently, pre-shifts of the first and of the last workdays remain the proposed urine sampling times to analyse this metabolite (Gendre et al., 2004).

The aim of this study was to fill the lack of data about the toxicokinetic of urinary 3-OHBaP and make a comparison with 1-OHP, the common PAH exposure biomarker. Furthermore, the usefulness of different kinds of diuresis correction was studied for these urinary metabolites. The maximum urinary excretion rate, the influence of inter-individual variability and the appropriate normalization technique of urinary concentrations were studied using non-linear mixed effects models in a group of electrometallurgy workers.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The subjects were 6 non-smoking, healthy, male volunteers between 30 and 60 years old, working in a prebaked electrodes production plant. A questionnaire was completed by each worker in order to inform them about the study and obtain their consent. No special instruction concerning diet was given. Urinary analyses were prescribed by the occupational physician of the plant as part of PAHs exposure monitoring. During the last day of the workweek, one worker (W1) stored the cooled electrode after its extrusion, three workers (W2, W3, W4) loaded raw materials (carbon and pitch coke), one (W5) was in charge of administrative tasks in an office and the last one (W6) performed electrode extrusion and cleaning installations. All workers carried P3 masks and handling gloves, except workers 5 and 6.

2.2. Urine collection

Urine samples were collected at the beginning and at the post-shift on the last workday of the week in 50 ml propylene bottles. From this post-shift, subjects collected separately all urinations in their entirety in 500 ml propylene bottles during the weekend. Urine volume was measured at the laboratory before storage at

Table 1
Urinary 1-OHP and 3-OHBaP concentrations.

Metabolite	Worker	Creatinine adjustment (nmol/mol creatinine)			SG adjustment (pmol/l)			Non adjusted concentration (pmol/l)			N (n < LOQ)
		Pre-shift	Post-shift	Week-end (min-max)	Pre-shift	Post-shift	Week-end (min-max)	Pre-shift	Post-shift	Week-end (min-max)	
1-OHP	W1	420	500	30–660	5703	5303	367–8251	7514	6644	477–7885	13 (0)
	W2	320	580	60–690	4708	9875	665–10,381	4948	12,005	916–11,088	14 (0)
	W3	530	700	130–1000	7010	9311	2192–15,887	4948	11,867	2712–20,871	11 (0)
	W4	690	860	50–700	5876	8322	454–8156	5911	5727	545–6460	19 (0)
	W5	580	730	260–750	7894	10,830	2123–8455	11,455	17,136	820–11,721	8 (0)
	W6	310	400	120–250	2286	3991	944–2512	1649	4765	527– 3556	10 (0)
3-OHBaP	W1	0.13	0.16	< LOQ–0.26	1.70	1.73	< LOQ–3.31	2.24	2.16	< LOQ–2.78	13 (2)
	W2	0.40	0.23	0.02–0.39	5.85	3.86	0.22–5.06	6.15	4.70	0.34–7.78	14 (0)
	W3	0.04	0.05	0.02–0.03	0.53	0.70	0.26–0.43	0.37	0.89	0.28–0.54	11 (0)
	W4	0.80	0.64	0.07–0.28	6.85	6.23	0.55–3.20	6.90	4.29	0.50–2.54	19 (0)
	W5	0.18	0.16	0.17–0.27	2.47	2.38	1.45–2.62	3.58	3.76	0.56–3.63	8 (0)
	W6	0.19	0.12	0.02–0.11	1.45	1.22	0.16–1.21	1.04	1.45	0.09–1.24	10 (0)

LOQ: limit of quantification.

−20 °C until analysis. Data of W6 was excluded for toxicokinetic modeling because urine samples were not collected during the first 24 h following post-shift.

2.3. Urinary analyses

After thawing urine overnight, the 3-OHBaP analysis was conducted using the method previously described by Barbeau et al. (2011). Briefly, a 10 ml aliquot was diluted in acetate buffer before enzymatic hydrolysis. The sample was purified and concentrated by automated solid phase extraction from Gilson (Villiers-le-Bel, France) using Sep-Pak C18, 500 mg with a capacity of 6 ml from Waters (Guyancourt, France). Urinary 3-OHBaP was quantified by high pressure liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FLD). The heart-cut technique (Campins-Falco et al., 1993) was used: a first chromatographic separation was performed on a purification Supelcosil LC-18 column (50 mm × 4 mm, 5 μm) from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), then a second on an analytical column PAH-C18 (250 mm × 3 mm, 5 μm) from Waters. Excitation and emission wavelengths were fixed at 425 and 465 nm, respectively. The limit of quantification (LOQ) 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. (1988). Briefly, a 2 ml aliquot of urine was diluted in acetate buffer before enzymatic hydrolysis and directly injected into a HPLC-FLD system from Waters. 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 (Billerica, USA). Excitation and emission wavelengths were fixed at 333 and 390 nm, respectively. The LOQ 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 from a 2 ml aliquot of urine, while urinary SG was measured using a refractometer PEN-Urine S.G from ATAGO (Tokyo, Japan). For each sample, three successive measurements of SG were performed and arithmetic means was calculated. SG of distillated water (typically equal to 1) was measured at regular time interval to avoid any drift across time.

2.4. Data analyses

Metabolites concentrations lower than the LOQ were assigned values equal to half of the LOQ for graphical representations and data analyses.

Metabolites excretion rates (mol/h) were calculated from the first urine after the post-shift, by the sum of metabolites quantities excreted in different urine collected during five periods of 12 h. These quantities were obtained by multiplying concentration by volume for each sample.

Urinary metabolite concentrations were normalized by urinary creatinine (mol/mol creatinine), or by SG (mol/l) as follow:

$$C_{Cr}(mol/molcreatinine)=\frac{C}{Cr} \quad (1)$$

$$C_{SG}(mol/l)=\frac{C\times(SG_{ref}-1)}{(SG-1)} \quad (2)$$

where C was uncorrected metabolite urinary concentration (mol/l), Cr was urinary creatinine concentration (mol/l), SG was urinary specific gravity of the sample and $SG_{ref}=1.017$ was the reference specific gravity, i.e. the calculated mean of SG values from all collected urines.

2.5. Toxicokinetic modeling

3-OHBaP and 1-OHP elimination kinetics were studied from the observed individual excretion maxima that is the urinary sample after occupational exposure for which creatinine adjusted concentration of metabolites was the highest. To describe these data, a non-linear mixed effect model which assumed a mono-exponential urinary elimination kinetic and takes into account background exposure and inter-individual variability was used (Bartell, 2012). In order to compare different correction modes of diuresis, three models were developed from unadjusted urinary concentrations. Firstly, urinary creatinine concentration was included as independent variable, according to Eq. (3) (Cr-model):

$$C_{ij}=(Cm_i\times e^{-k_i\times t_{ij}}+C0_i)\times Cr_{ij}+\varepsilon_{ij} \quad (3)$$

where i was an index for workers and j was an index for each urinary sample. t_{ij} was the time from individual excretion maximum (h). C_{ij} was metabolite concentration (mol/l) and Cr_{ij} was

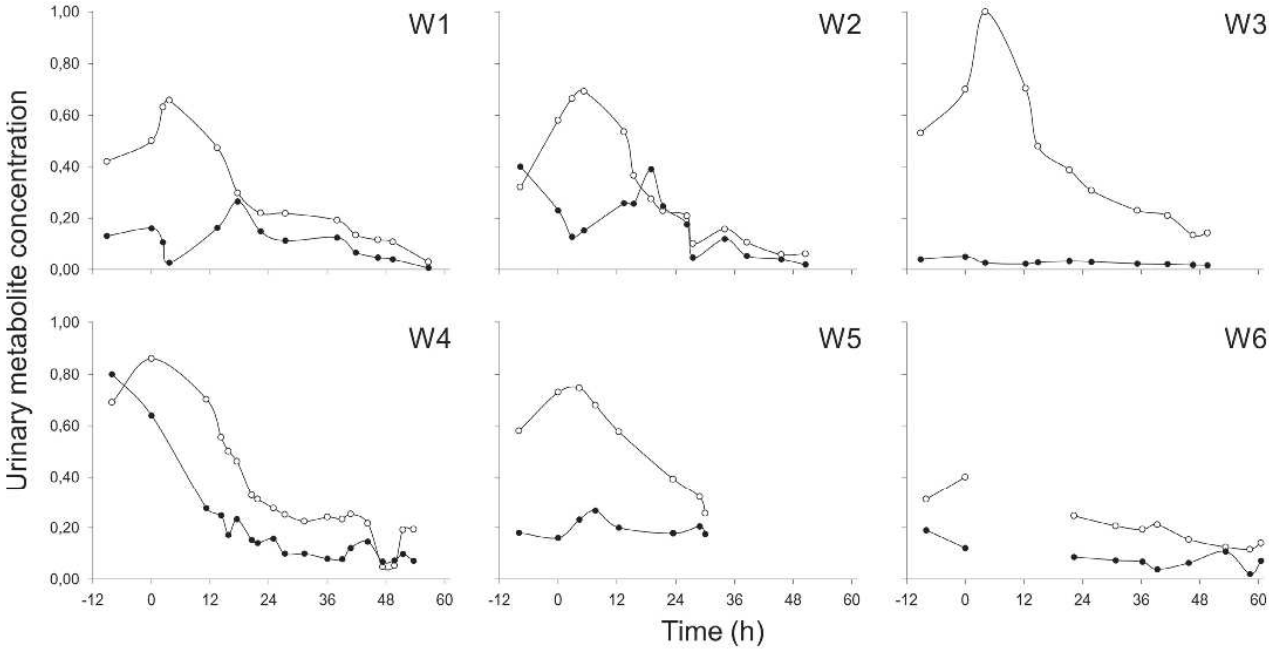


Fig. 1. Urinary creatinine adjusted concentration of 1-OHP (μmol/mol creatinine, open circle) and 3-OHBaP (nmol/mol creatinine, closed circle) during the weekend of 6 electrometallurgy workers (W). Sample at post-shift of the last workday took place at time 0 and the previous spot urine sample is the pre-shift of the same day.

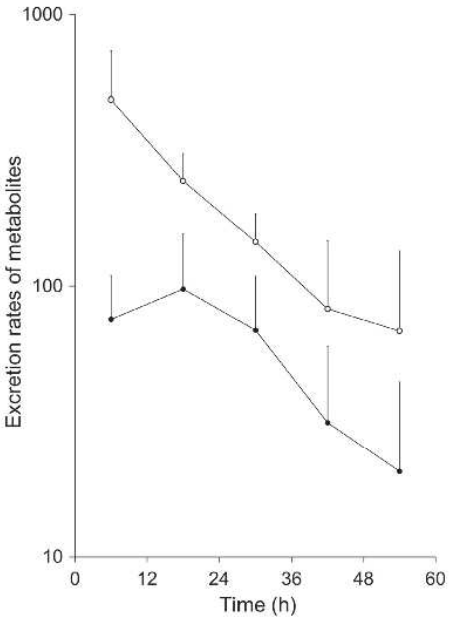


Fig. 2. Average and standard deviation of excretion rates into twelve hours periods for 1-OHP (pmol/h; open circles) and 3-OHBaP (fmol/h; closed circles).

creatinine concentration (mol/l), for urine *j* of worker *i*. Cm_i (mol/mol creatinine) was the concentration increase above the background after occupational exposure. $C0_i$ (mol/mol creatinine) was the background concentration. k_i was the individual first-order urinary elimination rate constant (1/h) and ε_{ij} was the error term.

Secondly, urinary SG was included as independent variable instead of creatinine, according to Eq. (4) (SG-model):

$$C_{ij} = (Cm_i \times e^{-k_i \times t_{ij}} + C0_i) \times \frac{SG_{ij}-1}{SG_{ref}-1} + \varepsilon_{ij} \quad (4)$$

Finally, no correction term was introduced as Eq. (5) (Zero-model):

$$C_{ij} = Cm_i \times e^{-k_i \times t_{ij}} + C0_i + \varepsilon_{ij} \quad (5)$$

For SG-model and Zero-model, Cm_i and $C0_i$ were expressed in mol/l.

For the three models, $C0_i$, Cm_i and k_i were further assumed to be independent and normally distributed among workers, with mean μC0, μCm and μk, respectively. Akaike Information Criterion (AIC) was used for models comparison and the percentage of root mean square error (%RMSE) was used to compare their residual error.

Apparent urinary half-life ($t_{1/2}$) was calculated as Eq.6:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (6)$$

Non-linear mixed effect models were performed with R 3.1.2 software (R Foundation for Statistical Computing) using "nlme" function from "nlme" package (Pinheiro and Bates, 2000). Parameters were maintained in the models if they were significantly different from null at $p \leq 0.10$.

3. Results

3.1. Urinary levels

Urinary levels of both metabolites for the last workday and during the weekend were summarized in Table 1 and showed in Fig. 1. Urinary 1-OHP concentrations were systematically higher at post-shift than pre-shift. For 3-OHBaP, concentrations were steady between pre- and post-shift for 3 workers (W1, W3 and W5) and decreased for the others (W2, W4 and W6). Among 65 urine samples, only 2 concentrations were below the LOQ for 3-OHBaP (W1) and none for 1-OHP. From the end of the shift and after exclusion of W6, urine samples were collected during 53 ± 3 h except for W5 who stopped sample collection after 30 h. For

1-OHP, average of minimum concentrations and average of maximum concentrations were 108 and 727 nmol/mol creatinine, 1124 and 9610 pmol/l and 1000 and 11,520 pmol/l, for creatinine adjusted, SG adjusted and non-adjusted concentrations, respectively. For 3-OHBaP, they ranged from 0.05 to 0.33 nmol/mol creatinine, 0.45–3.46 pmol/l and 0.30–3.93 pmol/l. Among workers, urinary 1-OHP levels were less fluctuating than 3-OHBaP, with relative standard deviation of maximum concentrations equal to 28% versus 79% for creatinine adjusted, 41% versus 70% for SG adjusted and 55% versus 72% for non-adjusted concentrations.

3.2. Urinary elimination rates

Urinary elimination rates profiles were different between the two metabolites during the first 24 h after the shift (Fig. 2). For 1-OHP, mean excretion rates decreased constantly throughout sampling time period. Conversely, for 3-OHBaP, mean excretion rates increased slightly from 75 to 98 fmol/h between 0–12 h and 12–24 h periods, before decreasing until the end of urine sampling.

3.3. Elimination kinetic models

Figs. 3–7 showed the observed and predicted urinary 1-OHP and 3-OHBaP concentrations for each worker. Models including correction term (Cr-model and SG-model) improved the model fitting for both metabolites compared to the Zero-model. Normalized residuals of predicted urinary 1-OHP and 3-OHBaP concentrations were heteroscedastic from Zero-model whereas those from Cr-model and SG-model were more homoscedastic (Fig. A.1). Scatter plots of observed versus predicted urinary concentrations indicated a better fit for models included diuresis correction term (Cr-model and SG-model) than Zero-model (Fig. A.2). Akaike Information Criterion (AIC) for Cr-model, SG-model and Zero-model were −600.38, −555.97 and −497.40, respectively, for 1-OHP and −581.53, −581.25 and −567.09 for 3-OHBaP. Residual variance of each model, compared with %RMSE, decreased in order Zero-model (48%) > > SG-model (28%) > Cr-model (18%) and Zero-model (43%) > SG-model (32%) ≈ Cr-model (31%), for 1-OHP and 3-OHBaP, respectively (Fig. 8). Calculated parameters for Cr-model and both metabolites were summarized in Table 2. μCm and μk were significantly different from null, for both metabolites, while μC0 was not significantly different from null for 1-OHP. Mean calculated urinary 3-OHBaP half-life was lower than 1-OHP with 8.9 h and 14.4 h respectively. Inter-individual variability was higher for 3-OHBaP than for 1-OHP with calculated half-life confidence interval wider.

4. Discussion

Elimination kinetics of urinary PAHs exposure biomarkers was studied for six workers after a whole workweek. Maximum observed levels adjusted with creatinine were 1.0 μmol/mol creatinine and 0.8 nmol/mol creatinine for 1-OHP and 3-OHBaP, respectively. These values are lower than those previously reported in the same industrial sector (Petry et al., 1996) but was in consistency with decreasing of levels over the last 20 years. Average of minimum observed concentrations adjusted with creatinine was 0.11 μmol/mol creatinine and 0.06 nmol/mol creatinine for 1-OHP and 3-OHBaP, respectively. For both metabolites, the highest minimum concentrations were found for W5 because he collected urines only for the thirty first hours after post-shift. Such urinary levels at the end of the weekend in non-smoking workers corresponded to those of non-occupationally exposed smokers which ranged from 0.03 to 0.53 μmol/mol creatinine and from < 0.01 to 0.08 nmol/mol creatinine for 1-OHP and 3-OHBaP, respectively (Barbeau et al., 2011; Lafontaine et al., 2006). Increase risk of cancer due to smoking is well-known and PAHs belong to carcinogenic compounds emitted by tobacco combustion (IARC, 2004). Thus, even for moderate occupational PAHs exposure noticed here, the health risk for workers is real.

Excretion rate profiles of the two urinary metabolites were clearly different. While 1-OHP followed a mono-exponential elimination as soon as the end of the shift, 3-OHBaP mean excretion rates slightly increased during the first 24 h, probably due to an accumulation of 3-OHBaP in the kidney as shown in rats (Marie et al., 2010). Indeed, physiologically-based pharmacokinetic model developed from rats data was used to modeling human 3-OHBaP urinary elimination kinetic and the results seemed indicate that specific 3-OHBaP kinetic, including atypical renal excretion, is similar between human and rat (Heredia Ortiz et al., 2014). Among workers involved in different industrial sectors, an important inter-individual variability of excretion gap between the two metabolites was shown, with a delay for 3-OHBaP ranging from 3 to 24 h (Gendre et al., 2004). In case of occupational exposure very variable one day to another, 60% of urinary 3-OHBaP maximum were occurred at the pre-shift of the last workday (Barbeau et al., 2015). On the other hand, in case of steady occupational exposure throughout workweek, urinary 3-OHBaP concentrations were not statistically different between sample at post-shift of penultimate workday and sample at pre-shift of the following (Barbeau et al., 2014). These discrepancies complicate the choice of an appropriate sampling time for urinary 3-OHBaP. Urinary metabolites excretion rates were calculated to reduce the error on the assessment of maximum 3-OHBaP excretion that could come from the use of urinary concentrations (mass per volume unit). Such a method is more relevant because it takes into account the total excreted quantities in function of time. The urinary excretion delay between 3-OHBaP and 1-OHP, observed even from excretion rates, confirmed that urinary 3-OHBaP analysis should be performed the next morning after occupational exposure rather than at post-shift.

Considering workers as a random effect on urinary biomarkers concentrations, kinetic models built in this study were able to estimated inter-individual variability of PAHs uptake (Cm), urinary background (C0) and toxicokinetic process (k) coming from occupational exposure conditions, lifestyle and personal characteristics, respectively. By contrast, intra-individual variability participated to residual variance (variance of error term). If diuresis was a factor of intra-individual variability of urinary PAHs metabolites concentrations, addition of a term linked to urine dilution in the models could reduce residual variance and improve the parameters calculation. Indeed, normalized residuals of Zero-model were heteroscedastic for both metabolites, while addition of a variable adjusting urine dilution allowed decreasing of heteroscedasticity. In the same way, scatter plots indicated a better fit for models included diuresis correction. Finally, AICs which penalize complex models were lower for Cr-model and SG-model even if they included one more independent variable than Zero-model. These results confirmed the diuresis correction requirement to perform urinary biomonitoring of pyrene and BaP exposure. Previous mixed effects models simulating urinary elimination kinetic of gaseous PAH metabolites after dietary exposure were developed from urinary creatinine corrected concentrations (Li et al., 2012; Motorykin et al., 2015). This approach assumed that urinary creatinine correction is a relevant normalization method while age, sex, ethnicity and muscular mass influenced its urinary levels. Thus, SG adjustment was recommended for occupational biomonitoring (Truchon et al., 2014). However, this method requires the choice of a reference density (SG_{ref}) ranging from 1.016 to 1.024 (Heavner et al., 2006; Lee et al., 1996; Levine and Fahy, 1945). A

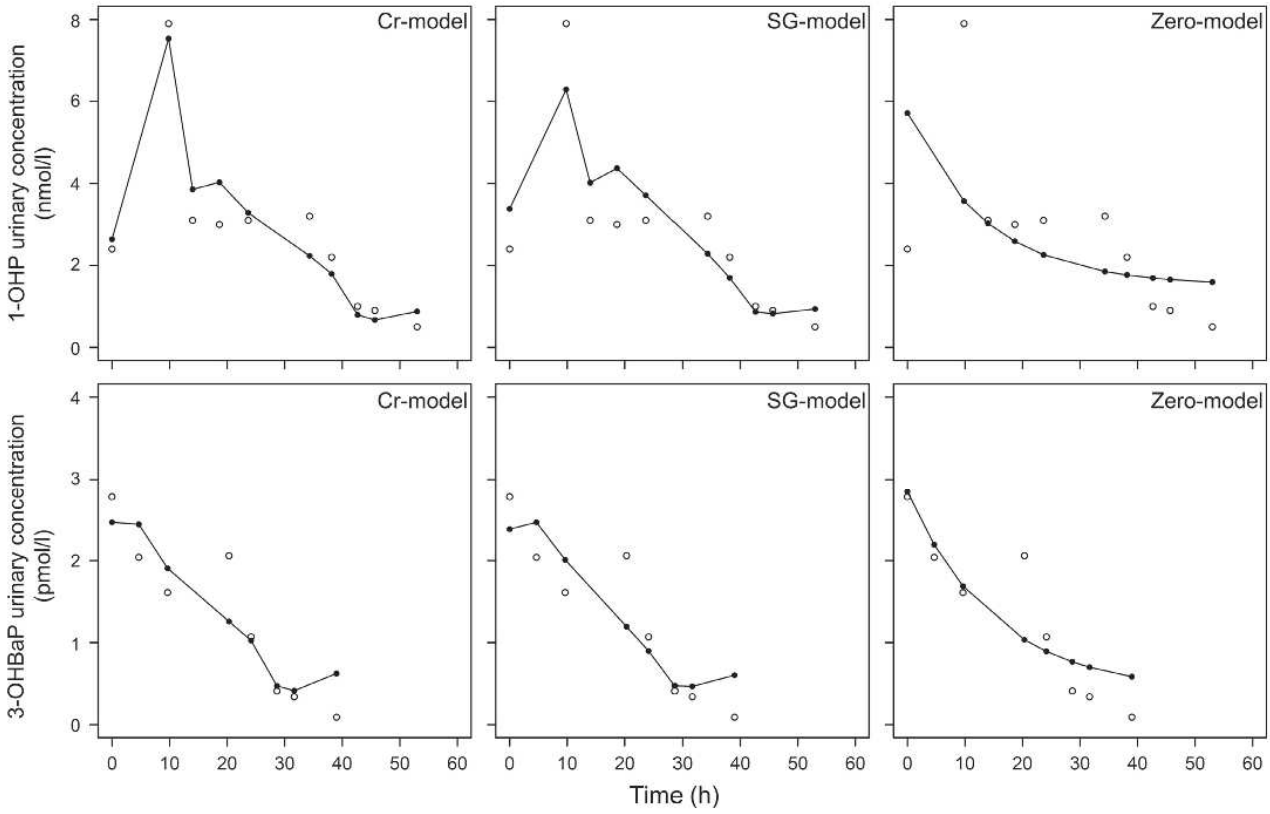


Fig. 3. Comparison of measured urinary concentrations for W1 (open circles) and model simulations (lines and closed circles).

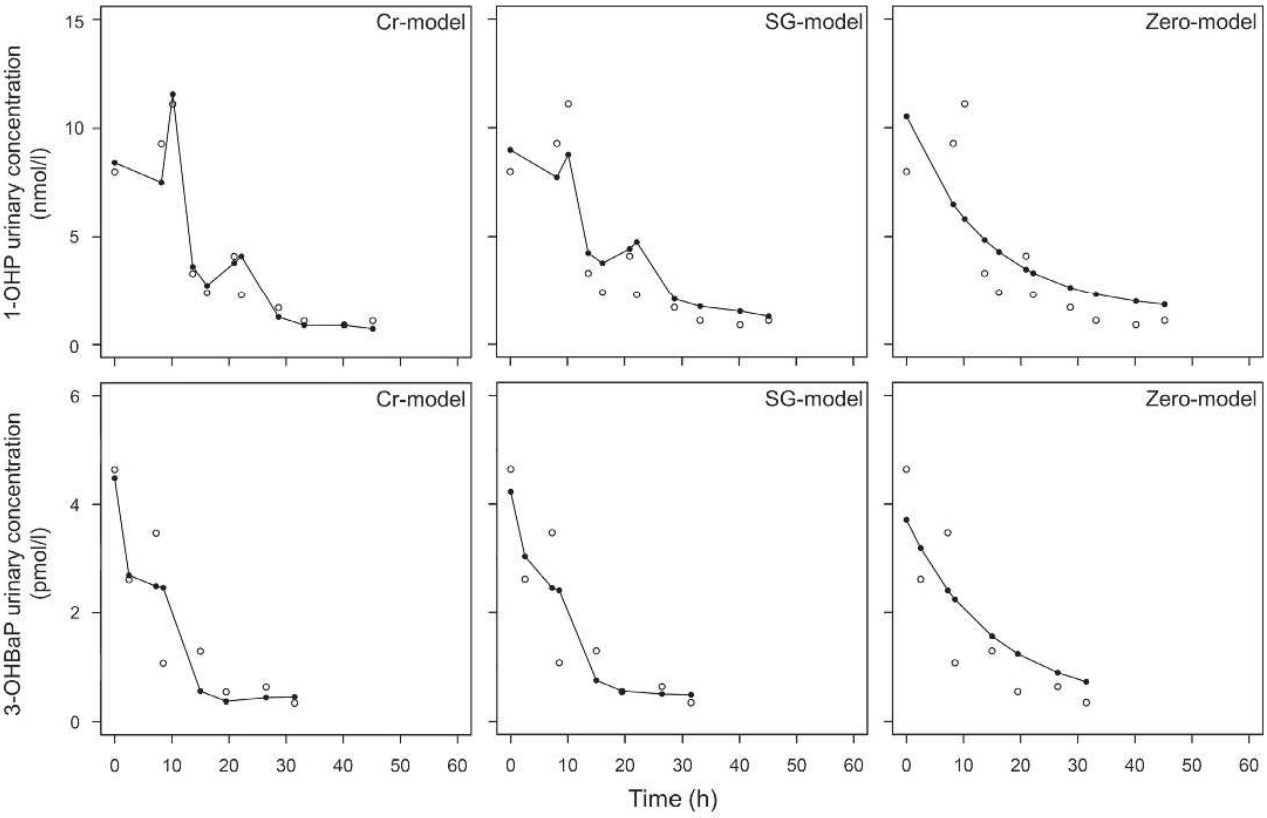


Fig. 4. Comparison of measured urinary concentrations for W2 (open circles) and model simulations (lines and closed circles).

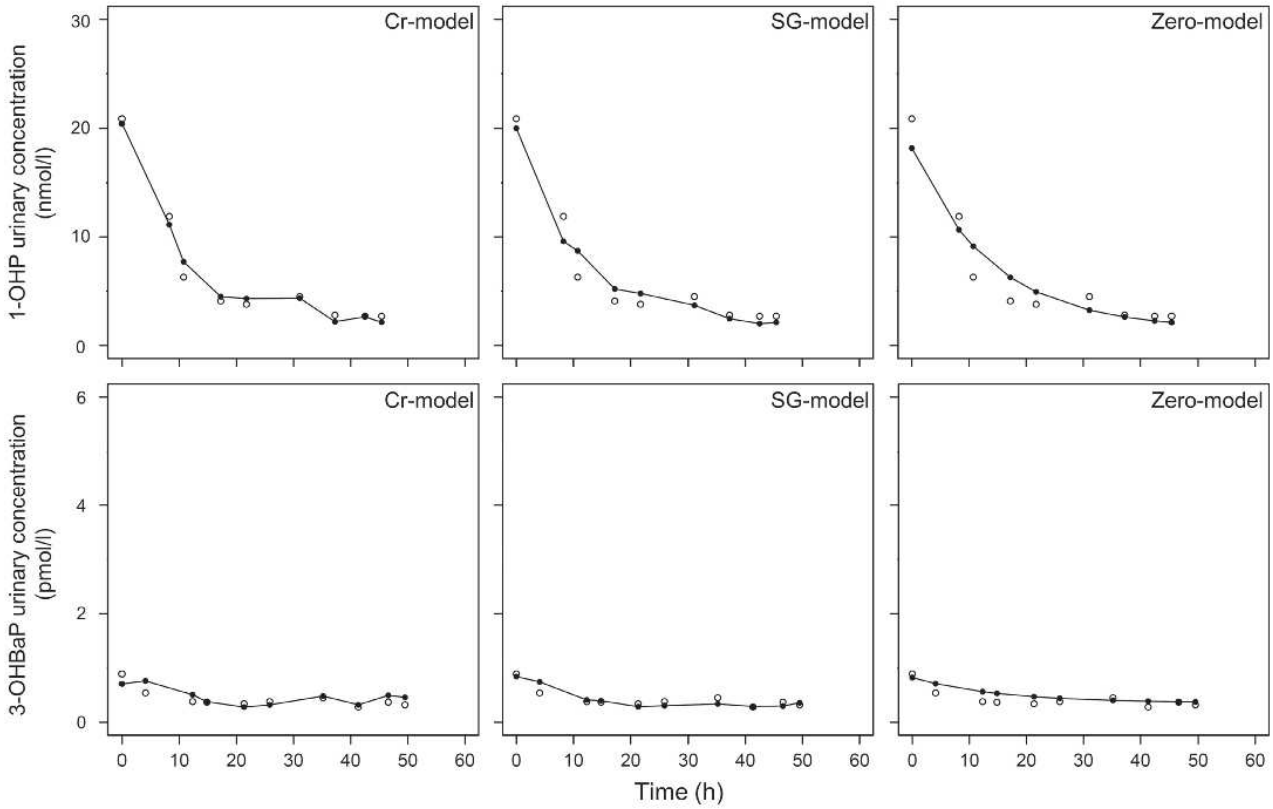


Fig. 5. Comparison of measured urinary concentrations for W3 (open circles) and model simulations (lines and closed circles).

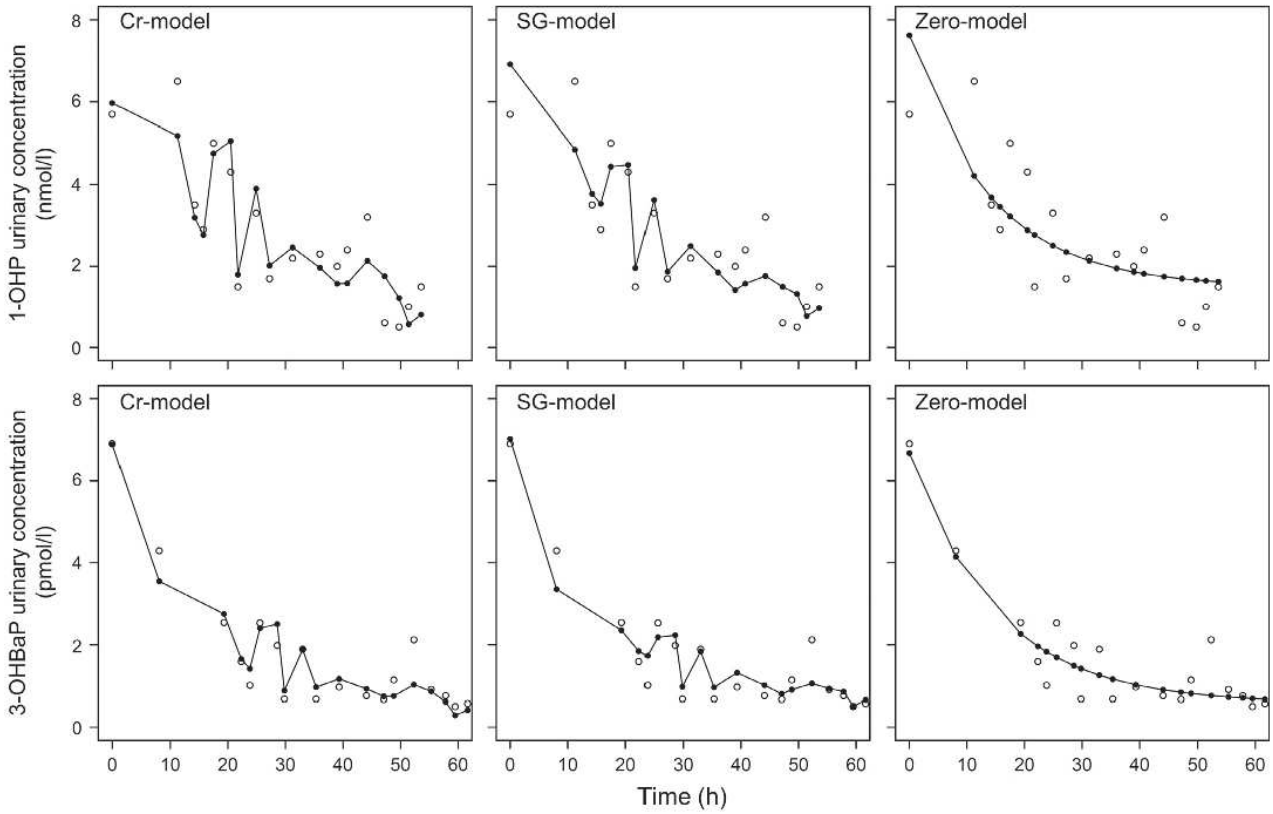


Fig. 6. Comparison of measured urinary concentrations for W4 (open circles) and model simulations (lines and closed circles).

