



**HAL**  
open science

Mise au point du dosage du 3-hydroxybenzo[a]pyrène  
urinaire et utilisation de ce métabolite comme  
biomarqueur d'exposition aux Hydrocarbures  
Aromatiques Polycycliques en population générale et  
professionnellement exposée

Damien Barbeau

► To cite this version:

Damien Barbeau. Mise au point du dosage du 3-hydroxybenzo[a]pyrène urinaire et utilisation de ce métabolite comme biomarqueur d'exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en population générale et professionnellement exposée. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00829751

**HAL Id: dumas-00829751**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00829751>**

Submitted on 5 Jun 2013

**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.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : [thesebum@ujf-grenoble.fr](mailto:thesebum@ujf-grenoble.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Mise au point du dosage du 3-hydroxybenzo[a]pyrène urinaire et utilisation de ce métabolite comme biomarqueur d'exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en population générale et professionnellement exposée**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
PHARMACIE SPECIALISEE

*Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de*

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

**Damien BARBEAU**

Né le 09 août 1982 à Auxerre

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE

Le : 27 octobre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

- Président du jury : M. le Pr Patrice Faure
- Directeur de thèse : Mme le Pr Anne Maitre
- M. le Pr Pierre Cuq
- M. le Pr Vincent Danel
- Mlle le Dr Mireille Bartoli
- M. le Dr Bruno Buclez

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*



UFR  
de PHARMACIE  
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE  
Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice-Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011  
Mise à jour : 07 avril 2011

### PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n=18)

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
<b>BOUMENDEL</b>	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M)
<b>BURMEISTER</b>	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
<b>CORNET</b>	Muriel	Parasitologie-Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU, PU-PH)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M)
<b>DROUET</b>	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (HP2, PU-PH)
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
<b>LENORMAND</b>	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX TIMC-IMAG)
<b>MOSSUZ</b>	Pascal	Hématologie (PU-PH)
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie analytique (D.P.M)
<b>SEVE</b>	Michel	Biochimie-Biotechnologie (IAB, PU-PH)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
<b>ROUSSEL</b>	Anne –Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
<b>WOUESSIDJEW</b>	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M)

### ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

<b>BUSSER</b>	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
<b>MONNERET</b>	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)



UFR  
de PHARMACIE  
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE  
Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice –Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011  
Mise à jour : 07 avril 2011

**MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n=34)**

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
<b>ALLENET</b>	Benoît	Pharmacie clinique (ThEMAS TIMC-IMAG, MCU-PH)
<b>BATANDIER</b>	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
<b>BRETON</b>	Jean	Biologie Moléculaire, Biochimie (L.C.I.B LAN)
<b>BRIANCON-MARJOLLET</b>	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>BUDAYOVA SPANO</b>	Monika	Biophysique (I.B.S)
<b>CAVAILLES</b>	Pierre	Biologie Cellulaire et Génétique (L.A.P.M)
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>DELETRAZ-DELPORTE</b>	Martine	Droit Pharmaceutique
<b>DEMEILLIERS</b>	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>GERMI</b>	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I, MCU-PH)
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie thérapeutique (D.P.M)
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie analytique (D.P.M)
<b>GUIEU</b>	Valérie	Chimie analytique (D.P.M)
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
<b>JOYEUX-FAURE</b>	Marie	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>KHALEF</b>	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Biologie végétale et Botanique (L.C.B.M)
<b>MOUHAMADOU</b>	Bello	Cryptogamie, Mycologie Médicale (L.E.C.A)
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>MELO DE LIMA</b>	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>PERES</b>	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>PEUCHMAUR</b>	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
<b>PINEL</b>	Claudine	Parasitologie-Mycologie Médicale (GIN, MCU-PH)
<b>RACHIDI</b>	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>SOUARD</b>	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>TARBOURIECH</b>	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie Organique (D.P.M)
<b>VILLET</b>	Annick	Chimie Analytique (VP Formation Adjoint UJF, D.P.M)



UFR  
de **PHARMACIE**  
de **GRENOBLE**



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE  
Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice –Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011  
Mise à jour : 07 avril 2011

#### ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

<b>COLLE</b>	Pierre Emmanuel	Maitre de conférence
<b>FITE</b>	Andrée	Professeur Certifié
<b>GOUBIER</b>	Laurence	Professeur Certifié

#### ATER (n=5)

<b>DEFENDI</b>	Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI TIMC)
<b>GRATIA</b>	Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
<b>REGENT</b>	Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
<b>ROSSI</b>	Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
<b>RUFFIN</b>	Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex TIMC)
<b>SAPIN</b>	Emilie	ATER	Physiologie-Pharmacologie

#### MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

<b>BOUCHET</b>	Audrey (01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN ESRF)
<b>DUCAROUGE</b>	Benjamin (01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>FAVIER</b>	Mathieu (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>GRAS</b>	Emmanuelle (01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>HAUDECOEUR</b>	Romain (01-10-2009 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
<b>LESART</b>	Anne Cécile (01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
<b>POULAIN</b>	Laureline (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

#### PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

<b>BELLET</b>	Béatrice	Pharmacie Clinique
<b>RIEU</b>	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché-CHU)
<b>TROUILLER</b>	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier-CHU)



UFR  
de PHARMACIE  
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE  
Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice –Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011  
Mise à jour : 07 avril 2011

**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie

**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire

**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

**IAB** : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

**IBS** : Institut de Biologie Structurale

**JR** : Jean Roget

**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

**LBFA** : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine

**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

**PAST** : Professeur Associé à Temps Partiel

**PRAG** : Professeur Agrégé

**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

**UVHCI**: Unit of Virus Host Cell Interactions

# REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont tout naturellement au professeur Anne MAITRE. Pour m'avoir accueilli en tant qu'interne de Pharmacie dans son unité médicale, m'avoir permis de m'inscrire en master 2 puis en thèse d'université et bien sûr, pour son encadrement dans ce travail et son soutien dans l'obtention de mon poste d'assistant. Je tiens à rappeler ici ses qualités humaines et sa compréhension des situations tant professionnelles que privées. En résumé, tout ce que j'ai pu réaliser et apprendre dans l'enceinte du CHU et de l'Université de Grenoble, c'est bien à vous, Anne, que je le dois.

J'exprime mes remerciements au professeur Patrice FAURE, pour avoir suivi mon cursus d'interne, de ses débuts à aujourd'hui, pour m'avoir soutenu à chaque fois que le besoin s'en est fait sentir et pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse.

Je remercie les autres membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail :

- Le professeur Vincent DANIEL, qui m'a fait confiance pour assurer certains cours de Toxicologie en faculté de Pharmacie,
- Le professeur Pierre CUQ, qui a accepté immédiatement de faire le déplacement de Montpellier, lui qui m'a transmis le virus de la Toxicologie il y a déjà plus de 4 ans,
- Le docteur Mireille BARTOLI, nos discussions les soirs de garde étaient toujours enrichissantes,
- Le docteur Bruno BUCLEZ, qui est présent aujourd'hui malgré ses multiples responsabilités.

J'adresse mes sincères remerciements au docteur Philippe Thoumelin, pour la qualité de notre collaboration, essentielle à ce travail.

Je tiens également à remercier l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), pour ses financements.

Un grand merci à toute l'équipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, notamment, à Pascale PALENZUELA pour ses qualités de super assistante de direction (j'en profite pour souhaiter la bienvenue à Aurore FONTAINE), à Franck BALDUCCI pour avoir rempli le vide qui me séparait de la science statistique et à Sylvette LIAUDY pour sa bonne humeur, la richesse de ses réflexions et son efficacité à dénicher la moindre information en un temps record.

C'est une profonde gratitude que je souhaite exprimer aux membres de l'unité médicale de Toxicologie Professionnelle et Environnementale du CHU de Grenoble :

- à Muriel STOKLOV, pour ses nombreux conseils et pour son sens aiguisé de la Toxicologie, de l'humour et de la vie en général,
- à Renaud PERSOONS, qui par sa gentillesse, son sérieux et la confiance qu'il me témoigne en font la personne idéale pour notre future collaboration professionnelle,
- à Aurélie AUGIER, pour avoir rattrapé mes nombreuses bourdes administratives, pour son travail indispensable et pour être très vite devenue bien plus qu'une amie de travail,
- à Sarah MONTLEVIER, pour son volontariat dans tous les domaines et son sourire,
- à Claire HERVE, pour l'énergie que je lui ai demandé, elle que j'ai vu passer de stagiaire à pilier de l'équipe (n'oublie jamais que qui aime bien, châtie bien),
- à Marie MARQUES, véritable clé de voute de ce travail, l'alter ego sans qui rien n'aurait aboutit. Je te suis sincèrement reconnaissant pour tes qualités scientifiques, ta curiosité, mais aussi et surtout, pour tout ce que nous avons partagé pendant ces années et que j'espère, nous partagerons encore.

Aux (anciennes) doctorantes de l'équipe, merci Caroline d'avoir si bien défriché le terrain accidenté des HAP et d'avoir été une collaboratrice hors pair, merci Adeline d'avoir bouleversé bien plus que mes journées de travail bibliographique à la fac et merci Laurie d'avoir, par ta joie de vivre, tes coups de gueules et nos fous rires, scellé l'amitié sincère qui nous rapproche aujourd'hui.

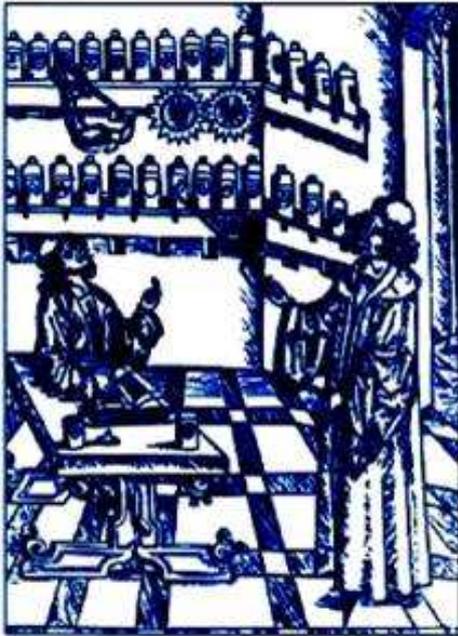
A mes co-internes, merci pour tous les moments de franches rigolades ! A l'incroyable équipe des débuts, Yannick, Julie, Xavier, Laetitia, Séverine et Biancuch (interne en quoi déjà ?) ; à l'impossible team de la nuit, Pierre, Antoine, Guillaume, Nico (j'ai enfin une limite !) ; aux exilés lyonnais : Marie, Julie, Paul ; et à tous les autres...

Merci vivement à mes amis de la contrée ensoleillée d'où je viens, Didier, Fab, Aurélien. Reprendre l'accent, lors de mes furtifs retours, m'a souvent permis de résister aux neiges qui m'entourent aujourd'hui !

A mes parents, vous qui m'avez toujours soutenu. Je suis plus que conscient que c'est en grande partie grâce à vous que cette thèse existe. Pour tout cela je veux vous témoigner ma reconnaissance et mon amour.

A mes frères et sœurs, pour les soutiens, les leçons de vie proférées au petit matin, les questions déconcertées quant à la teneur de mon travail et pour les innombrables fois où je me suis demandé à quoi sert-il d'avoir des potes quand on a une telle fratrie !

Enfin, je dédicace ce travail à mon fils Paul Barbeau. Tu as toujours été pour moi la source d'un amour immense, d'une énergie inépuisable et d'une certitude du chemin à accomplir. Ce « livre », comme tu dis, est autant le tien que le mien.



# Serment des Apothicaire



**Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>13</b>
1.1 LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES .....	14
1.1.1 Généralités .....	14
1.1.2 Toxicité .....	14
1.1.3 Modalités de l'exposition.....	17
1.2 DEVENIR DES HAP DANS L'ORGANISME .....	18
1.2.1 Absorption .....	18
1.2.2 Distribution.....	19
1.2.3 Métabolisation.....	20
1.2.4 Elimination .....	25
1.3 ACTIVATION METABOLIQUE ET CANCEROGENESE .....	26
1.3.1 Voie des diol-époxydes .....	26
1.3.2 Voie du radical cation .....	27
1.3.3 Voie de l'ortho-quinone.....	28
1.3.4 Autres mécanismes d'action .....	28
1.4 SURVEILLANCE DE L'EXPOSITION AUX HAP .....	29
1.4.1 Métrologie atmosphérique.....	30
1.4.2 Surveillance biologique .....	33
1.5 OBJECTIF DE L'ETUDE .....	36
<b>2. MISE AU POINT DU DOSAGE DU 3-HYDROXYBENZO(A)PYRENE URINAIRE .....</b>	<b>37</b>
2.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE .....	38
2.2 MATERIEL ET METHODE .....	39
2.2.1 Mise au point et validation analytique du dosage du 3OHBaP.....	39
2.2.2 Analyses urinaires .....	44
2.3 RESULTATS ET DISCUSSION .....	45
2.3.1 Optimisation de la méthode d'extraction.....	45
2.3.2 Conditions chromatographiques .....	46
2.3.3 Performances de la méthode .....	47
2.3.4 Analyses urinaires .....	49
<b>3. UTILISATION DU 3-HYDROXYBENZO(A)PYRENE DANS LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DE L'EXPOSITION AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DE POPULATIONS PROFESSIONNELLEMENT EXPOSEES.....</b>	<b>61</b>
3.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE .....	62
3.2 MATERIEL ET METHODE .....	64
3.2.1 Population de l'étude.....	64
3.2.2 Modalités de recueil des urines .....	64
3.2.3 Réalisation des dosages.....	65
3.2.4 Statistiques utilisés .....	65
3.3 RESULTATS .....	66
3.3.1 Concentrations urinaires de 3OHBaP.....	66
3.3.2 Concentrations urinaires de 1OHP .....	69
3.3.3 Influence du tabac sur les niveaux.....	71
3.3.4 Etude des ratios 1OHP/3OHBaP .....	71
3.3.5 Corrélations ente les niveaux de 3OHBaP et de 1OHP .....	73
3.4 DISCUSSION .....	75
<b>4. CONCLUSION .....</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>83</b>

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

**Tableau I.** Liste des 16 HAP inscrits sur la liste des polluants prioritaires de l'US-EPA. Les HAP dits particulaires (plus de 4 cycles) sont les plus préoccupants en termes de toxicité.

**Tableau II.** Concentration moyennes d'HAP en ng/m<sup>3</sup>, sur différents sites en Europe.

**Tableau III.** Paramètres de l'extraction en phase solide automatisée.

**Tableau IV.** Résumé des paramètres de l'analyse chromatographique.

**Tableau V.** Concentrations urinaires de 3OHBaP et de 1OHP chez des sujets fumeurs et non fumeurs. Méd, médiane ; min, minimum ; max, maximum ; m, moyenne ; ET, écart-type ; n, nombre d'échantillons ; (n < LD), nombre de dosages inférieurs à la LD.

**Tableau VI.** Concentrations urinaires de 3OHBaP chez des salariés exposés aux HAP dans les secteurs de la production du silicium et d'électrodes de carbone. Méd, médiane ; min, minimum ; max, maximum ; m, moyenne géométrique ; 95ème, 95ème percentile ; N, effectif ; n<LD, nombre de concentrations inférieures à la limite de détection.

**Tableau VII.** Concentrations urinaires de 1OHP chez des salariés exposés aux HAP dans les secteurs de la production du silicium et d'électrodes de carbone. méd, médiane ; min, minimum ; max, maximum ; m, moyenne géométrique ; 95ème, 95ème percentile ; N, effectif ; n<LD, nombre de concentrations inférieures à la limite de détection.

**Tableau VIII.** Ratios 1OHP/3OHBaP à différents temps de prélèvements dans le secteur du silicium et des électrodes de carbone. Méd, médiane ; min, minimum ; max, maximum.

**Figure 1.** Cartographie française des expositions professionnelles aux toxiques (milliers de salariés). Sont surlignées en jaune les sources responsables d'une exposition aux HAP.

**Figure 2.** Région de baie et de fjord de deux HAP.

**Figure 3.** Schéma du métabolisme du BaP. CYP, cytochrome P450 ; EH, époxyde hydrolase ; PS, prostaglandine synthase ; DD, dihydrodiol déshydrogénase ; QR, quinone réductase. En rouge, les composés réactifs issus de l'activation métabolique.

**Figure 4.** Structure chimique du 1-hydroxypyrene (1OHP), 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3OHBaP) et du 7,8-dihydrodiol-9,10-époxy-benzo(a)pyrène (BPDE).

**Figure 5.** Structure chimique du 9,10-dihydrodiol-7,8-époxyde-benzo(a)pyrène (reverse-BPDE) et du 1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-phénanthrène.

**Figure 6.** Phases composant la SPE.

**Figure 7.** Schéma du système chromatographique. P1, pompe 1 ; P2, pompe 2 ; C1, colonne 1 Supelcosil LC-18 (150 x 4,6mm, 5µm) ; C2, colonne 2 PAH-C18 (250mm x 3mm, 5µm), Waste, poubelle ; Detector, fluorimètre.

**Figure 8.** Chromatogrammes urinaires. A, sujet fumeur 3OHBaP = 0,2 ng/L ; B, sujet non fumeur 3OHBaP < LQ ; C, urine surchargée, 3OHBaP = 10 ng/L ; D, urine surchargée et dosage réalisé sans l'étape de SPE, 3OHBaP = 10 ng/L.

**Figure 9.** Boîtes à moustaches représentant les niveaux urinaires de 3OHBaP (nmol/mol). Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25ème percentile, la médiane, le 75ème percentile et le maximum lorsque les valeurs extérieures (●) et extrêmes (\*), qui sont respectivement supérieures à 1,5 et 3 fois l'espace interquartile, sont écartées.

**Figure 10.** Boîtes à moustaches représentant les niveaux urinaires de 1OHP (nmol/mol). Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25ème percentile, la médiane, le 75ème percentile et le maximum lorsque les valeurs extérieures (●) et extrêmes (\*), qui sont respectivement supérieures à 1,5 et 3 fois l'espace interquartile, sont écartées.

**Figure 11.** Boîtes à moustaches représentant les ratios 1OHP/3OHBaP. Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25ème percentile, la médiane, le 75ème percentile et le maximum lorsque les valeurs extérieures (●) et extrêmes (\*), qui sont respectivement supérieures à 1,5 et 3 fois l'espace interquartile, sont écartées.

**Figure 12.** Corrélation pour chaque secteur industriel des logarithmes népériens des concentrations de 3OHBaP en FSFP+16 et de 1OHP en FSFP. Les équations des droites de régression sont affichées en haut à gauche des graphiques, suivies des coefficients de détermination ( $R^2$ ).

**Figure 13.** Corrélation pour chaque secteur industriel des logarithmes népériens des concentrations de 3OHBaP et de 1OHP en FSFP. Les équations des droites de régression sont affichées en haut à gauche des graphiques, suivies des coefficients de détermination ( $R^2$ ).

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

**HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**BaP** : Benzo(a)pyrène

**CIRC** : Centre international de recherche sur le cancer

**US-EPA** : Agence américaine de protection de l'environnement

**CYP450** : Mono-oxygénase à cytochrome P 450

**GSH** : Glutathion

**GST** : Glutathion-S-transférase

**EH** : Epoxyde hydrolase

**Tétrols** : Tetrahydroxy-tetrahydro-HAP

**DD** : Dihydrodiol déshydrogénase

**o-quinone** : Ortho-quinone

**AhR** : Aryl hydrocarbon receptor

**Hsp90** : Heat shock protein 90

**AIP** : AhR interacting protein

**Arnt** : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

**1OHP** : 1-hydroxypyrene

**3OHBaP** : 3-hydroxybenzo(a)pyrène

**BPDE** : Benzo(a)pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde

**Reverse-BPDE** : Benzo(a)pyrène-9,10-dihydrodiol-7,8-époxyde

**GHE** : Groupes homogènes d'exposition

**HPLC-FLD** : Chromatographie liquide haute performance couplée à la détection par fluorescence

**CNAM** : Caisse nationale d'assurance maladie

**INRS** : Institut national de recherche et sécurité

**LD** : Limite de détection

**LC-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en mode tandem

**GC-MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

**GC-HRMS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse haute résolution

**UPLC-MS/MS** : Chromatographie liquide ultra performante couplée à un spectromètre de masse en mode tandem

**SPE** : Extraction en phase solide

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**SFSTP** : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

**LQ** : Limite de quantification

**nmol/mol** : Nanomoles par mole de créatinine urinaire

**méd** : Médiane

**min** : Minimum

**max** : Maximum

**m** : Moyenne

**ET** : Ecart-type

**n** : Nombre d'échantillons

**FSFP** : Fin de semaine fin de poste

**FSFP+16** : Fin de semaine fin de poste + 16 heures

**DSDP** : Début de semaine début de poste

**1OHP<sub>FSFP</sub>/3OHBaP<sub>FSFP+16</sub>** : Ratio des concentrations de 1OHP en FSFP sur les concentrations en 3OHBaP en FSFP+16

**1OHP<sub>FSFP</sub>/3OHBaP<sub>FSFP</sub>** : Ratio des concentrations de 1OHP en FSFP sur les concentrations de 3OHBaP en FSFP

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de détermination

# **1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques**

### **1.1.1 Généralités**

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des molécules constituées de carbone et d'hydrogène dont la structure comporte au moins 2 cycles aromatiques condensés. Ils forment une famille chimique comprenant plus de 100 individus. Ils sont issus de la combustion incomplète de la matière organique ou des procédés industriels de distillation de la houille et du pétrole. Leur origine est donc à la fois anthropique et naturelle. Leur production conduit toujours à l'émission de mélanges complexes dont la composition relative varie considérablement selon la source [33].

Dans l'atmosphère, les plus légers (jusqu'à 4 cycles) sont sous forme gazeuse et les plus lourds (à partir de 4 cycles) sont sous forme particulaire [32], adsorbés pour plus de la moitié d'entre eux sur des particules fines de diamètre inférieur à 0,5 µm [54]. Le pyrène et le fluoranthène, composés de 4 cycles, sont retrouvés à la fois sous forme gazeuse et sous forme particulaire.

### **1.1.2 Toxicité**

Parmi la grande famille des HAP, le benzo(a)pyrène (BaP) a été récemment classé cancérigène certain pour l'homme (groupe 1) par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), tandis que d'autres membres ont été classés comme cancérigènes probables (groupe 2A), possibles (groupe 2B), ou sont non classables quant à leur cancérigénicité pour l'Homme (groupe 3) [32].

Le CIRC a également classé cancérogènes certains pour l'homme, les expositions professionnelles aux HAP dans les secteurs de la gazéification du charbon, de la production de coke, de la distillation du goudron de houille, du ramonage et de la production d'aluminium. Les expositions lors de la fabrication d'électrodes de carbone et l'utilisation de créosote ont été classées cancérogènes probables (groupe 2A) [32].

Les cancers concernés sont ceux du poumon, de la peau et de la vessie. Le poumon reste la cible principale de l'effet cancérogène des HAP et l'augmentation de l'incidence de ce cancer est retrouvée dans tous les secteurs cités précédemment. L'estimation du risque d'apparition de cancers broncho-pulmonaires lors d'une exposition à 1 ng/m<sup>3</sup> de BaP, 40 heures par semaine, durant 40 ans varie de 1 à 5 sur 100 000 personnes. Les cas de cancers de la peau sont restreints aux expositions professionnelles impliquant un contact cutané avec les HAP important, tandis que l'apparition de cancers de la vessie, moins fréquente, semble liée à des expositions élevées provenant du goudron de houille (coal-tar), de la poix (pitch) ou de la gazéification du charbon et de la distillation du goudron [7].

A ce jour, les données épidémiologiques disponibles ne permettent pas de conclure quand à l'excès de risque d'apparition de cancer lors d'une exposition aux HAP à des niveaux environnementaux.

L'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) a inscrit 16 HAP sur la liste des polluants prioritaires dès 1976 de par leur prépondérance dans les mélanges (tableau I).

Composé	Groupe CIRC	Groupe UE	N° CAS	Formule brute	Structure chimique	Masse molaire (g/mol)
Naphtalène		3	91-20-3	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>		128
Acénaphtylène	3		208-96-8	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>		152
Acénaphtène	3		83-32-9	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>		154
Fluorène	3		86-73-7	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>		166
Phénanthrène	3		85-01-8	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>		178
Anthracène	3		120-12-7	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>		178
Fluoranthène	3		206-44-0	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>		202
Pyrène	3		129-00-0	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>		202
Benzo(a)anthracène	2B	2	56-55-3	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>		228
Chrysène	2B	2	218-01-9	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>		228
Benzo(b)fluoranthène	2B	2	205-99-2	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252
Benzo(k)fluoranthène	2B	2	207-08-9	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252
Benzo(a)pyrène	1	2	50-32-8	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	2B		193-39-5	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>		276
Benzo(ghi)pérylène	3		191-24-2	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>		276
Dibenzo(a,h)anthracène	2A	2	53-70-2	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>		278

Tableau I. Liste des 16 HAP inscrits sur la liste des polluants prioritaires de l'US-EPA. Les HAP dits particuliers (plus de 4 cycles) sont les plus préoccupants en termes de toxicité.