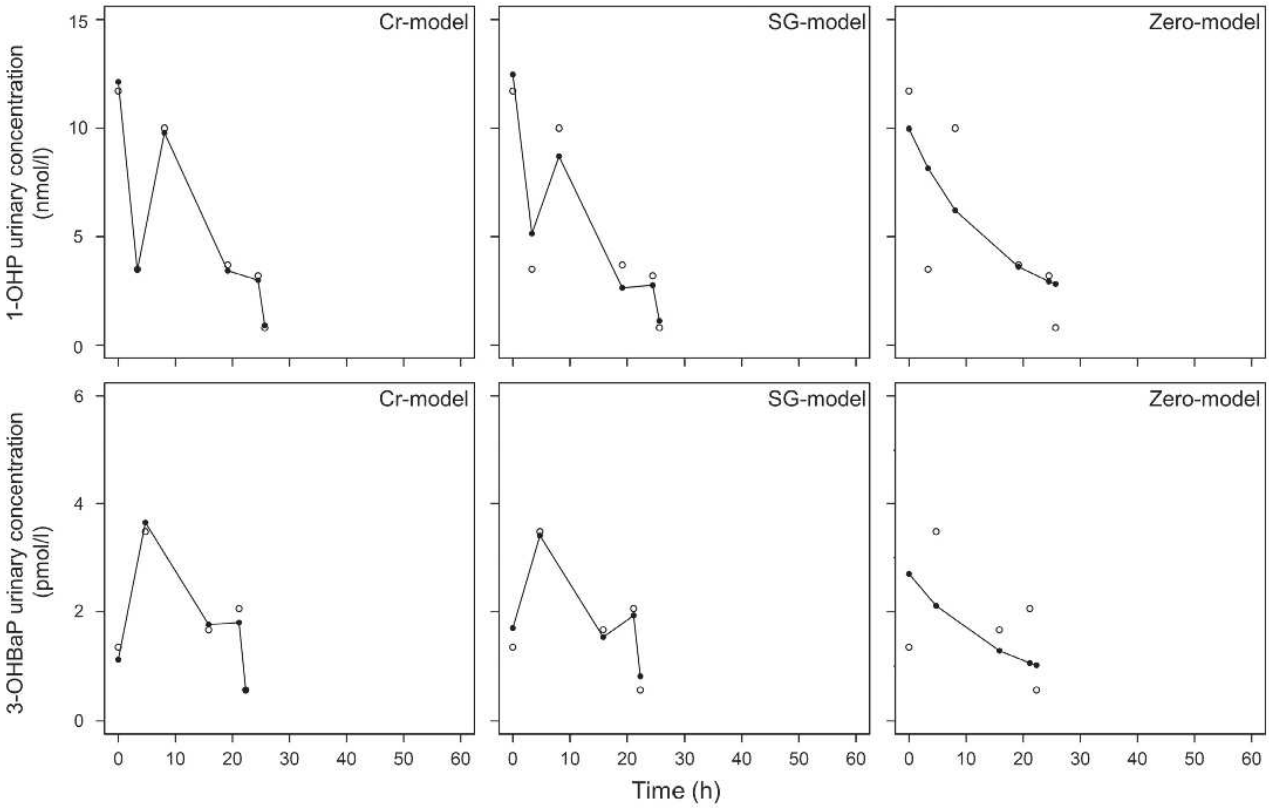


Fig. 7. Comparison of measured urinary concentrations for W5 (open circles) and model simulations (lines and closed circles).

SG_{ref} equal to 1.020 was widely used (Goldberger et al., 1995; Vij and Howell, 1998). For SG-model in the current work, the mean of urinary SG from samples of studied population (1.017) was used as SG_{ref}, as recommended (Truchon et al., 2014). Regarding 1-OHP, lower %RMSE was obtained for Cr-model compared to SG-model. Viau et al. (2004) had already shown that creatinine adjustment was an adapted diuresis correction method for this metabolite. However, for 3-OHBaP, the difference was less evident, with quite similar %RMSE between the two correction modes. To our knowledge, diuresis normalization method was not previously studied for the latter exposure biomarker. Comparison of different diuresis correction ways should provide information about the renal excretion mechanisms of urinary metabolites. First, substances excreted in urine by passive diffusion should not be normalized (Boeniger et al., 1993). Results of this current study were thus in accordance with renal elimination of 1-OHP and 3-OHBaP by glomerular filtration or tubular secretion. Secondly, since Cr-model was better than SG-model for 1-OHP, this metabolite is probably excreted by the same renal mechanism than creatinine, *ie* glomerular filtration without tubular reabsorption (Boeniger et al., 1993). Finally, SG-model was not better for 3-OHBaP, while normalization by SG should be more adapted if it was excreted by active tubular secretion (Truchon et al., 2014), as previously proposed to explain its accumulation in kidney (Marie et al., 2010). Recently, a potential reabsorption of mono-hydroxylated BaP metabolite (including 3-OHBaP) was proposed to explain kidney accumulation (Moreau et al., 2015). Results of the current study were more in accordance with 3-OHBaP tubular reabsorption than active tubular secretion. This hypothesis could also explain the higher %RMSE of kinetic models for 3-OHBaP than 1-OHP since they were built from linear first-order elimination kinetic. However, further works were required to define accurately renal mechanisms of 3-OHBaP excretion. In the end, Cr-model seemed a bit more appropriate to reproduce urinary kinetic than SG-model for both metabolites in case of W3 and W4 and was distinctly better for the others. Thus, use of urinary creatinine adjustment was proposed as good compromise to take into account diuresis effect on urinary 1-OHP and 3-OHBaP concentrations.

Calculated urinary 1-OHP half-life from Cr-model (14.4 h) was two times higher than mean half-life obtained after pyrene inhalation in smokers (St Helen et al., 2012) and corresponded to those observed after dermal uptake in volunteers (Viau and Vyskocil, 1995). In rats, cutaneous absorption of pyrene increased threefold the apparent urinary half-life of 1-OHP compared to intraperitoneal injection (Payan et al., 2008). This skin reservoir effect combined with occupational exposure conditions could explain the high variability of 1-OHP half-lives previously observed (from 2.7 to 14.9 h) in six different workplaces with different personal protection equipment (Lafontaine et al., 2004). In the current study, the low inter-individual variability of 1-OHP half-lives (CI95%=12.0–18.2 h) indicated that PAHs exposure was mainly via cutaneous absorption for every worker. On the other hand, calculated urinary 3-OHBaP half-life from Cr-model (8.9 h) was the same that the previously obtained from occupational exposed workers (Bouchard and Viau, 1996; Lafontaine et al., 2004; Payan et al., 2009) and from rats exposed to BaP via intravenous injection (8.1 h) or via cutaneous application (8.9 h) (Bouchard and Viau, 1996; Lafontaine et al., 2004; Payan et al., 2009). Skin reservoir effect in case of dermal uptake of BaP previously showed (Bouchard and Viau, 1997; Chu et al., 1996) was probably hidden by the accumulation of this metabolite into the kidney. Unlike to 1-OHP, inter-individual variability of 3-OHBaP half-lives from Cr-model was very high. This result was partly due to the short sampling period of W5 (22 h) responsible for consideration of a

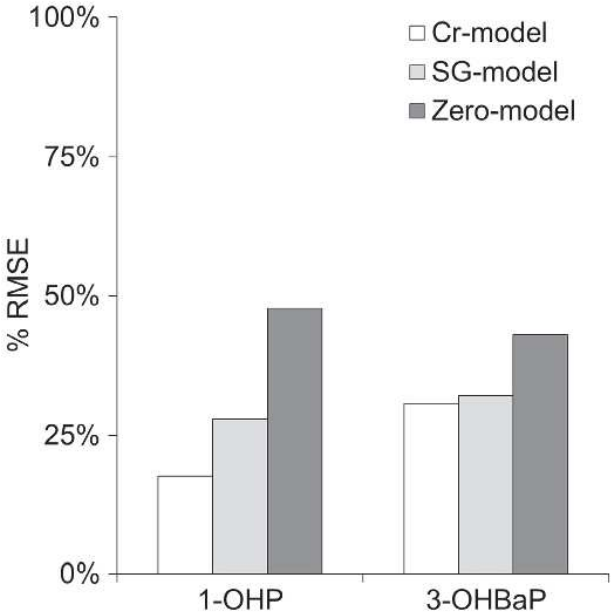


Fig. 8. Percentage of root mean square error (%RMSE) of Cr-model, SG-model and Zero-model for urinary 1-OHP and 3-OHBaP.

high urinary 3-OHBaP background (C0) for this worker. Indeed, delay in the excretion of 3-OHBaP compared to 1-OHP was demonstrated and C0 for this metabolite was significant in the Cr-model (mean 3-OHBaP half-life was increased by 42% when C0 was excluded). Consequently, after exclusion of W5, upper limit of CI95% for calculated 3-OHBaP half-life was drastically decreased, from 49.5 h to 20.9 h while mean was less affected (from 8.9 h to 6.8 h). This result were in agreement with previous studies showing that including background allowed to prevent miscalculation of half-lives (Bartell, 2012; Lafontaine et al., 2000; Li et al., 2012). However, in this study, urinary 1-OHP background coming from lifestyle seemed too low compared to pyrene occupational exposure to impact calculated half-life.

5. Conclusions

Knowledge about urinary elimination kinetic is required to find a compromise between excretion maximum of biomarkers and convenience to perform biomonitoring. The delay observed for maximum urinary excretion rates of 3-OHBaP confirmed that sampling time should be performed the next morning after exposure. Considering workers as a random effect, toxicokinetic mixed effect models proposed in this work allowed to observe inter- and intra-individual variability of urinary biomarkers concentrations. Impact of diuresis, as part of intra-individual variability, was studied and urinary creatinine was found as a better way than SG to normalize urinary concentrations of 1-OHP and as a good compromise for 3-OHBaP. Study of diuresis correction modes also allowed to strengthen the hypothesis of tubular reabsorption of 3-OHBaP as a specific excretion mechanism. Mean apparent urinary half-life of 3-OHBaP and 1-OHP was equal to 8.9 h and 14.4 h, respectively. Finally, due to homogeneous influence of dermal uptake among workers on the kinetic of 1-OHP, inter-individual variability of its half-life was low. On the contrary, high inter-individual variability of 3-OHBaP half-life came from heterogeneous urinary background levels among workers. Such toxicokinetic mixed effects model could be used to other urinary biomarkers of chemicals or metals exposure in order to perform biomonitoring.

Table 2
Calculated parameters of Cr-model and elimination half-lives for urinary 1-OHP and 3-OHBaP.

Metabolite	μCm[a] (SE) [CI95%]	μC0[a] (SE) [CI95%]	μk[b] (SE) [CI95%]	$t_{1/2}$[c] [CI95%]
1-OHP	820** (60) [710–930]	NS	0.048** (0.005) [0.038–0.058]	14.4 [12.0–18.2]
3-OHBaP	0.31* (0.12) [0.08–0.55]	0.02* (0.01) [0.01–0.04]	0.078* (0.033) [0.014–0.143]	8.9 [4.8–49.5]

[a] nmol/mol creatinine
[b] h^{-1}
[c] h
* $p < 0.05$
** $p < 0.01$

Funding sources and ethical approvals

This work was supported by the "Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES)". ANSES's missions include risk assessment in the fields of food, environment and workplace, for the purpose of assisting the authorities on health and safety issues. ANSES is a public authority reporting to the French Ministries of Health, Agriculture, Environment, labor and Consumer Affairs.

Study ethics approval was obtained by CECIC Rhône-Alpes-Auvergne, Clermont-Ferrand, IRB 5891.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the "Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) (2011-CRD-13)" and thank "Région Rhône-Alpes, France (RA0000R604)" for a grant for the thesis of S. Lutier. We thank volunteers who collected numerous biological samples, and Sylvette Liaudy, information specialist, for her work.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.035.

References

ACGIH, 2015. Documentation of the TLVs and BEIs. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH., 272 p. Isbn:978-1-607260-77-6.

Barbeau, D., Lutier, S., Bonneterre, V., Persoons, R., Marques, M., Herve, C., Maitre, A., 2015. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: relations between atmospheric mixtures, urinary metabolites and sampling times. Int Arch Occup Environ Health. Epub ahead of print Mar 6. http://dx.doi.org/10.1007/s00420-015-1042-1.

Barbeau, D., Maitre, A., Marques, M., 2011. Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. Analyst 136, 1183–1191. http://dx.doi.org/10.1039/C0AN00428F.

Barbeau, D., Persoons, R., Marques, M., Herve, C., Laffitte-Rigaud, G., Maitre, A., 2014. Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess

exposure to carcinogenic polycyclic aromatic Hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. Ann. Occup. Hyg. 58, 579–590. http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/meu004.
Bartell, S.M., 2012. Bias in half-life estimates using log concentration regression in the presence of background exposures, and potential solutions. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 22, 299–303. http://dx.doi.org/10.1038/jes.2012.2.
Boeniger, M.F., Lowry, L.K., Rosenberg, J., 1993. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 54, 615–627. http://dx.doi.org/10.1080/15298669391355134.
Boogaard, P.J., 2008. Urinary biomarkers in the risk assessment of PAHs. Occup. Environ. Med. 65, 221–222. http://dx.doi.org/10.1136/oem.2007.034157.
Bouchard, M., Viau, C., 1996. Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a) pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. Toxicol. Appl. Pharmacol. 139, 301–309. http://dx.doi.org/10.1006/taap.1996.0169.
Bouchard, M., Viau, C., 1997. Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration. Can. J. Physiol. Pharm. 75, 185–192. http://dx.doi.org/10.1139/y97-017.
Bouchard, M., Viau, C., 1999. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. Biomarkers 4, 159–187. http://dx.doi.org/10.1080/135475099230859.
Buchet, J.P., Gennart, J.P., Mercado-Calderon, F., Delavignette, J.P., Cupers, L., Lauwerys, R., 1992. Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a coke production and a graphite electrode manufacturing plant: assessment of urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biological indicator of exposure. Br. J. Ind. Med. 49, 761–768.
Buckley, T.J., Lioy, P.J., 1992. An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. Br. J. Ind. Med. 49, 113–124. http://dx.doi.org/10.1136/oem.49.2.113.
Campins-Falco, P., Herraez-Hernandez, R., Sevillano-Cabeza, A., 1993. Column-switching techniques for High-performance liquid chromatography of drugs in biological samples. J. Chromatogr. 619, 177–190.
Chien, Y.C., Yeh, C.T., 2010. Amounts and proportion of administered pyrene dose excreted as urinary 1-hydroxypyrene after dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Arch. Toxicol. 84, 767–776. http://dx.doi.org/10.1007/s00204-010-0570-4.
Chu, I., Dick, D., Bronaugh, R., Tryphonas, L., 1996. Skin reservoir formation and bioavailability of dermally administered chemicals in hairless guinea pigs. Food Chem. Toxicol. 34, 267–276. http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(95)00112-3.
Elovaara, E., Heikkilä, P., Pyy, L., Mutanen, P., Riihimäki, V., 1995. Significance of dermal and respiratory uptake in creosote workers: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of 1-hydroxypyrene. Occup. Env. Med. 52, 196–203. http://dx.doi.org/10.1136/oem.52.3.196.
Forster, K., Preuss, R., Rossbach, B., Bruning, T., Angerer, J., Simon, P., 2008. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. Occup. Env. Med. 65, 224–229. http://dx.doi.org/10.1136/oem.2006.030809.
Gelboin, H.V., 1980. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. Physiol. Rev. 60, 1107–1166.
Gendre, C., Lafontaine, M., Delsaut, P., Simon, P., 2004. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene: assessment of an appropriate sampling time. Polycycl. Aroma. Compd. 24, 433–439. http://dx.doi.org/10.1080/10406630490468766.
Gendre, C., Lafontaine, M., Morele, Y., Payan, J.P., Simon, P., 2002. Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic Hydrocarbons. Polycycl. Aroma. Compd. 22, 761–769. http://dx.doi.org/10.1080/10406630213612.
Goldberger, B.A., Loewenthal, B., Darwin, W.D., Cone, E.J., 1995. Intrasubject variation of creatinine and specific gravity measurements in consecutive urine specimens of heroin users. Clin. Chem. 41, 116–117.
Guignon, N., Sandret, N., 2005. SUMER 2003 : les expositions aux produits cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques, Documents pour le médecin du Trav. 104, pp. 471–483.
Hansen, A.M., Mathiesen, L., Pedersen, M., Knudsen, L.E., 2008. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies – a review. Int. J. Hyg. Environ. Health 211, 471–503. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.09.012.
Heavner, D.L., Morgan, W.T., Sears, S.B., Richardson, J.D., Byrd, G.D., Ogden, M.W., 2006. Effect of creatinine and specific gravity normalization techniques on xenobiotic biomarkers in smokers' spot and 24-h urines. J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 928–942. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.08.008.
Heredia Ortiz, R., Maitre, A., Barbeau, D., Lafontaine, M., Bouchard, M., 2014. Use of physiologically-based pharmacokinetic modeling to simulate the profiles of 3-hydroxybenzo(a)pyrene in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. PLoS One. 9, e102570. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102570.
IARC 2004. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon volume 83. Lyon, IARC, p. 1470. ISBN 978-92-832-1283-6.
IARC, 2010. Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon volume 92, Lyon, IARC, p. 868. ISBN : 978-92-832-1292-8.
Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Leijdekkers, C.M., Bos, R.P., Henderson, P.T., 1985. 1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. Int. Arch. Occup. Environ. Health 57, 47–55. http://dx.doi.org/10.1007/BF00383545.
Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Scheepers, P.T.J., Bos, R.P., Henderson, P.T., Nijenhuis, E.H., Veenstra, S.J., Brouns, R.M.E., Winkes, A., 1988. 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. Ann. Occup. Hyg. 32, 35–43. http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/32.1.35.
Lafontaine, M., Champmartin, C., Simon, P., Delsaut, P., Funck-Brentano, C., 2006. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers. Toxicol. Lett. 162, 181–185. http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.019.
Lafontaine, M., Gendre, C., Delsaut, P., Simon, P., 2004. Urinary 3-hydroxybenzo(a) pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limit value. Polycycl. Aroma. Compd. 24, 441–450. http://dx.doi.org/10.1080/10406630490471447.
Lafontaine, M., Gendre, C., Morele, Y., Laffitte-Rigaud, G., 2002. Excretion of urinary 1-hydroxypyrene in relation to the penetration routes of polycyclic aromatic hydrocarbons. Polycycl. Aroma. Compd. 22, 579–588. http://dx.doi.org/10.1080/10406630213600.
Lafontaine, M., Payan, J.P., Delsaut, P., Morele, Y., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in an artificial shooting target factory: assessment of 1-hydroxypyrene urinary excretion as a biological indicator of exposure. Ann. Occup. Hyg. 44, 89–100. http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/44.2.89.
Lee, E., Park, H.K., Kim, H.J., 1996. Adjustment of urinary mercury in health risk assessment of mercury. J. Korean Med. Sci. 11, 319–325. http://dx.doi.org/10.3346/jkms.1996.11.4.319.
Levine, L., Fahy, J.P., 1945. Evaluation of urinary lead determinations. J. Ind. Hyg. Toxicol. 27, 217–223.
Li, Z., Romanoff, L., Bartell, S., Pittman, E.N., Trinidad, D.A., McClean, M., Webster, T. F., Sjödin, A., 2012. Excretion profiles and half-lives of ten urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites after dietary exposure. Chem. Res. Toxicol. 25, 1452–1461. http://dx.doi.org/10.1021/tx300108e.
Marczynski, B., Raulf-Heimsoth, M., Spickenheuer, A., Pesch, B., Kendzia, B., Mensing, T., Engelhardt, B., Lee, E.H., Schindler, B.K., Heinze, E., Welge, P., Bramer, R., Angerer, J., Breuer, D., Kafferlein, H.U., Bruning, T., 2011. DNA adducts and strand breaks in workers exposed to vapours and aerosols of bitumen: associations between exposure and effect. Arch. Toxicol. 85 (Suppl. 1), S53–64. http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0682-5.
Marie, C., Bouchard, M., Heredia-Ortiz, R., Viau, C., Maître, A., 2010. 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. 30, 402–410. http://dx.doi.org/10.1002/jat.1511.
Moreau, M., Ayotte, P., Bouchard, M., 2015. Kinetics of diol and hydroxybenzo[a] pyrene metabolites in relation to DNA adduct formation and gene expression in rats. J. Toxicol. Environ. Health A 78, 725–746. http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1028119.
Motorykin, O., Santiago-Delgado, L., Rohlman, D., Schrlau, J.E., Harper, B., Harris, S., Harding, A., Kile, M.L., Massey Simonich, S.L., 2015. Metabolism and excretion rates of parent and hydroxy-PAHs in urine collected after consumption of traditionally smoked salmon for Native American volunteers. Sci. Total Environ. 514, 170–177. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.083.
Payan, J.P., Lafontaine, M., Simon, P., Marquet, F., Champmartin-Gendre, C., Beydon, D., Ferrari, E., 2008. In vivo and in vitro percutaneous absorption of [14C]pyrene in Sprague Dawley male rats: skin reservoir effect and consequence on urinary 1-OH pyrene excretion. Arch. Toxicol. 82, 739–747. http://dx.doi.org/10.1007/s00204-008-0300-3.
Payan, J.P., Lafontaine, M., Simon, P., Marquet, F., Champmartin-Gendre, C., Beydon, D., Wathier, L., Ferrari, E., 2009. 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. Arch. Toxicol. 83, 873–883. http://dx.doi.org/10.1007/s00204-009-0440-0.
Petry, T., Schmid, P., Schlatter, C., 1996. Airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. Ann. Occup. Hyg. 40, 345–357. http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/40.3.345.
Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Springer-Verlag, New York, p. 537, ISBN: 978-0-387-98957-0.
Sauvé, J.F., Lévesque, M., Huard, M., Drolet, D., Lavoué, J., Tardif, R., Truchon, G., 2015. Creatinine and specific gravity normalization in biological monitoring of occupational exposures. J. Occup. Environ. Hyg. 12, 123–129. http://dx.doi.org/10.1080/15459624.2014.955179.
Siwińska, E., Mielzyńska, D., Kapka, L., 2004. Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in Coke oven workers. Occup. Env. Med. 61, e10. http://dx.doi.org/10.1136/oem.2002.006643.
Sobus, J.R., McClean, M.D., Herrick, R.F., Waidyanatha, S., Onyemauwa, F., Kupper, L. L., Rappaport, S.M., 2009. Investigation of PAH biomarkers in the urine of workers exposed to hot asphalt. Ann. Occup. Hyg. 53, 551–560. http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.09.006.
St Helen, G., Goniewicz, M.L., Dempsey, D., Wilson, M., Jacob 3rd, P., Benowitz, N.L., 2012. Exposure and kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cigarette smokers. Chem. Res. Toxicol. 25, 952–964. http://dx.doi.org/10.1021/tx300043k.
Strickland, P., Kang, D., Sithisarankul, P., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. Env. Health Perspect. 104 (Suppl. 5), 927–932.
Talaska, G., Thoroman, J., Schuman, B., Kafferlein, H.U., 2014. Biomarkers of

polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in European coke oven workers. Toxicol. Lett. 231, 213–216. http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.10.025.

Truchon, G., Huard, M., Lévesque, M., Sauvé, J.F., Larivière, P., Tardif, R., 2014. Surveillance biologique de l'exposition professionnelle – quel mode de correction urinaire choisir lors de prélèvements ponctuels ? Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), Montréal, p. 55. ISBN 978-2-89631-728-8.

Unwin, J., Cocker, J., Scobbie, E., Chambers, H., 2006. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. Ann. Occup. Hyg. 50, 395–403. http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/mel010.

VanRooij, J.G., Bodelier-Bade, M.M., Jongeneelen, F.J., 1993. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. Br. J. Ind. Med. 50, 623–632. http://dx.doi.org/10.1136/oem.50.7.623.

Viau, C., Lafontaine, M., Payan, J.P., 2004. Creatinine normalization in biological monitoring revisited: the case of 1-hydroxypyrene. Int. Arch. Occup. Environ. Health 77, 177–185. http://dx.doi.org/10.1007/s00420-003-0495-9.

Viau, C., Vyskocil, A., 1995. Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. Sci. Total Environ. 163, 187–190. http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(95)04495-M.

Vij, H.S., Howell, S., 1998. Improving the specific gravity adjustment method for assessing urinary concentrations of toxic substances. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 59, 375–380. http://dx.doi.org/10.1080/15428119891010622.

Weaver, V.M., Kotchmar, D.J., Fadrowski, J.J., Silbergeld, E.K., 2015. Challenges for environmental epidemiology research: are biomarker concentrations altered by kidney function or urine concentration adjustment? J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. http://dx.doi.org/10.1038/jes.2015.8

Appendix A. Supplementary material

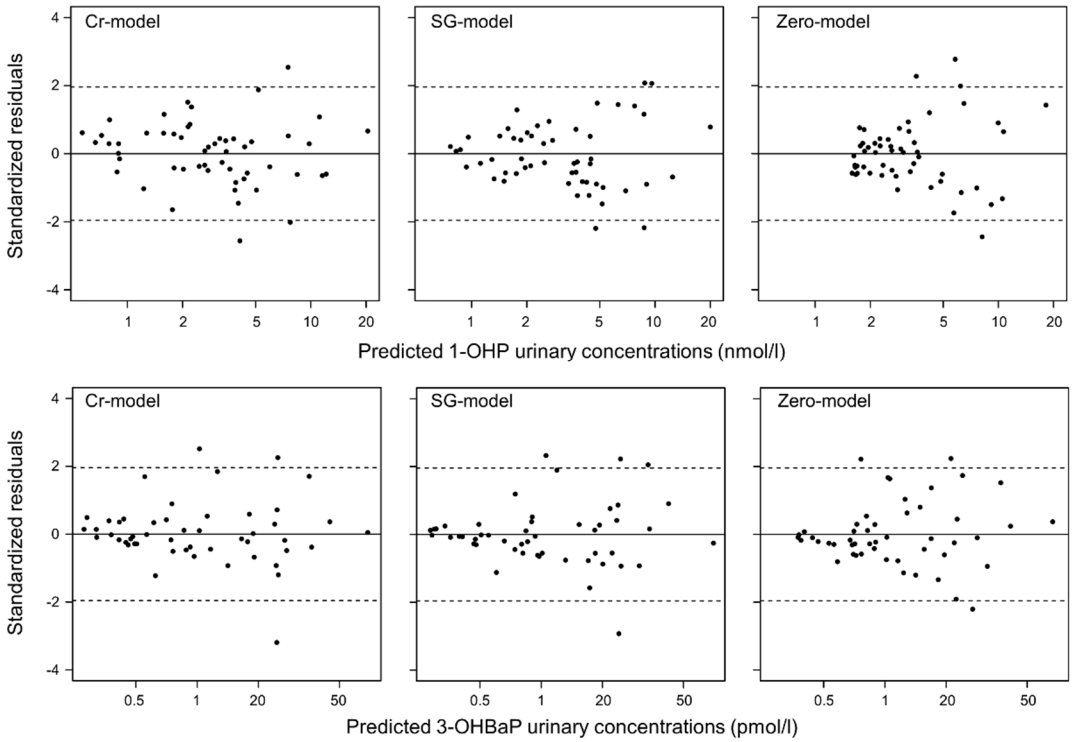


Fig. A.1. Normalized residuals in function of predicted urinary concentrations of three models for 1-OHP and 3-OHBaP.

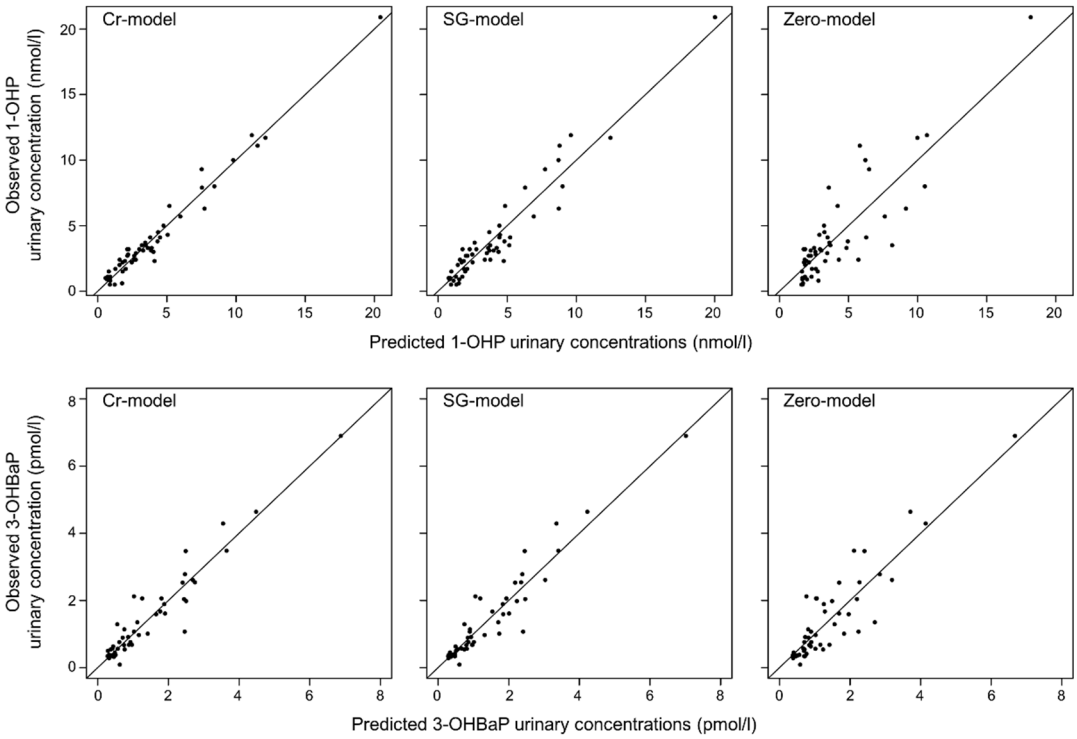


Fig. A.2. Scatter plots of observed in function of predicted urinary concentrations of three models for 1-OHP and 3-OHBaP.

III.2. Synthèse de l'article

III.2.1. Matériels et Méthodes

Chez 6 des 7 travailleurs suivis pendant la semaine de travail, toutes les urines ont été collectées dans leur intégralité pendant les deux jours de repos suivants. Cette étude inclut également les prélèvements réalisés en début et en fin de poste du dernier jour travaillé. Les analyses du 3-OHBaP et du 1-OHP urinaires ont été réalisées en HPLC-FLD.

Afin de pouvoir comparer les modes de correction de la diurèse, la créatinine urinaire a été quantifiée par la méthode de Jaffe et la SG a été mesurée par réfractométrie.

Les cinétiques d'élimination urinaire des deux métabolites ont été étudiées à l'aide de modèles non linéaires à effets mixtes. A partir d'un modèle précédemment développé et appliqué aux métabolites monohydroxylés des HAP gazeux [Bartell 2012, Li 2012b], les concentrations urinaires non corrigées ont été utilisées et le mode de correction de la diurèse a été intégrée comme variable indépendante. Trois modèles ont été créés pour chaque métabolite qui intègrent respectivement la créatinine, la SG et aucun mode de correction de la diurèse : Cr-model, SG-model et Zero-model. A partir de la constante d'élimination déterminée par le modèle, la demi-vie d'élimination urinaire a été calculée.

Le critère d'information d'Akaike (AIC) a été utilisé pour comparer les modèles et le pourcentage de la racine du carré moyen des erreurs (%RMSE) pour comparer l'erreur résiduelle.