### **1.1.3 Modalités de l'exposition**

Les HAP sont des molécules ubiquitaires présentes dans les différents compartiments de l'environnement. La population générale est principalement exposée par voie alimentaire lors de la consommation de produits grillés, fumés ou frits. Une exposition aux HAP par voie respiratoire est également retrouvée lors de la consommation de tabac et dans une moindre mesure lorsque l'atmosphère est chargée en émissions de moteurs diesel, de chauffage au bois, d'industries, etc.

Les HAP sont également bien connus en toxicologie professionnelle. L'étude SUMER estime à 1 600 000 le nombre de salariés potentiellement exposés aux HAP en France [25]. Le plus grand nombre de travailleurs en contact avec ces molécules se retrouve dans les secteurs des émissions diesel et des huiles minérales, où les niveaux d'exposition sont peu élevés. En revanche, bien que représentant un effectif de sujets moins important, les sites industriels utilisant des goudrons de houilles ou produisant des fumées de métallurgie, comme les fonderies, la production de coke, la production d'aluminium et la fabrication d'électrodes de carbone ou de graphite, sont plus préoccupants en terme de niveaux d'exposition (figure 1) [30].

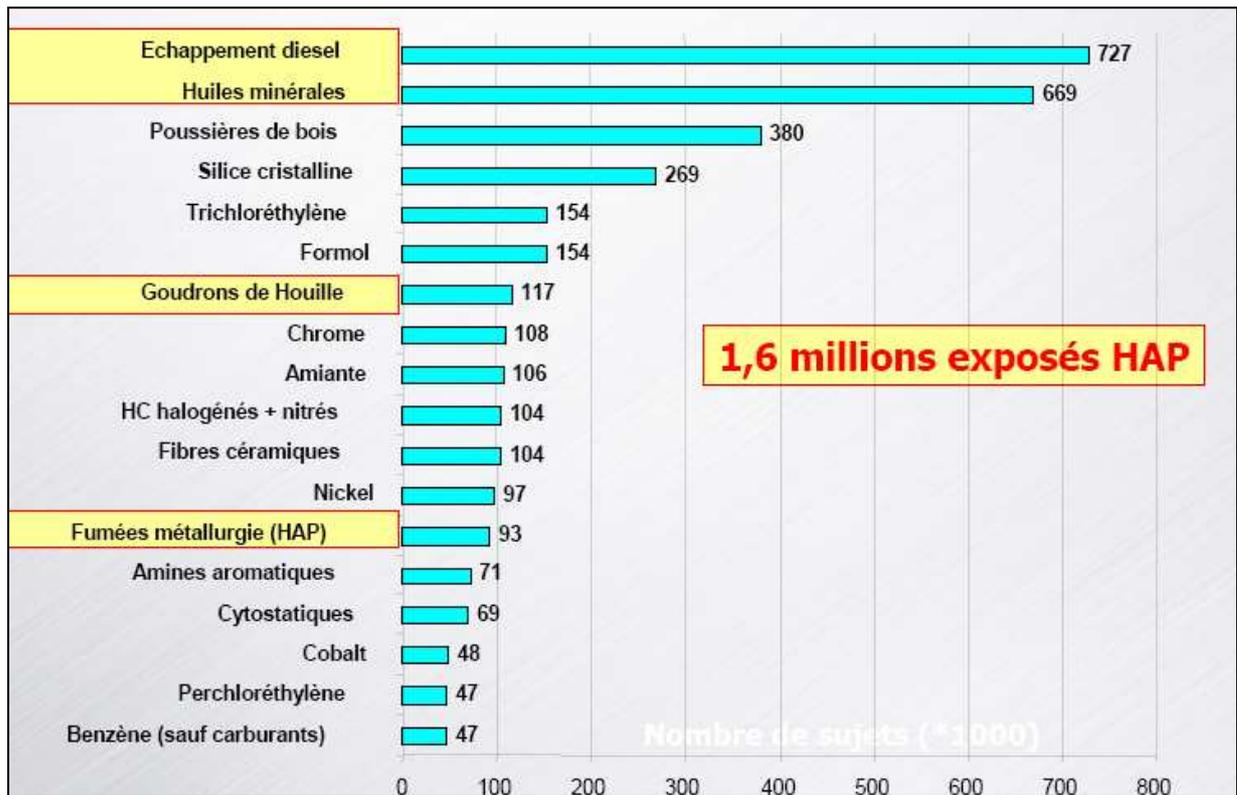


Figure 1. Cartographie française des expositions professionnelles aux toxiques (milliers de salariés). Sont surlignées en jaune les sources responsables d'une exposition aux HAP.

## 1.2 Devenir des HAP dans l'organisme

### 1.2.1 Absorption

Les HAP sont des molécules lipophiles, ce qui leur permet de pénétrer dans l'organisme en passant la barrière cutanée, digestive et pulmonaire par diffusion passive à travers les membranes cellulaires. Ceux dont le nombre de cycles est élevé, sont particulièrement hydrophobes donc rapidement dissous dans la bicouche lipidique constituant la membrane cellulaire. Néanmoins, ils diffuseront lentement à travers l'épithélium à cause des espaces inter-membranaires aqueux. Ce phénomène a pour conséquence une concentration en HAP plus élevée au niveau du site d'entrée que dans le compartiment sanguin et les tissus éloignés [23].

Dans le cas d'une exposition par voie respiratoire, les HAP comportant jusqu'à 4 cycles sont rapidement absorbés puisque déposés dans les poumons sous forme de vapeurs solubles. En revanche, pour les plus lourds, le diamètre aérodynamique de la particule atmosphérique sur laquelle ils sont adsorbés, sera déterminant. Les plus grosses particules sont déposées au niveau des voies aériennes supérieures où les HAP seront lentement absorbés, tandis que les plus fines peuvent pénétrer dans le poumon profond où les HAP traverseront en quelques minutes la paroi alvéolaire [3, 32].

L'absorption cutanée est importante à prendre en compte en environnement professionnel où elle est une voie majeure de pénétration des HAP dans l'organisme [64]. En effet, le contact avec les vêtements, les équipements de protection individuelle et le matériel de travail souillés, est important. Elle entre également en jeu lors de l'application d'onguents à base de goudrons de houille dans le traitement local du psoriasis.

### **1.2.2 Distribution**

Après absorption, les HAP sont largement et rapidement distribués dans tout l'organisme. Chez le rat, moins de 4 heures après injection intraveineuse, le BaP est retrouvé dans le poumon, le tissu adipeux, le foie, la peau et les reins [43]. Withey et al a montré que 95 minutes après une exposition de rats au BaP par voie respiratoire, les concentrations dans les différents compartiments s'ordonnaient ainsi : poumon > sang > foie > rein > tissu adipeux ; puis 6 heures après arrêt de l'exposition elles s'ordonnaient ainsi : tissu adipeux > poumon > rein > foie > sang [72]. La même constatation a été faite avec le pyrène, pour lequel les concentrations dans l'organisme 7 h après exposition respiratoire de rats s'ordonnaient ainsi : tissu adipeux > rein > poumon > foie [71].

Du fait de leur forte lipophile, les HAP absorbés seront donc stockés dans le tissu adipeux d'où ils seront lentement relâchés. Le poumon est également un site de stockage important dans le cas d'une exposition respiratoire, mais également après une injection intraveineuse, car cet organe qui reçoit la totalité du débit cardiaque, est le premier, après le cœur, à être en contact avec la dose intraveineuse [43].

Il est intéressant de noter que le compartiment gastro-intestinal contient des niveaux élevés d'HAP quelle que soit la voie d'entrée. Ceci s'explique par la clairance muco-ciliaire des voies respiratoires qui draine les particules du poumon vers les voies digestives et par l'excrétion hépatobiliaire des métabolites des HAP.

Cette large diffusion des HAP dans l'organisme peut être considérée comme une étape limitante de leur cinétique d'élimination.

### **1.2.3 Métabolisation**

Les HAP sont métabolisés dans de très nombreux tissus sans quoi leur forte lipophilie empêcherait leur élimination des membranes cellulaires [3]. En effet, les métabolites de phase 1 sont légèrement plus mobiles et les métabolites de phase 2 considérablement plus mobiles que leurs composés parents. Ainsi, le métabolisme prenant place au sein des cellules épithéliales du site d'entrée des HAP permet de limiter l'exposition de ces cellules en accélérant leur transport dans la circulation générale.

Néanmoins, lors de leur métabolisme, les HAP font l'objet de réactions d'oxydation qui peuvent conduire à des composés réactifs selon le niveau d'attaque sur la molécule. Dans ce cas, on parle d'activation métabolique, le métabolite produit étant plus toxique que le composé parent dont il est issu. Ce processus nécessite la présence d'une région de baie ou de fjord, qui sont des structures angulaires formées par les anneaux et constituant une gêne stérique favorisant les réactions d'oxydation et la formation de radicaux (figure 2).

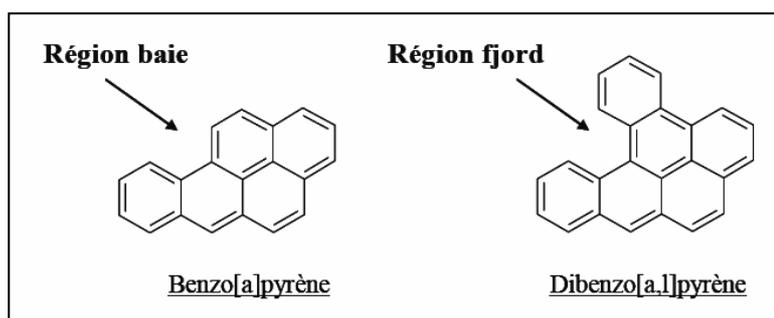


Figure 2. Région de baie et de fjord de deux HAP.

Ainsi, les HAP symétriques ne possédant ni région de baie ni région de fjord, comme le pyrène ou le naphthalène, sont éliminés en un nombre restreint de métabolites mono-hydroxylés. En revanche, le métabolisme des molécules asymétriques conduit à de très nombreux composés secondaires de type époxydes, phénols, quinones, hydroquinones, dihydrodiols, phenol-dihydrodiols, dihydrodiol-époxydes, tétrahydrodiols et autres intermédiaires réactifs, qui pourront réagir avec des composants cellulaires ou bien être éliminés après conjugaison, sans exercer leur toxicité (figure 3).

Bien que complexe, la cascade de réactions enzymatiques conduisant à la formation de ces métabolites semble se dérouler très rapidement. En effet, chez l'homme, leurs concentrations plasmatiques maximum sont retrouvées 15 à 30 minutes après une exposition respiratoire [74].

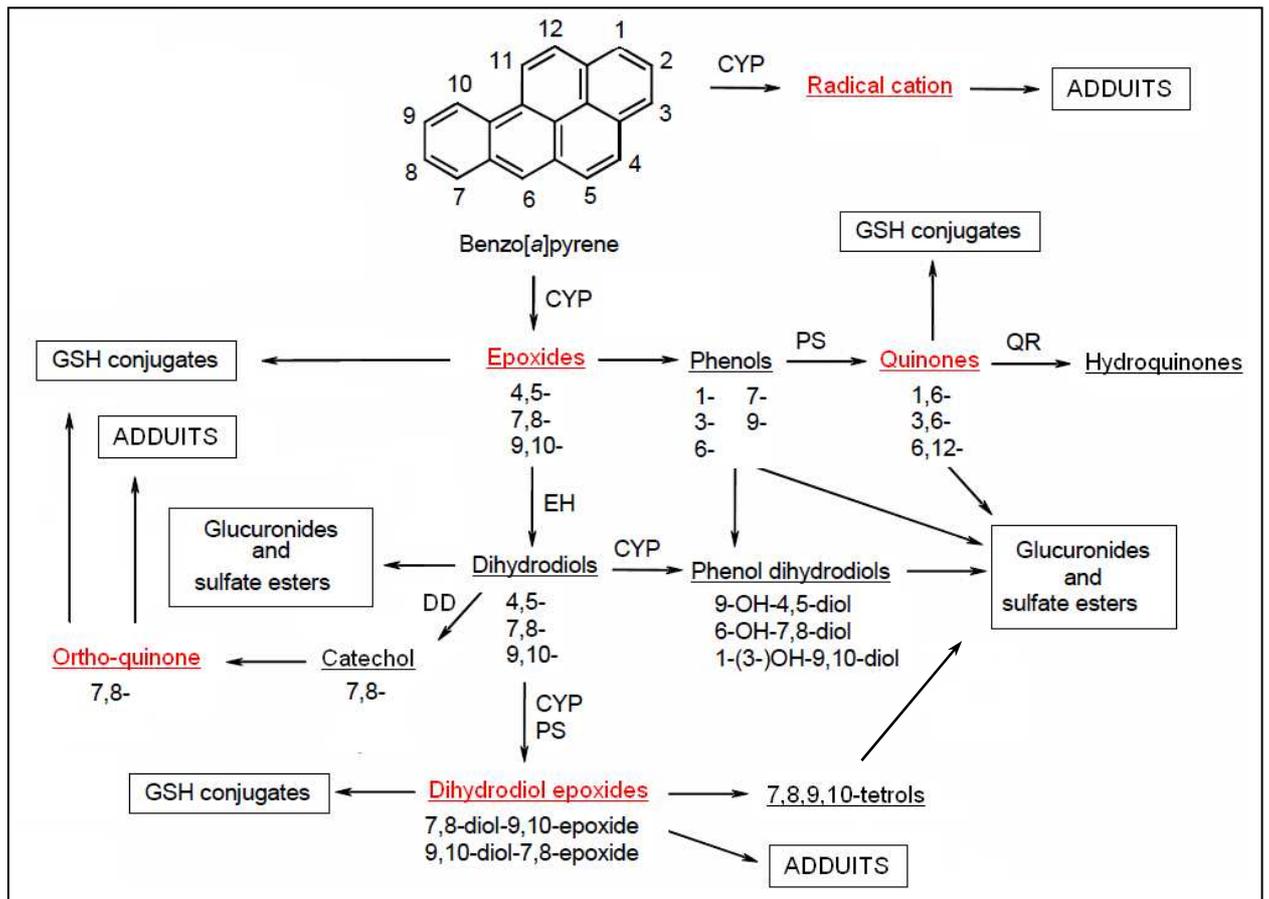


Figure 3. Schéma du métabolisme du BaP. CYP, cytochrome P450 ; EH, époxyde hydrolase ; PS, prostaglandine synthase ; DD, dihydrodiol déshydrogénase ; QR, quinone réductase. En rouge, les composés réactifs issus de l'activation métabolique.

La première étape de la métabolisation des HAP est leur prise en charge par les mono-oxygénases à cytochrome P 450 (CYP450). Les isoformes 1A1, 1A2, surtout, mais également des membres des familles 1B, 2B, 2C et 3A sont capables d'oxyder un grand nombre d'HAP [6]. Ces enzymes réalisent soit une réaction de peroxydation sur le squelette carboné, conduisant à la production du radical cation électrophile, soit une réaction de mono-oxygénation produisant différents arènes oxydes (ou époxydes). Cette oxydation enzymatique est régiosélective, elle ne peut prendre place que sur certaines positions des cycles aromatiques : 1,2- ; 2,3- ; 4,5- ; 7,8- ; 9,10-, dans le cas du BaP [29].

Les époxydes les plus instables sont spontanément transformés en phénols qui peuvent donner des quinones réactives mais qui seront principalement éliminés sous forme glucurono- ou sulfo-conjuguée [48]. Les autres époxydes, plus stables, sont conjugués au glutathion (GSH) par l'intermédiaire de la glutathion-S-transférase (GST), ou bien pris en charge par l'époxyde hydrolase (EH) entraînant la formation de trans-dihydrodiols [60].

Dans ce deuxième cas, les dihydrodiols sont de nouveau activés par les CYP450 conduisant à la formation de dihydrodiols-époxydes. Ces derniers peuvent être conjugués au GSH, spontanément hydrolysés en tetrahydroxy-tetrahydro-HAP (tétrols), ou encore se lier de façon covalente avec les composants cellulaires nucléophiles comme l'ADN, l'ARN, les lipides ou les protéines. Ces liaisons covalentes sont appelées adduits.

Une autre voie d'activation métabolique est liée à l'oxydation du dihydrodiol, par la dihydrodiol déshydrogénase (DD), en catéchol instable, conduisant à la formation d'une ortho-quinone (o-quinone). Cette dernière réaction produit des espèces réactives de l'oxygène, mais l'o-quinone est aussi électrophile et réactive vis à vis de l'ADN [73].

Il est intéressant de noter que la présence des HAP dans le cytoplasme entraîne une induction spécifique de certaines des enzymes métabolisant les xénobiotiques. En effet, le récepteur cytoplasmique Aryl hydrocarbon receptor (AhR) est lié à divers facteurs cytoplasmiques tels que les Heat shock protein 90 (Hsp90) et les AhR interacting protein (AIP). L'association entre l'AhR, les Hsp 90 et l'AIP confère au récepteur cytoplasmique une reconnaissance spécifique et optimale vis-à-vis de certains ligands, notamment les HAP. Dès sa pénétration dans la cellule, le BaP se lie spécifiquement à l'AhR, ce complexe pouvant alors migrer dans le noyau. Dans l'espace intranucléaire, l'AhR, toujours associé au BaP, se lie

spécifiquement à une protéine nucléaire, l'Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) pour constituer un hétérodimère considéré comme un facteur de transcription crucial dans l'induction de l'expression de plusieurs gènes. Ainsi, le BaP est capable d'induire l'expression génique du CYP1A1 et des GST alpha, donc d'induire son propre métabolisme [69].

Des différences inter-individuelles existent dans les proportions relatives des métabolites éliminés [24]. Néanmoins, dans le cas du pyrène, du fait de sa structure chimique symétrique, le 1-hydroxypyrene (1OHP) (figure 4) est le seul métabolite mono-hydroxylé formé. Pour le BaP, sur les cinq métabolites mono-hydroxylés potentiellement éliminés, le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3OHBaP) (figure 4) est toujours le majoritaire et sur les quatre stéréo-isomères possibles du benzo(a)pyrène-diol-époxyde, la forme prédominante est le (+)-anti-benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) (figure 4) [9, 32, 66].

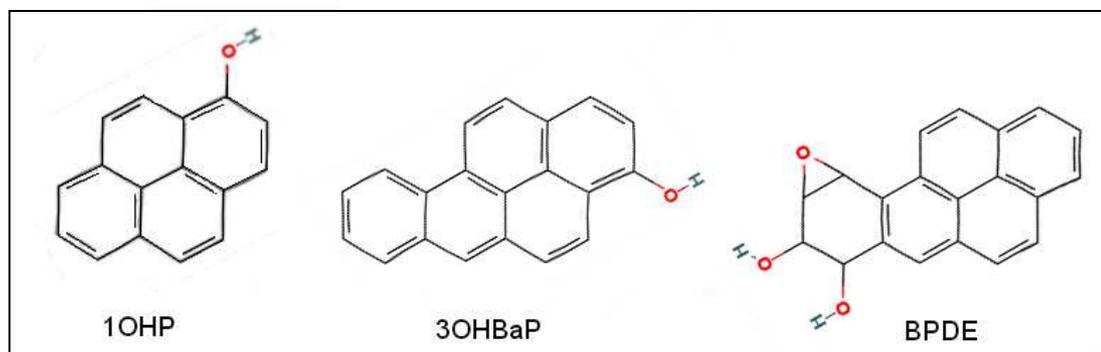


Figure 4. Structure chimique du 1-hydroxypyrene (1OHP), 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3OHBaP) et du 7,8-dihydrodiol-9,10-époxy-benzo(a)pyrène (BPDE).

#### 1.2.4 Elimination

Les résultats des études animales d'exposition aux HAP, montrent que leurs métabolites sont largement excrétés sous forme conjuguée au glutathion, à l'acide glucuronique ou au sulfate, dans les fécès par excrétion biliaire et dans les urines [3]. Les métabolites issus des HAP les plus légers sont principalement éliminés dans les urines, ceux issus des HAP les plus lourds le sont principalement dans les fécès.

Il existe néanmoins de larges différences dans les cinétiques d'élimination des différents HAP. Ainsi, lors de l'injection intraveineuse de BaP chez le rat, le maximum d'excrétion urinaire du 3OHBaP se situe 10 heures après l'injection, alors qu'il se situe immédiatement après administration dans le cas du 1OHP après injection de pyrène. Ces différences ne sont pas à attribuer à l'étape de métabolisation de phase 1 de ces HAP, car l'injection du 3OHBaP chez le rat, produit le même profil d'élimination urinaire [8]. Marie et al. a montré une accumulation du 3OHBaP dans le rein durant les 8 heures qui suivent une injection de BaP chez le rat, suivie d'une diminution linéaire de sa concentration avec une demi-vie de 15,6 heures [43]. Le 3OHBaP glucuroconjugué, étant activement sécrété par des transporteurs d'anions organiques au niveau des tubules rénaux proximaux, l'explication proposée serait une meilleure efficacité des transporteurs responsables du passage du compartiment sanguin aux cellules tubulaires, par rapport à ceux responsables du transport des cellules tubulaires au lumen, induisant donc une accumulation intra-rénale. Chez l'homme, le même décalage dans les cinétiques d'élimination a été observé, avec un maximum d'excrétion urinaire du 3OHBaP retardé de 10 à 20 heures par rapport au 1OHP dans un groupe de salariés exposés aux HAP [22]. Il est intéressant de noter que ce retard dans l'élimination urinaire du 3OHBaP n'existe pas pour d'autres métabolites du

BaP, comme le 4,5-dihydrodiol [8]. Des différences dans les cinétiques d'élimination existent donc également entre les différents métabolites d'un même HAP.

Enfin, la voie d'absorption est également un facteur influençant la cinétique d'élimination des HAP. Par exemple, le 1OHP est éliminé en 5 à 9 heures après exposition respiratoire ou digestive au pyrène, alors qu'un plateau d'élimination apparaît à 20 heures lors d'une exposition cutanée [37].

## **1.3 Activation métabolique et cancérogénèse**

### **1.3.1 Voie des diol-époxydes**

C'est l'activation métabolique des HAP contenant une région de baie ou de fjord qui est responsable de leur génotoxicité. La cascade de réactions enzymatiques aboutit à la formation d'un diol-époxyde appelé cancérogène ultime car certains isomères de cette forme métabolique sont capables de former des adduits stables ou dépurinants avec l'ADN, étape pouvant être initiatrice d'un phénomène de cancérogénèse.

Les adduits stables tout comme les adduits dépurinants sont majoritairement formés avec la base nucléotidique de l'ADN guanine. Ces lésions provoquent des mutations lorsqu'elles sont mal ou non réparées par les mécanismes de réparation de l'ADN. Si les métabolites diol-époxyde des HAP induisent des mutations sur des gènes critiques comme les proto-oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeurs, la cellule est dite initiée.

Néanmoins, les métabolites diol-époxydes des HAP ne sont pas tous réactifs vis-à-vis de l'ADN. Le pont époxy doit être localisé immédiatement après la région de baie ou de fjord pour

que s'exerce sa toxicité. Dans le cas du BaP, la forme 9,10-dihydrodiol-7,8-époxyde (reverse-BPDE) (figure 5) est majoritairement éliminée sous forme d'acide mercapturique après conjugaison au GSH, tandis que la forme 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) (figure 4) est très peu détoxifiée par ce mécanisme [63] et est responsable de la formation d'adduits [16]. Le nombre de cycle aromatique est également important. En effet, bien que son pont époxy soit localisé immédiatement après la région de baie, le métabolite du phénanthrène, 1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde (figure 5), n'est pas cancérigène chez des souris nouveau-nés [11].

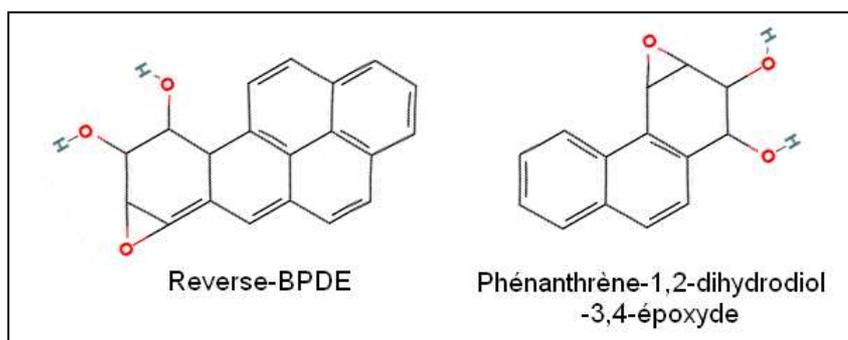


Figure 5. Structure chimique du 9,10-dihydrodiol-7,8-époxyde-benzo(a)pyrène (reverse-BPDE) et du 1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-phénanthrène.

### 1.3.2 Voie du radical cation

Le mécanisme chimique de cette voie est basé sur l'arrachement d'un électron à l'HAP via une oxydation mono-électronique par les activités peroxydases des CYP450. Elle conduit à la formation de radicaux cations électrophiles permettant la formation de liens covalents avec les sites nucléophiles de l'ADN. Le BaP mais également dibenzo[a,l]pyrène peuvent être métabolisés par cette voie.

Le radical cation du BaP est une espèce chimique très instable, il ne pourra exercer sa toxicité que s'il est produit en présence d'ADN ou de nucléosides.

Les adduits issus de cette voie sont principalement des adduits dépurinants de l'adénine et de la guanine, générant des sites apuriniques capables de conduire à des mutations du proto-oncogène Ras, connu pour être fortement associé aux phénomènes de tumorigénèse [32].