I.1.1. Résultats

Un travailleur sur les six n'a pas collecté les urines des premières 24h et a donc été exclu de l'étude. Indépendamment du mode de correction de la diurèse, les concentrations urinaires de 3-OHBaP (coefficient de variation compris entre 70 et 79%) sont plus variables que celles du 1-OHP (coefficient de variation compris entre 28 et 55%).

Pour le 1-OHP, les vitesses moyennes d'élimination urinaire (calculées par période de 12h) diminuent au cours du temps. Pour le 3-OHBaP, les vitesses moyennes augmentent entre la période 0-12h et 12-24h avant de diminuer au cours du temps. La demi-vie d'élimination urinaire moyenne était respectivement de 14,4h et de 8,9h pour le 1-OHP et le 3-OHBaP.

L'AIC est plus faible lorsqu'un moyen de correction est ajouté comme variable indépendante pour les deux métabolites. La variance résiduelle décroit respectivement dans l'ordre suivant Zero-model (48%) >> SG-model (28%) > Cr-model(18%) et Zero-model (43%) > SG-model (32%) ≈ Cr-model(31% pour le 1-OHP et le 3-OHBaP.

III.2.2. Conclusions

Un retard d'élimination a été observé pour le 3-OHBaP par rapport au 1-OHP ce qui avait déjà été observé chez le rat et chez l'homme après une journée d'exposition professionnelle. Les demi-vies d'élimination urinaire estimées sont similaires à celles mesurées chez le rat et chez l'homme. L'homogénéité des voies d'absorption au sein de la population étudiée (absorption essentiellement cutanée) permet d'avoir des demi-vies peu variables pour le 1-OHP (intervalle de confiance à 95% : 12,0-18,2h). En effet, les voies d'absorption influencent le temps de demi-vie urinaire de ce métabolite. La moyenne des demi-vies d'élimination du 1-OHP mesurées chez l'homme était respectivement de 6,0h et de 11,8h après une exposition par inhalation ou par voie cutanée [Viau 1995, St Helen 2012]. Ces différences en fonction de la voie d'absorption ont également été montrées chez le rat où la demi-vie d'élimination du 1-OHP après exposition par voie cutanée était trois fois supérieure à celle mesurée après une injection intrapéritonéale [Payan 2008].

En revanche, la demi-vie du 3-OHBaP est similaire à celle déjà observée en population professionnelle (8,9h) et à celles mesurées chez des rats exposés par injection IV (8,1h) ou par voie cutanée (8,9h) [Bouchard 1996, Lafontaine 2004, Payan 2009]. Ainsi, la voie d'absorption n'influence pas la demi-vie d'élimination urinaire du 3-OHBaP. L'effet réservoir de la peau qui

a déjà été démontré [Chu 1996, Bouchard 1997] est probablement masqué par l'accumulation du 3-OHBaP au niveau du rein.

Contrairement au 1-OHP, les niveaux de base dus à l'exposition environnementale aux HAP sont non négligeables pour déterminer la demi-vie du 3-OHBaP. Lorsque les niveaux de base ne sont pas intégrés au modèle, la demi-vie urinaire du 3-OHBaP augmente de 42%. De plus, la grande variabilité des niveaux de base entre les salariés engendre une importante variabilité inter-individuelle de la demi-vie du 3-OHBaP (intervalle de confiance à 95% : 4,8-49,5h).

La prise en compte de la diurèse est nécessaire pour corriger les concentrations urinaires de 3-OHBaP et de 1-OHP. La créatinine urinaire est plus appropriée que la SG pour le 1-OHP et est un bon compromis pour le 3-OHBaP. La SG n'apparaissant pas plus adaptée que la créatinine urinaire, cela permet de penser que le 3-OHBaP n'est pas activement sécrété au niveau du rein mais plutôt réabsorbé après filtration glomérulaire.

Le 3-OHBaP étant probablement accumulé au niveau du rein, cette étude confirme que le prélèvement doit être effectué en fin de poste plus 16h pour la SBEP quand l'exposition est variable au cours de la semaine de travail.

Ces modèles toxicocinétiques pourraient être utilisés pour d'autres biomarqueurs d'exposition aux composés organiques ou aux métaux.

IV. Conclusions

Bien que le 1-OHP reflète l'exposition globale aux HAP (gazeux et particulaires), son utilisation comme seul biomarqueur n'est recommandée que lorsque la composition des mélanges émis est constante [Viau 2002a]. L'importante variabilité des mélanges (en fonction des postes et des activités du jour), notamment au niveau du ratio pyrène gazeux sur pyrène particulaire, mais aussi des cinétiques d'élimination en fonction des composés et des voies d'absorption complique l'interprétation des concentrations urinaires de 1-OHP en vue de l'estimation de l'exposition aux HAP cancérogènes contenus dans la phase particulaire.

Par rapport au 1-OHP, le 3-OHBaP est un biomarqueur d'exposition plus pertinent pour estimer le risque cancérogène. Ces deux études ont permis d'apporter des connaissances supplémentaires quant à l'utilisation du 3-OHBaP en tant que biomarqueur d'exposition au BaP. L'accumulation du 3-OHBaP au niveau du rein engendre une cinétique d'élimination urinaire atypique. Après une seule journée d'exposition professionnelle, un retard d'excrétion avait été observé pour le 3-OHBaP et le moment de prélèvement recommandé était le début de poste du dernier jour travaillé de la semaine [Gendre 2004]. Une autre étude avait montré que les concentrations urinaires de 3-OHBaP en début de poste du dernier jour de la semaine de travail n'étaient pas significativement plus élevées que celles de fin de poste de l'avant dernier jour lorsque les expositions étaient constantes tout au long de la semaine de travail [Barbeau 2014]. Il avait été ainsi proposé de prélever les urines de fin de poste du dernier jour de travail.

Les deux articles de ce travail de thèse, qui sont résumés ci-dessus, ont étudié des niveaux d'exposition professionnelle très variables tout au long de la semaine de travail. Elles ont permis de confirmer que dans ce cas le prélèvement des urines devait être réalisé en fin de poste plus 16h. De par son accumulation au cours de la semaine, il est également recommandé d'effectuer le prélèvement en début de poste du dernier jour travaillé. Ce moment de prélèvement permet de prendre en compte le délai d'excrétion tout en étant facilement réalisable sur le terrain. Il a

également été vérifié que la prise en compte de la diurèse était nécessaire pour corriger les concentrations de 3-OHBaP et que la créatinine urinaire est une méthode pertinente.

En revanche, le 3-OHBaP est un biomarqueur dont l'interprétation des concentrations urinaires s'avère parfois difficile. Sa cinétique d'élimination urinaire atypique, due à son accumulation rénale, engendre une variabilité biologique importante de ce biomarqueur ce qui complique son interprétation, et ce, surtout quand la SBEP est réalisée avec un seul prélèvement par individu.

De plus, les faibles concentrations urinaires ne permettent pas d'effectuer la SBEP dans des secteurs professionnels avec de faibles niveaux d'exposition [Leroyer 2010]. Enfin le 3-OHBaP est issu des voies de détoxication et ne représente pas la fraction absorbée de BaP qui a suivi des voies de métabolisation toxique.

Chapitre 3 :

Surveillance biologique de l'exposition aux HAP de la phase gazeuse

I. Contexte scientifique

Les HAP gazeux étant plus abondants dans la grande majorité des mélanges atmosphériques et étant majoritairement éliminés par voie urinaire, les concentrations de leurs métabolites sont retrouvées dans les urines à niveaux plus élevés que ceux des HAP particulaires. Ces composés constituent une bonne alternative pour le suivi de la population générale et pour les secteurs professionnels ayant de faibles niveaux d'exposition. De plus, avoir des biomarqueurs d'exposition spécifiques de la phase gazeuse permet de mieux définir les mélanges auxquels sont exposées les populations.

Parmi les HAP gazeux, le Nap est le HAP majoritaire dans la plupart des mélanges. Le Flu et le Phe sont souvent les deux autres HAP les plus abondants après le Nap. Ainsi, ce sont les métabolites urinaires monohydroxylés de ces trois HAP qui sont le plus souvent utilisés pour la SBE de la population générale. Ces métabolites ont également été utilisés dans différents milieux professionnels. Pour la SBEP, les biomarqueurs d'exposition nécessitent d'être fortement associés aux niveaux d'exposition rencontrés sur le lieu de travail [Seidel 2008]. Toutefois, les fortes concentrations rencontrées en environnement peuvent venir interférer avec l'exposition professionnelle et biaiser les interprétions des concentrations urinaires observées.

Aujourd'hui, aucun métabolite issu de ces HAP n'a clairement été défini comme un biomarqueur d'exposition pertinent pour la SBEP. L'objectif cette partie est d'étudier les différents métabolites urinaires du Nap, du Flu et du Phe afin de sélectionner les métabolites les plus intéressants en tant que biomarqueur d'exposition professionnelle.

II. Comparaison de la spécificité des métabolites urinaires du Nap, du Flu et du Phe en tant que biomarqueur d'exposition professionnelle

II.1. Article 3 soumis

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Hazardous Materials

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Comparison of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons' metabolites according to their specificity as biomarkers of occupational exposure: selection of 2-hydroxyfluorene and 2-hydroxyphenanthrene

Article Type: Research Paper

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Biomonitoring; 2-hydroxyfluorene; 2-hydroxyphenanthrene

Corresponding Author: Mr. damien barbeau, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Université Grenoble Alpes

First Author: Simon Lutier

Order of Authors: Simon Lutier; Anne Maitre; Renaud Persoons; Marie Marques; damien barbeau, Ph.D

Abstract: Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) occurs by respiratory, digestive and dermal absorption through contact with environment and in some occupational sectors. Biomonitoring takes all pathways into account but sensitive and specific biomarkers are required. Nowadays, no PAH metabolite was selected as better biomarker than the others. To identify the best candidates, relation between low occupational PAH exposure, measured by individual atmospheric samples, and urinary excretion of Naphtalene, Fluorene and Phenanthrene metabolites was studied in a carbon electrode workers group. Linear mixed effects models were built to select explanatory variables and estimate variance component. Urinary creatinine was a predictor of metabolites levels confirming the importance of diuresis for interpreting results. Increase of coefficients for the first days of the week suggested an accumulation of PAH into organism. High significance of pre-shift sampling time combined with positive coefficients of post-shift indicated that urine should be sampled at the end of the workday in association with pre-shift urine to avoid misinterpretations. Among the 10 metabolites studied, urinary 2-hydroxyfluorene and 2-hydroxyphenanthrene showed the highest increase of variance explained by models after inclusion of individual atmospheric levels as explanatory variable. Priority could be given to 2-hydroxyfluorene due to higher excretion levels than 2-hydroxyphenanthrene.

Manuscript
Click here to view linked References

Comparison of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons' metabolites according to their specificity as biomarkers of occupational exposure: selection of 2-hydroxyfluorene and 2-hydroxyphenanthrene

Simon Lutier[1], Anne Maitre[1,2], Renaud Persoons[1,2], Marie Marques[1], Damien Barbeau[1,2,*]

[1] EPSP-TIMC (CNRS UMR 5525), Université Grenoble Alpes, TIMC-IMAG, F-38000 Grenoble, France

[2] Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, DBTP, CHU de Grenoble, France

Simon Lutier : SLutier@chu-grenoble.fr

Anne Maitre : anne.maitre@univ-grenoble-alpes.fr

Renaud Persoons : RPersoons@gchu-grenoble.fr

Marie Marques : MMarques@chu-grenoble.fr

* Corresponding author: Dr Barbeau, Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, Université Joseph Fourier – Grenoble 1, UFR de Médecine, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, FRANCE.

Tel.: +33 4 76 76 51 78. Fax: +33 4 76 76 56 64.

E-mail address: DBarbeau@chu-grenoble.fr

Highlights

- 2-hydroxyfluorene and 2-hydroxyphenanthrene are the best PAH exposure biomarkers
- Low occupational and environmental exposures can be studied
- Urine must be sampled at the beginning and end of days to avoid misinterpretation

Abstract

Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) occurs by respiratory, digestive and dermal absorption through contact with environment and in some occupational sectors. Biomonitoring takes all pathways into account but sensitive and specific biomarkers are required. Nowadays, no PAH metabolite was selected as better biomarker than the others. To identify the best candidates, relation between low occupational PAH exposure, measured by individual atmospheric samples, and urinary excretion of Naphtalene, Fluorene and Phenanthrene metabolites was studied in a carbon electrode workers group. Linear mixed effects models were built to select explanatory variables and estimate variance component. Urinary creatinine was a predictor of metabolites levels confirming the importance of diuresis for interpreting results. Increase of coefficients for the first days of the week suggested an accumulation of PAH into organism. High significance of pre-shift sampling time combined with positive coefficients of post-shift indicated that urine should be sampled at the end of the workday in association with pre-shift urine to avoid misinterpretations. Among the 10 metabolites studied, urinary 2-hydroxyfluorene and 2-hydroxyphenanthrene showed the highest increase of variance explained by models after inclusion of individual atmospheric levels as explanatory variable. Priority could be given to 2-hydroxyfluorene due to higher excretion levels than 2-hydroxyphenanthrene.

Keywords

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Biomonitoring

2-hydroxyfluorene

2-hydroxyphenanthrene

1. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are carcinogenic pollutants ubiquitous in environment mainly emitted by anthropogenic activities via incomplete organic matter combustion processes [1]. According to molecular weight, the lightest PAH are emitted in atmosphere under gaseous form, while the heaviest are adsorbed on particulate matter. Generally, gaseous PAH are more abundant than particulate congeners in complex mixtures present in the atmosphere [2]. Among PAH, naphthalene (Nap), fluorene (Flu) and phenanthrene (Phe) are especially abundant both in environment [3-5] and in industrial sectors, including electrode production plant.[2, 6]. Despite the fact that most carcinogenic PAH are contained in particulate phase, numerous gaseous congeners belong to the list of 16 priority PAH established by United States Environmental Protection Agency [7]. Nap is classified in the group of possibly carcinogenic agents to humans.[8] While Flu and Phe are not classifiable as to their carcinogenicity, they induce detoxification enzymes [9], probably via constitutive androstane receptor like pyrene does [10], and could modify metabolism of other PAH. Potential cocktail effects of complex mixtures are not well known.

Due to potential health effect of PAH mixtures exposure, assessing health risk remains a major issue. Advances in analytical chemistry, in combination with recognition of the substantial uncertainties involved in estimating environmental measures, lead to a shift toward assessing humans' exposures to chemicals through biomonitoring [11]. Indeed, biomarkers take into account all routes of absorption (inhalation, skin, ingestion), both occupational and leisure exposures, and individual differences such as metabolic capabilities [12]. Biomonitoring is particularly suitable for PAH since they are absorbed by inhalation but also via dermal uptake and ingestion [3]. Moreover, differences in metabolic capabilities were reported between individuals [13]. In case of occupational exposure, biomonitoring also takes into account personal protection equipment efficiency [14].

Urinary 1-hydroxypyrene, the main urinary metabolite of pyrene, was initially proposed by Jongeneelen in 1985[15] and is currently the most used PAH biomarker [16]. 1-hydroxypyrene represents both gaseous and particulate phases indifferently [17] and could be a relevant biomarker to assess total PAH exposure. However, it is not a relevant biomarker because absorption ways, carcinogenic risk and required protective equipment differ between gaseous and particulate phases. Other urinary metabolites are proposed such as 3-hydroxybenzo(a)pyrene, resulting from carcinogenic particulate benzo(a)pyrene exposure [18]. But due to the very low amounts excreted in urine, this latter metabolite may not be suitable for assessing low exposure [19]. On the contrary, urinary metabolites concentrations of Nap and Flu were well correlated with low atmospheric levels of parent compounds, while those of Phe seemed be more influenced by diet [4, 20]. In the case of

biomonitoring at work, a good correlation was found between Phe levels and the sum of its urinary metabolites concentrations, while metabolites of Nap were too much influenced by tobacco consumption [6, 21, 22]. Metabolites of gaseous PAH seemed thus suitable for assessing low exposures, but the strong influence of environmental sources of PAH on their excreted amounts could alter interpretation of results for occupational exposure assessment.

Although biomarkers are closer to the biologically relevant dose than environmental measures [23], biomonitoring may represent a snapshot in time while variability of biomarker concentrations come from many factors in addition to magnitude of exposure [24]. Longitudinal data analyses, especially with mixed effects models, allow to partition the variability of biomarkers levels into intra- and inter-individual variance in order to estimate the importance of timed events (*e.g.,* sampling time, frequency, duration of exposure,…) and kinetic processes [25, 26]. Such study showed the influence of diuresis on urinary Phe metabolites levels and the importance to correct concentrations by urinary creatinine [27]. Quantitative information on exposure variability is also important to compare different biomarkers in epidemiological investigations [28]. Thus, Addition of fixed effects, as individual or work characteristics, to one-way random effect model decreased the unexplained variance of urinary concentrations and allowed to study biomarker relevance [29]. Sobus et al. showed that 63% to 82% of variance of urinary Phe metabolites concentrations in a group of asphalt workers was explained by occupational exposure, depending on metabolite [30]. Use of several metabolites from the same PAH to perform exposure assessment complicates the interpretation of biomonitoring results and the sum of metabolites levels induces a loss of information [31]. However, no metabolite of gaseous PAH has so far been explicitly selected as a better biomarker of exposure with respect to its ability to reflect occupational exposure.

The aim of this work was thus to identify the most relevant biomarker(s) among urinary metabolites of Nap, Flu and Phe for assessing low occupational PAH exposure. For this purpose, intra- and inter-individual variability of both atmospheric PAH levels and urinary metabolites concentrations were calculated thanks to linear mixed effects models from a longitudinal study performed during the whole working week of carbon electrode production workers.

2. Methods

2.1 Study population

The subjects were 7 non-smoking, healthy, male volunteers, between 30 and 60-years old, working in a prebaked electrode production plant. Detailed information about products used, processes and daily tasks performed, as

well as collective and personal protective equipment were collected and described previously [17]. Each worker gave their informed consent to participate in this study. Study ethics approval was obtained by CECIC Rhône-Alpes-Auvergne, Clermont-Ferrand, IRB 5891.

2.2. Reagents and standards

Mix of Nap, Flu and Phe; solutions of 2-Nap and 1-Nap-2,3,4,5,6,7,8-d7 (1-Nap_{d7}); 2- and 9-Flu in powder form; BSTFA with 1% of trimethylchlorosilane were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Solutions of 1-Nap, 1- and 4-Phe; 2-, 3- and 9-Phe in powder form were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Solution of 3-Flu was purchased from LGC standards (Molsheim, Germany) and β-glucuronidase/arylsulfatase was obtained from Roche (Mannheim, Germany).

2.3. Urine and atmospheric sample collection

All urinary samples were collected under the responsibility of the occupational health physician of the company as part of the routine follow-up of workers, at the pre-shift and at the post-shift every day of the working week. Three subjects (W1, W2, and W3) worked four days and provided eight samples while four subjects (W4, W5, W6, and W7) worked five days and provided ten samples. Urine was collected in 50 mL propylene bottle and stored at -20°C until analysis.

For each worker, personal atmospheric samples were collected every workday according to the methods recommended in France [32]. Briefly, a pump which flow rate was regulated at 1 L/min was connected to an ORBO 43 Supelpak-20 XAD2 tube from Sigma-Aldrich where gaseous PAH were adsorbed. The stability of the air flow during sampling was checked by comparing rates at the beginning and the end of sampling and a variation greater than 5% resulted in the exclusion of the sample. Afterwards, the sample material was stored at –20°C until analysis.

2.4. Atmospheric sample analysis

The XAD2 tube was eluted with 2 mL acetonitrile. PAH were measured by HPLC-FLD using a HPLC Alliance 2695 separation module and a 2475 Multi λ fluorescence detector from Waters (Guyancourt, France). Chromatographic separation was performed by injecting 30 µL on a PAH-C18 column (250 mm x 3 mm 5 µm) from Waters and elution with an acetonitrile/water gradient. The column oven temperature was set at 32°C. The wavelengths (excitation-emission) were 276-323, 305-321 and 249-362 nm for detection of Nap, Flu and Phe, respectively. The limits of quantifications (LQ) in air were 0.30, 0.10 and 0.10 ng/tube for Nap, Flu and Phe, respectively.

2.5. Urinary analyses

2 ml aliquot of urine was diluted in 1 mL of acetate buffer before enzymatic hydrolysis by 20 µL of β-glucuronidase/arylsulfatase at 37°C during overnight. In every sample 100 µL of 1-Nap_{d7} solution (400 ng/mL) was added, as internal standard. Then, metabolites were extracted twice with 5 mL of pentane during 30 min. The supernatant was recovered after centrifugation and was evaporated until dryness without heating with evaporator-concentrator Labconco (Kansas City, MO, USA). Finally, 50 µL of BSTFA was added and derivatization of urinary metabolites was performed at ambient temperature during 15 min.

Samples were analyzed on an Agilent 6890N Network Gas Chromatogram coupled with Agilent 5975C Mass Spectrometer from Agilent Technologies (Les Ulis, France). 1 µL of sample was injected in splitless mode with an inlet temperature of 250°C. Chromatographic column was a 30 m × 0.25 mm 5% phenyl dimethylsiloxane column (DB-5) from Agilent Technologies with a constant 1 mL/min helium flow. Temperature started at 60°C for 3 min before to ramp at 10°C/min to 150°C and hold for 3min, then ramped again at 10°C/min to 210°C followed by a plate during 7 min, and ramped a last time at 10°C/min to 300°C. Temperature of the transfer line was 280°C. Metabolites detection was performed in electron impact ionization mode (-70 eV) and selective ion monitoring (SIM) mode. For each metabolite, both quantification and qualification ions (m/z) were used: 201-216 for 1-Nap, 216-201 for 2-Nap, 254-239 for 2- and 3-Flu, 239-254 for 9-Flu, 266-251 for 1-, 2- and 3-Phe and 251-266 for 4- and 9-Phe. For internal standard 1-Nap_{d7} only a quantification ion was used (223 m/z). LQ were 0.05 µg/L for 1-Nap; 0.1 µg/L for 3-Flu, 1-, 2- and 3-Phe; 0.25 µg/L for 2-Nap, 2- and 9-Flu; 0.5 µg/L for 4- and 9-Phe. The calculated within- and between-day relative standard deviations ranged from 2.3% to 15.8% and from 1.0% to 16.1%, respectively.

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

2.6. Statistical analysis

For urinary concentrations below the LQ, values equal to half of the LQ were assigned.

Linear mixed effect models were built to dissociate between and within workers variability of atmospheric PAH and urinary metabolites concentrations during the working week. Workers were processed as random effect in order to obtain inter-individual variability ($\sigma^2{}_b$). Intra-individual variability ($\sigma^2{}_w$) was estimated from the residual variance of the models. The total estimated variance (σ^2) was obtained by the sum of both ($\sigma^2 = \sigma^2{}_b + \sigma^2{}_w$). Intra-class correlation coefficients (ICC) of dependent variable were estimated as follow [33]:

$$ICC = \frac{\sigma^2{}_b}{\sigma^2} \quad (1)$$

The distributions of atmospheric and urinary metabolites levels were log-normal. Thus, log-transformed values were used in the models. The use of autoregressive (AR1) instead of compound symmetry (CS) covariance matrix, to take into account potential correlation between repeated measurements, was appreciated from the significance of coefficient correlation parameter (ϕ).

First, one-way random effect model (*null model*), consisting of the mean plus one random effect, was built for every PAH and metabolite, as follow:

$$Y_{ij} = ln(C_{ij}) = \mu + b_i + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

Where C_{ij} was atmospheric PAH (ng/m^3) or urinary metabolite concentration (nmol/L) of ith worker for the jth measure, μ was the mean of concentrations, b_i was the random effect for the ith worker and ε_{ij} was the residual error. It was assumed that b_i and ε_{ij} were independent, $b_i \sim N(0; \sigma^2{}_b)$ and $\varepsilon_{ij} \sim N(0; \sigma^2{}_w)$.

Secondly, for each metabolite, establishment of a linear mixed effect model to describe urinary concentrations was performed by adding fixed effects (standardized independent variables) in the previous model. Screened fixed effects were ATM (atmospheric parent compound concentrations in ln(ng/m^3)), CR (urinary creatinine concentration in ln(mmol/L)), TIME (factor with two modalities: pre- or post-shift), DAY (factor with 5 modalities: from day 1 to 5), BMI (body mass index), AGE (years) and interactions: ATM x TIME, ATM x DAY and TIME x DAY. Identification of significant fixed effects (p<0.10) was performed by backward manual stepwise. Only variables which were significant for more than half of metabolites were selected to build the *full model* used for all metabolites in order to compare to each other.

Finally, a *post-shift model* was built from the *full model* but using post-shift urine concentrations (POST) as dependent variable and including pre-shift urine concentrations (PRE) as fixed effect.

Proportion of urinary levels variance explained by fixed effects was determined as follow [28]:

$$\sigma^2{}_{explained}(\%) = \frac{(\sigma^2{}_{null,post-shift} - \sigma^2{}_{post-shift})}{\sigma^2{}_{null,post-shift}} \times 100 \quad (3)$$

Where $\sigma^2{}_{null,post-shift}$ was the variance of the one-way random effect model using urinary post-shift metabolite concentrations as dependent variable and $\sigma^2{}_{post-shift}$ the variance of the *post-shift model* for the same metabolite. In order to isolate the proportion of variance coming exclusively from occupational exposure, difference of $\sigma^2{}_{explained}$ from *post-shift model* including and excluding fixed effect ATM was calculated.

3. Results

3.1. Data description

Results of personal air measurements are available in supplementary data. Median levels during the working week were 815 ng/m^3 (min-max: 123-12 237), 347 ng/m^3 (min-max: 89-3 598), 636 ng/m^3 (min-max: 123-5 904) for Nap, Flu and Phe, respectively.

Results of urinary metabolites concentrations were summarized in Table 1. Proportion of urinary concentrations below the LQ reached 47%, 89% and 98% for 9-Flu, 9-Phe and 4-Phe, respectively. These metabolites were thus considered non-relevant for biomonitoring and were excluded of the modelling. For other metabolites (1- and 2-Nap; 2- and 3-Flu; 1-, 2- and 3-Phe), ≤ 15% of analyses were lower than LQ. Geometric means of urinary concentrations ranged from 479 to 790 nmol/mol and 1 423 to 1 929 nmol/mol for 1-Nap and 2-Nap; from 257 to 861 nmol/mol and from 79 to 230 nmol/mol for 2-Flu and 3-Flu; from 204 to 501 nmol/mol, 57 to 246 nmol/mol and 57 to 278 nmol/mol for 1-Phe, 2-Phe and 3-Phe, respectively. Among each parent compound, the main metabolites were 2-Nap, 2-Flu and 1-Phe which were 2 to 4 fold higher than the others. Figures 1 to 3 show individual PAH atmospheric levels and urinary metabolites concentrations during the whole working week. Geometric mean (GM) of urinary concentrations increased between every pre-shift and post-shift except for 1-Nap and 2-Nap whose GM increased only for Day 3 and Day 1, respectively.

Calculated ICC from *null model* of atmospheric measures was much higher than urinary metabolites for Nap and Phe and slightly higher for Flu (Table 2).

3.2. Full model building

Coefficient correlation parameter of AR1 covariance matrix was generally non-significant (confidence interval including 0). Thus, CS covariance matrix was used in all models. Among screened fixed effects, AGE was never significant, BMI was significant only for 1-Nap, and ATM was significant for 3-Flu and 1-Phe. On the contrary, CR, TIME, DAY and TIME x ATM were significant for at least 4 out of 7 metabolites and were thus included in the *full model* as follow:

$$Y_{ij} = \ln(C_{ij}) = \beta_0 + \beta_1 CR_{ij} + \beta_2 TIME_{ij} + \beta_3 DAY_{ij} + \beta_4 (TIME_{ij} \times ATM_{ij}) + b_i + \varepsilon_{ij} \qquad (4)$$

Where C_{ij} represented the urinary PAH metabolite concentration of ith worker for the jth measure, b_i was the random effect for the ith worker and ε_{ij} was the residual error. β_0 was the intercept of the model and β_1, β_2, β_3 and β_4 were the coefficient for fixed effects CR_{ij}, $TIME_{ij}$, DAY_{ij} and $TIME_{ij} \times ATM_{ij}$, respectively.

Results of the *full model* for each metabolite were showed in Table 3. Highly significant (p<0.001) positive effect of CR was observed for all metabolites indicating an increase of urinary metabolites with CR increase. TIME was highly significant (p<0.001) for Flu and Phe metabolites indicating an effect of the sampling time on their urinary concentrations. DAY was significant for all metabolites except for 2-Nap indicating also an effect

of the sampling day. Significant interaction effect of TIME x ATM was observed for 2- and 3-Flu, and for 2- and 3-Phe, indicating a different effect of atmospheric PAH levels on urinary concentrations according to the sampling time. Estimate coefficients were higher for interaction POST x ATM than PRE x ATM indicating a stronger effect of atmospheric PAH levels on post-shift than pre-shift concentrations. While $\sigma^2{}_w$ were relatively close according to all metabolites (ranged from 0.048 to 0.159), $\sigma^2{}_b$ were more heterogeneous among them (ranged from 0.078 to 0.437).

3.3. Explained variance of post-shift urine samples

Post-shift model was built from significant variables of ***full model*** as follow:

$$Y_{ij} = \ln(POST_{ij}) = \beta_0 + \beta_1 CR_{ij} + \beta_2 DAY_{ij} + \beta_3 ATM_{ij} + \beta_4 PRE_{ij} + b_i + \varepsilon_{ij} \quad (5)$$

Where $POST_{ij}$ represented the post-shift urinary PAH metabolite concentration of ith worker for the jth measure, b_i was the random effect for the ith worker and ε_{ij} was the residual error. β_0 was the intercept of the model and β_1, β_2, β_3 and β_4 were the coefficient for fixed effects of CR_{ij}, DAY_{ij}, ATM_{ij} and PRE_{ij}, respectively.

For all metabolites, CR and PRE significantly explained the post-shift urinary concentrations while ATM was non-significant for 2-Nap. Explained variance reached 85% and 88%; 90% and 86%; 92%, 91% and 87% of the total variance for 1- and 2-Nap; 2- and 3-Flu; 1-, 2- and 3-Phe, respectively (Table 4). After removal of ATM from ***post-shift model***, total $\sigma^2{}_{explained}$ [inter-individual $\sigma^2{}_{explained}$] decreased by 22 [32] and 15 [22] percentage points for 2- and 3-Flu, respectively, and by 25 [43] for 2-Phe, while it decreased by less than 10 [20] percentage points for other metabolites. Excluding ATM was responsible to a weak effect on $\sigma^2{}_w$.

4. Discussion

Biomarkers are close to the biologically relevant dose because differences in activity patterns, physiological parameters and metabolism are accounted for at the individual level [23]. However, a relevant exposure biomarker needs to be sensitive for assessing exposure, even in case of low exposure. Moreover, biomonitoring doesn't allow differentiation of exposure ways and environmental exposure should not be ignored for risk assessment. In the current study, use of longitudinal data and mixed effects modelling were proposed to identify the better surrogate to PAH exposure among urinary gaseous PAH metabolites.

Nap levels were close to previous measurements found in graphite electrode plants [34]. Those of Flu and Phe corresponded to atmospheric concentrations previously observed at low exposed workplaces in electrode production plant such as "graphitization" and "conditioning" [6]. Concerning urinary biomarkers, post-shift

concentrations of Flu and Phe metabolites were higher than population reference values coming from NHANES study, while their pre-shift levels and all 1- and 2-Nap concentrations were similar [35]. In a Canadian population biomonitoring study, urinary metabolites of Nap, Flu, Phe and pyrene were detectable, while those of fluoranthene, chrysene and benzo(a)pyrene were below LQ [36]. Urinary metabolites of Nap, Flu and Phe seemed thus sensitive exposure biomarkers and might be used for assessing low exposure to PAH. However, previous medians of urinary metabolites concentrations in graphite electrode plant were 2 to 4 fold and 5 to 10 fold higher for Nap and Phe, respectively [6, 37]. Low urinary concentrations of the current study, related to similar atmospheric levels than previous works, were in agreement with the improvement of health and safety standards in industries over the last 20 years. Moreover, this finding implied that potential environmental exposure contribution on urinary metabolites concentrations variability might be observed.

Biomonitoring is a snapshot of exposure and estimation of intra- and inter-individual variability of biomarker concentrations allows better results understanding. The variances ratio magnitude of air measurements and biomarkers was one criterion for selecting the optimal surrogate for exposure [38]. Unique measure is sufficient for assessing exposure if ICC of the surrogate is 1, while it is impossible to differentiate individual means with ICC equal to 0. In this work, ICC of urinary concentrations were generally lower than those of atmospheric measures. However, urinary biomarkers concentrations tend to have smaller intra-individual compared to inter-individual variance than air measurements, due to the smoothing of exposure variability in the human body [38]. These discrepancies came from the short half-lives of urinary gaseous PAH metabolites estimated from 4.1 to 26 hours [27, 39, 40] and the absence of diuresis consideration. Indeed, concentrations expressed as a function of creatinine yielded smaller estimates of the intra-individual variance [27, 28].

The ***full model*** was able to identify fixed effects explaining significant part of urinary concentrations variability. Time effect and covariance matrix structure are important for the variance component estimation. AR1 covariance matrix structure was preconized for longitudinal studies including above 5 subjects, 5 samples and when the delay between two sampling times was shorter than biomarkers half-lives [41] In this study, the short half-lives of metabolites relative to the sampling times explained the non-significance of the parameter ϕ for AR1 matrix. Correlation between repeated measurements of the same worker during the working week could thus be assumed as stable using CS covariance matrix in the models. CR was the most important predictor of all metabolites concentrations. These results were in accordance with previous studies showing the importance to take diuresis into account for interpreting urinary levels of gaseous PAH metabolites as exposure biomarkers [27, 42]. Urine should be sampled at the end of the workday as shown by the positive significant coefficients of

post-shift sampling time, except for 1- and 2-Nap for which elimination was more irregular. Highest contribution of Phe exposure in metabolites concentrations variability for urine sampled at post-shift relative to bedtime or morning was previously observed [27]. Coefficients of DAY increased the first three days for all metabolites, apart from 2-Nap, and throughout the whole working week for 2- and 3-Flu. These results suggested a slight accumulation of PAH into organism, as reported in road-paving workers [30]. TIME x ATM was also an important fixed effect, especially for 2- and 3-Flu. Concentrations of these metabolites of gaseous PAH in post-shift urine were thus strongly linked with atmospheric parent compounds exposure. Conversely, ATM x DAY and TIME x DAY were not selected in the ***full model***, suggesting that relation between atmospheric PAH levels and urinary metabolites as well as the hours of sampling time for each day were similar throughout the working week. Indeed, biomarker levels were influenced by sampling time especially if the period between two sampling times was higher than their urinary elimination half-lives [24]. Between ***null model*** and ***full model***, σ^2_w was more explained by fixed effects than σ^2_b. Previously, sampling time, day and diuresis included as fixed effects were responsible for the same decrease of σ^2_w [30].

Variance unexplained by including fixed-effects could come from between-subjects toxicokinetic differences (genetic polymorphism or physical characteristics) and non-occupational exposure [24]. Indeed, PAH were found in indoor and outdoor air, dust, soil, tap water, solid food and beverages [29]. Population exposure occurred mainly by diet, especially for non-smokers, and by inhalation of diesel exhaust, tobacco smoke, residential heating… [3, 5, 40, 43]. The aim of ***post-shift model*** was to study the percentage of variance of urinary post-shift metabolites concentrations explained by fixed effects and the specific contribution of the occupational exposure, thanks to atmospheric parent PAH measurements, in order to identify reliable biomarkers for occupational exposure assessment. Because independent variable PRE was significant for all metabolites, pre-shift samples should be collected in addition to post-shift samples, to avoid misinterpretation of results coming from environmental exposure. Similar results were previously published for jet fuel exposure [42]. The low contribution of ATM to explain variability of Nap metabolites as well as 1-Phe and 3-Phe, suggested that occupational exposure weakly influenced their post-shift urinary concentrations. These results confirmed that Nap metabolites were not appropriate biomarkers for reflecting low occupational PAH exposures [22]. The same conclusion could be drawn for 1- and 3-Phe. On the contrary, the link between occupational exposure and urinary post-shift concentrations of 2-Flu, 3-Flu and 2-Phe was strong. Among them, 2-Flu and 2-Phe seemed to be the best biomarkers to assess occupational exposure of gaseous PAH, with an increase of inter-individual $\sigma^2_{explained}$ by 32 and 43 percentage points, respectively, versus 22 for 3-Flu, after adding ATM as fixed effect.

The lower urinary concentrations observed for 2-Phe than 2-Flu (despite generally higher Phe atmospheric levels) could be in favor of use of Flu metabolite. These results can be generalizable to other PAH exposure sources since each atmospheric parent compound was studied to explain urinary metabolites concentrations rather than sum of different congeners as previously published [42]. However, further studies are required to confirm these results regarding dermal absorption previously shown for gaseous PAH [44] and including smokers since smoking status could be a cofounding factor for urinary metabolites [40].

5. Conclusion

Due to potential health effect of PAH, assessing exposure remains a major issue. The aim of this work was to selected relevant urinary metabolites of PAH to assess low occupational exposure. Urinary 1-Nap, 2-Nap, 1-Phe and 3-Phe concentrations profiles were weakly explained by occupational exposure, while 2-Flu, 3-Flu and 2-Phe were strongly linked with atmospheric levels. Among them, urinary 2-Flu and 2-Phe were the best biomarkers of PAH exposure with the highest explained variance by *post-shift model*. Urinary samples should be collected at pre- and post-shift due to the observed pre-shift influence on post-shift levels coming from environmental exposure and slight accumulation of metabolites into organism during the working week.

Supplementary information is available at website of Journal of Hazardous Materials.

Funding

This work was supported by the "Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES)" [grant number 2011-CRD-13] and "Région Rhône-Alpes, France" [grant number RA0000R604].

References

[1] IARC, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 2010.

[2] J. Unwin, J. Cocker, E. Scobbie, H. Chambers, An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK, Ann. Occup. Hyg. 50 (2006) 395-403.

[3] C.E. Bostrom, P. Gerde, A. Hanberg, B. Jernstrom, C. Johansson, T. Kyrklund, A. Rannug, M. Tornqvist, K. Victorin, R. Westerholm, Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air, Environ. Health. Perspect. 110 Suppl 3 (2002) 451-488.

[4] E. Nethery, A.J. Wheeler, M. Fisher, A. Sjodin, Z. Li, L.C. Romanoff, W. Foster, T.E. Arbuckle, Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons as a biomarker of exposure to PAHs in air: a pilot study among pregnant women, J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol. 22 (2012) 70-81.

[5] J.R. Sobus, J.D. Pleil, M.C. Madden, W.E. Funk, H.F. Hubbard, S.M. Rappaport, Identification of surrogate measures of diesel exhaust exposure in a controlled chamber study, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 8822-8828.

[6] J. Angerer, C. Mannschreck, J. Gundel, 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. 69 (1997) 323-331.

[7] L.H. Keith, The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants, Polycyclic Aromat. Compd. 35 (2015) 147-160.

[8] IARC, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 2002.

[9] K. Chaloupka, M. Steinberg, M. Santostefano, L.V. Rodriguez, L. Goldstein, S. Safe, Induction of Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice, Chem. Biol. Interact. 96 (1995) 207-221.

[10] C.H. Lee, Y. Ito, Y. Yanagiba, O. Yamanoshita, H. Kim, S.Y. Zhang, M. Kamijima, F.J. Gonzalez, T. Nakajima, Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR, Toxicology. 238 (2007) 147-156.

[11] S.M. Hays, R.A. Becker, H.W. Leung, L.L. Aylward, D.W. Pyatt, Biomonitoring equivalents: a screening approach for interpreting biomonitoring results from a public health risk perspective, Regul. Toxicol. Pharmacol. 47 (2007) 96-109.

[12] P. Manini, G. De Palma, A. Mutti, Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability, Toxicol. Lett. 168 (2007) 210-218.

[13] T. Shimada, Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons, Drug. Metab. Pharmacokinet. 21 (2006) 257-276.

[14] M. Lafontaine, C. Gendre, Y. Morele, G. Laffitte-Rigaud, Excretion of Urinary 1-Hydroxypyrene in Relation to the Penetration Routes of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polycyclic Aromat. Compd. 22 (2002) 579-588.

[15] F.J. Jongeneelen, R.B. Anzion, C.M. Leijdekkers, R.P. Bos, P.T. Henderson, 1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product, Int. Arch. Occup. Environ. Health. 57 (1985) 47-55.

[16] A.M. Hansen, L. Mathiesen, M. Pedersen, L.E. Knudsen, Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies--a review, Int. J. Hyg. Environ. Health. 211 (2008) 471-503.

[17] D. Barbeau, S. Lutier, V. Bonneterre, R. Persoons, M. Marques, C. Herve, A. Maitre, Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: relations between atmospheric mixtures, urinary metabolites and sampling times, Int. Arch. Occup. Environ. Health. 88 (2015) 1119-1129.

[18] D. Barbeau, R. Persoons, M. Marques, C. Herve, G. Laffitte-Rigaud, A. Maitre, Relevance of Urinary 3-Hydroxybenzo(a)pyrene and 1-Hydroxypyrene to Assess Exposure to Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures in Metallurgy Workers, Ann. Occup. Hyg. 58 (2014) 579-590.

[19] A. Leroyer, F. Jeandel, A. Maitre, M. Howsam, D. Deplanque, M. Mazzuca, C. Nisse, 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations, Sci. Total. Environ. 408 (2010) 1166-1173.

[20] Z. Li, J.A. Mulholland, L.C. Romanoff, E.N. Pittman, D.A. Trinidad, M.D. Lewin, A. Sjodin, Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring, J. Environ. Monit. 12 (2010) 1110-1118.

[21] M. Raulf-Heimsoth, J. Angerer, B. Pesch, B. Marczynski, J.U. Hahn, A. Spickenheuer, R. Preuss, R. Ruhl, P. Rode, T. Bruning, Biological monitoring as a useful tool for the detection of a coal-tar contamination in bitumen-exposed workers, J. Toxicol. Environ. Health. Part A. 71 (2008) 746-750.

[22] J.R. Sobus, M.D. McClean, R.F. Herrick, S. Waidyanatha, F. Onyemauwa, L.L. Kupper, S.M. Rappaport, Investigation of PAH biomarkers in the urine of workers exposed to hot asphalt, Ann. Occup. Hyg. 53 (2009) 551-560.

[23] J.D. Pleil, J.R. Sobus, Estimating lifetime risk from spot biomarker data and intraclass correlation coefficients (ICC), J. Toxicol. Environ. Health. Part A.76 (2013) 747-766.

[24] L.L. Aylward, S.M. Hays, R. Smolders, H.M. Koch, J. Cocker, K. Jones, N. Warren, L. Levy, R. Bevan, Sources of variability in biomarker concentrations, J. Toxicol. Environ. Health. Part B. 17 (2014) 45-61.

[25] J.R. Sobus, Y.M. Tan, J.D. Pleil, L.S. Sheldon, A biomonitoring framework to support exposure and risk assessments, Sci. Total. Environ. 409 (2011) 4875-4884.

[26] L.L. Aylward, C.R. Kirman, J.L. Adgate, L.M. McKenzie, S.M. Hays, Interpreting variability in population biomonitoring data: role of elimination kinetics, J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol. 22 (2012) 398-408.

[27] J.R. Sobus, M.D. McClean, R.F. Herrick, S. Waidyanatha, L.A. Nylander-French, L.L. Kupper, S.M. Rappaport, Comparing urinary biomarkers of airborne and dermal exposure to polycyclic aromatic compounds in asphalt-exposed workers, Ann. Occup. Hyg. 53 (2009) 561-571.

[28] E. Symanski, E. Bergamaschi, A. Mutti, Inter- and intra-individual sources of variation in levels of urinary styrene metabolites, Int. Arch. Occup. Environ. Health. 74 (2001) 336-344.

[29] P.P. Egeghy, J.J. Quackenboss, S. Catlin, P.B. Ryan, Determinants of temporal variability in NHEXAS-Maryland environmental concentrations, exposures, and biomarkers, J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol. 15 (2005) 388-397.

[30] J.R. Sobus, J.D. Pleil, M.D. McClean, R.F. Herrick, S.M. Rappaport, Biomarker variance component estimation for exposure surrogate selection and toxicokinetic inference, Toxicol. Lett. 199 (2010) 247-253.

[31] Z. Li, L.C. Romanoff, M.D. Lewin, E.N. Porter, D.A. Trinidad, L.L. Needham, D.G. Patterson, Jr., A. Sjodin, Variability of urinary concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolite in general

population and comparison of spot, first-morning, and 24-h void sampling, J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol. 20 (2010) 526-535.

[32] NF X43-294. Air des lieux de travail - Échantillonnage et analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Paris-La-Défense, AFNOR, 1995.

[33] B. Rosner, Fundamentals of Biostatistics, seventh ed., Brooks/Cole, Boston, 2011.

[34] R. Preuss, J. Angerer, H. Drexler, Naphthalene--an environmental and occupational toxicant, Int. Arch. Occup. Environ. Health. 76 (2003) 556-576.

[35] Centers for Disease Control and Prevention, Fourth National Report on Humans Exposure to Environement Chemicals, Atlanta, 2015.

[36] Health Canada, Third report on human biomonitoring of environmental chemicals in Canada, Ottawa, 2015.

[37] R. Preuss, H. Drexler, M. Bottcher, M. Wilhelm, T. Bruning, J. Angerer, Current external and internal exposure to naphthalene of workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries, Int. Arch. Occup. Environ. Health.78 (2005) 355-362.

[38] Y.S. Lin, L.L. Kupper, S.M. Rappaport, Air samples versus biomarkers for epidemiology, Occup. Environ. Med. 62 (2005) 750-760.

[39] Z. Li, L. Romanoff, S. Bartell, E.N. Pittman, D.A. Trinidad, M. McClean, T.F. Webster, A. Sjödin, Excretion profiles and half-lives of ten urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites after dietary exposure, Chem. Res. Toxicol. 25 (2012) 1452-1461.

[40] G. St Helen, M.L. Goniewicz, D. Dempsey, M. Wilson, P. Jacob, 3rd, N.L. Benowitz, Exposure and kinetic of polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smokers, Chem. Res. Toxicol. 25 (2012) 952-964.

[41] E. Symanski, N.M. Greeson, Assessment of variability in biomonitoring data using a large database of biological measures of exposure, AIHA J. 63 (2002) 390-401.

[42] E.G. Rodrigues, K. Smith, A.L. Maule, A. Sjodin, Z. Li, L. Romanoff, K. Kelsey, S. Proctor, M.D. McClean, Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon (OH-PAH) metabolite concentrations and the effect of GST polymorphisms among US Air Force personnel exposed to jet fuel, J. Occup. Environ. Med. 56 (2014) 465-471.

[43] G. Falco, J.L. Domingo, J.M. Llobet, A. Teixido, C. Casas, L. Muller, Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain, J. Food. Prot. 66 (2003) 2325-2331.

[44] K.W. Smith, S.P. Proctor, A.L. Ozonoff, M.D. McClean, Urinary biomarkers of occupational jet fuel exposure among air force personnel, J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol. 22 (2012) 35-45.

Figure captions

Figure 1: Atmospheric Nap levels and urinary pre- and post-shift creatinine adjusted concentrations of 1-hydroxynaphthalene (1-Nap) and 2-hydroxynaphthalene (2-Nap) during the whole working week for each worker (W1 to W7).

Figure 2: Atmospheric Flu levels and urinary pre- and post-shift creatinine adjusted concentrations of 2-hydroxyfluorene (2-Flu) and 3-hydroxyfluorene (3-Flu) during the whole working week for each worker (W1 to W7).

Figure 3: Atmospheric Phe levels and urinary pre- and post-shift creatinine adjusted concentrations of 1-hydroxyphenanthrene (1-Phe), 2-hydroxyphenanthrene (2-Phe) and 3-hydroxyphenanthrene (3-Phe) during the whole working week for each worker (W1 to W7).

Table 1: Urinary pre- and post-shift creatinine adjusted metabolites concentrations for all workers and every day of the working week

		1-Nap			2-Nap			2-Flu			3-Flu			1-Phe			2-Phe			3-Phe		
		GM	(GSD)	<LQ	GM	(GSD)	<LQ	GM	(GSD)	<LQ	GM	(GSD)	<LQ	GM	(GSD)	<LQ	GM	(GSD)	<LQ	GM	(GSD)	<LQ
Day 1																						
n=7	Pre-shift	522.1	(1.4)	0	1 718.2	(1.6)	0	280.1	(2.5)	1	79.2	(2.0)	2	203.7	(1.5)	0	56.5	(1.9)	3	56.8	(1.9)	3
	Post-shift	484.1	(1.4)	0	1 892.8	(1.5)	1	722.4	(2.6)	1	169.3	(2.5)	2	325.4	(1.2)	1	179.5	(1.6)	1	174.1	(2.1)	2
Day 2																						
n=7	Pre-shift	780.8	(2.3)	0	1 801.9	(1.6)	0	363.4	(2.4)	0	107.8	(2.8)	1	321.8	(1.9)	0	75.9	(2.1)	0	90.5	(2.0)	0
	Post-shift	640.3	(1.8)	0	1 725.7	(1.4)	0	861.3	(2.4)	1	229.7	(2.1)	1	501.1	(1.4)	0	246.3	(1.9)	1	277.7	(1.8)	1
Day 3																						
n=7	Pre-shift	779.3	(1.9)	0	1 929.4	(1.7)	0	395.0	(2.7)	1	142.2	(2.6)	1	392.0	(1.8)	0	125.9	(2.4)	0	122.7	(1.9)	0
	Post-shift	789.6	(2.2)	0	1 796.7	(1.8)	0	566.8	(3.5)	2	175.4	(2.8)	2	399.0	(1.7)	0	208.0	(2.1)	0	197.7	(1.8)	0
Day 4																						
n=7	Pre-shift	578.7	(1.6)	0	1 692.0	(1.8)	0	414.5	(1.9)	1	145.2	(1.8)	1	268.2	(1.4)	0	103.9	(1.7)	1	111.3	(1.4)	1
	Post-shift	478.6	(1.4)	0	1 674.6	(1.5)	0	799.6	(2.2)	0	199.3	(1.9)	0	454.5	(1.4)	0	205.4	(1.6)	0	230.3	(1.2)	0
Day 5																						
n=4	Pre-shift	776.7	(1.3)	0	1 724.5	(1.3)	0	256.8	(2.2)	1	120.1	(1.3)	0	371.3	(1.6)	0	87.9	(1.7)	1	129.6	(1.5)	0
	Post-shift	588.2	(1.5)	0	1 422.9	(1.3)	0	540.5	(1.6)	0	147.5	(1.3)	0	451.4	(1.3)	0	187.5	(1.2)	0	238.2	(1.2)	0

GM: Geometric mean (nmol/mol); GSD: Geometric standard deviation; <LQ: number of concentrations under the limit of quantification; n: number of followed workers; 1-Nap: 1-hydroxynaphthalene; 2-Nap: 2-hydroxynaphthalene; 2-Flu: 2-hydroxyfluorene; 3-Flu: 3-hydroxyfluorene; 1-Phe: 1-hydroxyphenanthrene; 2-Phe: 2-hydroxyphenanthrene; 3-Phe: 3-hydroxyphenanthrene

Table 2: Intra- and inter-individual variability of atmospheric PAH levels and urinary unadjusted metabolites concentrations estimated from *null model*

	σ^2_b	σ^2_w	ICC
Nap	1.619	0.339	0.827
1-Nap	0.286	0.604	0.321
2-Nap	0.437	0.422	0.509
Flu	0.837	0.279	0.750
2-Flu	0.842	0.398	0.679
3-Flu	0.665	0.390	0.630
Phe	0.694	0.308	0.693
1-Phe	0.192	0.576	0.250
2-Phe	0.384	0.486	0.441
3-Phe	0.324	0.502	0.392

σ^2_b: inter-individual variance; σ^2_w: intra-individual variance; ICC: intra-class correlation coefficient; Nap: naphthalene; 1-Nap: 1-hydroxynaphthalene; 2-Nap: 2-hydroxynaphthalene; Flu: fluorene; 2-Flu: 2-hydroxyfluorene; 3-Flu: 3-hydroxyfluorene; Phe: phenanthrene; 1-Phe: 1-hydroxyphenanthrene; 2-Phe: 2-hydroxyphenanthrene; 3-Phe: 3-hydroxyphenanthrene

Table 3: Estimated parameters of the *full model*

Parameters	1-Nap		2-Nap		2-Flu		3-Flu		1-Phe		2-Phe		3-Phe	
	Estimate (SE)	p-value	Estimate (SE)	p-value	Estimate (SE)	p-value	Estimate (SE)	p-value	Estimate (SE)	p-value	Estimate (SE)	p-value	Estimate (SE)	p-value
Fixed effects														
Intercept [ln(nmol/L)]	1.65 (0.20)	**<0.001**	2.88 (0.19)	**<0.001**	1.10 (0.27)	**<0.001**	-0.12 (0.23)	0.591	0.70 (0.14)	**<0.001**	-0.44 (0.20)	**0.031**	-0.45 (0.18)	**0.012**
CR [ln(mmol/L)]	0.66 (0.06)	**<0.001**	0.64 (0.04)	**<0.001**	0.58 (0.05)	**<0.001**	0.51 (0.06)	**<0.001**	0.75 (0.05)	**<0.001**	0.57 (0.07)	**<0.001**	0.60 (0.05)	**<0.001**
TIME		0.108		0.246		**<0.001**		**<0.001**		**<0.001**		**<0.001**		**<0.001**
PRE	0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)	
POST	-0.16 (0.10)		-0.07 (0.06)		0.62 (0.09)		0.33 (0.01)		0.39 (0.09)		0.77 (0.11)		0.76 (0.09)	
DAY		**0.003**		0.827		**0.074**		**<0.001**		**0.001**		**0.006**		**<0.001**
1	0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)		0 (ref)	
2	0.32 (0.14)		-0.002 (0.09)		0.13 (0.13)		0.19 (0. 13)		0.42 (0.13)		0.26 (0.15)		0.40 (0.13)	
3	0.45 (0.14)		0.03 (0.08)		0.17 (0.13)		0.47 (0.14)		0.45 (0.13)		0.54 (0.16)		0.54 (0.13)	
4	0.03 (0.14)		-0.06 (0.09)		0.32 (0.13)		0.48 (0.13)		0.32 (0.12)		0.40 (0.15)		0.52 (0.12)	
5	0.17 (0.17)		0.05 (0.10)		0.33 (0.15)		0.61 (0.16)		0.44 (0.15)		0.49 (0.18)		0.76 (0.15)	
TIME x ATM		0.185		0.672		**0.001**		**<0.001**		0.103		**0.038**		**0.005**
PRE x ATM	-0.02 (0.12)		-0.06 (0.08)		0.16 (0.11)		0.30 (0.11)		-0.02 (0.09)		0.03 (0.11)		0.11 (0.09)	
POST x ATM	0.14 (0.12)		-0.07 (0.08)		0.37 (0.11)		0.42 (0.11)		0.16 (0.10)		0.25 (0.12)		0.30 (0.10)	
Random effects														
σ^2_b	0.193		0.213		0.437		0.294		0.078		0.190		0.159	
σ^2_w	0.129		0.048		0.103		0.117		0.106		0.159		0.104	

1-Nap: 1-hydroxynaphthalene; 2-Nap: 2-hydroxynaphthalene; 2-Flu: 2-hydroxyfluorene; 3-Flu: 3-hydroxyfluorene; 1-Phe: 1-hydroxyphenanthrene; 2-Phe: 2-hydroxyphenanthrene; 3-Phe: 3-hydroxyphenanthrene; SE: Standard error; CR: creatinine; PRE: pre-shift; POST: post-shift; ATM: atmospheric parent PAH levels; σ^2_b: inter-individual variance; σ^2_w: intra-individual variance. Significant variables are in bold

Table 4: Variance components estimated from ***post-shift models***

	Null, post-shift model		*Post-shift model* excluding ATM			*Post-shift model*			% $\sigma^2_{explained}$ from ATM		
	σ^2_b	σ^2_w	σ^2_b	σ^2_w	$\sigma^2_{explained}$ (%)	σ^2_b	σ^2_w	$\sigma^2_{explained}$ (%)	σ^2_b	σ^2_w	σ^2
1-Nap	0.459	0.500	0.083	0.101	80.8	0.040	0.108	84.6	9.5	-1.5	3.8
2-Nap	0.603	0.409	0.057	0.051	89.3	0.070	0.051	88.1	-2	-0.1	-1.2
2-Flu	0.898	0.501	0.343	0.107	67.8	0.059	0.086	89.6	31.7	4.3	21.8
3-Flu	0.595	0.435	0.154	0.136	71.8	0.022	0.119	86.3	22.2	3.9	14.5
1-Phe	0.282	0.549	0.059	0.050	86.9	0.015	0.049	92.4	15.5	0.2	5.4
2-Phe	0.423	0.384	0.235	0.065	65.3	0.034	0.044	90.6	42.7	6.1	25.2
3-Phe	0.270	0.578	0.085	0.108	77.2	0.040	0.069	87.1	16.8	6.7	9.9

1-Nap: 1-hydroxynaphthalene; 2-Nap: 2-hydroxynaphthalene; 2-Flu: 2-hydroxyfluorene; 3-Flu: 3-hydroxyfluorene; 1-Phe: 1-hydroxyphenanthrene; 2-Phe: 2-hydroxyphenanthrene; 3-Phe: 3-hydroxyphenanthrene; ATM: atmospheric parent PAH levels; σ^2_b: inter-individual variance; σ^2_w: intra-individual variance; σ^2 : total variance

Figure 1
Click here to download high resolution image

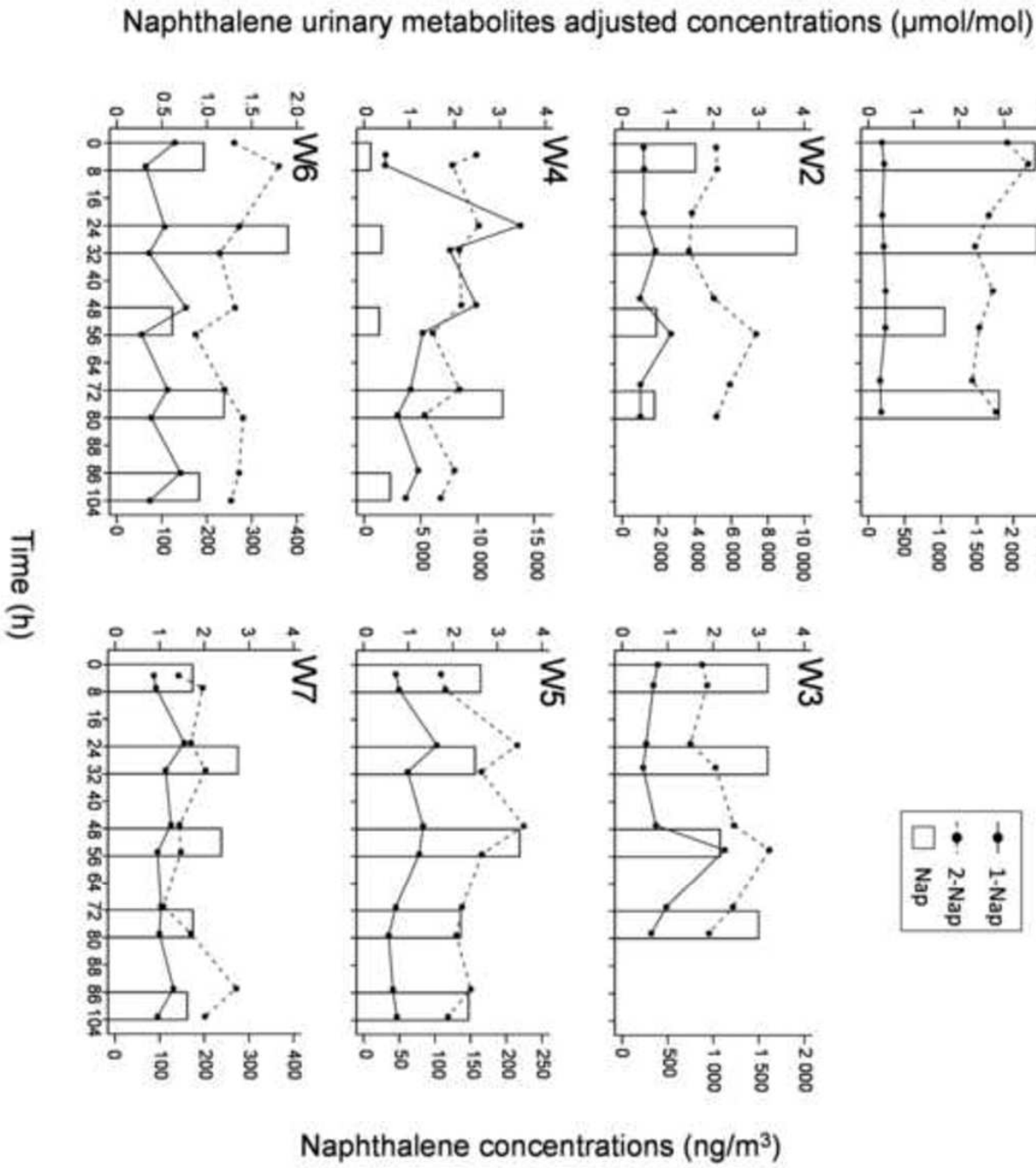


Figure 2
Click here to download high resolution image

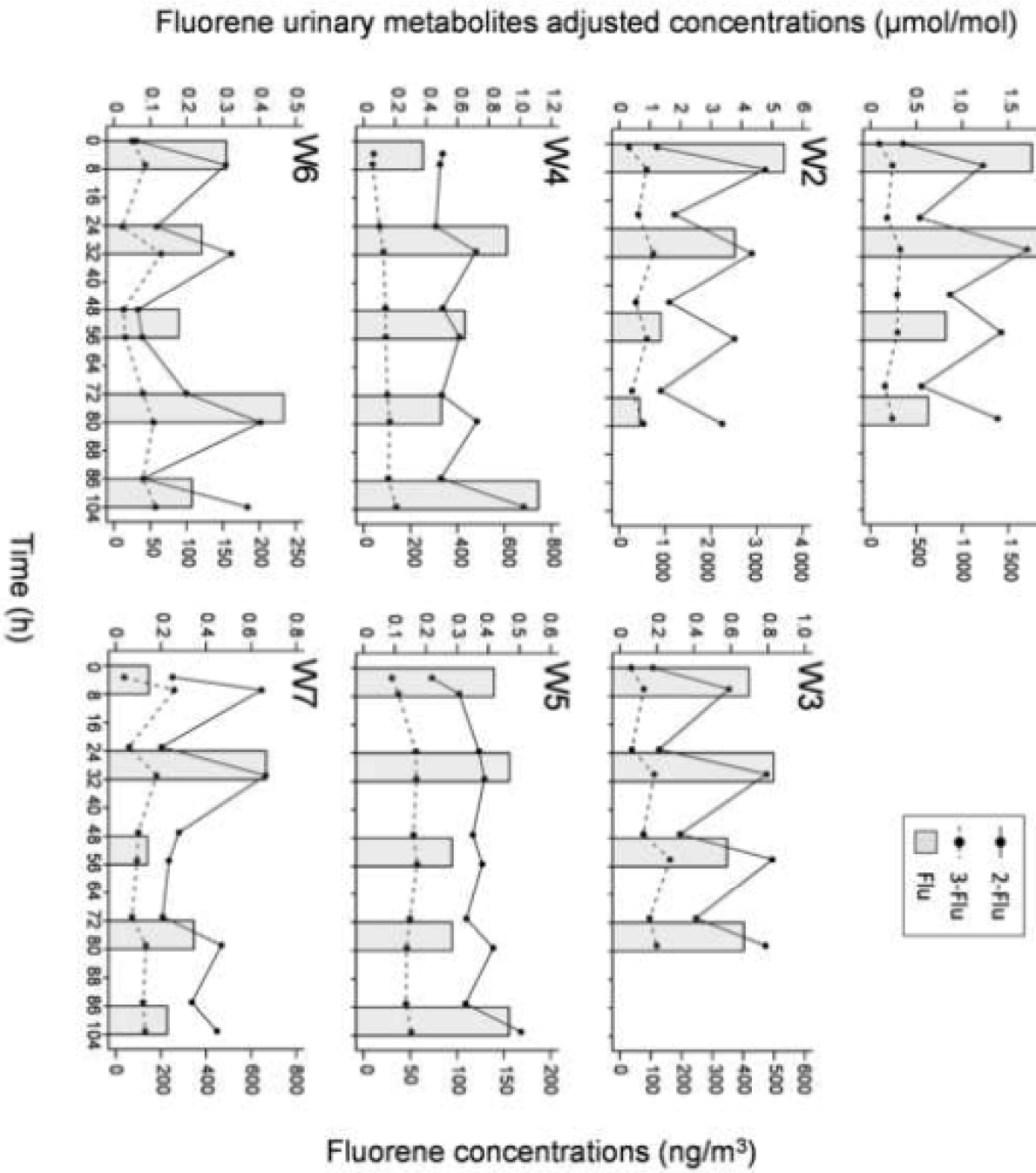
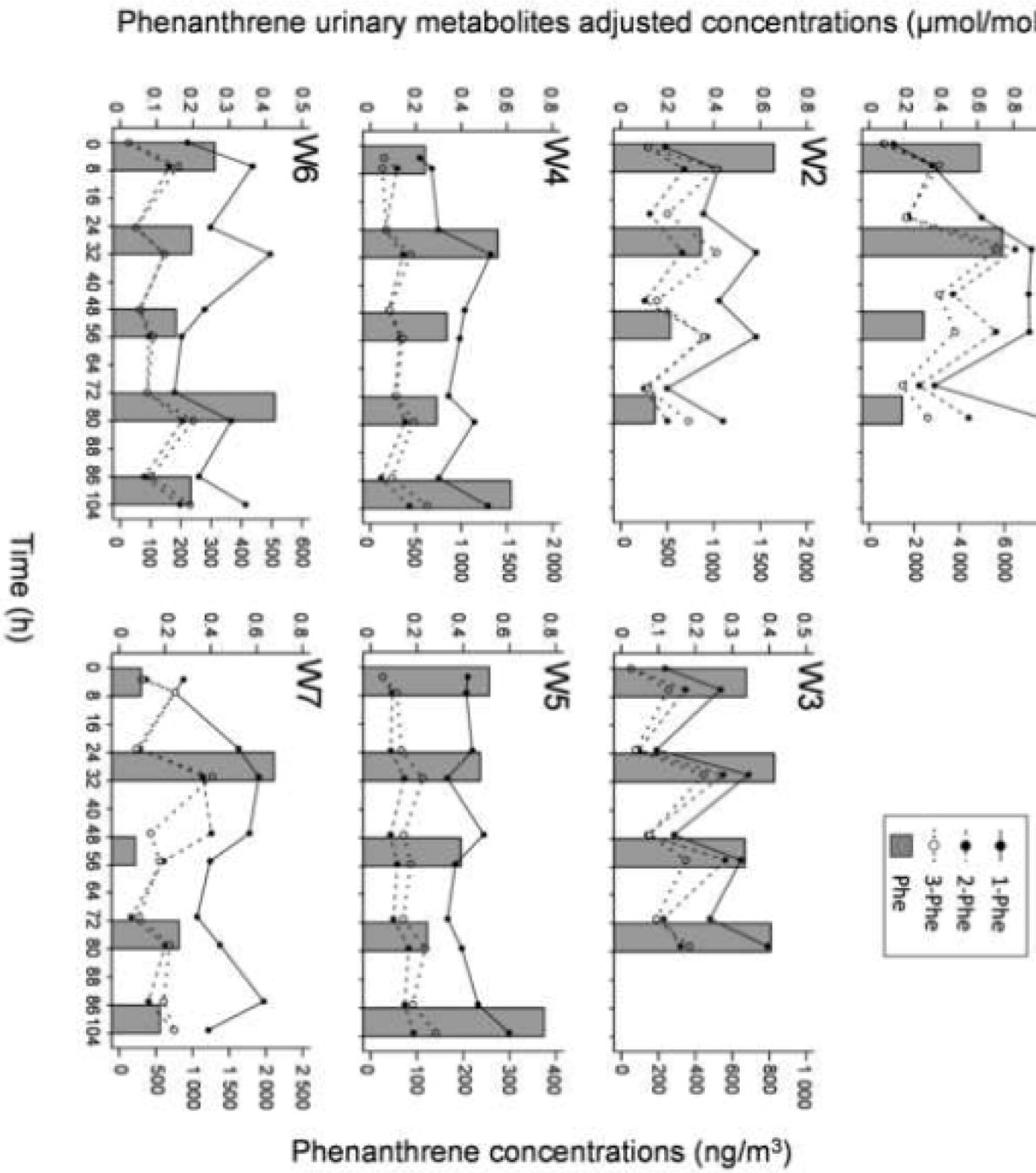