### **1.3.3 Voie de l'ortho-quinone**

Cette espèce chimique, issue de l'oxydation d'un dihydrodiol, serait capable de se fixer à l'ADN. Néanmoins, l'action toxique majeure de cette voie est essentiellement de type oxydatif, par le biais d'une génération d'espèces réactives de l'oxygène. Le radical hydroxyle est le principal responsable des dommages à l'ADN. Ce dernier peut engendrer des cassures de l'hélice double brins, après oxydation du 2'-désoxyribose, ou bien provoquer l'oxydation de la désoxyguanosine générant la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine.

Cette attaque oxydative peut être également responsable de mutations sur le gène suppresseur de tumeurs « p53 » [32].

### **1.3.4 Autres mécanismes d'action**

Les HAP se liant à l'Ahr induisent une modification de l'expression des gènes de la croissance et de la différenciation cellulaire. Ce phénomène pourrait jouer un rôle dans la promotion des cellules initiées. Le BaP, par exemple, possède des capacités à la fois d'initiateur et de promoteur alors que le pyrène ne possède aucune de ces caractéristiques.

Plusieurs études ont également souligné le potentiel phototoxique des HAP [32]. Dans ce sens, Douki et al. a montré que la formation d'adduits stables à l'ADN, par l'action du BPDE, augmentait la phototoxicité de rayonnements UV appliqués à des cellules en culture [17].

Les HAP sont également suspectés d'être des agents reprotoxiques [32].

## **1.4 Surveillance de l'exposition aux HAP**

Les HAP sont donc des toxiques cancérogènes dont la distribution est ubiquitaire. La totalité de la population y est exposée, ce qui peut présenter un risque sanitaire qu'il est nécessaire d'évaluer par la surveillance des expositions. Ceci est particulièrement vrai pour les expositions professionnelles, où le risque sanitaire est clairement identifié.

Ce suivi des expositions peut être réalisé par deux approches complémentaires :

- La surveillance des atmosphères de travail ou de l'environnement, dont le but est d'estimer l'exposition des sujets (dose externe) à partir des mesures de concentrations atmosphériques.
- La surveillance biologique de l'exposition, qui repose sur la quantification de la substance elle-même, ou de ses métabolites, dans les différents milieux biologiques de l'individu (dose interne).

La classification des sujets en groupes homogènes d'exposition (GHE) est réalisée avant la mesure proprement dite des niveaux. En environnement professionnel, elle se base sur le type d'activité réalisée au poste de travail.

### 1.4.1 Métrologie atmosphérique

Cette approche permet la caractérisation des mélanges d'HAP présents dans l'atmosphère. Elle nécessite de réaliser des prélèvements atmosphériques dans des conditions standardisées (norme NF X 43-294). Des pompes dont le débit est réglé à 1 L/min sont reliées en série à un filtre en fibre de quartz piégeant les HAP particulaires et à un support type XAD2 piégeant les HAP gazeux. Elles sont placées soit directement sur le salarié (prélèvement individuel), soit proche d'une source d'émission (prélèvement d'ambiance). Les HAP seront ensuite extraits des supports par ultrasons et leur dosage réalisé par chromatographie liquide haute performance couplée à la détection par fluorescence (HPLC-FLD).

La métrologie atmosphérique permet de comparer tant les niveaux d'HAP particulaires et gazeux issus d'une source d'émission, que leurs proportions relatives dans les mélanges, ces dernières variant en fonction de la source d'émission, mais restant constantes pour une même source.

Dans l'environnement général, les concentrations atmosphériques en HAP montrent des variations saisonnières avec des niveaux plus élevés en hiver qu'en été [45, 57]. Dans le cas du BaP en milieu urbain, les concentrations en hiver peuvent être 5 fois plus élevées qu'en été [51]. Cette observation s'explique principalement par :

- le nombre de sources d'émission plus importantes à cette période, avec notamment la présence d'émissions dues au chauffage domestique [47],
- une modification de la répartition entre phase gazeuse et phase particulaire due à des différences de température ambiante, de pression de vapeur, et de concentration en particules [4],

- des phénomènes de dégradation des HAP moins importants en hiver et particulièrement la photodégradation et l'oxydation par l'ozone,
- des phénomènes de dispersion atmosphérique plus limités, avec de possibles inversions thermiques à cette période [41].

En milieu industriel, les concentrations atmosphériques en HAP sont généralement plus élevées qu'en environnement général. Elles vont dépendre du nombre de sources d'émissions, du type d'activité professionnelle, de l'éloignement par rapport à la source et de l'existence d'un système d'aspiration à la source ou de filtration des émissions. Les niveaux d'exposition professionnels peuvent être classés comme suit [61] :

- Exposition très élevée au BaP (supérieure à 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) : Cokerie, production d'électrodes de carbone ou de graphite, manipulation de brai, etc.
- Exposition modérée (0,1 à 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) : Aluminerie, aciérie, etc.
- Exposition faible (inférieure à 0,1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) : Productions et application de bitumes, ateliers de réparation d'automobile et garages, etc.

Le tableau II présente des intervalles de concentrations moyennes en différents HAP, retrouvées en environnements général et professionnel [61].

HAP	Site rural	urbain	trafic	industriel
Acénaphthène	0,3-2,6			98
Acénaphthylène				
Anthracène	0,04-15		0,2-0,6	1,1
Benzo(a)anthracène	0,01-0,9		0,6-4,2	0,37-42
Benzo(a)pyrène	0,02-2,8	0,4-2	0,7-3,1	0,5-39
Benzo(e)pyrène	0,18-1,1	0,2-2,1	0,9-3,7	0,65-80
Benzo(b)fluoranthène	0,04-0,6			0,3-34
Benzo(g,h,i)perylène	0,15-1,0	0,5-2,8	1-4,7	0,7-52
Benzo(j)fluoranthène				
Benzo(k)fluoranthène	0,04-0,32	0,2-1		0,3-17
Chrysène	0,02-4,4	0,3-2,2		0,3-37
Coronène	0,02-0,5	0,1-0,6	0,4-2,5	0,26-5,2
Dibenzo (a,h)anthracène	0,02-1,1	0,06-0,3	0,1-0,4	0,05-7,5
Fluoranthène	0,04-7,4			42
Fluorène	0,3-46		9,9-16,7	
Indeno(1,2,3- cd)pyrène	0,04-0,21	0,3-2,1	1,3-2,6	0,4-37
Naphtalène	0,3-10			88
Phenanthrène	0,42-150			16
Pyrène	0,1-6,1	0,24-1,2	9,2-15	75

Tableau II. Concentration moyennes d'HAP en ng/m<sup>3</sup>, sur différents sites en Europe.

En France, la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM) recommande comme objectif provisoire de maintenir la concentration atmosphérique en BaP à une valeur inférieure à 150 ng/m<sup>3</sup>.

Avec la métrologie atmosphérique, il est donc possible de discriminer les sources dont la composition du mélange contient plus ou moins d'HAP cancérogènes et d'identifier les

expositions devant faire l'objet de recommandations particulières. En revanche, elle ne permet pas d'évaluer la dose réellement absorbée par l'organisme. En effet, elle ne renseigne que sur la quantité d'HAP potentiellement absorbée par voie respiratoire mais ne prend pas en compte l'absorption par voie cutanée ni le port d'équipements de protection individuelle.

### 1.4.2 Surveillance biologique

L'institut national de recherche et sécurité (INRS) définit la surveillance biologique comme : « l'identification et la mesure des substances de l'environnement de travail, de leurs métabolites ou des effets biologiques spécifiques précoces qu'elles induisent, dans les tissus, les excréta, les sécrétions ou l'air expiré des salariés, pour évaluer l'exposition et les risques pour la santé, en comparant les valeurs mesurées à des références appropriées ».

Cette mesure est donc représentative de la dose réellement absorbée par l'organisme. Elle tient compte de l'exposition professionnelle par absorption respiratoire ou cutanée, mais également de l'exposition environnementale liée à la consommation de tabac, à l'alimentation ou à la pollution urbaine, ce qui est essentiel pour l'appréciation et la gestion du risque sanitaire [33]. L'efficacité des équipements de protection collective et individuelle peut également être évaluée.

Les indicateurs utilisés pour la mesure biologique de l'exposition sont appelés biomarqueurs. Ils peuvent être classés en trois catégories [1, 49] :

- Les **biomarqueurs d'exposition** qui correspondent à une mesure quantitative du polluant ou d'un de ses métabolites. Le moment du prélèvement est déterminé en fonction de sa cinétique d'absorption, de transformation, et d'élimination. Parmi ces biomarqueurs

d'exposition on distingue les biomarqueurs de dose interne qui sont généralement les métabolites urinaires du polluant et les biomarqueurs de dose efficace qui correspondent à la dose de toxique présent au niveau du site d'action, comme les adduits à l'ADN dans le cas d'effets cancérogènes.

- Les **biomarqueurs d'effets** qui permettent de détecter des effets biologiques plus ou moins proches de la survenue de la maladie. Contrairement aux biomarqueurs d'exposition, ils ne sont pas spécifiques de l'exposition à un toxique. Certains sont dits précoces, comme les lésions oxydatives de l'ADN, les mutations chromosomiques, ou encore les mutations ponctuelles, et d'autres tardifs car plus proches de la survenue de la maladie, comme l'activation ou l'inhibition de gènes critiques.
- Les **biomarqueurs de susceptibilité individuelle** qui incluent l'ensemble des caractéristiques modulant la susceptibilité des individus vis-à-vis de la survenue du cancer (génotypes à risque, genre, âge, etc.).

Dans le cas de la surveillance biologique de l'exposition aux HAP, le dosage des métabolites urinaires est la méthode la plus largement employée (biomarqueur de dose interne). Ils sont en effet de bons indicateurs de l'exposition humaine à ces composés [66] tout en étant simples et fiables [39]. Néanmoins, une des difficultés de cette approche, est la validation d'un biomarqueur unique, représentatif de l'exposition aux différents mélanges d'HAP et de la toxicité qui leur est associée.

Ces vingt dernières années, la dose interne de l'organisme en HAP a été principalement évaluée par le dosage du 1OHP. En effet, le pyrène est toujours présent en grandes proportions dans les mélanges atmosphériques et l'élimination de son métabolite est essentiellement urinaire, facilitant sa détection [33]. Cependant, le pyrène ne possède aucun pouvoir cancérogène et les

ratios BaP/pyrène varient considérablement selon les sources d'émission. Ainsi, la concentration urinaire en 1OHP ne reflète pas l'exposition interne aux HAP cancérogènes ni au BaP seul, lorsque la composition des mélanges varie [21, 39]. Certains auteurs proposent de pondérer la concentration de 1OHP par le ratio des concentrations atmosphériques BaP/pyrène afin de mieux apprécier le risque sanitaire [10].

Une autre possibilité est l'utilisation du 3OHBaP, métabolite mono-hydroxylé majoritaire du BaP, comme biomarqueur de dose interne plus proche du risque cancérogène [9]. En effet, ce métabolite est directement issu du seul HAP classé cancérogène certain pour l'homme par le CIRC [32]. De plus, Marie-Desvergne et al. a montré récemment qu'après injection de BaP chez le rat, la concentration urinaire de ce métabolite était très bien corrélée à celle des adduits du BPDE à l'ADN dans le poumon ( $r=0,936$ ,  $p<0,001$ ,  $n=32$ ) [42]. Néanmoins, une des difficultés de son utilisation en population humaine, est la mise au point d'une méthode de dosage suffisamment sensible pour le détecter dans la matrice urinaire aux niveaux correspondants à la surveillance biologique. En effet, le BaP est métabolisé en de nombreux composés secondaires (phénols, diols, triols, etc.) et son élimination est majoritairement fécale via l'excrétion biliaire [48]. Ainsi, 72 heures après une injection intra-veineuse de BaP chez le rat, le 3OHBaP excrété dans les urines ne représentait que 0,21 % de la dose [43]. Il en résulte des niveaux urinaires de 3OHBaP de l'ordre du ng/L, soit 1000 à 30 000 fois plus faibles que ceux du 1OHP, dans les urines de salariés des fours à coke tout comme dans les urines de patients traités par application d'onguents à base de coal-tar [2, 34, 39].

## 1.5 Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est double.

La première étape est la mise au point d'une méthode dosage du 3OHBaP urinaire possédant une limite de détection (LD) inférieure à 0,1 ng/L d'urine, afin de pouvoir l'utiliser dans l'évaluation de l'exposition au BaP.

La deuxième partie du travail consiste à valider l'utilisation du 3OHBaP, par le biais de son utilisation en routine dans la surveillance biologique de salariés issus de différents secteurs industriels.

Les données issues de notre étude devraient permettre d'améliorer les connaissances sur les modalités d'utilisation de ce nouveau biomarqueur d'une part, et sur les conditions d'exposition des salariés aux HAP cancérogènes d'autre part.

Ce travail est présenté à travers une première partie résumant la méthode de dosage mise au point et les principaux résultats publiés dans la revue « Analyst » [5], puis une deuxième partie présentant les niveaux de 3OHBaP urinaire obtenus au sein de deux populations de salariés exposés aux HAP.

**2. MISE AU POINT DU DOSAGE DU  
3-HYDROXYBENZO(a)PYRENE URINAIRE**

## 2.1 Contexte scientifique

De 1994 à nos jours, ce sont quatorze méthodes de dosage du 3OHBaP urinaire qui ont été publiées. L'utilisation de la chromatographie liquide couplée à un détecteur de type spectromètre de masse en mode tandem (LC-MS/MS) [18] ou de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) [13] n'a pas permis d'atteindre des LD inférieures à 1 µg/L. Seules des techniques de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS) [55] ou de chromatographie liquide ultra performante couplée à un spectromètre de masse en mode tandem (UPLC-MS/MS) [58] ont permis d'atteindre une meilleure sensibilité (LD=0,05 ng/L). Toutefois, ces méthodes de dosage nécessitent une étape pré-analytique de dérivatisation chimique de l'analyte et l'utilisation de matériel à ce jour disponible en laboratoire de recherche uniquement et n'apparaissent donc pas adaptées à une utilisation en routine.

A coté de ces techniques prometteuses, la plupart des études ont utilisé l'HPLC-FLD [2, 12, 26, 31, 59, 68]. Bien que plus répandu et moins onéreux, ce type de détection est moins spécifique. La séparation chromatographique de l'analyte et des constituants urinaires, potentiellement interférents, doit donc être optimisée. De plus, une séparation efficace permet d'atténuer le signal du bruit de fond et d'obtenir une sensibilité satisfaisante. Ainsi, la seule méthode analytique publiée permettant d'atteindre une LD inférieure à 0,1 ng/L par HPLC-FLD a nécessité le montage d'un système de séparation chromatographique utilisant quatre colonnes fabriquées in situ et reliées par trois de vannes de commutation [59].

Dans ce travail, l'objectif était de développer un dosage utilisable en routine dans de nombreux laboratoires. Deux étapes ont été associées pour atteindre la sensibilité requise : la concentration de l'échantillon par extraction en phase solide (SPE), afin d'augmenter le signal et l'analyse par HPLC-FLD à l'aide de deux colonnes chromatographiques disponibles dans le commerce et commutées par une vanne.

## **2.2 Matériel et méthode**

### **2.2.1 Mise au point et validation analytique du dosage du 3OHBaP**

#### **a. Pré-analytique**

La prise d'essai urinaire a été fixée à 10 mL en rapport avec les faibles niveaux attendus de 3OHBaP. Le 3OHBaP étant éliminé sous forme glucurono- et sulfo-conjuguée dans les urines, la première étape est l'hydrolyse enzymatique des échantillons, pour obtenir le métabolite sous forme libre. La  $\beta$ -glucuronidase/arylsulphatase (Roche) a été utilisée afin de réaliser cette déconjugaison. La durée de cette étape a été fixée à 2 heures conformément aux études déjà publiées [59, 62].

Les urines une fois hydrolysées ont été purifiées par SPE permettant l'élimination de nombreux composés urinaires (figure 6). Les cartouches SPE utilisées étaient des Sep-Pak C18 d'une capacité de 500 mg (Waters).

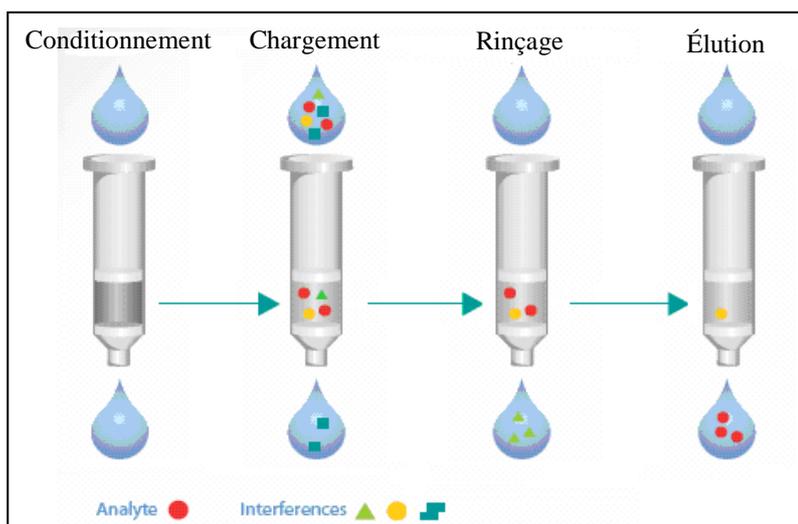


Figure 6. Phases composant la SPE.

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

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

Tableau III. Paramètres de l'extraction en phase solide automatisée.

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

## b. Conditions analytiques

Malgré l'étape pré-analytique de purification, de nombreux composés interférents sont encore présents dans l'échantillon concentré. Afin d'améliorer la séparation chromatographique et d'éliminer ces interférences, deux colonnes distinctes ont été placées en série. La première colonne de purification (C1) est une Supelcosil LC-18 50mm x 4mm ; 5 $\mu$ m (Supelco). La deuxième colonne d'analyse (C2) était une PAH-C18 (250mm x 3mm ; 5 $\mu$ m) (Waters). Le matériel utilisé (figure 7) était une HPLC Alliance 2695 (Waters) composée d'un module de séparation possédant une pompe quaternaire (P1) et couplée à une pompe 600 (P2) (Waters) par une vanne de commutation 10 voies 2 positions.

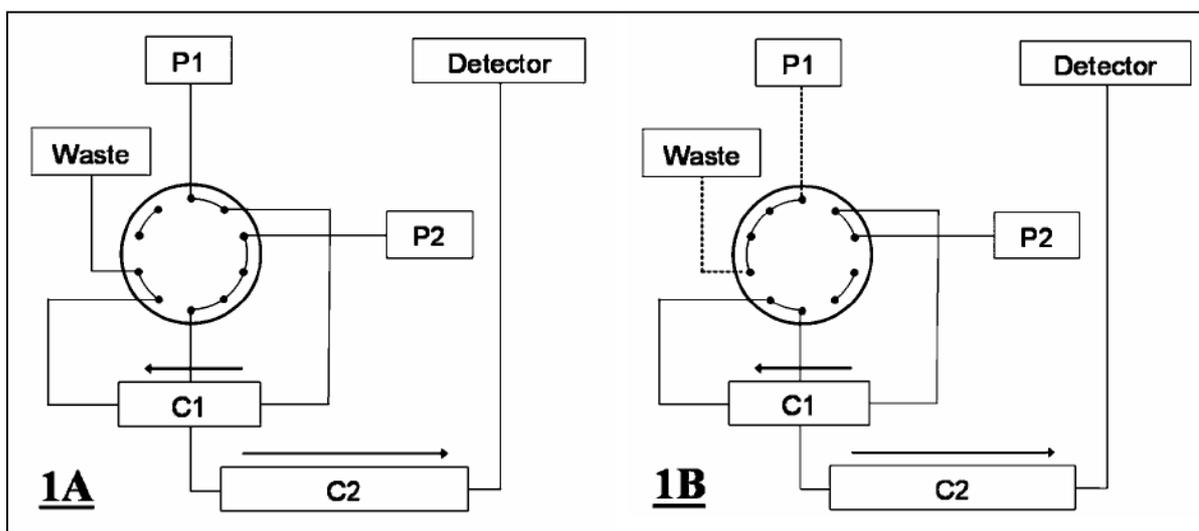


Figure 7. Schéma du système chromatographique. P1, pompe 1 ; P2, pompe 2 ; C1, colonne 1 : Supelcosil LC-18 (150 x 4,6mm, 5 $\mu$ m) ; C2, colonne 2 : PAH-C18 (250mm x 3mm, 5 $\mu$ m) ; Waste, poubelle ; Detector, fluorimètre.

Ce système a été configuré pour utiliser la technique dite de « heart-cut » [35]. Après l'injection de l'échantillon la vanne est en position d'analyse (figure 7, 1A). P1 applique un gradient de solvants (E1) sur la colonne C1 pour effectuer une première séparation, tandis que P2 conditionne la colonne C2. Les composés peu retenus sur C1 sont éliminés. Entre la 18<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> minute de l'analyse chromatographique, la vanne passe dans sa position alternative (figure 7, 1B). P2 applique un gradient (E2) de solvant sur les deux colonnes en série, et les composés urinaires élués de C1 à ce moment, dont le 3OHBaP, ne sont plus éliminés mais transférés sur C2. Pour finir, la vanne retourne en position d'analyse (figure 7, 1A) et une seconde séparation a lieu au sein de la colonne C2 à l'aide d'un gradient de solvant linéaire appliqué par P2. Les paramètres des gradients de solvants et des positions associées de la vanne, sont résumés dans le tableau IV.

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

Temps (min)	Phase mobile E1		Position de la vanne	Phase mobile E2	
	Tampon formiate 0,5mM (%)	Méthanol (%)		Tampon formiate 0,5mM (%)	Méthanol (%)
0	100	0	A	20	80
2	100	0	A	-	-
6.0	70	30	A	-	-
8	70	30	A	-	-
10	50	50	A	-	-
12	50	50	A	-	-
13	↓	↓	A	20	80
14	20	80	A	↓	↓
<b>18</b>	<b>16</b>	<b>84</b>	<b>B</b>	<b>15</b>	<b>85</b>
<b>20</b>	<b>14</b>	<b>86</b>	<b>B</b>	<b>13</b>	<b>87</b>
24	10	90	A	↓	↓
25	0	100	A	↓	↓
30	0	100	A	↓	↓
31	50	50	A	↓	↓
32	100	0	A	↓	↓
33	-	-	A	0	100
35	-	-	A	20	80
45	100	0	A	20	80

Tableau IV. Résumé des paramètres de l'analyse chromatographique.

### c. Validation analytique

La validation de la méthode de dosage a été réalisée à partir des recommandations de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [20] et de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) [52]. Le rendement d'extraction, la linéarité de la gamme d'étalonnage, la justesse, la fidélité, la limite de quantification (LQ) et la LD de l'analyse ont été déterminés.

### 2.2.2 Analyses urinaires

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

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

Le dosage du 1OHP urinaire a été réalisé au sein du laboratoire par une méthode analytique déjà décrite dans la littérature [40] et répondant aux normes du système de contrôle externe de la qualité, organisé par la société allemande pour la médecine professionnelle et environnementale.

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

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

## 2.3 Résultats et discussion

### 2.3.1 Optimisation de la méthode d'extraction

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

Certaines méthodes de dosage de métabolites des HAP ont utilisé l'extraction liquide-liquide [12, 13] mais cette technique nécessite de trop grands volumes de solvants et demande beaucoup de temps. La SPE semblait plus appropriée et présentait une sélectivité meilleure pour la purification des composés urinaires interférents [26, 31, 55].

Les tests de différentes phases solides composant les cartouches d'extraction et de différents solvants permettant le nettoyage des urines et l'élution du 3OHBaP ont conduit à l'utilisation des Sep-Pak C18 500 mg (Waters). Les rendements d'extraction obtenus étaient de  $77,7 \pm 7 \%$ ,  $76,4 \pm 0,8 \%$  et  $77,8 \pm 2,0 \%$  pour des concentrations urinaires de 3OHBaP respectivement de 0,4 ng/L, 3 ng/L et 10 ng/L. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hollender et al. [31] et meilleurs que ceux des autres méthodes décrites dans la littérature [2, 26].

L'évaporation qui suit cette étape a été réalisée sous vide, de manière à être totale en 2 heures sans dépasser une température de 50°C, ceci pour éviter une possible dégradation de l'analyte [67].

### 2.3.2 Conditions chromatographiques

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

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

Pour la détection, le couple de longueur d'onde 425/460 nm (excitation/émission) a été retenu pour son rapport signal sur bruit de fond bien supérieur à d'autres couples proposés dans la littérature et testés lors de notre travail [9, 26, 31, 59].

Au final, l'analyse chromatographique et le reconditionnement des colonnes précédant l'injection suivante, nécessitaient 45 minutes par échantillon, ce qui est proche des temps d'analyse des méthodes de dosage publiées [59, 70].

### 2.3.3 Performances de la méthode

La méthode a montré une LQ de 0,05 ng/L d'urine et une LD de 0,02 ng/L d'urine ce qui est tout fait conforme à l'objectif de travail. Les dosages précédemment décrits et permettant d'atteindre une sensibilité comparable, ont été réalisés à partir d'un système chromatographique original [59] ou à partir d'une UPLC-MS/MS, matériel aujourd'hui disponible en laboratoire de recherche uniquement [58].