Figure 3
Click here to download high resolution image



Supplementary Material

Supplementary data: Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from individual atmospheric samples during the whole working week in a group of seven electrometallurgy workers

Worker		Naphthalene ng/m^3	Fluorene ng/m^3	Phenanthrene ng/m^3
W1				
	Day 1	2 303	1 757	4 920
	Day 2	2 333	1 878	5 904
	Day 3	1 052	821	2 415
	Day 4	1 805	628	1 461
W2				
	Day 1	4 034	3 598	1 648
	Day 2	9 569	2 519	861
	Day 3	1 878	907	533
	Day 4	1 783	447	365
W3				
	Day 1	1 599	419	675
	Day 2	1 599	499	827
	Day 3	1 075	347	668
	Day 4	1 497	402	808
W4				
	Day 1	578	253	603
	Day 2	1 578	611	1 401
	Day 3	1 353	431	840
	Day 4	1 224	331	729
	Day 5	2 316	744	1 545
W5				
	Day 1	164	140	256
	Day 2	156	156	237
	Day 3	220	95	195
	Day 4	136	95	123
	Day 5	147	156	375
W6				
	Day 1	194	155	312
	Day 2	381	121	236
	Day 3	123	89	185
	Day 4	238	234	510
	Day 5	183	107	233
W7				
	Day 1	174	146	298
	Day 2	275	667	2 115
	Day 3	238	140	220
	Day 4	175	346	818
	Day 5	162	228	560

II.2. Synthèse de l'article

II.2.1. Matériels et Méthodes

Après avoir développé une méthode de dosage des métabolites monohydroxylés du Nap, du Flu et du Phe en GC-MS, les urines des 7 travailleurs de l'usine de production d'électrodes de carbone collectées en début et fin de poste pendant la semaine de travail ont été analysées. Les concentrations atmosphériques de Nap, de Flu et de Phe ont été mesurées en HPLC-FLD, à partir des prélèvements atmosphériques individuels réalisés chaque jour travaillé.

Des modèles linéaires à effets mixtes ont été utilisés pour chaque métabolite afin de déterminer leur variabilité inter- et intra-individuelle. La variance des données a été estimée à partir d'un modèle aléatoire avec le travailleur comme seule variable aléatoire.

Ensuite, un modèle a été construit pour sélectionner les variables ayant un effet significatif sur l'explication de la variance des concentrations urinaires (*full model*). Seules les variables étant significatives pour une majorité de métabolites ont été conservées. A partir du *full model*, un troisième modèle a été développé (*post-shift model*) pour expliquer la variance des concentrations urinaires en fin de poste et notamment la contribution des niveaux atmosphériques.

I.1.1. Résultats

Le 9-Flu, 9-Phe et le 4-Phe ont respectivement 47%, 89% et 98% des concentrations urinaires qui sont inférieures à la LQ et ont donc été exclus du reste de l'étude. Pour les autres métabolites (1- and 2-Nap ; 2- and 3-Flu ; 1-, 2- and 3-Phe), moins de 15% des concentrations étaient inférieures à la LQ.

Parmi les variables testées, seules les variables « créatinine », « moment de prélèvement », « jour » et l'interaction « moment de prélèvement x concentrations atmosphériques » sont significatives pour au moins 4 métabolites et ont ainsi été conservées. La créatinine est

fortement significative pour l'ensemble des métabolites urinaires. Le moment de prélèvement est significatif pour les métabolites du Flu et du Phe. L'interaction « moment de prélèvement x concentrations atmosphériques » est significatif pour le 2-Flu, le 3-Flu, le 2-Phe et le 3-Phe. Le jour est quant à lui, significatif pour tous les métabolites sauf pour le 2-Nap.

Ces variables ont été utilisées pour l'explication de la variance des concentrations urinaires en fin de poste. Pour l'ensemble des métabolites, la créatinine et la concentration urinaire de début de poste du même jour sont des variables significatives. La variable « concentration atmosphérique » est significative pour tous les métabolites sauf pour le 2-Nap. La variance expliquée par les effets fixes (créatinine, concentration urinaire de début de poste, jour et concentrations atmosphériques) atteint respectivement 85% et 88% ; 90% et 86% ; 92%, 91% et 87% de la variance pour le 1- et le 2-Nap ; le 2- et le 3-Flu ; le 1-, le 2- et le 3-Phe. Lorsque les niveaux atmosphériques sont retirés du modèle, la variance expliquée diminue respectivement de 22 et 15 points le pourcentage du 2- et 3-Flu, de 25 points le pourcentage du 2-Phe, et de moins de 10 points le pourcentage des autres métabolites.

II.2.2. Conclusions

La correction par la créatinine des concentrations urinaires des métabolites permet de diminuer de manière importante leur variabilité. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui concluent que la correction de la diurèse, notamment avec la créatinine est nécessaire pour ces métabolites [Sobus 2009a, Rodrigues 2014].

L'importante significativité des concentrations urinaires de début de poste pour expliquer les niveaux de fin de poste amène à recommander la réalisation de deux prélèvements (en début et en fin de poste) pour discerner les expositions professionnelles et environnementales. La faible contribution des niveaux atmosphériques dans l'explication de la variance des concentrations urinaires du 1-Nap, 2-Nap, 1-Phe et 3-Phe indiquent une faible importance de l'exposition professionnelle dans la variabilité des concentrations urinaires. Ces métabolites ne semblent

donc pas adaptés pour effectuer de la SBEP. En revanche, le 2-Flu et le 2-Phe paraissent être les métabolites les plus pertinents en tant que biomarqueurs d'exposition professionnelle aux HAP gazeux.

Les résultats obtenus peuvent être extrapolables à d'autres sources d'exposition aux HAP puisque c'est la contribution du composé parent qui a été intégré comme variable indépendante plutôt que la somme des HAP atmosphériques [Rodrigues 2014].

Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de prendre en compte l'absorption cutanée qui a été démontrée pour les HAP gazeux [Smith 2012] ainsi que le statut tabagique (en incluant des fumeurs dans la population étudiée). En effet, l'exposition au tabac pourrait être un facteur important de confusion [St Helen 2012].

III. Conclusions

Les résultats obtenus viennent confirmer que le 1- et 2-Nap ne sont pas de bons biomarqueurs pour les faibles expositions professionnelles du fait de l'importance de l'exposition environnementale au Nap. En revanche, le 2-Flu et le 2-Phe sont de bons candidats pour être utilisés comme biomarqueurs d'exposition professionnelle dans les secteurs faiblement exposés où les métabolites des HAP cancérogènes sont difficilement quantifiables de par leur faible abondance dans les urines. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer la pertinence du 2-Flu et du 2-Phe comme biomarqueurs d'exposition, et notamment étudier l'influence du statut tabagique ou d'une alimentation riche en HAP.

Bien que ces métabolites soient intéressants pour la SBE de la population générale et des travailleurs faiblement exposés, ils ne sont pas spécifiques de l'exposition aux HAP cancérogènes de la phase particulaire, et notamment du BaP.

Chapitre 4 :

Développement de nouveaux biomarqueurs urinaires d'exposition au BaP

I. Contexte

Parmi les biomarqueurs urinaires d'exposition aux HAP, la plupart ne sont pas spécifiques de l'exposition aux HAP cancérogènes, tels le 1-OHP ou les métabolites monohydroxylés des HAP gazeux. Le 3-OHBaP, métabolite du BaP, seul HAP classé cancérogène certain pour l'homme, est actuellement le biomarqueur le plus pertinent pour estimer le risque cancérogène. Cependant, sa cinétique d'élimination urinaire atypique complique l'interprétation des concentrations urinaires mesurées à partir d'un seul moment de prélèvement. De plus, le 3-OHBaP est issu des voies de détoxication du BaP et reflète donc la fraction non toxique de la dose interne de BaP.

Le Tetraol-BaP urinaire constitue un biomarqueur d'exposition intéressant car issu de la voie du BPDE, il reflète la fraction du BaP ayant suivi la voie de métabolisation du diol-époxyde (voie de métabolisation toxique). Parmi les différents diastéréoisomères du Tetraol-BaP, le (±)trans-anti-BaP-tétraol semble être le plus pertinent car il dérive de l'anti-BPDE qui est l'isomère le plus abondant.

De précédentes études ont développé des méthodes analytiques pour doser le Tetraol-BaP et la GC-NCI-MSMS est la méthode la plus sensible. Les concentrations urinaires de ce métabolite en population générale étaient du même ordre de grandeur que celles du 3-OHBaP. Cependant, les étapes pré-analytiques de ces méthodes sont conséquentes ne permettant pas leur utilisation en routine.

L'objectif de cette partie est donc de développer une méthode de dosage du Tetraol-BaP en GC-MSMS applicable en routine. De plus, le dosage du 4,5-diol-BaP va également être mis au point pour avoir une méthode capable de doser différents métabolites du BaP à partir d'une seule méthode.

II. Développement analytique

II.1. Matériels et Méthodes

II.1.1. Matériels

II.1.1.1. Produits chimiques et réactifs

Le tampon acétate pH 4,6 +/- 0,1 a été obtenu de Merck. L'eau ultra pure Milli Q est obtenue à partir d'un système de traitement Millipore. L'enzyme β-glucuronidase-arylsulfatase (venant de *Helix pomatia*) a été obtenue chez Roche Diagnostics GmbH. L'acétonitrile (ACN), l'ammoniaque 25% et l'acide formique proviennent de chez VWR. Le méthanol (MeOH), le tetrahydrofurane (THF), la pyridine et le BSTFA proviennent de chez Sigma-Aldrich. Le (±)trans-anti-BaP-tétraol et le trans-4,5-diol-BaP ont été obtenus sous forme de poudre chez MRI Global. Le [$^{13}C_6$] trans-anti-BaP-tétraol (100 µg/ml dans du MeOH) a été obtenu chez LGC Standards.

I.1.1.1. Appareillage

Le système de SPE off-line est un GX-271 ASPEC (Gilson). Les analyses HPLC sont réalisées avec un système de type 2695 de Waters couplé à une deuxième pompe Waters 600 pour permettre de faire de la 2 dimension. La détection se fait avec un fluorimètre de type Waters 2475. Les analyses en GC-MSMS sont réalisées avec un GC 7890B de chez Agilent couplé à un détecteur de masse triple quadripôle 7000C (Agilent). Le passeur d'échantillon est un système Pal RSI 85 (PAL SYSTEM).

II.1.2. Pré-analytique

10 ml d'urine sont hydrolysés pendant 16h à 37°C après ajout de 5 ml de tampon acétate pH 4,6 +/-0,1 et 20 µl d'enzyme β-glucuronidase/arylsulfatase. Après hydrolyse, 50 µl de [$^{13}C_6$]Tetraol-BaP (d'une solution à 0,1 ng/ml) et 4 ml de MeOH sont ajoutés avant centrifugation pendant 10 min à 4000 rpm. Ensuite les échantillons sont purifiés et concentrés

à l'aide d'une SPE automatisée. Les cartouches utilisées sont des Oasis MAX (150mg ; 6cc) de Waters. Ces dernières sont conditionnées avec 5 ml de MeOH puis 10 ml d'eau. L'échantillon est déposé dans la cartouche en 3 chargements successifs de 6,33 ml. Ensuite la cartouche est rincée avec 5 ml d'un mélange eau :MeOH (80 :20) contenant 2% d'acide formique, 5 ml d'un mélange eau :MeOH (80 :20), 5 ml d'un mélange eau :MeOH (80 :20) contenant 2% de NH_4OH et 5 ml d'un mélange eau :MeOH (80 :20). L'élution se fait avec 5 ml de MeOH.

L'éluat est ensuite évaporé à l'aide d'un agitateur concentrateur (LABCONCO) avant d'être repris puis dérivatisé avec 60 µl d'ACN, 20 µl de pyridine et 20 µl de BSTFA. Après 15 min aux ultra-sons, 15 µl sont injectés dans la GC-MSMS.

Pour la mise au point de la dérivatisation, HPLC-FLD/UV a été utilisée pour déterminer les rendements de dérivatisation de chacun des métabolites. La colonne utilisée est une Altima C18 (250 mm x 4,6 mm ; 5µm). Le gradient commence à 20% d'ACN et 80% d'eau pendant 1 min avant d'atteindre 100% d'ACN en 20 min et d'y rester 3 min. La colonne est ensuite reconditionnée avec un pallier de 10 min à 20% d'ACN atteint en 2min. Le temps d'analyse est de 35 min. A partir des spectres d'absorbance fournis par le fournisseur pour (MRIGlobal), des spectres de fluorescence sont réalisés pour le Tetraol-BaP et le 4,5-Diol.

Le rendement de dérivatisation est estimé en calculant le pourcentage de disparition du pic chromatographique de la molécule non dérivatisé. Le point direct, qui permet d'avoir la surface sous le pic chromatographique sans dérivatisation, correspond à une solution standard de 130 ng/L et 127 ng/L pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP. Les mêmes solutions ont été utilisées dans les conditions suivantes : Après évaporation à sec, le résidu a été repris avec 80µl d'ACN et 20µl de pyridine ou 80µl d'ACN et 20µl de BSTFAou 60µl d'ACN, 20µl de pyridine et 20 µl de BSTFA. Chaque condition a été réalisée trois fois.

II.1.3. Analytique

Les conditions analytiques dérivent de la publication de [Zhong 2011]. La colonne utilisée est une DB17-MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 µm) d'Agilent. Le programme de température de l'injecteur est 70°C pendant 0,1 min avant d'atteindre 320°C à une vitesse de 800°C/min. Le programme de température du four est de 70°C pendant 1 min avant de monter à 200°C avec une vitesse de 35°C/min, à 215°C à 3°C/min puis 320°C à 35°C/min. La ligne de transfert est à 320°C. Le débit est de 1 ml/min d'He.

L'appareil est équipé d'un injecteur multimode (MMI) qui permet d'injecter des volumes supérieurs à 2 µl. Un programme de température permet d'évaporer le solvant sans le faire entrer dans la colonne chromatographique et sans évaporer le ou les analytes qui ont un point d'ébullition supérieur. Après injection d'un volume de 15 µl, l'injecteur reste à une température initiale de 70°C pendant 0,14 min. Ensuite, la température monte à 320°C à une vitesse de 600°C/min et reste 5 min à 320°C. Le système est en mode Vent pendant 0,14 min (la phase gaz ne passe pas dans la colonne) à un débit de 300 ml/min. L'injecteur est purgé à partir de 2,64 min à un débit de 64 ml/min.

Les conditions d'ionisation chimique négative sont : 70% de méthane (gaz d'ionisation) correspondant à un débit de 3,5 ml/min, température de la source à 200°C, courant d'émission 157 µA. L'Argon est utilisé comme gaz de collision. Les transitions MRM sélectionnées et les énergies de collision correspondantes pour chaque métabolite sont dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Transitions MRM du 4,5-diol-BaP et du Tetraol-BaP

Métabolite	Temps de rétention (min)	Ion parent (m/z)	Cellule de collision (eV)	Ion fils (m/z)
4,5-diol-BaP	14,75	341,1	20	267,0
Tetraol-BaP	15,64	446,3	10	255,1
[$^{13}C_6$]Tetraol-BaP	15,64	452,0	10	261,0

Des plans d'expérience ont été conduits pour optimiser les conditions d'ionisation chimique négative.

Un premier plan fractionnaire a été défini pour identifier les variables ayant un effet réel sur la réponse (surface du pic chromatographique) parmi les 5 paramètres testés : débit de gaz réactant, température de la source, courant d'émission du filament, énergie électronique et température des quadripôles). Pour cette première étape, le spectromètre de masse a été utilisé en mode scan.

A partir des variables identifiées, un second plan de type composite en face centré permet de modéliser la réponse pour optimiser cette dernière. Ici, le spectromètre de masse a été utilisé en mode « single réaction monitoring » avec les ions d'intérêts. Les conditions optimales théoriques d'ionisation ont ensuite été testées (trois fois) pour valider le modèle d'optimisation.

II.1.4. Validation de la méthode

La validation analytique réalisée est en accord avec les recommandations françaises [AFNOR 2012]. Le rendement d'extraction, la linéarité, la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la LQ et la contamination inter-échantillons ont été déterminés.

Pour déterminer les pertes lors de la SPE, des urines témoins ont été surchargées à trois concentrations de 0,54, 2,15 et 26,90 ng/L. Extrait à partir de la SPE détaillée ci-dessus, les rendements ont été déterminés à partir d'urines témoins surchargées après extraction aux mêmes concentrations. Les rendements ont été calculés pour chaque concentration à partir de 3 urines extraites.

La limite de linéarité a été testée jusqu'à une concentration de 219,52 ng/L et a été évaluée à partir du r^2.

Il n'existe pas d'EEQ et de CQI certifié pour le Tetraol-BaP. Ainsi, la répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été calculées à l'aide de contrôle fabriqué au sein du laboratoire à deux

niveaux de concentrations. Pour la répétabilité, des urines témoins ont été surchargées aux concentrations de 1,08 et de 21,52 ng/L et injectées successivement 15 fois. Pour la fidélité intermédiaire, des urines témoins ont été surchargées aux concentrations de 0,16 et de 1,61 ng/L et injectées 14 fois pendant 7 jours différents non consécutifs (chaque échantillon a été analysé 2 fois par séquence). Ensuite, la répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été déterminées à partir du coefficient de variation. La justesse a été estimée à partir du pourcentage de déviation de la moyenne par rapport à la valeur cible.

La LQ a été déterminée à l'aide d'urine témoin surchargée à différentes concentrations. A partir d'une première concentration, la justesse et la répétabilité ont respectivement été évaluées en calculant le pourcentage de déviation de la moyenne par rapport à la valeur cible et le CV à partir de 10 injections successives. L'urine témoin est ensuite surchargée à des concentrations de plus en plus faibles et la LQ correspond à la concentration la plus faible pour laquelle le pourcentage de déviation de la moyenne par rapport à la valeur cible et le CV sont inférieurs à 15%.

La contamination inter-échantillons a été mesurée par trois injections successives de niveaux hauts (H1, H2, H3) suivis de 3 injections successives de niveaux bas (B1, B2, B3). Ce schéma a été répété cinq fois pour permettre de calculer la moyenne des B1 (mB1), des B3 (mB3) et de l'ensemble des niveaux hauts (mH). Le pourcentage de contamination a été calculée comme ci-dessous [COFRAC 2015] :

$$Contamination\ (\%) = \frac{(mB1 - mB3)}{(mH - mB3)} \times 100$$

II.1.5. Dosage du Tétraol-BaP urinaire

Les urines de début de poste du premier et du dernier jour de la semaine de travail ainsi que les urines de fin de poste du dernier jour de la semaine de travail ont été analysées chez les sept

travailleurs de l'usine de production d'électrode de carbone. Les niveaux mesurés pourront ainsi être comparés à ceux du 1-OHP et du 3-OHBaP.

Les concentrations urinaires mesurées aux différents moments de prélèvement ont ensuite été comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Si celui-ci est significatif, un test de Wilcoxon deux à deux est réalisé avec un ajustement de la p-valeur par la méthode de Bonferroni et avec une prise en compte de l'appariement des données.

II.2. Résultats et discussion

II.2.1. Pré-analytique

II.2.1.1. SPE

L'ensemble des précédentes méthodes de dosage du Tetraol-BaP urinaire nécessite une ou plusieurs SPE avant analyse (Tableau 6, page 131). Dans ce travail, l'objectif était de simplifier le pré-analytique (avec une seule SPE) tout en conservant une sensibilité similaire. La méthode la plus sensible qui réalisait une double SPE (polymère Strata-X et acide phénylboronique) [Zhong 2011] a été modifiée au niveau de la seconde SPE en utilisant des cartouches Oasis MAX [Hecht 2014]. Nous avons choisi la cartouche Oasis MAX car elle permet de faire des rinçages acides et basiques en plus d'avoir des interactions lipophiles qui retiennent le Tetraol-BaP et le 4,5-diol-BaP. Après optimisation de la SPE automatisée, les rendements moyens (CV) d'extraction du Tetraol-BaP étaient respectivement de 69% (5%), 75% (1%), 77% (2%) pour les concentrations de 0,54, 2,15 et 26,90 ng/L ce qui est tout à fait acceptable. En effet, une double SPE C18 puis acide phénylboronique avaient des rendements respectifs de 80 et 85% ce qui donnait un rendement final de 68% [Simpson 2000a]. La méthode permettant de doser les deux énantiomères du (±)trans-anti-BaP-tétraol avait quant à elle un rendement général de 40% [Hecht 2014].

II.2.1.2. Réaction de dérivatisation

La réaction de dérivatisation permet de faciliter la volatilisation des produits peu volatils qui sont composés de fonctions hydrophiles, tels les groupements hydroxyles. Le Tetraol-BaP qui comporte quatre groupements hydroxyles nécessite d'être dérivatisé avant une analyse en GC. Les précédentes méthodes de dosage du Tetraol-BaP urinaire en GC-MSMS utilisaient du BSTFA pour réaliser une réaction de silylation [Hecht 2010, Zhong 2011, Hecht 2014].

Le mélange ACN et pyridine permet de confirmer qu'il n'y a pas de perte à l'évaporation et que le résidu est correctement repris pour les deux métabolites avec un rendement moyen de reprise respectif de 91% et de 87% pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP. Sans pyridine, les rendements moyens de dérivatisation sont respectivement de 30% et 32% pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP. L'ajout de pyridine permet d'obtenir des rendements moyens de dérivatisation qui sont de 91% et 99% pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP (Figure 41).

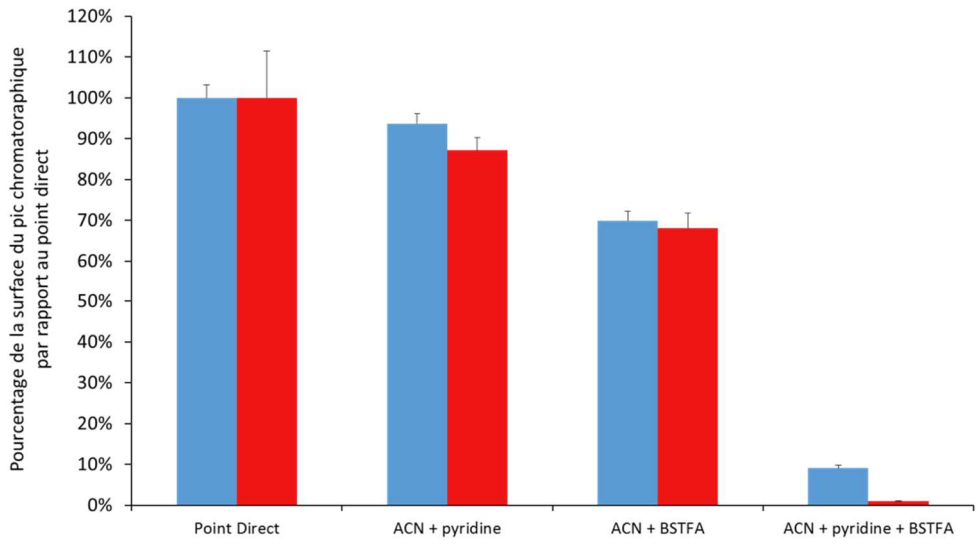


Figure 41 : Dérivatisation du 4,5-diol-BaP (en bleu) et du Tetraol-BaP (en rouge). Le point direct correspond à une solution standard de 130 ng/L et 127 ng/L pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP. Les mêmes solutions ont été utilisées et ont d'abord été évaporées à sec puis reprises dans différentes conditions. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Les conditions de dérivatisation semblent adaptées pour les deux métabolites. La pyridine apparaît comme indispensable dans cette étape pré-analytique pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP. La pyridine joue un rôle de catalyseur et est souvent utilisée pour les réactions de

dérivatisation par silylation, notamment pour l'analyse d'oestrogènes [Shareef 2006]. Dans ce cas, la pyridine permet de favoriser la formation d'un seul composé dérivé. Elle permet également d'améliorer la répétabilité [Samaras 2011]. Les ultra-sons ont été ajoutés de manière systématique puisqu'ils permettent d'améliorer l'homogénéisation entre les phases et d'accélérer la réaction de dérivatisation [Priego Capote 2007, Sanchez Avila 2007, Prata Vde 2012].

II.2.2. Optimisation de l'ionisation chimique négative

L'ionisation chimique est un mode d'ionisation plus doux que l'impact électronique. En revanche, ce mode d'ionisation requiert un ajustement des différents paramètres d'ionisation qui est molécule dépendant. La majorité des études qui cherchent à optimiser cette ionisation chimique (négative ou positive) ajustent essentiellement la pression de gaz réactant et la température de la source d'ionisation [Schoots 1979, Hernando 2001a, Hernando 2001b, Deme 2014]. Une étude a cherché à optimiser l'ionisation chimique en faisant varier le courant d'émission et l'énergie électronique en plus de la température de la source et de la pression de gaz réactant. Des auteurs ont également défini des températures de quadripôles différentes entre une ionisation chimique positive (PCI) et une ionisation chimique négative (NCI) [Aguera 2000]. Dans ce travail de thèse, l'utilisation de plans d'expériences a permis de tester l'ensemble des paramètres pouvant avoir un impact sur l'ionisation de nos molécules.

Pour la première étape d'identification des variables pertinentes, les domaines expérimentaux étaient 1 ml/min à 2,5 ml/min pour le débit de gaz réactant, 10 à 300 eV pour l'énergie électronique, 150°C à 200°C pour la température de la source d'ionisation et 100°C à 150°C pour les quadripôles. Quelques soient les réponses considérées, les données brutes ou transformées ne permettent pas d'obtenir un modèle de régression significatif (p-valeur > 0,05). La présence d'un effet de courbure significatif (effet quadratique) et l'influence des différentes variables étudiées sont réalisées en calculant les contributions respectives (Tableau 8).

Tableau 8 : Contributions respectives des différents paramètres d'ionisation sur la réponse pour 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP

Métabolites	Débit de gaz réactant	Courant d'émission	Energie électronique	Température Source	Température Quadripôle	Effet de courbure
4,5-diol-BaP	37%	18%	2%	8%	1%	30%
Tetraol-BaP	38%	33%	0,02%	0,4%	0,2%	26%

La contribution a été déterminée à partir de la somme du carré des écarts (SCE) : (SCE variable/SCE totale x 100).

L'analyse de la présence d'un effet de courbure est significative pour les 2 réponses (p-valeur <0,05) et leur contribution est élevée (>25%), ce qui signifie qu'un modèle quadratique doit être recherché. Cette approche réalisée par plan composite face centrée doit être envisagée uniquement sur les variables les plus pertinentes. Ces dernières sont sélectionnées en fonction de leur contribution respective. Pour l'ensemble des réponses du 4,5-diol-BaP et du Tetraol-BaP, les variables les plus pertinentes sont donc le débit de gaz réactant, le courant d'émission et la température de la source. En ce qui concerne le débit de gaz réactant, le domaine expérimental a été élargie jusqu'à 4 ml/min pour le plan composite en face centrée. L'énergie électronique et la température des quadripôles ont respectivement été fixées à 150 eV et à 150°C.

Après régression linéaire des données transformées par un logarithme népérien (transformation sélectionnée par un test de transformation de Box-cox), une sélection du meilleur sous modèle est réalisée par une méthode algorithmique pas à pas. Les modèles obtenus ont respectivement un r^2 ajusté et un r^2 prédit de 0,99 et 0,97 pour le 4,5-diol-BaP ; de 0,96 et 0,85 pour le Tetraol-BaP. A partir de ces deux modèles, un algorithme d'optimisation simplexe est utilisé pour rechercher les meilleures conditions expérimentales permettant de maximiser les deux réponses. Ces dernières sont un débit de gaz réactant de 3,5 ml/min, une température de 150°C pour la source d'ionisation et un courant d'émission de 157µA. Ces conditions ont ensuite été testées expérimentalement et les réponses mesurées ont été comparées aux réponses théoriques afin de valider les modèles (Tableau 9).

Tableau 9 : Comparaison des réponses expérimentales mesurées avec les conditions optimales d'ionisation chimique négative à celles prédites par le modèle crée à partir des données du plan composite en face centrée

Métabolite	Moyenne [a]	Intervalle de confiance à 95% [b]
4,5-diol-BaP	$2,33 \times 10^{7}$	$[1,79 \times 10^{7} - 2,97 \times 10^{7}]$
Tetraol-BaP	$2,58 \times 10^{8}$	$[1,84 \times 10^{8} - 3,52 \times 10^{8}]$

[a] : Valeurs moyenne mesurée à partir des trois mesures
b : L'intervalle de confiance à 95% correspond à celui estimé par le modèle créer à partir du plan composite en face centré

Les valeurs moyennes mesurées expérimentalement pour les réponses du 4,5-diol-BaP et du Tetraol-BaP appartiennent aux intervalles de confiance à 95% autour des valeurs prédites correspondantes. Les réponses prédites en fonction des réponses observées (scatter plot) montrent la bonne qualité du modèle (Figure 42). De plus, les conditions de NCI optimisées correspondent aux plus grandes réponses obtenues pour le 4,5-diol-BaP et le Tetraol-BaP.