Le coefficient de répétabilité obtenu était inférieur à 3 % et le coefficient de fidélité intermédiaire inférieur à 4 % pour des concentrations de 0,2 ng/L, 2 ng/L et 16 ng/L. L'utilisation d'un automate pour le traitement pré-analytique a permis d'obtenir ces résultats, qui sont systématiquement meilleurs que les dosages déjà publiés, utilisant la SPE [18, 31, 55]. Les calculs de justesse ont montré des pourcentages de déviation de la valeur cible de 8,1 %, 0,3 %, et 5 %, pour des concentrations respectivement de 0,2 ng/L, 2 ng/L et 16 ng/L. La linéarité des gammes d'étalonnage a été statistiquement validée dans l'intervalle de concentrations de 0,1 ng/L à 20 ng/L.

La figure 8 présente les chromatogrammes issus du dosage d'urines contenant des concentrations de 3OHBaP de 0,2 ng/L (A), inférieure à la LQ (B) et de 10 ng/L (C). Le dernier chromatogramme est également obtenu pour une urine dont la concentration était de 10 ng/L, lorsque l'étape de SPE a été volontairement omise (D).

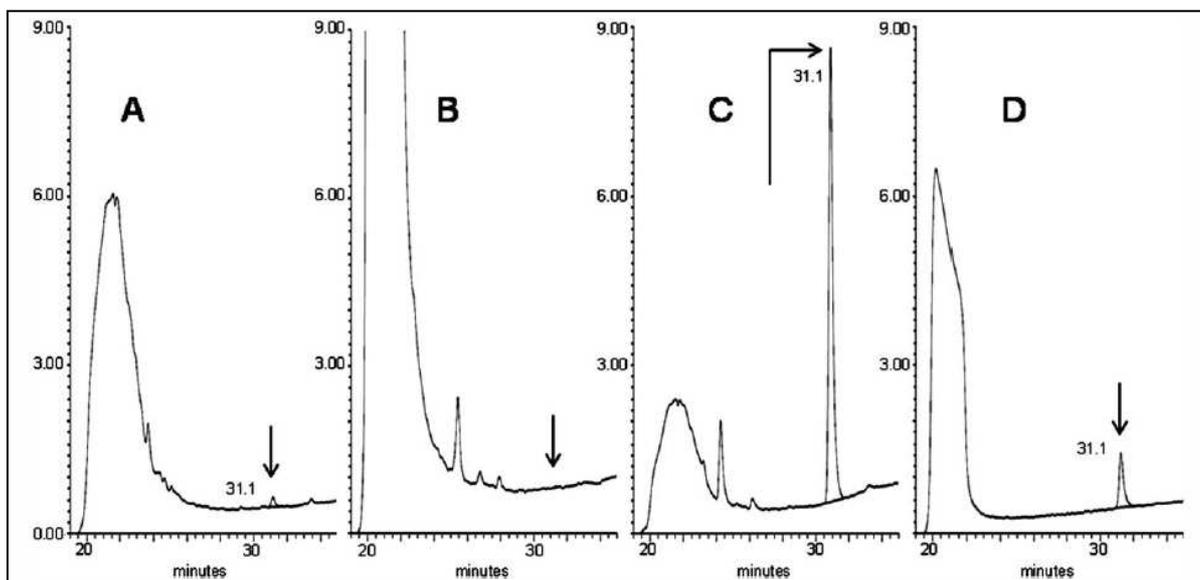


Figure 8. Chromatogrammes urinaires. A, sujet fumeur 3OHBaP = 0,2 ng/L ; B, sujet non fumeur 3OHBaP < LQ ; C, urine surchargée, 3OHBaP = 10 ng/L ; D, urine surchargée et dosage réalisé sans l'étape de SPE, 3OHBaP = 10 ng/L.

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

### 2.3.4 Analyses urinaires

Dans les années 1980, Jongeneelen et al. a proposé l'utilisation du 1OHP pour évaluer l'exposition aux HAP en mélanges [34]. Son élimination principalement urinaire et la présence du pyrène en grande quantité dans les mélanges atmosphériques particulaires, ont pour conséquence des niveaux urinaires de 1OHP de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$ , facilitant son dosage en routine. Pour les mêmes raisons, les métabolites urinaires des HAP gazeux ont été largement étudiés [27, 36, 53]. Des différences dans les concentrations urinaires de chacun de ces biomarqueurs ont été retrouvées entre des groupes de sujets fumeurs et non fumeurs, ou entre des salariés exposés par rapport à la population générale. Néanmoins, c'est bien l'exposition aux HAP particulaires qui présente un risque cancérigène pour l'homme. En ce sens, des méthodes de dosage ont été développées pour analyser en même temps les métabolites mono-hydroxylés du benzo(a)anthracène, du chrysène et/ou du BaP [12-14, 31, 46, 56]. Mais cette approche multi-analytes manque encore de spécificité et n'a pas permis d'atteindre la sensibilité nécessaire à leur utilisation dans la surveillance biologique de l'exposition aux HAP cancérigènes.

Dans ce travail, nous avons choisi de développer une méthode analytique spécifique du 3OHBaP. En effet, ce dernier est le métabolite mono-hydroxylé majoritaire du BaP [9, 66], seul HAP classé cancérigène certain pour l'homme [32]. En revanche, du fait de l'existence d'un retard de 16 heures dans sa cinétique d'élimination par rapport à celle du 1OHP, les deux dosages ne doivent pas être réalisés dans les mêmes échantillons urinaires [21, 43]. Ainsi, afin d'évaluer l'exposition aux HAP sur une même journée par ces deux biomarqueurs, le 1OHP est dosé dans les urines récoltées le soir de l'exposition, tandis que le 3OHBaP est dosé dans les urines récoltés le matin après l'exposition. Les niveaux urinaires obtenus dans la population de l'étude sont regroupés dans le tableau V.

	Nombre de cigarettes par jour	3OHBaP (nmol/mol)	1OHP (nmol/mol)
	med [min;max] m ± ET n		med [min;max] m ± ET n (n < LD)
<b>Non fumeurs</b>		0,009 [0,003;0,023] 0,010 ± 0,005 23 (18)	38 [7;167] 42 ± 33 23 (0)
<b>Fumeurs</b>	17,8 [10;40] 20 ± 8.9 13	0,023 [0,003;0,075] 0,029 ± 0,024 13 (1)	133 [33;330] 162 ± 90 13 (0)

Tableau V. Concentrations urinaires de 3OHBaP et de 1OHP chez des sujets fumeurs et non fumeurs. Med, médiane ; min, minimum ; max, maximum ; m, moyenne ; ET, écart-type ; n, nombre d'échantillons ; (n < LD), nombre de dosages inférieurs à la LD.

Dans les urines de sujets non fumeurs 78 % des concentrations de 3OHBaP sont inférieures à la LD alors que le 1OHP est quantifié dans tous les échantillons.

Les niveaux urinaires de 1OHP sont 3,5 fois plus élevés ( $p < 0,001$ ), chez les sujets fumeurs que chez les non fumeurs et ceux de 3OHBaP, 2 fois plus élevés ( $p < 0,05$ ). Le dosage du 3OHBaP par la méthode proposée a donc permis l'évaluation de l'exposition aux HAP au même titre que le dosage du 1OHP. L'augmentation plus forte du 1OHP par rapport au 3OHBaP entre les deux groupes est expliquée par la quantité plus importante de pyrène que de BaP, dans la fumée de cigarette [15]. Ces résultats confirment également la présence de 3OHBaP dans les urines de sujets fumeurs, à des niveaux 5000 fois plus faibles que ceux de 1OHP. Les concentrations de 3OHBaP urinaire quantifiées ici sont très proches de celles décrites dans la littérature. Ainsi, Sarkar et al. a évalué à 193 pg la quantité de ce métabolite éliminée en 24 h chez des sujets dont la consommation tabagique était comparable à celle de notre étude [58]. Les niveaux obtenus dans notre travail correspondent à une quantité éliminée en 24 h de 155 pg, en considérant un volume d'excrétion urinaire moyen en 24 h de 1,5 L et une concentration urinaire

moyenne de créatinine égale à 1.5 g/L. Lafontaine et al, a rapporté des concentrations de 3OHBaP de 0,023 nmol/mol dans les urines de 24 h de sujets fumeurs [38]. Les concentrations que nous avons quantifiées le lendemain matin de l'exposition à la cigarette sont donc identiques à celles retrouvées dans des urines de 24 h, mais l'échantillonnage est plus simple et plus adapté à une surveillance biologique de routine.

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

Damien Barbeau,<sup>ab</sup> Anne Maitre<sup>\*ab</sup> and Marie Marques<sup>a</sup>

Received 21st June 2010, Accepted 15th December 2010

DOI: 10.1039/c0an00428f

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

### Introduction

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

(IARC), and a dozen of other particulate PAHs are classified in group 2A or 2B (likely or suspected carcinogens).<sup>3</sup> High exposure levels have been reported in some workplaces, such as factories producing graphite electrodes, aluminium, tar, fireproof material and coke ovens. The general population is also exposed to PAHs in tobacco smoke, traffic exhaust, wood heating or industrial emissions.<sup>4</sup> In non-smokers, food is responsible for 96% of PAHs contamination<sup>5</sup> and some studies have also indicated that dermal exposure may be an important exposure pathway.<sup>6-8</sup> While airborne monitoring of PAHs concentrations may underestimate individual internal burden, biological monitoring of PAHs metabolites plays an important role in determining the internal dose, and thus the real exposure taking into account all ways of absorption.<sup>9</sup> PAHs can be analyzed in urine by "reverse metabolism",<sup>10</sup> but this approach is not used for biomonitoring because of the risk of urine contamination during sampling as well as unexplained variability.<sup>11</sup> Analysis of urinary metabolites of PAHs is more appropriate. Once PAHs have been absorbed, they undergo metabolic transformation mediated by enzymes of the CYP450 family to form epoxides.<sup>12</sup> These reactive compounds can react with glutathione. They can also spontaneously rearrange to form phenols or be catalytically hydrolyzed to form dihydrodiols.<sup>13</sup> These hydroxylated metabolites are excreted in feces or urine in the form of sulfate or glucuronide conjugates.<sup>14</sup>

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

<sup>b</sup>Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, Département de Biochimie Toxicologie Pharmacologie, Pole de Biologie, CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

Over the past 20 years, internal exposure has been determined by assessment of urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), the mono-hydroxylated metabolite of pyrene.<sup>15</sup> However, pyrene is not carcinogenic and the ratio between atmospheric concentrations of pyrene and BaP or carcinogenic PAHs varies depending on emission sources. Thus, exposure to carcinogenic compounds cannot be extrapolated automatically from urinary 1-OHP levels. Inversely, 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene (3-OHBAp), a metabolite of BaP, could possibly assess internal exposure more accurately in relation to the carcinogenic potential.<sup>16</sup> It is difficult to use because of the high sensitivity of the analytical method required for biomonitoring. Levels of urinary 3-OHBAp were in fact 1000 to 30 000 times lower than those of 1-OHP in the urine of workers exposed to creosote or to coke-ovens, as well as in dermatological patients after treatment with a coal tar ointment.<sup>15,17,18</sup> This can be explained by metabolism of BaP in the form of many metabolites such as phenols, diols, triols, quinones, tetraols or epoxydes, and by their predominant elimination in feces, *via* biliary excretion.<sup>19</sup> Thus, levels of urinary 3-OHBAp are very low, in the range of pmol L<sup>-1</sup> (ng L<sup>-1</sup>), and most analytical methods previously published were not sufficiently sensitive to discriminate environmental exposures. The use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)<sup>20</sup> or standard gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)<sup>21</sup> made it possible to reach limits of detection (LOD) in the range of nmol L<sup>-1</sup> (μg L<sup>-1</sup>). Romanoff *et al.*<sup>22</sup> and Sarkar *et al.*<sup>23</sup> obtained better sensitivity using isotope-dilution gas chromatography-high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS) and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), respectively. However, these promising techniques for biomonitoring are currently available only in research laboratories and additional tedious analyte derivatization step is necessary. Most analytical methods described used high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLUO).<sup>17,24-28</sup> With this technique, the lowest detection and quantification limits of urinary 3-OHBAp published were 0.3 pmol L<sup>-1</sup> (0.08 ng L<sup>-1</sup>) and 0.9 pmol L<sup>-1</sup> (0.25 ng L<sup>-1</sup>), respectively.<sup>26</sup> The HPLC system consisted of two chromatographic pumps, four automated switching valves, three purification columns and one analytical column. This method was used to perform urinary 3-OHBAp analysis among workers in different workplaces<sup>29</sup> and also among non-occupationally exposed people.<sup>30</sup> However, it is not easy to use in routine analysis due to the complex switching system and home-made packed columns.