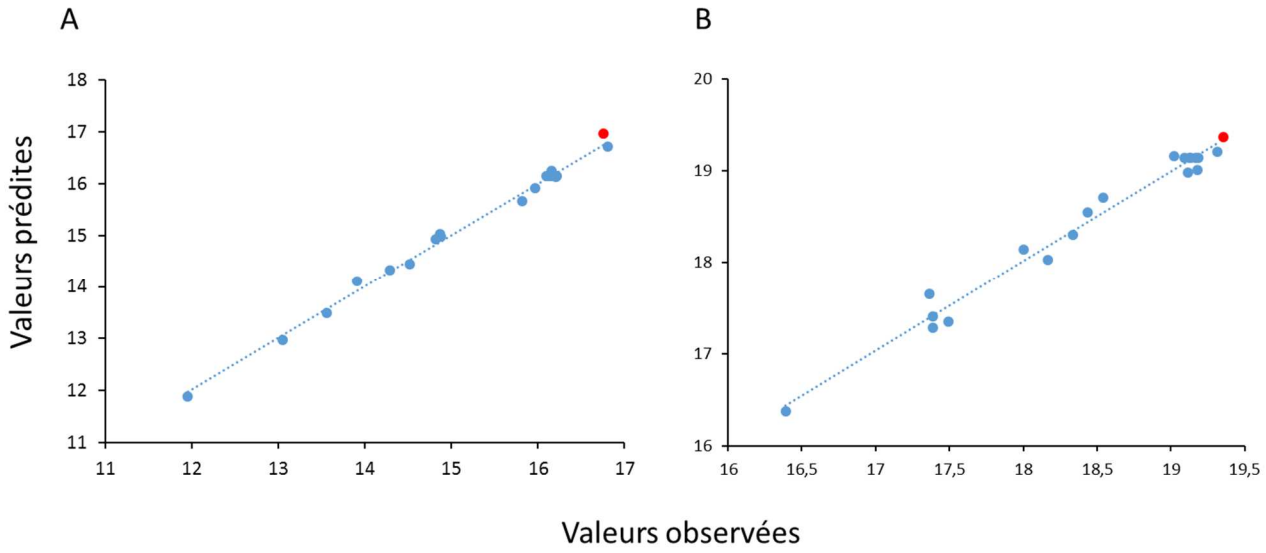


Figure 42 : Valeurs prédites par le modèle en fonction des valeurs observées lors des expériences selon le plan composite en face centrée (en bleu) et les conditions optimisées (en rouge) pour le 4,5-diol-BaP (A) et le Tetraol-BaP (B).

II.2.3. Performance de la méthode

La méthode développée ne montre pas une sensibilité suffisante pour le 4,5-diol-BaP (LQ estimée à 5 ng/L) du fait d'un bruit de fond urinaire élevé. En effet, même si chez le rat, les quantités urinaires de 4,5-diol-BaP excrétés sont 10 fois supérieures à celles du 3-OHBaP, la LQ obtenue n'est pas suffisante [Moreau 2015]. La procédure de validation de méthode a donc été réalisée uniquement pour le Tetraol-BaP.

La LQ a été estimée à 0,02 ng/L avec un CV de 14% et un écart à la concentration théorique de 0,44%. La LQ obtenue est similaire à celle des méthodes analytiques les plus sensibles qui toutefois ont un pré-analytique plus important [Zhong 2011]. Le CV pour la répétabilité était respectivement de 3,78% et 2,90% pour les concentrations de 1,08 et de 21,52 ng/L. Le CV pour la fidélité intermédiaire était respectivement de 6,50% et 6,86% pour les concentrations de 0,16 et de 1,61 ng/L. L'équation de la droite de calibration pour évaluer la linéarité était $y = x - 0,25$ ($r^2 = 0,999$) (Figure 43). La linéarité a ainsi pu être établie pour des concentrations comprises 0,54 et 219,52 ng/L. Le pourcentage de contamination a été estimé à 1,25%. Les méthodes précédemment publiées n'ont pas été validées pour une application en routine de l'utilisation du Tetraol-BaP urinaire et ces critères ne sont pas indiqués.

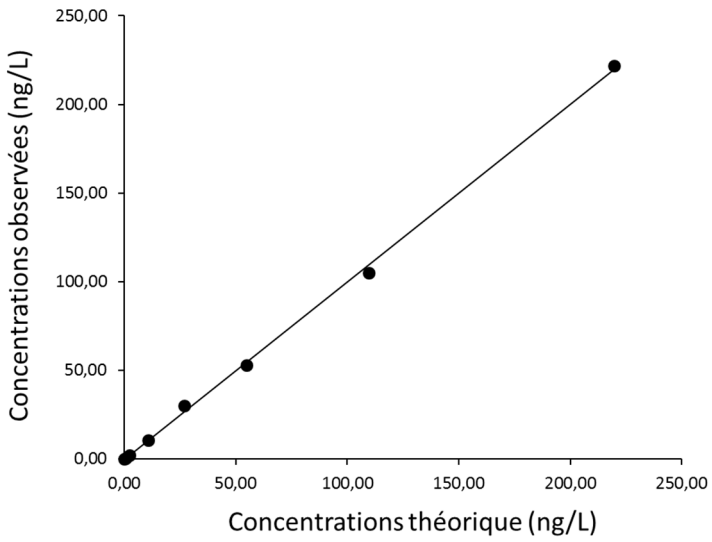


Figure 43 : Courbe de calibration du Tetraol-BaP

II.2.4. Analyses urinaires

Sur les 21 urines analysées, l'échantillon collecté en début de poste du premier jour de la semaine du travailleur 5 n'a pas été analysé à cause d'une créatinine urinaire supérieure à 3 g/L. L'ensemble des concentrations urinaires ont pu être quantifiées (Tableau 10). Un chromatogramme est présenté dans la Figure 44. L'identification du pic de Tetraol-BaP est confirmé à l'aide de l'étalon interne et de son temps de rétention. Les moyennes des concentrations urinaires sont respectivement de 0,13, 0,65 et 0,45 µmol/mol en DSDP, FSFP et FSFP16 pour le 1-OHP ; de 0,05, 0,15 et 0,26 nmol/mol en DSDP, FSFP et FSFP16 pour le 3-OHBaP ; de 0,13, 0,41 et 0,45 nmol/mol en DSDP, FSFP et FSFP16 pour le Tetraol-BaP. Peu de concentrations urinaires du Tetraol-BaP ont été publiées dans la littérature, notamment en environnement professionnel. Cependant, les concentrations moyennes observées en FSFP et FSFP16 sont similaires à celles observées dans des cokeries et inférieures à celles mesurées après des expositions à la créosote [Simpson 2000a, Wu 2002, Hochalter 2011].

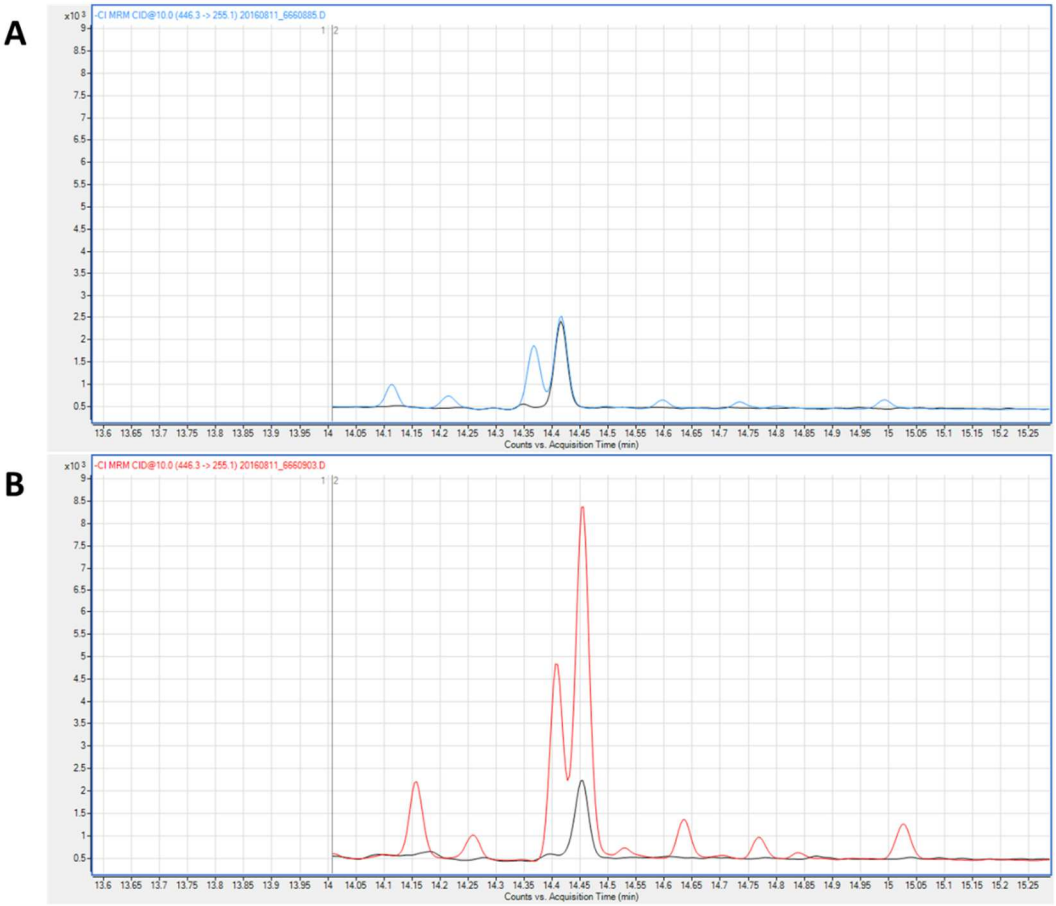


Figure 44 : Chromatogramme d'un échantillon urinaire prélevé en DSDP (en bleu) et en FSFP (en rouge) pour un même travailleur. Le chromatogramme en noir représente l'étalon interne.

Le ratio moyen Tetraol-BaP/3-OHBaP est respectivement de 2,44, 2,61 et 1,73 pour les prélèvements urinaires de DSDP, FSFP et FSFP16. Pour l'ensemble des prélèvements urinaires, ce même ratio est compris entre 0,95 et 8,76. Le Tetraol-BaP a donc une abondance dans les urines supérieure au 3-OHBaP.

Le prélèvement en début de poste du premier jour travaillé (DSDP) représente les concentrations de base d'un individu due à son exposition environnementale aux HAP ou à l'exposition professionnelle de la semaine précédente [SFMT 2016]. Les concentrations urinaires de Tetraol-BaP mesurées en DSDP ont une médiane de 0,8 nmol/mol, soit 2,6 fois supérieure à la médiane observée en population générale de non-fumeurs [Zhong 2011]. Les concentrations urinaires de 1-OHP et de 3-OHBaP sont également supérieures d'un facteur 2,2 et 5,5 à la médiane observée en population générale de non-fumeurs [Lafontaine 2006,

NHANES 2015]. Ainsi, il y a une cohérence entre les trois biomarqueurs d'exposition. La population semble donc avoir un niveau de base plus élevée que ceux précédemment rapportés dans la littérature.

Tableau 10 : Concentrations urinaires de 1-OHP, 3-OHBaP et de Tetraol-BaP de travailleurs d'une usine de production d'électrode de carbone.

Travailleur	Moment de prélèvement	Créatinine	1-OHP		3-OHBaP		Tetraol-BaP	
		g/L	*µg/L*	*µmol/mol*	*ng/L*	*nmol/mol*	*ng/L*	*nmol/mol*
1	DSDP	1,47	0,22	0,08	0,12	0,03	0,20	0,05
	FSFP	0,61	0,41	0,35	0,21	0,15	0,56	0,33
	FSFP16	2,00	1,64	0,43	0,60	0,13	2,01	0,35
2	DSDP	1,13	0,23	0,11	0,15	0,06	0,26	0,08
	FSFP	0,55	0,52	0,49	0,26	0,20	0,84	0,54
	FSFP16	1,75	1,08	0,32	1,65	0,40	3,24	0,65
3	DSDP	1,97	0,40	0,11	0,10	0,02	0,34	0,06
	FSFP	0,77	1,87	1,26	0,09	0,05	0,30	0,14
	FSFP16	1,06	1,08	0,53	0,10	0,04	0,59	0,20
4	DSDP	1,26	0,27	0,11	<LQ	<LQ	0,31	0,09
	FSFP	0,80	1,15	0,75	0,41	0,22	1,03	0,46
	FSFP16	0,97	1,29	0,69	1,85	0,80	2,10	0,76
5	DSDP	3,54	1,33	0,19	0,76	0,09	NA	NA
	FSFP	0,94	1,17	0,65	0,46	0,21	1,34	0,50
	FSFP16	2,23	2,50	0,58	0,96	0,18	2,81	0,45
6	DSDP	0,48	0,11	0,12	0,09	0,08	0,40	0,29
	FSFP	0,93	0,77	0,43	0,19	0,09	1,20	0,46
	FSFP16	0,61	0,36	0,31	0,28	0,19	0,96	0,56
7	DSDP	0,84	0,36	0,22	0,14	0,07	0,44	0,19
	FSFP	0,49	0,61	0,65	0,21	0,18	0,58	0,41
	FSFP16	2,00	1,15	0,30	0,39	0,08	1,07	0,19

DSDP : Prélèvement urinaire réalisé en début de poste du premier jour de la semaine de travail
FSFP : Prélèvement urinaire réalisé en fin de poste du dernier jour de la semaine de travail
FSFP16 : Prélèvement urinaire réalisé en début de poste du dernier jour de la semaine de travail

Les concentrations urinaires du 1-OHP, du 3-OHBaP et du Tetraol-BaP aux trois moments de prélèvements ont été comparés (Figure 45). L'analyse non paramétrique de la variance (test de Kruskal-Wallis) indique des différences significatives entre les moments de prélèvements pour les trois biomarqueurs avec des p-valeurs respectivement inférieures à 0,01, 0,05 et 0,01 pour le 1-OHP, le 3-OHBaP et le Tetraol-BaP. En revanche, les tests deux à deux n'ont pas révélé de différences significatives probablement dues aux petits effectifs. Les concentrations urinaires de Tetraol-BaP ont tout de même tendance à augmenter en FSFP et FSFP16 par rapport au DSDP.

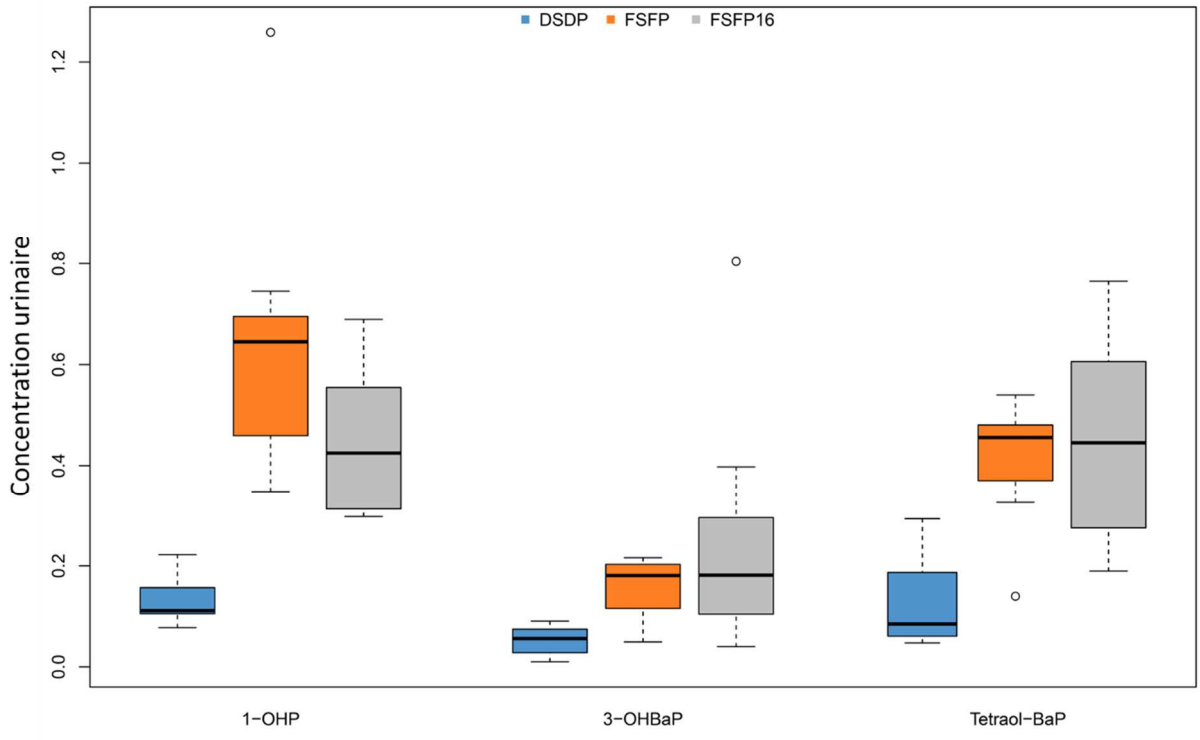


Figure 45 : Distribution des concentrations urinaires de 1-OHP (µmol/mol), de 3-OHBaP (nmol/mol) et de Tetraol-BaP (nmol/mol) aux différents moments de prélèvement. En bleu, les prélèvements urinaires réalisés en début de poste du premier jour de la semaine de travail (DSDP). En orange, les prélèvements urinaires réalisés en fin de poste du dernier jour de la semaine de travail (FSFP). En gris, les prélèvements urinaires réalisés en début de poste du dernier jour de la semaine de travail (FSFP16).

III. Conclusions

La méthode de dosage du Tetraol-BaP que nous avons développée en GC-NCI-MSMS présente des performances similaires à celles précédemment publiées. L'avantage de notre méthode réside dans son pré-analytique qui ne comporte qu'une seule SPE avant dérivatisation. En effet, l'optimisation de la SPE, de la dérivatisation et de l'ionisation chimique négative couplée à un volume d'injection important a permis de simplifier la méthode pour pouvoir envisager une utilisation en routine. De plus, cette méthode a fait l'objet d'une validation analytique réalisée selon la règlementation française en vigueur.

Malgré l'optimisation des différentes étapes, le développement simultané du 4,5-diol-BaP avec le Tetraol-BaP a échoué. L'ionisation moins efficace et un bruit de fond urinaire plus important au niveau du temps de rétention du 4,5-diol-BaP ne permettent pas d'obtenir une LQ suffisamment basse pour réaliser des dosages urinaires chez des sujets professionnellement exposés.

Par contre, avec une LQ de 0,02 ng/L pour le Tetraol-BaP, le dosage de ce métabolite a pu être réalisé sur l'ensemble des urines collectées. Des dosages urinaires de ce métabolite chez des sujets non exposés professionnellement devraient également être réalisés afin de pouvoir confirmer ces premiers résultats encourageants.

Les analyses effectuées en milieu professionnel ont montré que le Tetraol-BaP urinaire était plus abondant que le 3-OHBaP. Ainsi, en plus de l'augmentation des concentrations urinaires au cours de la semaine de travail, le Tetraol-BaP apparait comme un biomarqueur d'exposition intéressant pour la SBE.

Chapitre 5 :

Conclusion du Travail de thèse et Perspectives de Recherche

Les HAP sont des polluants ubiquitaires émis dans l'atmosphère sous forme de gaz ou adsorbés sur des particules fines en suspension et constituent des mélanges complexes issus de sources multiples. Ainsi, l'ensemble des populations sont exposées aux HAP par voie respiratoire et digestive via l'alimentation. En plus de ces expositions environnementales, les travailleurs de certains secteurs professionnels sont exposés à des niveaux élevés de HAP tant par voie respiratoire que cutanée.

Pour être éliminés de l'organisme via les fèces ou les urines, les HAP vont être métabolisés par les enzymes de biotransformation en composés hydrosolubles. Cette biotransformation engendre parallèlement la production de métabolites réactifs capables de causer des dommages à l'ADN. Les expositions chroniques en milieux professionnels peuvent aboutir à la formation de cancers, notamment du poumon, de la peau et de la vessie.

Emis en mélanges complexes de composition variable, les effets cocktails des HAPs au niveau de l'organisme sont encore largement étudiés. Ainsi, en plus d'avoir déterminé le potentiel cancérogène de certains HAP de manière individuelle, le CIRC et l'UE ont également classé certains mélanges et certains secteurs professionnels comme cancérogènes certains ou probables pour l'homme.

De par leurs effets néfastes sur la santé, la surveillance de l'exposition aux HAP est nécessaire pour estimer le risque sanitaire. Bien que les mesures atmosphériques permettent de caractériser les sources d'émission, la SBE apparaît comme plus pertinente car plus proche de l'effet toxique et tenant compte de toutes les voies d'absorption. Toutefois, le choix des biomarqueurs les plus pertinents pour l'estimation du risque sanitaire est une question centrale de la SBE.

Les biomarqueurs urinaires d'exposition sont couramment mis en œuvre par les Services de Santé au Travail. Le 1-OHP est le biomarqueur qui a été développé le premier car son dosage est simple du fait de son abondance dans les urines. Ceci est dû au fait que le pyrène dont il est

issu est un des HAP particulaires les plus abondants dans les mélanges et qu'il est largement éliminé dans les urines. Cependant, l'utilisation du 1-OHP seul pour estimer l'exposition aux mélanges de HAP est aujourd'hui controversée car le pyrène n'est pas cancérogène et car le ratio pyrène/BaP est variable en fonction des secteurs industriels. Le dosage du 3-OHBaP a récemment été développé car ce métabolite est issu du BaP, seul HAP classé cancérogène certain pour l'homme par le CIRC. Ainsi, ce biomarqueur apparaît comme plus adapté pour estimer l'exposition aux HAP cancérogènes. Pour la SBE des faibles niveaux d'exposition, a également été proposé le dosage des métabolites monohydroxylés des HAP gazeux, composés les plus abondants dans les mélanges, comme le Nap, le Flu et le Phe.

Ce travail avait pour objectif de développer et de valider un ensemble de biomarqueurs permettant une SBE pertinente et efficace de l'exposition aux HAP tant au niveau professionnel qu'environnemental, mais aussi, d'approcher les éventuels effets cocktails sur la métabolisation du BaP résultant de cette multi-exposition.

La première partie du travail a étudié en parallèle les biomarqueurs d'exposition au pyrène et au BaP qui sont classiquement utilisés (le 1-OHP et le 3-OHBaP) ce qui a donné lieu à la publication de 2 articles. Le premier article a permis de mettre en évidence que la composition des mélanges, notamment l'abondance de la phase gazeuse par rapport à la phase particulaire, différait au sein d'une même entreprise en fonction du poste des travailleurs, mais aussi en fonction des jours de la semaine pour un même poste. Le pyrène étant présent dans l'aérosol sous forme gazeuse et particulaire, les concentrations urinaires de 1-OHP reflètent l'exposition à ces deux phases. Le 1-OHP n'est pas spécifique de l'exposition aux HAP particulaires et est donc peu adapté à la surveillance de l'exposition aux HAP cancérogènes qui sont présents seulement dans la phase particulaire.

L'étude des modes de correction de la diurèse a confirmé la nécessité de prendre en compte le degré de dilution des urines dans la quantification du 1-OHP et du 3-OHBaP et a permis de valider l'utilisation de la créatinine urinaire comme moyen de correction.

Le dosage urinaire du 3-OHBaP apparaît comme le biomarqueur le plus approprié pour estimer l'exposition aux HAP cancérogènes mais il nécessite que le prélèvement soit réalisé en fin de poste plus 16h de par sa cinétique d'élimination urinaire. De plus, il est recommandé de collecter les urines en début de poste du dernier jour travaillé du fait l'accumulation du BaP dans l'organisme tout au long de la semaine. Ce prélèvement permet ainsi de prendre en compte le délai d'excrétion du 3-OHBaP tout en étant réalisable sur le terrain.

En revanche, le 3-OHBaP a une cinétique d'élimination urinaire atypique, due à son accumulation rénale. Cette dernière engendre une variabilité biologique qui peut être importante et complique ainsi l'interprétation des concentrations. De plus, sa faible abondance urinaire ne permet pas d'utiliser la SBE dans des milieux professionnels avec de faibles niveaux d'exposition [Leroyer 2010]. Enfin, le 3-OHBaP est issu des voies de détoxication et ne représente pas la fraction absorbée de BaP qui a suivi les voies toxiques de métabolisation.

Ces éléments ont orienté la suite du travail de thèse vers le développement et la sélection d'autres biomarqueurs d'exposition : D'une part, vers des biomarqueurs adaptés pour les faibles expositions professionnelles ; d'autre part, vers un biomarqueur plus spécifique de l'effet toxique du BaP.

Ainsi, la deuxième partie de ce travail a consisté à sélectionner des biomarqueurs pour les faibles expositions professionnelles. Ce choix s'est porté sur les métabolites des HAP gazeux car plus abondants dans les urines, ils sont déjà utilisés pour suivre l'exposition des populations générales et de certains milieux professionnels faiblement exposés. Cependant, les études publiées analysent souvent plusieurs métabolites issus d'un même HAP et interprètent la

somme des concentrations urinaires des différents métabolites. L'utilisation de plusieurs métabolites issus d'un même HAP complique l'interprétation des résultats et l'utilisation de la somme des métabolites urinaires engendre une perte d'information [Li 2010b].

N'existant pas de méthode de dosage des métabolites monohydroxylés des HAP gazeux au sein du laboratoire, la première étape a été d'en développer une en GC-MS. Après avoir effectué la validation initiale, cette méthode est aujourd'hui utilisée en routine par mon équipe. La procédure continue de vérification des bonnes performances de la méthode qui est effectuée au cours du temps, par le biais des contrôles de qualité interne (CQI), a permis de faire évoluer cette méthode et d'en améliorer ces performances. La participation à des EEQ pour les 1- et 2-Nap a également permis d'attester de la pertinence des résultats rendus pour ces deux métabolites. Il n'existe pas encore d'EEQ pour les autres métabolites mais elles sont en cours de mise en place.

Le troisième article qui compare les métabolites monohydroxylé du Nap, du Flu et du Phe quant à leur utilisation en tant que biomarqueur d'exposition professionnelle est en cours de soumission. Ce dernier propose le 2-Flu et le 2-Phe comme biomarqueurs d'exposition professionnelle pour la surveillance des faibles niveaux d'exposition. Cependant, ils ne sont pas spécifiques de l'exposition aux HAP cancérogènes essentiellement contenus dans la phase particulaire.

La troisième partie de ce travail a été de développer un biomarqueur spécifique de l'exposition aux HAP cancérogènes, plus proche de l'effet toxique du BaP que le 3-OHBaP. Le Tetraol-BaP a été sélectionné car il est issu du BPDE, métabolite cancérogène ultime du BaP capable de former des adduits stables à l'ADN. Le Tetraol-BaP est ainsi un marqueur de la voie du diol-époxyde, principale voie toxique de métabolisation du BaP. Dans les études précédemment publiées, les méthodes de dosage de ce métabolite urinaire semblaient assez sensibles pour l'utiliser en population générale. Cependant l'importance des étapes pré-analytiques ne

permettait pas leur utilisation en tant que méthode de routine pour un laboratoire de biologie médicale.

Après avoir optimisé différentes étapes, notre méthode de dosage du Tetraol-BaP ne comporte plus qu'une SPE au lieu des deux nécessaires dans les méthodes publiées tout en ayant une LQ similaire de 0,02 ng/L. La méthode vient d'être validée selon les recommandations françaises de qualité analytique pour pouvoir l'utiliser en routine.

Aucun des dosages de Tetraol-BaP effectué sur des échantillons urinaires collectés en milieu professionnel n'a été inférieur à la LQ, et les niveaux mesurés sont plus élevés que ceux de 3-OHBaP. Ces premiers résultats sont encourageants d'autant que le Tetraol-BaP pourrait être un biomarqueur d'exposition intéressant pour estimer le risque cancérogène. Il est nécessaire d'analyser d'autres urines en population générale et dans différents secteurs industriels pour confirmer la pertinence du dosage du Tetraol-BaP urinaire en tant que biomarqueur d'exposition aux HAP cancérogènes.

Il sera également nécessaire d'étudier sa cinétique d'élimination afin de définir les moments optimums de prélèvement. Les diols du BaP ne sont pas accumulés au niveau du rein chez le rat probablement par leur caractère hydrophile plus important que les métabolites monohydroxylés [Bouchard 1996, Moreau 2015]. Le Tetraol-BaP étant encore plus hydrophile que les diols, il est possible que sa cinétique se rapproche plus de celle des diols que de celle du 3-OHBaP. Ainsi, sans accumulation rénale, l'effet réservoir de la peau pourrait modifier les paramètres toxicocinétiques du Tetraol-BaP comme pour le 1-OHP qui a ses demi-vies d'élimination urinaire qui varient en fonction des voies d'absorption. Les modes de correction de la diurèse devront également être évalués pour utiliser le moyen le plus adapté. Contrairement aux autres biomarqueurs qui sont utilisés depuis des années où il existe énormément de données qui sont corrigés à la créatinine, il n'y a que très peu de données disponibles sur le Tetraol-BaP urinaire. Ainsi, il serait possible d'utiliser, pour ce biomarqueur,

la SG qui a récemment été recommandée à la place de la créatinine [Truchon 2014]. En effet, la SG est encore très peu utilisée et les niveaux publiés sont quasi inexistants, notamment pour les HAP. Les deux modes de correction devraient être appliqués afin d'accumuler des données pour mener des études comparatives.

Après avoir défini les usages du Tetraol-BaP pour la SBE, l'utilisation combinée du 3-OHBaP et du Tetraol-BaP permettrait d'évaluer en parallèle la fraction de BaP métabolisée via les voies de détoxication et via la voie du diol-époxyde. Ainsi, l'étude du ratio Tetraol-BaP/3-OHBaP permettrait d'étudier la susceptibilité phénotypique inter-individuelle.

Enfin, il sera important d'étudier la relation entre les concentrations urinaires de Tetraol-BaP et les niveaux des biomarqueurs de dose efficace (adduits ADN-BPDE) ou d'effet afin de pouvoir proposer à terme une Valeur Limite Biologique.

Pour compléter ce travail, le développement du dosage de métabolites urinaires du BaP issus des autres voies de métabolisation permettrait d'avoir des marqueurs de chaque voie métabolique comme cela a été réalisé en condition *in vitro* [Lu 2011]. Le dosage des diones urinaires est possible mais leur instabilité doit être prise en compte. En effet, le dosage urinaire des diones du pyrène ont nécessité une dérivatisation [Ruzgyte 2005]. De plus, le développement de méthodes d'analyse de biomarqueurs pertinents d'exposition à d'autres HAP particulaires cancérogènes tel que le chrysène et le benzo(a)anthracène pourrait être effectué. Les méthodes de dosages actuelles ne permettent pas de détecter les métabolites monohydroxylés de ces HAP car ceux-ci sont trop peu abondants dans les urines. Les diols de ces HAP n'ont pas encore été analysés dans les urines humaines. Toutefois leur abondance semble plus importante que les métabolites monohydroxylés pour le Nap, le Phe ou le BaP lors des études *in vitro* ce qui constitue une piste intéressante à étudier pour développer des biomarqueurs d'exposition aux HAP particulaires cancérogènes.

L'évaluation de l'exposition aux mélanges de HAP à partir d'un seul métabolite est difficilement interprétable du fait de la variabilité de la composition des mélanges émis. Comme pour la surveillance atmosphérique où la phase gazeuse et la phase particulaire sont analysées séparément [Ravindra 2008], la SBE pourrait être réalisée avec des biomarqueurs d'exposition spécifiques de la phase gazeuse ou de la phase particulaire pour mieux caractériser l'exposition à l'échelle du mélange de HAP.

A travers cet ensemble de biomarqueurs urinaires d'exposition disponibles, il sera possible d'étudier l'influence de la composition des mélanges de HAP sur la production de métabolites issus de voies métaboliques différentes (ratio Tetraol-BaP/3-OHBaP) et ainsi d'approcher les effets cocktails qui sont encore mal connus et difficilement pris en compte dans l'évaluation des risques.

Bibliographie

AFNOR (1995). NF X43-294 Air des lieux de travail - Echantillonnage et analyse des hydrocarbures aromatiques polycyliques. **NF X43-294**.

AFNOR (2012). NF EN ISO 15189 Laboratoires de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence. **NF EN ISO 15189**.

Aguera, A., Piedra, L., Hernando, M.D. and Fernandez-Alba, A.R. (2000). Multiresidue method for the analysis of five antifouling agents in marine and coastal waters by gas chromatography-mass spectrometry with large-volume injection. J Chromatogr A. **889**(1-2): 261-269.

Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, O., Castegnaro, M., Camus, A.M., Petruzzelli, S., *et al.* (1992). An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers' lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Cancer Res. **52**(22): 6248-6253.

Alghamdi, M.A., Alam, M.S., Stark, C., Mohammed, N., Harrison, R.M., Shamy, M., *et al.* (2015). Urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in Saudi Arabian schoolchildren in relation to sources of exposure. Environ Res. **140**: 495-501.

Andersson, J.T. and Achten, C. (2015). Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. Polycycl Aromat Compd. **35**(2-4): 330-354.

Angerer, J., Mannschreck, C. and Gundel, J. (1997a). Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Int Arch Occup Environ Health. **70**(6): 365-377.

Angerer, J., Mannschreck, C. and Gundel, J. (1997b). 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. **69**(5): 323-331.

Aquilina, N.J., Delgado-Saborit, J.M., Meddings, C., Baker, S., Harrison, R.M., Jacob, P., 3rd, *et al.* (2010). Environmental and biological monitoring of exposures to PAHs and ETS in the general population. Environ Int. **36**(7): 763-771.

Araujo, R., Dyer, R.S., Fortmann, R.C., Fulk, F.A., Hauchmann, F.S., Heggem, D.T., *et al.* (2009). A Conceptual Framework for U.S. EPA's National Exposure Research Laboratory. USEPA. Washington, DC, USEPA. **EPA/600/R-09/003 (NTIS PB2010-103951)**.

Arenas-Huertero, F., Apátiga-Vega, E., Miguel-Pérez, G., Villeda-Cuevas, D. and Trillo-Tinoco, J. (2011). Chapter 4: Molecular Markers Associated with the Biological

Response to Aromatic Hydrocarbons from Urban Air in Humans Air Pollution - New Developments. InTech. Moldoveanu AM, InTech**:** 27.

ATSDR (1995). Toxicological Profile for Polycylcic Aromatic Hydrocarbons. A. f. T. S. a. D. Registry. Atlanta.

Aubier, M., Crestani, B., Fournier, M. and Mal, H., Eds. (2009). Traité de pneumologie. Paris.

Aylward, L.L., Hays, S.M., Smolders, R., Koch, H.M., Cocker, J., Jones, K., *et al.* (2014). Sources of variability in biomarker concentrations. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. **17**(1): 45-61.

Aylward, L.L., Kirman, C.R., Adgate, J.L., McKenzie, L.M. and Hays, S.M. (2012). Interpreting variability in population biomonitoring data: role of elimination kinetics. J Expo Sci Environ Epidemiol. **22**(4): 398-408.

Barbeau, D. (2013). Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène urinaire en tant qu'indicateur biologique de l'exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. Grenoble, Université Grenoble Alpes**:** 251.

Barbeau, D., Maitre, A. and Marques, M. (2011). Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. Analyst. **136**(6): 1183-1191.

Barbeau, D., Persoons, R., Marques, M., Herve, C., Laffitte-Rigaud, G. and Maitre, A. (2014). Relevance of Urinary 3-Hydroxybenzo(a)pyrene and 1-Hydroxypyrene to Assess Exposure to Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures in Metallurgy Workers. Ann Occup Hyg. **58**(5): 579-590.

Barr, D.B., Wang, R.Y. and Needham, L.L. (2005). Biologic monitoring of exposure to environmental chemicals throughout the life stages: requirements and issues for consideration for the National Children's Study. Environ Health Perspect. **113**(8): 1083-1091.

Bartell, S.M. (2012). Bias in half-life estimates using log concentration regression in the presence of background exposures, and potential solutions. J Expo Sci Environ Epidemiol. **22**(3): 299-303.

Bekki, K., Takigami, H., Suzuki, G.O., Toriba, A., Tang, N., Kameda, T., *et al.* (2012). Gene Expression Changes of Phases I and II Metabolizing Enzymes Induced by PAH Derivatives. Polycyclic Aromat Compd. **32**(2): 141-153.

Beland, F.A., Churchwell, M.I., Von Tungeln, L.S., Chen, S., Fu, P.P., Culp, S.J., *et al.* (2005). High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts. Chem Res Toxicol. **18**(8): 1306-1315.

Bentsen-Farmen, R.K., Botnen, I.V., Noto, H., Jacob, J. and Ovrebo, S. (1999). 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. **72**(3): 161-168.

Bieniek, G. (1997). Urinary naphthols as an indicator of exposure to naphthalene. Scand J Work Environ Health. **23**(6): 414-420.

Bin, P., Leng, S., Cheng, J., Dai, Y., Huang, C., Pan, Z., *et al.* (2008). Association of aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms and urinary 1-hydroxypyrene in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **17**(7): 1702-1708.

Boeniger, M.F., Lowry, L.K. and Rosenberg, J. (1993). Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. Am Ind Hyg Assoc J. **54**(10): 615-627.

Boogaard, P.J. (2008). Urinary biomarkers in the risk assessment of PAHs. Occup Environ Med. **65**(4): 221-222.

Bostrom, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernstrom, B., Johansson, C., Kyrklund, T., *et al.* (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. Environ Health Perspect. **110 Suppl 3**: 451-488.

Bosveld, A.T., de Bie, P.A., van den Brink, N.W., Jongepier, H. and Klomp, A.V. (2002). In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. Chemosphere. **49**(1): 75-83.

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

Bouchard, M., Normandin, L., Gagnon, F., Viau, C., Dumas, P., Gaudreau, E., *et al.* (2009). 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. **72**(23): 1534-1549.

Bouchard, M. and Viau, C. (1996). Urinary Excretion Kinetics of Pyrene and Benzo(a)pyrene Metabolites Following Intravenous Administration of the Parent Compounds or the Metabolites. Toxicology and Applied Pharmacology. **139**(2): 301-309.

Bouchard, M. and Viau, C. (1997). Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. **75**(3): 185-192.

Bowman, E.D., Rothman, N., Hackl, C., Santella, R.M. and Weston, A. (1997). Interindividual variation in the levels of certain urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites following medicinal exposure to coal tar ointment. Biomarkers. **2**(5): 321-327.

Boyland, E. and Sims, P. (1964). Metabolism of polycyclic compounds. 23. The metabolism of pyrene in rats and rabbits. Biochem J. **90**(2): 391-398.

Boysen, G. and Hecht, S.S. (2003). Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. Mutat Res. **543**(1): 17-30.

Bravo, R., Caltabiano, L.M., Fernandez, C., Smith, K.D., Gallegos, M., Whitehead, R.D., Jr., *et al.* (2005). Quantification of phenolic metabolites of environmental chemicals in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **820**(2): 229-236.

Brinkmann, J., Stolpmann, K., Trappe, S., Otter, T., Genkinger, D., Bock, U., *et al.* (2013). Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[a]pyrene. Toxicol Sci. **131**(2): 351-359.

Brown, K. (2012). Methods for the detection of DNA adducts. Genetic Toxicology: Principles and Methods: 207-230.

Burczynski, M.E., Palackal, N.T., Harvey, R.G. and Penning, T.M. (2000a). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Trans-Dihydrodiol Specificity of four Recombinant Human Dihydrodiol Dehydrogenase Isoforms. Polycyclic Aromat Compd. **16**(1-4): 205-214.

Burczynski, M.E. and Penning, T.M. (2000b). Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. Cancer Res. **60**(4): 908-915.

Burstyn, I., Kromhout, H., Kauppinen, T., Heikkila, P. and Boffetta, P. (2000). Statistical modelling of the determinants of historical exposure to bitumen and polycyclic aromatic hydrocarbons among paving workers. Ann Occup Hyg. **44**(1): 43-56.

Busbee, D.L., Norman, J.O. and Ziprin, R.L. (1990). Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. Arch Toxicol. **64**(4): 285-290.

Cadou, S. (2012). Produits chimiques cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction ED 976. Paris, INRS.

Campins-Falco, P., Herraez-Hernandez, R. and Sevillano-Cabeza, A. (1993). Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples. J Chromatogr. **619**(2): 177-190.

Campo, L., Fustinoni, S., Consonni, D., Pavanello, S., Kapka, L., Siwinska, E., *et al.* (2014). Urinary carcinogenic 4-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in coke oven workers and in subjects belonging to the general population: role of occupational and environmental exposure. Int J Hyg Environ Health. **217**(2-3): 231-238.

Campo, L., Rossella, F. and Fustinoni, S. (2008). 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. **875**(2): 531-540.

Cavalieri, E.L. and Rogan, E.G. (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. Pharmacol Ther. **55**(2): 183-199.

Cavallari, J.M., Osborn, L.V., Snawder, J.E., Kriech, A.J., Olsen, L.D., Herrick, R.F., *et al.* (2012). Predictors of dermal exposures to polycyclic aromatic compounds among hot-mix asphalt paving workers. Ann Occup Hyg. **56**(2): 125-137.

Cavet, M. and Léonard, M. (2013). Les expositions aux produits chimiques cancérogènes en 2010. Dares Analyses. **54**: 1-9.

Chaloupka, K., Santostefano, M., Goldfarb, I.S., Liu, G., Myers, M.J., Tsyrolv, I.B., *et al.* (1994). Aryl hydrocarbon (Ah) receptor-independent induction of Cyp1a2 gene expression by acenaphthylene and related compounds in B6C3F1 mice. Carcinogenesis. **15**(12): 2835-2840.

Chaloupka, K., Steinberg, M., Santostefano, M., Rodriguez, L.V., Goldstein, L. and Safe, S. (1995). Induction of Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice. Chem Biol Interact. **96**(3): 207-221.

Chaturapit, S. and Holder, G.M. (1978). Studies on the hepatic microsomal metabolism of (14C) phenanthrene. Biochem Pharmacol. **27**(14): 1865-1871.

Chetiyanukornkul, T., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N. and Hayakawa, K. (2006). Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Anal Bioanal Chem. **386**(3): 712-718.

Chu, I., Dick, D., Bronaugh, R. and Tryphonas, L. (1996). Skin reservoir formation and bioavailability of dermally administered chemicals in hairless guinea pigs. Food Chem Toxicol. **34**(3): 267-276.

Chu, I., Ng, K.M., Benoit, F.M. and Moir, D. (1992). Comparative metabolism of phenanthrene in the rat and guinea pig. J Environ Sci Health B. **27**(6): 729-749.

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

COFRAC (2015). SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale.

Council, N.R. (1987). Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. Environ Health Perspect. **74**: 3-9.

Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., *et al.* (2015). Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. Nat Commun. **6**: 8089.

Deme, P., Azmeera, T., Prabhavathi Devi, B.L., Jonnalagadda, P.R., Prasad, R.B. and Vijaya Sarathi, U.V. (2014). An improved dispersive solid-phase extraction clean-up method for the gas chromatography-negative chemical ionisation tandem mass spectrometric determination of multiclass pesticide residues in edible oils. Food Chem. **142**: 144-151.

Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M. and Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Science. **274**(5286): 430-432.

Duca, R.C., Salquebre, G., Hardy, E. and Appenzeller, B.M. (2014). Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **955-956**: 98-107.

Ebert, B., Seidel, A. and Lampen, A. (2005). Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. Carcinogenesis. **26**(10): 1754-1763.

Efron, B. and Morris, C.N. (1977). Stein's paradox in statistics. WH Freeman.

Egeghy, P.P., Quackenboss, J.J., Catlin, S. and Ryan, P.B. (2005). Determinants of temporal variability in NHEXAS-Maryland environmental concentrations, exposures, and biomarkers. J Expo Anal Environ Epidemiol. **15**(5): 388-397.

Ehrenhauser, F.S. (2015). PAH and IUPAC Nomenclature. Polycyclic Aromat Compd. **35**(2-4): 161-176.

Elovaara, E., Mikkola, J., Stockmann-Juvala, H., Luukkanen, L., Keski-Hynnila, H., Kostiainen, R., *et al.* (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolizing enzyme activities in human lung, and their inducibility by exposure to naphthalene, phenanthrene, pyrene, chrysene, and benzo(a)pyrene as shown in the rat lung and liver. Arch Toxicol. **81**(3): 169-182.

Elovaara, E., Vaananen, V. and Mikkola, J. (2003). 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. **77**(4): 183-193.

Falco, G., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Teixido, A., Casas, C. and Muller, L. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. J Food Prot. **66**(12): 2325-2331.

Ferreira Junior, M.F., Tas, S., dell'Omo, M., Goormans, G., Buchet, J.P. and Lauwerys, R. (1994). Determinants of benzo(a)pyrenediol epoxide adducts to haemoglobin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Occup Environ Med. **51**(7): 451-455.

Forster, K., Preuss, R., Rossbach, B., Bruning, T., Angerer, J. and Simon, P. (2008). 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. Occup Environ Med. **65**(4): 224-229.

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

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

Gelboin, H.V. (1980). Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. Physiol Rev. **60**(4): 1107-1166.

Gelhaus, S.L., Gilad, O., Hwang, W.T., Penning, T.M. and Blair, I.A. (2012). Multidrug resistance protein (MRP) 4 attenuates benzo[a]pyrene-mediated DNA-adduct formation in human bronchoalveolar H358 cells. Toxicol Lett. **209**(1): 58-66.

Gendre, C., Lafontaine, M., Delsaut, P. and Simon, P. (2004). Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Excretion of Urinary 3-Hydroxybenzo[a]pyrene: Assessment of an Appropriate Sampling Time. Polycyclic Aromat Compd. **24**(4-5): 433-439.

Genies, C., Jullien, A., Lefebvre, E., Revol, M., Maitre, A. and Douki, T. (2016). Inhibition of the formation of benzo[a]pyrene adducts to DNA in A549 lung cells exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicol In Vitro. **35**: 1-10.

Genter, M.B., Marlowe, J., Kevin Kerzee, J., Dragin, N., Puga, A., Dalton, T.P., *et al.* (2006). Naphthalene toxicity in mice and aryl hydrocarbon receptor-mediated CYPs. Biochem Biophys Res Commun. **348**(1): 120-123.

Gerde, P., Muggenburg, B.A. and Henderson, R.F. (1993a). Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. III. Mechanisms of the dosimetry. Toxicol Appl Pharmacol. **121**(2): 328-334.

Gerde, P., Muggenburg, B.A., Hoover, M.D. and Henderson, R.F. (1993b). Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. I. The alveolar region. Toxicol Appl Pharmacol. **121**(2): 313-318.

Gerde, P., Muggenburg, B.A., Lundborg, M. and Dahl, A.R. (2001). The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. Carcinogenesis. **22**(5): 741-749.

Gerde, P., Muggenburg, B.A., Sabourin, P.J., Harkema, J.R., Hotckiss, J.A., Hoover, M.D., *et al.* (1993c). Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. II. The conducting airways. Toxicol Appl Pharmacol. **121**(2): 319-327.

Gmeiner, G., Krassnig, C., Schmid, E. and Tausch, H. (1998). Fast screening method for the profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine using derivatisation--solid-phase microextraction. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. **705**(1): 132-138.

Goldberger, B.A., Loewenthal, B., Darwin, W.D. and Cone, E.J. (1995). Intrasubject variation of creatinine and specific gravity measurements in consecutive urine specimens of heroin users. Clin Chem. **41**(1): 116-117.

Goldman, R., Day, B.W., Carver, T.A., Mauthe, R.J., Turteltaub, K.W. and Shields, P.G. (2000). Quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts by postlabeling with 14C-acetic anhydride and accelerator mass spectrometry. Chem Biol Interact. **126**(3): 171-183.

Grova, N., Feidt, C., Laurent, C. and Rychen, G. (2002). [14C] Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [14C]polycyclic aromatic hydrocarbons. Int Dairy J. **12**(12): 1025-1031.

Grova, N., Salquebre, G. and Appenzeller, B.M. (2013). Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 52 monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in hairs of rats after controlled exposure. Anal Bioanal Chem. **405**(27): 8897-8911.

Grova, N., Salquebre, G., Hardy, E.M., Schroeder, H. and Appenzeller, B.M. (2014). Tetrahydroxylated-benzo[a]pyrene isomer analysis after hydrolysis of DNA-adducts isolated from rat and human white blood cells. J Chromatogr A. **1364**: 183-191.

Grova, N., Salquebre, G., Schroeder, H. and Appenzeller, B.M. (2011). Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. Chem Res Toxicol. **24**(10): 1653-1667.

Gu, A., Ji, G., Jiang, T., Lu, A., You, Y., Liu, N., *et al.* (2012). Contributions of aryl hydrocarbon receptor genetic variants to the risk of glioma and PAH-DNA adducts. Toxicol Sci. **128**(2): 357-364.

Guignon, N. and Sandret, N. (2005). SUMER 2003 : Les expositions aux produits cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques. Documents pour le médecin du travail. **104**: 471-483.

Guney, M., Chapuis, R.P. and Zagury, G.J. (2016). Lung bioaccessibility of contaminants in particulate matter of geological origin. Environ Sci Pollut Res Int.

Gurbani, D., Bharti, S.K., Kumar, A., Pandey, A.K., Ana, G.R., Verma, A., *et al.* (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human alveolar and bronchiolar cells. Int J Hyg Environ Health. **216**(5): 553-565.

Han, X., Zhou, N., Cui, Z., Ma, M., Li, L., Cai, M., *et al.* (2011). Association between urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and sperm DNA damage: a population study in Chongqing, China. Environ Health Perspect. **119**(5): 652-657.

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

Hays, S.M., Becker, R.A., Leung, H.W., Aylward, L.L. and Pyatt, D.W. (2007). Biomonitoring equivalents: a screening approach for interpreting biomonitoring results from a public health risk perspective. Regul Toxicol Pharmacol. **47**(1): 96-109.

Health Canada (2015). Third report on human biomonitoring of environmental chemicals in Canada. 88.

Heavner, D.L., Morgan, W.T., Sears, S.B., Richardson, J.D., Byrd, G.D. and Ogden, M.W. (2006). Effect of creatinine and specific gravity normalization techniques on xenobiotic biomarkers in smokers' spot and 24-h urines. J Pharm Biomed Anal. **40**(4): 928-942.

Hecht, S.S., Berg, J.Z. and Hochalter, J.B. (2009). Preferential glutathione conjugation of a reverse diol epoxide compared to a bay region diol epoxide of phenanthrene in human hepatocytes: relevance to molecular epidemiology studies of glutathione-s-transferase polymorphisms and cancer. Chem Res Toxicol. **22**(3): 426-432.

Hecht, S.S., Carmella, S.G., Villalta, P.W. and Hochalter, J.B. (2010). 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. **23**(5): 900-908.

Hecht, S.S., Carmella, S.G., Yoder, A., Chen, M., Li, Z.Z., Le, C., *et al.* (2006). Comparison of polymorphisms in genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism with urinary phenanthrene metabolite ratios in smokers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **15**(10): 1805-1811.

Hecht, S.S., Chen, M., Yoder, A., Jensen, J., Hatsukami, D., Le, C., *et al.* (2005). Longitudinal study of urinary phenanthrene metabolite ratios: effect of smoking on the diol epoxide pathway. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **14**(12): 2969-2974.

Hecht, S.S. and Hochalter, J.B. (2014). Quantitation of enantiomers of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]-pyrene in human urine: evidence supporting metabolic activation of benzo[a]pyrene via the bay region diol epoxide. Mutagenesis. **29**(5): 351-356.

Hecht, S.S., Villalta, P.W. and Hochalter, J.B. (2008). Analysis of phenanthrene diol epoxide mercapturic acid detoxification products in human urine: relevance to molecular epidemiology studies of glutathione S-transferase polymorphisms. Carcinogenesis. **29**(5): 937-943.

Hernando, M.D., Aguera, A., Fernandez-Alba, A.R., Piedra, L. and Contreras, M. (2001a). Gas chromatographic determination of pesticides in vegetable samples by sequential positive and negative chemical ionization and tandem mass spectrometric fragmentation using an ion trap analyser. Analyst. **126**(1): 46-51.

Hernando, M.D., Piedra, L., Belmonte, A., Aguera, A. and Fernandez-Alba, A.R. (2001b). Determination of traces of five antifouling agents in water by gas chromatography with positive/negative chemical ionisation and tandem mass spectrometric detection. J Chromatogr A. **938**(1-2): 103-111.

Hessel, S., Lampen, A. and Seidel, A. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food--efflux of the conjugated biomarker 1-hydroxypyrene is mediated by Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in human intestinal Caco-2 cells. Food Chem Toxicol. **62**: 797-804.

Ho, W.L., Lin, T.C., Liu, Y.Y. and Chen, J.A. (2010). Analysis of smoke PAHs from selected Taiwanese cigarettes by using molecular imprinting polymers. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. **45**(2): 211-223.

Hochalter, J.B., Zhong, Y., Han, S., Carmella, S.G. and Hecht, S.S. (2011). 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. **24**(2): 262-268.

Horak, S., Polanska, J. and Widlak, P. (2003a). Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. Mutat Res. **537**(1): 53-65.

Horak, S., Polanska, J. and Widlak, P. (2003b). High levels of bulky DNA adducts in human sperm correlate with impaired fertility. Acta Biochim Pol. **50**(1): 197-203.

Hrycay, E.G. and Bandiera, S.M. (2012). The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. Arch Biochem Biophys. **522**(2): 71-89.

Hsu, P.C., Chen, I.Y., Pan, C.H., Wu, K.Y., Pan, M.H., Chen, J.R., *et al.* (2006). Sperm DNA damage correlates with polycyclic aromatic hydrocarbons biomarker in coke-oven workers. Int Arch Occup Environ Health. **79**(5): 349-356.

Hu, H., Liu, B., Yang, J., Lin, Z. and Gan, W. (2016). Sensitive determination of trace urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene using ionic liquids-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by chemical derivatization and high performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **1027**: 200-206.

Huang, M., Blair, I.A. and Penning, T.M. (2013). Identification of stable benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA adducts in human lung cells. Chem Res Toxicol. **26**(5): 685-692.

Hussain, M., Madl, P. and Khan, A. (2011). Lung deposition predicoins of airborne particles and the emergence of contemporary diseases Part-I. theHealth. **2**(2): 51-59.

IARC, (1983). IARC Monographs on the Evaluation of the Risk of Chemicals to Humans. Lyon.

IARC (2002). Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon.

IARC, (2010). Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon.

IARC, (2012). Chemical Agents and Related Occupations. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon.

IARC, (2014). Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon.

IARC, (2016). Outdoor Air Pollution. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon.

Ibanez, R., Agudo, A., Berenguer, A., Jakszyn, P., Tormo, M.J., Sanchez, M.J., *et al.* (2005). Dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Spanish population. J Food Prot. **68**(10): 2190-2195.

Ifegwu, O.C. and Anyakora, C. (2015). Chapter Six - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part I. Exposure. Adv Clin Chem. S. M. Gregory, Elsevier. **Volume 72:** 277-304.

Ifegwu, O.C. and Anyakora, C. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part II, Urine Markers. Adv Clin Chem. **75**: 159-183.

Ihunnah, C.A., Jiang, M. and Xie, W. (2011). Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. Biochim Biophys Acta. **1812**(8): 956-963.

Jacob, J., Grimmer, G., Raab, G. and Schmoldt, A. (1982). The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. Xenobiotica. **12**(1): 45-53.

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

Jakubowski, M. and Trzcinka-Ochocka, M. (2005). Biological monitoring of exposure: trends and key developments. J Occup Health. **47**(1): 22-48.

Jamin, E.L., Riu, A., Douki, T., Debrauwer, L., Cravedi, J.P., Zalko, D., *et al.* (2013). Combined genotoxic effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (B(a)P) and an heterocyclic amine (PhIP) in relation to colorectal carcinogenesis. PLoS One. **8**(3): e58591.

Jarvis, I.W., Dreij, K., Mattsson, A., Jernstrom, B. and Stenius, U. (2014). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. Toxicology. **321**: 27-39.

Jeng, H.A., Pan, C.H., Chao, M.R. and Lin, W.Y. (2015). Sperm DNA oxidative damage and DNA adducts. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. **794**: 75-82.

Jeng, H.A., Pan, C.H., Lin, W.Y., Wu, M.T., Taylor, S., Chang-Chien, G.P., *et al.* (2013). Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons from coke oven emissions and reproductive toxicity in nonsmoking workers. J Hazard Mater. **244-245**: 436-443.

Jones, N.J. (2012). 32 P-postlabelling for the Sensitive Detection of DNA Adducts. Genetic Toxicology: Principles and Methods: 183-206.

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

Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B., Leijdekkers, C.M., Bos, R.P. and Henderson, P.T. (1985). 1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. Int Arch Occup Environ Health. **57**(1): 47-55.

Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B., Scheepers, P.T., Bos, R.P., Henderson, P.T., Nijenhuis, E.H., *et al.* (1988). 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. Ann Occup Hyg. **32**(1): 35-43.

Joseph, R. and Schild, R. (2010). Biological Cosmology and the Origins of Life in the Universe. Journal of Cosmology. **5**: 1040-1090.

Kammer, R., Tinnerberg, H. and Eriksson, K. (2011). Evaluation of a tape-stripping technique for measuring dermal exposure to pyrene and benzo(a)pyrene. J Environ Monit. **13**(8): 2165-2171.

Kao, J. and Carver, M.P. (1990). Cutaneous metabolism of xenobiotics. Drug Metab Rev. **22**(4): 363-410.

Kapitulnik, J., Wislocki, P.G., Levin, W., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H. (1978). Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo(a)pyrene which indicate that (+/-)-trans-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. Cancer Res. **38**(2): 354-358.

Katsoyiannis, A., Sweetman, A.J. and Jones, K.C. (2011). 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. **45**(20): 8897-8906.

Keith, L.H. (2015). The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. Polycyclic Aromat Compd. **35**(2-4): 147-160.

Kilanowicz, A., Czerski, B. and Sapota, A. (1999). The disposition and metabolism of naphthalene in rats. Int J Occup Med Environ Health. **12**(3): 209-219.

Klotz, K., Schindler, B.K. and Angerer, J. (2011). 1,2-Dihydroxynaphthalene as biomarker for a naphthalene exposure in humans. Int J Hyg Environ Health. **214**(2): 110-114.

Krais, A.M., Speksnijder, E.N., Melis, J.P., Indra, R., Moserova, M., Godschalk, R.W., *et al.* (2016). The impact of p53 on DNA damage and metabolic activation of the environmental carcinogen benzo[a]pyrene: effects in Trp53(+/+), Trp53(+/-) and Trp53(-/-) mice. Arch Toxicol. **90**(4): 839-851.

Kwack, S.J., Kim, D.Y., Kim, Y.J., Roh, T.H., Choi, S.M., Lim, D.S., *et al.* (2014). Potential application of benzo(a)pyrene-associated adducts (globin or lipid) as blood biomarkers for target organ exposure and human risk assessment. J Toxicol Environ Health A. **77**(22-24): 1491-1501.

Lafontaine, M., Champmartin, C., Simon, P., Delsaut, P. and Funck-Brentano, C. (2006). 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers. Toxicol Lett. **162**(2–3): 181-185.

Lafontaine, M., Gendre, C., Delsaut, P. and Simon, P. (2004). Urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: An approach for determining a biological limit value. Polycyclic Aromat Compd. **24**(4-5): 441-450.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C. and Ramade, F. (1998). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier.

Lampen, A., Ebert, B., Stumkat, L., Jacob, J. and Seidel, A. (2004). Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC-transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human Caco-2 cells. Biochim Biophys Acta. **1681**(1): 38-46.

Launen, L., Pinto, L., Wiebe, C., Kiehlmann, E. and Moore, M. (1995). The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. Can J Microbiol. **41**(6): 477-488.

Laurent, C., Feidt, C., Grova, N., Mpassi, D., Lichtfouse, E., Laurent, F., *et al.* (2002). Portal absorption of 14C after ingestion of spiked milk with 14C-phenanthrene, 14C-benzo[a]pyrene or 14C-TCDD in growing pigs. Chemosphere. **48**(8): 843-848.

Lauwerys, R.R., Haufroid, V., Lauwerys, R., Hoet, P. and Lison, D. (2007). Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Elsevier Masson.

Lee, C.H., Ito, Y., Yanagiba, Y., Yamanoshita, O., Kim, H., Zhang, S.Y., *et al.* (2007). Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR. Toxicology. **238**(2-3): 147-156.

Lee, E., Park, H.K. and Kim, H.J. (1996). Adjustment of urinary mercury in health risk assessment of mercury. J Korean Med Sci. **11**(4): 319-325.

Lee, W., Shin, H.S., Hong, J.E., Pyo, H. and Kim, Y. (2003). Studies on the analysis of benzo (a) pyrene and its metabolites in biological samples by using high performance liquid chromatograpy/fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. Bull Korean Chem Soc. **24**(5): 559-565.

Leonard, J.D. and Hellou, J. (2001). Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, Salvelinus fontinalis, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. Environ Toxicol Chem. **20**(3): 618-623.

Leroyer, A., Jeandel, F., Maitre, A., Howsam, M., Deplanque, D., Mazzuca, M., *et al.* (2010). 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. Sci Total Environ. **408**(5): 1166-1173.

Levine, L. and Fahy, J.P. (1945). Evaluation of urinary lead determinations. Journal of industrial hygiene and toxicology. **27**(8): 217-223.

Li, Y.-Q., Li, X.-Y., Shindi, A.A.F., Zou, Z.-X., Liu, Q., Lin, L.-R., *et al.* (2012a). Synchronous Fluorescence Spectroscopy and Its Applications in Clinical Analysis and Food Safety Evaluation. Reviews in Fluorescence 2010. D. C. Geddes. New York, NY, Springer New York**:** 95-117.

Li, Z., Mulholland, J.A., Romanoff, L.C., Pittman, E.N., Trinidad, D.A., Lewin, M.D., *et al.* (2010a). Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring. J Environ Monit. **12**(5): 1110-1118.

Li, Z., Romanoff, L., Bartell, S., Pittman, E.N., Trinidad, D.A., McClean, M., *et al.* (2012b). Excretion profiles and half-lives of ten urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites after dietary exposure. Chem Res Toxicol. **25**(7): 1452-1461.

Li, Z., Romanoff, L.C., Lewin, M.D., Porter, E.N., Trinidad, D.A., Needham, L.L., *et al.* (2010b). Variability of urinary concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolite in general population and comparison of spot, first-morning, and 24-h void sampling. J Expo Sci Environ Epidemiol. **20**(6): 526-535.

Li, Z., Sandau, C.D., Romanoff, L.C., Caudill, S.P., Sjodin, A., Needham, L.L., *et al.* (2008). Concentration and profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population. Environ Res. **107**(3): 320-331.

Liaud, C., Dintzer, T., Tschamber, V., Trouve, G. and Le Calve, S. (2014). Particle-bound PAHs quantification using a 3-stages cascade impactor in French indoor environments. Environ Pollut. **195**: 64-72.

Libalova, H., Krckova, S., Uhlirova, K., Milcova, A., Schmuczerova, J., Ciganek, M., *et al.* (2014). Genotoxicity but not the AhR-mediated activity of PAHs is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. Toxicol Lett. **225**(3): 350-357.

Lin, B., Doan, L., Yagi, H., Jerina, D.M. and Whalen, D.L. (1998). Halide effects in the hydrolysis reactions of (+/-)-7beta, 8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo- [a]pyrene. Chem Res Toxicol. **11**(6): 630-638.

Lin, Y.S., Kupper, L.L. and Rappaport, S.M. (2005). Air samples versus biomarkers for epidemiology. Occup Environ Med. **62**(11): 750-760.

Long, É., Hofman, V., Ilie, M., Washetine, K., Lespinet, V., Bonnetaud, C., *et al.* (2013). Accréditation de l'activité de pathologie moléculaire selon la norme ISO 15189. Principales étapes à respecter et principaux écueils possibles. Annales de Pathologie. **33**(1): 12-23.

Loomis, D. and Kromhout, H. (2004). Exposure variability: concepts and applications in occupational epidemiology. Am J Ind Med. **45**(1): 113-122.

Lu, D., Harvey, R.G., Blair, I.A. and Penning, T.M. (2011). 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. **24**(11): 1905-1914.

Luch, A., Ed. (2004). The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. London, Imperial College Press.

Luckert, C., Ehlers, A., Buhrke, T., Seidel, A., Lampen, A. and Hessel, S. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. Toxicol Lett. **222**(2): 180-188.

Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M. and Neca, J.V. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. Mutat Res. **497**(1-2): 49-62.

Mahadevan, B., Marston, C.P., Luch, A., Dashwood, W.M., Brooks, E., Pereira, C., *et al.* (2007). Competitive inhibition of carcinogen-activating CYP1A1 and CYP1B1 enzymes by a standardized complex mixture of PAH extracted from coal tar. Int J Cancer. **120**(6): 1161-1168.

Malaveille, C., Kuroki, T., Sims, P., Grover, P.L. and Bartsch, H. (1977). Mutagenicity of isomeric diol-epoxides of benzo[a]pyrene and benz[a]anthracene in S. typhimurium TA98 and TA100 and in V79 Chinese hamster cells. Mutat Res. **44**(3): 313-326.

Manini, P., De Palma, G. and Mutti, A. (2007). Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability. Toxicol Lett. **168**(3): 210-218.

Marie, C., Bouchard, M., Heredia-Ortiz, R., Viau, C. and Maître, A. (2010). A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. Journal of Applied Toxicology. **30**(5): 402-410.

Martorell, I., Perello, G., Marti-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M. and Domingo, J.L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. Environ Int. **36**(5): 424-432.

McCoull, K.D., Rindgen, D., Blair, I.A. and Penning, T.M. (1999). Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. Chem Res Toxicol. **12**(3): 237-246.

Meeker, J.D., Barr, D.B., Serdar, B., Rappaport, S.M. and Hauser, R. (2007). Utility of urinary 1-naphthol and 2-naphthol levels to assess environmental carbaryl and naphthalene exposure in an epidemiology study. J Expo Sci Environ Epidemiol. **17**(4): 314-320.

Miselnicky, S.R., Lichtin, J.L., Sakr, A. and Bronaugh, R. (1988). The influence of solubility, protein binding, and percutaneous absorption on reservoir formation in skin. Journal of the Society of Cosmetic Chemists. **39**(3): 169-177.

Moir, D., Viau, A., Chu, I., Withey, J. and McMullen, E. (1998). Pharmacokinetics of benzo[a]pyrene in the rat. J Toxicol Environ Health A. **53**(7): 507-530.

Moody, R.P., Nadeau, B. and Chu, I. (1995). In vivo and in vitro dermal absorption of benzo[a]pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. J Dermatol Sci. **9**(1): 48-58.

Moorthy, B., Chu, C. and Carlin, D.J. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. Toxicol Sci. **145**(1): 5-15.

Moreau, M., Ayotte, P. and Bouchard, M. (2015). Kinetics of Diol and Hydroxybenzo[a]pyrene Metabolites in Relation to DNA Adduct Formation and Gene Expression in Rats. J Toxicol Environ Health A. **78**(12): 725-746.

Motorykin, O., Santiago-Delgado, L., Rohlman, D., Schrlau, J.E., Harper, B., Harris, S., *et al.* (2015). Metabolism and excretion rates of parent and hydroxy-PAHs in urine collected after consumption of traditionally smoked salmon for Native American volunteers. Sci Total Environ. **514**: 170-177.

Murahashi, T., Watanabe, T., Kanayama, M., Kubo, T. and Hirayama, T. (2007). Human Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Activity of 31 Non-substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Soil Contaminants. Journal of Health Science. **53**(6): 715-721.

Neal, M.S., Zhu, J. and Foster, W.G. (2008). Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. Reprod Toxicol. **25**(1): 100-106.

Nethery, E., Wheeler, A.J., Fisher, M., Sjodin, A., Li, Z., Romanoff, L.C., *et al.* (2012). Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons as a biomarker of exposure to PAHs in air: a pilot study among pregnant women. J Expo Sci Environ Epidemiol. **22**(1): 70-81.

Ng, K.M., Chu, I., Bronaugh, R.L., Franklin, C.A. and Somers, D.A. (1991). Percutaneous absorption/metabolism of phenanthrene in the hairless guinea pig: comparison of in vitro and in vivo results. Fundam Appl Toxicol. **16**(3): 517-524.

Ng, K.M., Chu, I., Bronaugh, R.L., Franklin, C.A. and Somers, D.A. (1992). 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. **115**(2): 216-223.

NHANES (2015). Fourth National Report onHumans Exposure to Environement Chemicals. CDC.

Nordqvist, M., Thakker, D.R., Vyas, K.P., Yagi, H., Levin, W., Ryan, D.E., *et al.* (1981). Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol epoxides by rat liver enzymes. Mol Pharmacol. **19**(1): 168-178.

Oliveira, M., Slezakova, K., Alves, M.J., Fernandes, A., Teixeira, J.P., Delerue-Matos, C., *et al.* (2016). Firefighters' exposure biomonitoring: Impact of firefighting activities on levels of urinary monohydroxyl metabolites. Int J Hyg Environ Health.

Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harb Perspect Biol. **2**(1): a001008.

Onyemauwa, F., Rappaport, S.M., Sobus, J.R., Gajdosova, D., Wu, R. and Waidyanatha, S. (2009). Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **877**(11-12): 1117-1125.

Ozbal, C.C., Skipper, P.L., Yu, M.C., London, S.J., Dasari, R.R. and Tannenbaum, S.R. (2000). Quantification of (7S,8R)-dihydroxy-(9R,10S)-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene adducts in human serum albumin by laser-induced fluorescence: implications for the in vivo metabolism of benzo[a]pyrene. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **9**(7): 733-739.

Park, J.H., Gopishetty, S., Szewczuk, L.M., Troxel, A.B., Harvey, R.G. and Penning, T.M. (2005). Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH o-quinones: involvement of reactive oxygen species and copper(II)/copper(I) redox cycling. Chem Res Toxicol. **18**(6): 1026-1037.

Pathiratne, A. and Hemachandra, C.K. (2010). Modulation of ethoxyresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase activities in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) by polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: implications in biomonitoring aquatic pollution. Ecotoxicology. **19**(6): 1012-1018.

Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid-phase microextraction. J Chromatogr Sci. **38**(7): 270-278.

Payan, J.P., Lafontaine, M., Simon, P., Marquet, F., Champmartin-Gendre, C., Beydon, D., *et al.* (2008). In vivo and in vitro percutaneous absorption of [14C]pyrene in Sprague Dawley male rats: skin reservoir effect and consequence on urinary 1-OH pyrene excretion. Arch Toxicol. **82**(10): 739-747.

Payan, J.P., Lafontaine, M., Simon, P., Marquet, F., Champmartin-Gendre, C., Beydon, D., *et al.* (2009). 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. Arch Toxicol. **83**(9): 873-883.

Peltonen, K. and Dipple, A. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. J Occup Environ Med. **37**(1): 52-58.

Penning, T.M. (2014). Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Chem Res Toxicol. **27**(11): 1901-1917.

Penning, T.M., Burczynski, M.E., Hung, C.F., McCoull, K.D., Palackal, N.T. and Tsuruda, L.S. (1999). Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. Chem Res Toxicol. **12**(1): 1-18.

Peretz, C., Goren, A., Smid, T. and Kromhout, H. (2002). Application of mixed-effects models for exposure assessment. Ann Occup Hyg. **46**(1): 69-77.

Pfohl-Leszkowicz, A., Guillemaut, G., Masfaraud, J.F., Rether, B. and Haguenoer, J.M. (1995). Détection des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux substances génotoxiques de l'environnement. Pollut Atmos. **36**(147): 51-55.

Pinheiro, J. and Bates, D. (2000). Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. New York, Springer-Verlag.

Pleil, J.D. and Sobus, J.R. (2013). Estimating lifetime risk from spot biomarker data and intraclass correlation coefficients (ICC). J Toxicol Environ Health A. **76**(12): 747-766.

Prata Vde, M., Emidio, E.S. and Dorea, H.S. (2012). New catalytic ultrasound method for derivatization of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine, with analysis by GC-MS/MS. Anal Bioanal Chem. **403**(2): 625-632.

Pratt, M.M., John, K., MacLean, A.B., Afework, S., Phillips, D.H. and Poirier, M.C. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA adduct semi-quantitation in archived human tissues. Int J Environ Res Public Health. **8**(7): 2675-2691.

Preuss, R. and Angerer, J. (2004). Simultaneous determination of 1- and 2-naphthol in human urine using on-line clean-up column-switching liquid chromatography-fluorescence detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **801**(2): 307-316.

Preuss, R., Drexler, H., Bottcher, M., Wilhelm, M., Bruning, T. and Angerer, J. (2005). Current external and internal exposure to naphthalene of workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. Int Arch Occup Environ Health. **78**(5): 355-362.

Priego Capote, F. and Luque de Castro, M.D. (2007). Ultrasound in analytical chemistry. Anal Bioanal Chem. **387**(1): 249-257.

Pu, X., Lee, L.S., Galinsky, R.E. and Carlson, G.P. (2004). Evaluation of a rat model versus a physiologically based extraction test for assessing phenanthrene bioavailability from soils. Toxicol Sci. **79**(1): 10-17.

Pushparajah, D.S., Umachandran, M., Nazir, T., Plant, K.E., Plant, N., Lewis, D.F., *et al.* (2008). Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. Toxicol In Vitro. **22**(1): 128-145.

Ragin, A.D., Crawford, K.E., Etheredge, A.A., Grainger, J. and Patterson, D.G., Jr. (2008). 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. **32**(9): 728-736.

Ramesh, A., Inyang, F., Hood, D.B., Archibong, A.E., Knuckles, M.E. and Nyanda, A.M. (2001). Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. Exp Toxicol Pathol. **53**(4): 275-290.

Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D.B., Guillen, M.D., Schneider, K. and Weyand, E.H. (2004). Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. Int J Toxicol. **23**(5): 301-333.

Raulf-Heimsoth, M., Angerer, J., Pesch, B., Marczynski, B., Hahn, J.U., Spickenheuer, A., *et al.* (2008). Biological monitoring as a useful tool for the detection of a coal-tar contamination in bitumen-exposed workers. J Toxicol Environ Health A. **71**(11-12): 746-750.

Ravindra, K., Sokhi, R. and Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. Atmos Environ. **42**(13): 2895-2921.

Raychoudhury, S.S. and Kubinski, D. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytotoxicity in cultured rat Sertoli cells involves differential apoptotic response. Environ Health Perspect. **111**(1): 33-38.

Rehwagen, M., Muller, A., Massolo, L., Herbarth, O. and Ronco, A. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. Sci Total Environ. **348**(1-3): 199-210.

Reifenberg, J.-M., Riout, E. and Leroy, A. (2014). Métrologie dans un laboratoire de biologie médicale : enjeux et difficultés. Revue Francophone des Laboratoires. **2014**(461): 69-76.

Rodrigues, E.G., Smith, K., Maule, A.L., Sjodin, A., Li, Z., Romanoff, L., *et al.* (2014). Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon (OH-PAH) metabolite concentrations and the effect of GST polymorphisms among US Air Force personnel exposed to jet fuel. J Occup Environ Med. **56**(5): 465-471.

Rojas, M., Alexandrov, K., Auburtin, G., Wastiaux-Denamur, A., Mayer, L., Mahieu, B., *et al.* (1995). Anti-benzo[a]pyrene diolepoxide--DNA adduct levels in peripheral mononuclear cells from coke oven workers and the enhancing effect of smoking. Carcinogenesis. **16**(6): 1373-1376.

Rosner, B. (2011). Fundamentals of Biostatistics. Nelson Education.

Rubin, H. (2001). Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. Carcinogenesis. **22**(12): 1903-1930.

Ruby, M.V., Lowney, Y.W., Bunge, A.L., Roberts, S.M., Gomez-Eyles, J.L., Ghosh, U., *et al.* (2016). Oral Bioavailability, Bioaccessibility, and Dermal Absorption of PAHs from Soil-State of the Science. Environ Sci Technol. **50**(5): 2151-2164.

Ruzgyte, A., Bouchard, M. and Viau, C. (2005). Development of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal and human urine. J Anal Toxicol. **29**(6): 533-538.

Samaras, V.G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S. and Lekkas, T.D. (2011). An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. **399**(7): 2549-2561.

Sanchez-Soberon, F., van Drooge, B.L., Rovira, J., Grimalt, J.O., Nadal, M., Domingo, J.L., *et al.* (2016). Size-distribution of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and other organic source markers in the surroundings of a cement plant powered with alternative fuels. Sci Total Environ. **550**: 1057-1064.

Sanchez Avila, N., Priego Capote, F. and Luque de Castro, M.D. (2007). Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography-mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. J Chromatogr A. **1165**(1-2): 158-165.

Sarkar, M., Liu, J., Koval, T., Wang, J., Feng, S., Serafin, R., *et al.* (2010). Evaluation of biomarkers of exposure in adult cigarette smokers using Marlboro snus. Nicotine Tob Res. **12**(2): 105-116.

Sartorelli, P., Cenni, A., Matteucci, G., Montomoli, L., Novelli, M.T. and Palmi, S. (1999). Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from lubricating oil. Int Arch Occup Environ Health. **72**(8): 528-532.

Sauvé, J.F., Lévesque, M., Huard, M., Drolet, D., Lavoué, J., Tardif, R., *et al.* (2015). Creatinine and specific gravity normalization in biological monitoring of occupational exposures. J Occup Environ Hyg. **12**(2): 123-129.

Schinkel, A.H. and Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Adv Drug Deliv Rev. **55**(1): 3-29.

Schoots, A.C. and Leclercq, P.A. (1979). Chemical ionization mass spectrometry of trimethylsilylated carbohydrates and organic acids retained in uremic serum. Biomed Mass Spectrom. **6**(11): 502-507.

Seidel, A., Spickenheuer, A., Straif, K., Rihs, H.P., Marczynski, B., Scherenberg, M., *et al.* (2008). New biomarkers of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. J Toxicol Environ Health A. **71**(11-12): 734-745.

Sen, S., Bhojnagarwala, P., Francey, L., Lu, D., Penning, T.M. and Field, J. (2012). p53 Mutagenesis by benzo[a]pyrene derived radical cations. Chem Res Toxicol. **25**(10): 2117-2126.

Serdar, B., Lee, D. and Dou, Z. (2012). Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and DNA damage: a cross-sectional pilot study among roofers in South Florida. BMJ Open. **2**(4).

Serdar, B., Waidyanatha, S., Zheng, Y. and Rappaport, S.M. (2003). Simultaneous determination of urinary 1- and 2-naphthols, 3- and 9-phenanthrols, and 1-pyrenol in coke oven workers. Biomarkers. **8**(2): 93-109.

Serveau, M. (2013). Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France series sectorielles et analyses étendues-Format SECTEN. Rapport CITEPA 1057.

SFMT (2016). Recommandations de bonne pratique : Surveillance biologique des exposition professionnelles aux agents chimiques. Société Française de Médecine du Travail.

Shareef, A., Angove, M.J. and Wells, J.D. (2006). Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17alpha-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A. **1108**(1): 121-128.

Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., *et al.* (2013). Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. Environ Sci Technol. **47**(12): 6415-6424.

Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Drug Metab Pharmacokinet. **21**(4): 257-276.

Shimada, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. Cancer Sci. **95**(1): 1-6.

Shin, H.-S. and Lim, H.-H. (2011). Simultaneous determination of 2-naphthol and 1-hydroxy pyrene in urine by gas chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. **879**(7–8): 489-494.

Shou, M., Korzekwa, K.R., Krausz, K.W., Crespi, C.L., Gonzalez, F.J. and Gelboin, H.V. (1994). Regio- and stereo-selective metabolism of phenanthrene by twelve cDNA-expressed human, rodent, and rabbit cytochromes P-450. Cancer Lett. **83**(1-2): 305-313.

Simpson, C.D., Wu, M.T., Christiani, D.C., Santella, R.M., Carmella, S.G. and Hecht, S.S. (2000a). 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. **13**(4): 271-280.

Simpson, N.J. (2000b). Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications. CRC press.

Smith, K.W., Proctor, S.P., Ozonoff, A.L. and McClean, M.D. (2012). Urinary biomarkers of occupational jet fuel exposure among air force personnel. J Expos Sci Environ Epidemiol. **22**(1): 35-45.

Smolders, R., Schramm, K.W., Nickmilder, M. and Schoeters, G. (2009). Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. Environ Health. **8**: 8.

Sobus, J.R., McClean, M.D., Herrick, R.F., Waidyanatha, S., Nylander-French, L.A., Kupper, L.L., *et al.* (2009a). Comparing urinary biomarkers of airborne and dermal exposure to polycyclic aromatic compounds in asphalt-exposed workers. Ann Occup Hyg. **53**(6): 561-571.

Sobus, J.R., McClean, M.D., Herrick, R.F., Waidyanatha, S., Onyemauwa, F., Kupper, L.L., *et al.* (2009b). Investigation of PAH biomarkers in the urine of workers exposed to hot asphalt. Ann Occup Hyg. **53**(6): 551-560.

Sobus, J.R., Pleil, J.D., McClean, M.D., Herrick, R.F. and Rappaport, S.M. (2010). Biomarker variance component estimation for exposure surrogate selection and toxicokinetic inference. Toxicol Lett. **199**(3): 247-253.

Sobus, J.R., Tan, Y.M., Pleil, J.D. and Sheldon, L.S. (2011). A biomonitoring framework to support exposure and risk assessments. Sci Total Environ. **409**(22): 4875-4884.

Sobus, J.R., Waidyanatha, S., McClean, M.D., Herrick, R.F., Smith, T.J., Garshick, E., *et al.* (2009c). Urinary naphthalene and phenanthrene as biomarkers of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Occup Environ Med. **66**(2): 99-104.

Solbakken, J.E., Palmork, K.H., Neppelberg, T. and Scheline, R.R. (1980). Urinary and biliary metabolites of phenanthrene in the coalfish (Pollachius virens). Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). **46**(2): 127-132.

Spaan, S., Fransman, W., Warren, N., Cotton, R., Cocker, J. and Tielemans, E. (2010). Variability of biomarkers in volunteer studies: The biological component. Toxicol Lett. **198**(2): 144-151.

Spink, D.C., Wu, S.J., Spink, B.C., Hussain, M.M., Vakharia, D.D., Pentecost, B.T., *et al.* (2008). Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. Toxicol Appl Pharmacol. **226**(3): 213-224.

Srivastava, S.K., Watkins, S.C., Schuetz, E. and Singh, S.V. (2002). Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. Mol Carcinog. **33**(3): 156-162.

St Helen, G., Goniewicz, M.L., Dempsey, D., Wilson, M., Jacob, P., 3rd and Benowitz, N.L. (2012). Exposure and kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cigarette smokers. Chem Res Toxicol. **25**(4): 952-964.

Supelco (2009). Extraction and Analysis of PAHs in Olive Oil Using SupelMIP™ SPE – PAHs and GC-MS. Bellefonte, USA.

Symanski, E., Bergamaschi, E. and Mutti, A. (2001). Inter- and intra-individual sources of variation in levels of urinary styrene metabolites. Int Arch Occup Environ Health. **74**(5): 336-344.

Symanski, E. and Greeson, N.M. (2002). Assessment of variability in biomonitoring data using a large database of biological measures of exposure. AIHA J (Fairfax, Va). **63**(4): 390-401.

Symanski, E., Greeson, N.M. and Chan, W. (2007). Evaluating measurement error in estimates of worker exposure assessed in parallel by personal and biological monitoring. Am J Ind Med. **50**(2): 112-121.

Talaska, G., Thoroman, J., Schuman, B. and Kafferlein, H.U. (2014). Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in European coke oven workers. Toxicol Lett. **231**(2): 213-216.

Tappe, A., Rho, J. and Reach, W.T. (2006). Shock Processing of Interstellar Dust and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Supernova Remnant N132D. Astrophys J. **653**(1): 267.

Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Marie, C., Ravanat, J.L., *et al.* (2009). 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. **671**(1-2): 67-75.

Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Rajhi, A. and Douki, T. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. Toxicology. **279**(1-3): 36-44.

The European Group on Ethics in Science and New Technologies (2003). Opinion of the European Group on Ethics in Science and New Technologies to the European Commission: Ethical Aspects of Genetic Testing in the Workplace.

Thurman, E.M. (1998). Solid-phase extraction: principles and practice. Chemical analysis; 147.

Toriba, A., Nakamura, H., Chetiyanukornkul, T., Kizu, R., Makino, T., Nakazawa, H., *et al.* (2003). Method for determining monohydroxybenzo[a]pyrene isomers using column-switching high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. **312**(1): 14-22.

Truchon, G., Huard, M., Lévesque, M., Sauvé, J.-F., Larivière, P. and Tardif, R. (2014). Surveillance biologique de l'exposition professionnelle - Quel mode de correction urinaire choisir lors de prélèvements ponctuels ? Montréal, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en Sécurité du travail (IRSST).

Tsay, J.J., Tchou-Wong, K.M., Greenberg, A.K., Pass, H. and Rom, W.N. (2013). Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. Anticancer Res. **33**(4): 1247-1256.

UNECE (1998). The 1998 Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants (POPs), Original text of the protocol. 49.

Unwin, J., Cocker, J., Scobbie, E. and Chambers, H. (2006). An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. Ann Occup Hyg. **50**(4): 395-403.

Upadhyaya, P., Hochalter, J.B., Balbo, S., McIntee, E.J. and Hecht, S.S. (2010). 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. **38**(9): 1397-1402.

Vaananen, V., Hameila, M., Kalliokoski, P., Nykyri, E. and Heikkila, P. (2005). Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among road pavers. Ann Occup Hyg. **49**(2): 167-178.

Van de Wiele, T.R., Peru, K.M., Verstraete, W., Siciliano, S.D. and Headley, J.V. (2004). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, formed in a simulator of the human gastrointestinal tract. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **806**(2): 245-253.

van Haarst, E.P., Heldeweg, E.A., Newling, D.W. and Schlatmann, T.J. (2004). The 24-h frequency-volume chart in adults reporting no voiding complaints: defining reference values and analysing variables. BJU Int. **93**(9): 1257-1261.

van Schooten, F.J., Moonen, E.J., van der Wal, L., Levels, P. and Kleinjans, J.C. (1997). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces, and urine of rats orally exposed to PAH contaminated soils. Arch Environ Contam Toxicol. **33**(3): 317-322.

VanRooij, J.G., Bodelier-Bade, M.M. and Jongeneelen, F.J. (1993a). Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. Br J Ind Med. **50**(7): 623-632.

VanRooij, J.G.M., De Roos, J.H.C., Bodelier-Bade, M.M. and Jongeneelen, F.J. (1993b). Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons through human skin: Differences between anatomical sites and individuals. J Toxicol Environ Health. **38**(4): 355-368.

Vasiluk, L., Pinto, L.J., Tsang, W.S., Gobas, F.A., Eickhoff, C. and Moore, M.M. (2008). The uptake and metabolism of benzo[a]pyrene from a sample food substrate in an in vitro model of digestion. Food Chem Toxicol. **46**(2): 610-618.

Viau, C. (2002a). Biological monitoring of exposure to mixtures. Toxicol Lett. **134**(1-3): 9-16.

Viau, C., Diakite, A., Ruzgyte, A., Tuchweber, B., Blais, C., Bouchard, M., *et al.* (2002b). Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary polycyclic aromatic hydrocarbon under normal conditions? J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **778**(1-2): 165-177.

Viau, C., Lafontaine, M. and Payan, J.P. (2004). Creatinine normalization in biological monitoring revisited: the case of 1-hydroxypyrene. Int Arch Occup Environ Health. **77**(3): 177-185.

Viau, C. and Vyskocil, A. (1995). Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. Sci Total Environ. **163**(1-3): 187-190.

Vij, H.S. and Howell, S. (1998). Improving the specific gravity adjustment method for assessing urinary concentrations of toxic substances. Am Ind Hyg Assoc J. **59**(6): 375-380.

Wang, J.J., Frazer, D.G., Law, B. and Lewis, D.M. (2003a). 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. **128**(7): 864-870.

Wang, J.J., Frazer, D.G., Stone, S., Goldsmith, T., Law, B., Moseley, A., *et al.* (2003b). 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. **75**(21): 5953-5960.

Weaver, V.M., Kotchmar, D.J., Fadrowski, J.J. and Silbergeld, E.K. (2016). Challenges for environmental epidemiology research: are biomarker concentrations altered by kidney function or urine concentration adjustment? J Expo Sci Environ Epidemiol. **26**(1): 1-8.

Weston, A. and Bowman, E.D. (1991). Fluorescence detection of benzo[a]pyrene--DNA adducts in human lung. Carcinogenesis. **12**(8): 1445-1449.

WHO (1996). Biological monitoring of chemical exposure in the workplace : guidelines. Geneva, Switzerland, World Health Organization.

Wikistat (2016). "Modèle à effets aléatoires et modèle mixte." from http://wikistat.fr/pdf/st-m-modmixt6-modmixt.pdf.

Wohak, L.E., Krais, A.M., Kucab, J.E., Stertmann, J., Ovrebo, S., Seidel, A., *et al.* (2016). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP1A1 in human cells via a p53-dependent mechanism. Arch Toxicol. **90**(2): 291-304.

Wu, M.T., Simpson, C.D., Christiani, D.C. and Hecht, S.S. (2002). Relationship of exposure to coke-oven emissions and urinary metabolites of benzo(a)pyrene and pyrene in coke-oven workers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **11**(3): 311-314.

Xia, Y., Han, Y., Zhu, P., Wang, S., Gu, A., Wang, L., *et al.* (2009a). Relation between urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and human semen quality. Environ Sci Technol. **43**(12): 4567-4573.

Xia, Y., Zhu, P., Han, Y., Lu, C., Wang, S., Gu, A., *et al.* (2009b). Urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to idiopathic male infertility. Hum Reprod. **24**(5): 1067-1074.

Xu, C., Li, C.Y. and Kong, A.N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. Arch Pharm Res. **28**(3): 249-268.

Xu, S., Weerachayaphorn, J., Cai, S.Y., Soroka, C.J. and Boyer, J.L. (2010). Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **299**(1): G126-135.

Xue, W. and Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. Toxicology and Applied Pharmacology. **206**(1): 73-93.

Yang, M., Koga, M., Katoh, T. and Kawamoto, T. (1999). A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. Arch Environ Contam Toxicol. **36**(1): 99-108.

Yang, P., Ma, J., Zhang, B., Duan, H., He, Z., Zeng, J., *et al.* (2012). CpG site-specific hypermethylation of p16INK4alpha in peripheral blood lymphocytes of PAH-exposed workers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **21**(1): 182-190.

Yi, L.X., Fang, R. and Chen, G.H. (2013). Molecularly imprinted solid-phase extraction in the analysis of agrochemicals. J Chromatogr Sci. **51**(7): 608-618.

Zhang, L., Jin, Y., Huang, M. and Penning, T.M. (2012). 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. **3**: 193.

Zhang, X., Hou, H., Xiong, W. and Hu, Q. (2015). Development of a method to detect three monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by liquid chromatographic tandem mass spectrometry. J Anal Methods Chem. **2015**: 514320.

Zhong, Y., Carmella, S.G., Hochalter, J.B., Balbo, S. and Hecht, S.S. (2011). 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. **24**(1): 73-80.

Résumé :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des mélanges complexes de polluants émis dans l'atmosphère sous forme gazeuse ou particulaire par des sources multiples. Ils sont ubiquitaires et leur potentiel cancérogène diffèrent en fonction des composés. Les biomarqueurs urinaires d'exposition sont couramment utilisés dans le cadre de la surveillance biologique de l'exposition (SBE) professionnelle aux HAP, notamment le 1-hydroxypyrène (1-OHP), métabolite du pyrène. L'utilisation de ce seul biomarqueur pour estimer l'exposition aux mélanges de HAP cancérogènes est aujourd'hui controversée. Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHBaP) urinaire a été récemment proposé en milieu professionnel car il est issu du benzo(a)pyrène (BaP), seul HAP classé cancérogène certain pour l'homme. Par contre, ce biomarqueur n'est pas assez sensible pour être utilisé pour de faibles expositions ce qui explique que les métabolites monohydroxylés des HAP gazeux soient classiquement dosés du fait de l'abondance de la phase gazeuse dans les mélanges. Ce travail avait pour objectif de développer et sélectionner un ensemble de biomarqueurs permettant une SBE pertinente et efficace de l'exposition aux HAP tant au niveau professionnel qu'environnemental. Dans un premier temps, les biomarqueurs d'exposition aux HAP classiquement utilisés pour des expositions élevées que sont le 1-OHP et le 3-OHBaP ont été étudiés. La variabilité des mélanges atmosphériques émis, notamment l'abondance relative de la phase gazeuse par rapport à la phase particulaire font que le 1-OHP n'est pas spécifique de l'exposition aux HAP cancérogènes qui sont contenus dans la phase particulaire. En effet, les concentrations urinaires de 1-OHP dépendent des niveaux atmosphériques de pyrène, HAP non cancérogène émis sous forme gazeuse et particulaire. L'étude de la cinétique d'élimination urinaire du 3-OHBaP a permis de confirmer que le prélèvement d'urine dans le cadre de la SBE doit être réalisé en fin de poste plus 16h quand les expositions sont variables sur la semaine de travail de par la cinétique d'élimination urinaire atypique de ce composé. Ainsi, il est recommandé de l'effectuer en début de poste du dernier jour travaillé. L'étude des modes de correction de la diurèse a confirmé la nécessité de prendre en compte le degré de dilution des urines pour le 1-OHP et le 3-OHBaP et que la correction par la créatinine urinaire est un moyen adapté. Dans un deuxième temps, nous avons sélectionné des biomarqueurs pour les faibles expositions professionnelles parmi les différents métabolites monohydroxylés des HAP gazeux. Le 2-hydroxyfluorène et le 2-hydroxyphenanthrène sont ceux qui reflètent le mieux l'exposition professionnelle bien qu'ils ne soient pas représentatifs de l'exposition aux HAP cancérogènes contenus dans la phase particulaire. Enfin, nous avons développé une méthode de dosage urinaire du (±)trans-anti-BaP-tétraol (Tetraol-BaP) car ce métabolite, issu des voies de métabolisation toxique du BaP, est plus proche de l'effet toxique que le 3-OHBaP. La méthode de dosage est actuellement applicable en routine avec une limite de quantification de 0,02 ng/L. Les premières analyses du Tetraol-BaP sur des urines de sujets professionnellement exposés indiquent que ce biomarqueur est au moins aussi abondant que le 3-OHBaP et qu'il pourrait être un biomarqueur d'exposition intéressant pour estimer le risque cancérogène. Ce travail de thèse souligne que l'évaluation de l'exposition aux mélanges de HAP à partir d'un seul métabolite est difficilement interprétable du fait de la variabilité de la composition des mélanges émis et propose différents biomarqueurs pour caractériser l'exposition des populations aux mélanges de HAP.

Abstract:

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous carcinogenic pollutants emitted into the atmosphere in complex mixtures constituted of gaseous PAHs and particulate PAHs. Urinary exposure biomarkers are most commonly used in order to perform human biomonitoring (HB) to PAHs, especially the 1-hydroxypyrene (1-OHP) that is considered as the golden standard. However, its use to characterized mixture exposure is controversial. The 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) is recently used because it is a metabolite of the benzo(a)pyrene (BaP), the only PAH classified as carcinogenic to humans. Monohydroxylated metabolites of the most abundant gaseous PAHs are also used to perform HB. The aim of this thesis was to develop and select a set of exposure biomarkers that enables a relevant and effective HB for both environmental and occupational exposures. Firstly, the 1-OHP and the 3-OHBaP which are used as exposure biomarkers of carcinogenic PAHs (mainly contained in the particulate phase) were studied. The variability of the emitted atmospheric mixtures, especially the relative abundance between the gaseous and the particulate phases complicates the use of the 1-OHP to assess specific carcinogenic PAH exposure. Indeed, 1-OHP urinary concentrations depend on atmospheric pyrene concentrations (a non-carcinogenic PAH) which is present in both phases. The study of urinary elimination kinetic of the 3-OHBaP revealed atypical elimination kinetics (as in rats) and confirmed that sampling time should be done 16 hours after the end of the shift. Thus, sampling is recommended at pre-shift of the last day worked. The study of diuresis adjustment confirmed the need to take into account the urine's degree of dilution and that urinary creatinine adjustment is suitable to correct concentrations of the 1-OHP and the 3-OHBaP. HB in occupational sectors with low exposure can't be performed with 3-OHBaP due to its low urinary abundance. Secondly, monohydroxylated metabolites of gaseous PAHs were compared to select relevant biomarkers for low occupational exposure. Among the compared metabolites, the 2-hydroxyfluorene and the 2-hydroxyphenanthrene were proposed because they are those that best reflect occupational exposure. However, these two metabolites were not specific of carcinogenic PAH exposure in the particulate phase. Finally, an analytical method of the (±)trans-anti-BaP-tetraol (Tetraol-BaP) was developed for routine application (the limit of quantification was 0,02ng/L). The first urinary analysis indicated that the Tetraol-BaP is at least as abundant as the 3-OHBaP and that it could be a relevant biomarker to assess carcinogenic risk. Indeed, the Tetraol-BaP is a product of toxic metabolism pathways of the BaP, which allows it to be closer to the toxic effect than the 3-OHBaP. This thesis highlights the difficulty to use a single biomarker to assess PAH mixture exposure due to their important variability and suggests different biomarkers that would characterize mixture PAH exposure.