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

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

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

### Apparatus

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

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

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

### Creatinine and 1-OHP analysis

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

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

#### Development and validation of 3-OHBAp analysis

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

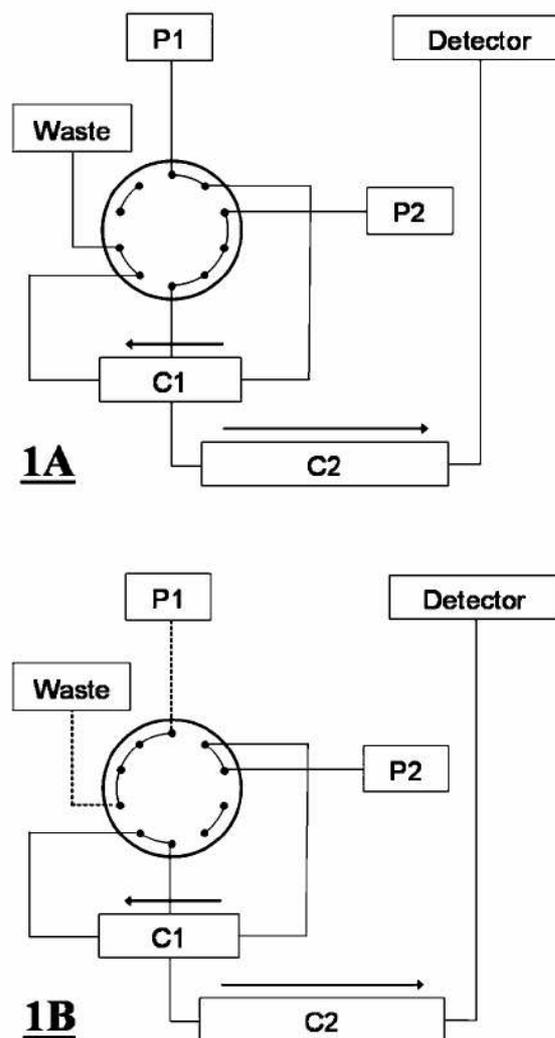
The first step consisted of washing the needle and the external tubing with 2 mL of methanol. Between each step, the needle and the transfer tubing of the dilutor were rinsed with 1 mL of methanol and a 30 µL air gap was generated inside the transfer tubing before aspiration of other liquids in order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

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

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

**Table 1** Automated solid-phase extraction scheme

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



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

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

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

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

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

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

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

**Analytical validation.** The analytical validation procedure was in accordance with the recommendations of the French Standardized Technical Specifications<sup>34</sup> and those of the French Society of Pharmaceutical Science and Technology.<sup>35</sup> Extraction recovery, linearity, accuracy, precision, LOD and limit of quantification (LOQ) were determined. Unfortunately, no external quality control or no Certified Reference Materials exist for 3-OHBAp analysis in urine.

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

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

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

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

### Study population

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

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

## Results and discussion

### Optimization of the extraction method

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

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

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

### Chromatographic conditions

Sensitivity is much better when background noise is low, which implies excellent chromatographic separation of the compounds. Sample clean-up can be improved by increasing the number of columns<sup>26</sup> or by using special columns.<sup>28</sup> For trace determination of urinary 3-OHBP with a more conventional system, the performances of the mobile and solid phases had to be optimized.

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

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

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

To perform the detection, many couples of wavelengths were proposed in the literature: 248/439 nm, 265/430 nm, 262/439 nm or 425/460 nm ( $\lambda$  excitation/ $\lambda$  emission).<sup>16,26–28,39</sup> In order to

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

Finally, the run time was set at 45 min so that the columns were fully reconditioned before the next injection, in accordance with other data.<sup>26,39</sup>

### Method performance

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

Gundel *et al.* obtained a LOD of 22.4  $\text{pmol L}^{-1}$  (6  $\text{ng L}^{-1}$ ) combining off-line and on-line SPE.<sup>28</sup> However, this sensitivity was not sufficient for urinary 3-OHBP monitoring and an expensive “tailor-made” pre-column was necessary. Ariese *et al.*<sup>17</sup> reached a LOD of 1.9  $\text{pmol L}^{-1}$  (0.5  $\text{ng L}^{-1}$ ) with only one C<sub>18</sub> column, but with a time-consuming derivatization step of 3-OHBP and a sophisticated laser-excited Shpol'skii spectrometry detector. Only use of four columns with different stationary phases made it possible to reach an LOD of 0.3  $\text{pmol L}^{-1}$  (0.08  $\text{ng L}^{-1}$ ) and an LOQ of 0.9  $\text{pmol L}^{-1}$  (0.25  $\text{ng L}^{-1}$ ).<sup>26</sup> However, this approach used a complex home-made switching system and the four columns had to be packed in the laboratory. To obtain a LOQ of 0.2  $\text{pmol L}^{-1}$  (0.05  $\text{ng L}^{-1}$ ), Sarkar *et al.* recently developed a method using a new sensitive system, *i.e.* Acquity UPLC® coupled with AB/Sciex API 5000®.<sup>23</sup> However, this promising technique for biomonitoring is currently available only in research laboratories and requires tedious analyte derivatization step.

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

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

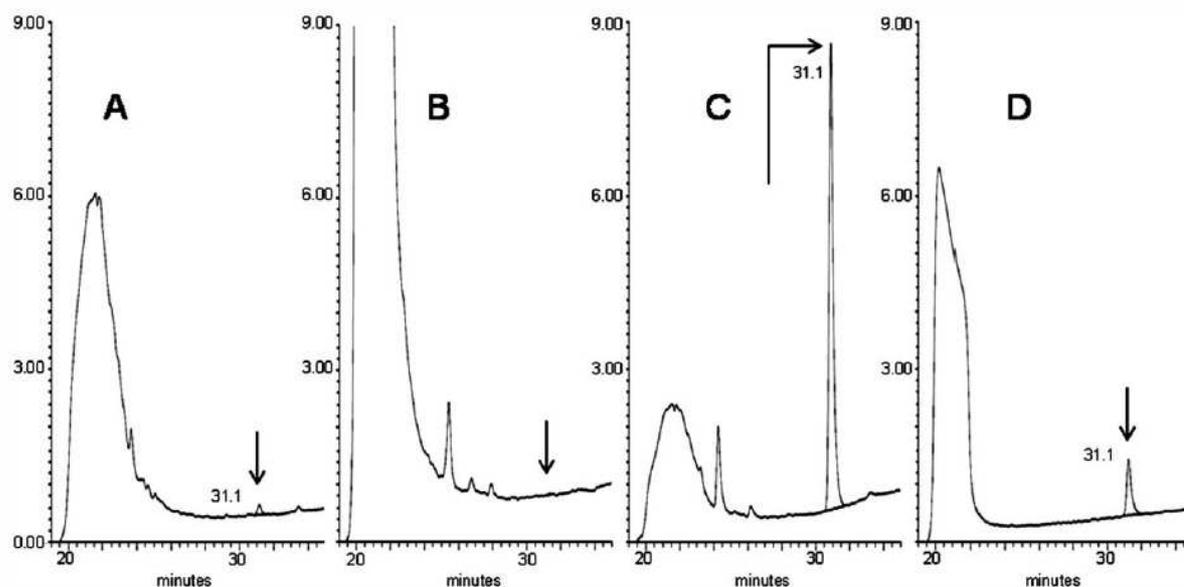


Fig. 2 Chromatograms of human urine samples: (A) smoker, 3-OHBAp = 0.7 pmol L<sup>-1</sup> (0.2 ng L<sup>-1</sup>); (B) non-smoker, 3-OHBAp < 0.2 pmol L<sup>-1</sup> (0.05 ng L<sup>-1</sup>); (C) spiked blank urine with SPE step, 3-OHBAp = 37.3 pmol L<sup>-1</sup> (10 ng L<sup>-1</sup>); (D) spiked blank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

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

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

#### Urinary analysis

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

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

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

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

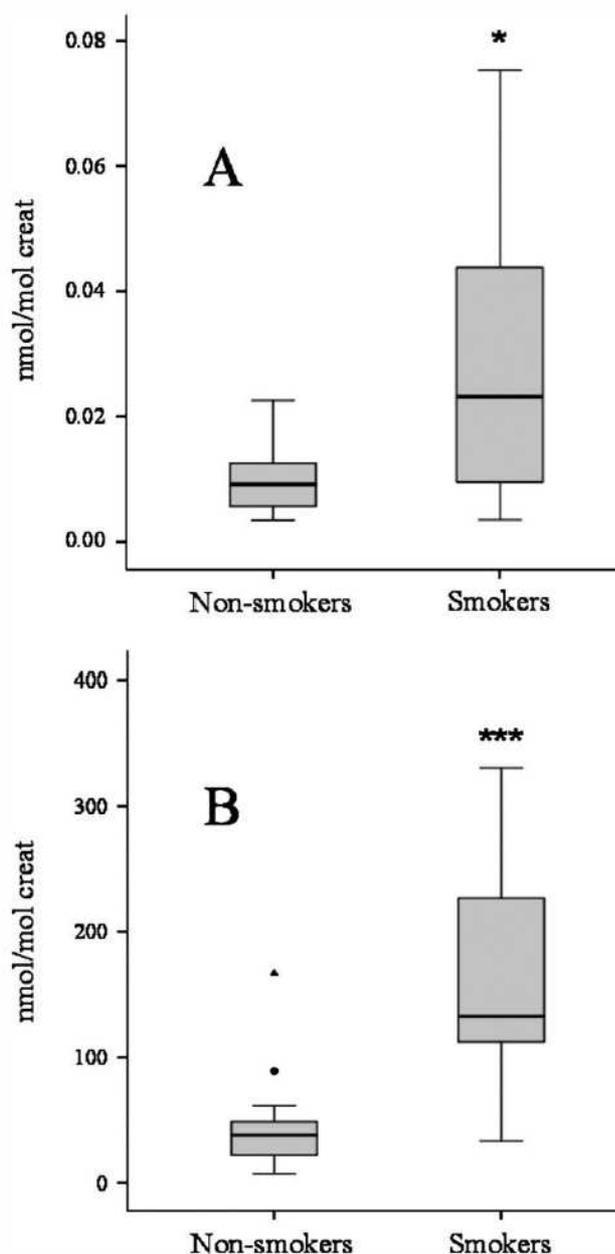
**Table 3** Urinary concentrations of 3-OHBAp and 1-OHP for smokers and non-smokers. Values corresponding to the median (med), minimum (min), maximum (max), mean ( $m$ )  $\pm$  standard deviation (SD), number of samples ( $n$ ) and number of samples with a concentration below the LOD ( $n < \text{LOD}$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

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

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

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

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



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

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

## Conclusion

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

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

## Acknowledgements

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

## References

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

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

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

**3. UTILISATION DU 3-HYDROXYBENZO(a)PYRENE  
DANS LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DE  
L'EXPOSITION AUX HYDROCARBURES  
AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DE  
POPULATIONS PROFESSIONNELLEMENT  
EXPOSEES**

### 3.1 Contexte scientifique

Peu d'études ont à ce jour évalué l'exposition aux HAP en site industriel par le dosage du 3OHBaP urinaire. Premièrement, le manque de sensibilité de plusieurs techniques de dosage a empêché la mise en évidence de différence entre les concentrations urinaires au sein de groupes exposés et non exposés [2, 12]. Deuxièmement, les résultats disponibles montrent une grande variabilité des niveaux de ce métabolite, mais également des ratios 1OHP/3OHBaP. Ces données confirment l'intérêt de procéder au dosage, par une méthode adaptée, du 3OHBaP dans les échantillons urinaires de salariés exposés à différentes sources d'émission de HAP.

Des niveaux extrêmement élevés ont été décrits dans le secteur de la fabrication de disques de carbone, avec une concentration urinaire maximum en 3OHBaP de 35 nmol/mol, tandis que des niveaux plus faibles mais supérieurs à ceux de témoins fumeurs ont été retrouvés dans le secteur de la créosote, avec une concentration urinaire minimum en 3OHBaP de 0,14 nmol/mol [38]. Une autre étude, a évalué les niveaux de 3OHBaP et de 1OHP dans les urines de fin de semaine fin de poste (FSFP) de plus de 200 salariés de quatre secteurs industriels différents [19]. Les médianes des niveaux de 3OHBaP étaient de 0,22 nmol/mol dans une usine de fabrication de coke, 0,46 nmol/mol dans la fabrication de pierres réfractaires, 0,51 nmol/mol dans une industrie de transformateurs et de 0,54 nmol/mol pour le secteur de production d'électrodes en graphite. Les ratios 1OHP/3OHBaP variaient de 1960 dans la production d'électrodes de graphite à 10140 dans la production de coke, démontrant une forte variation de la composition des sources d'HAP et particulièrement des ratios BaP/pyrène dans ces différentes industries et confirmant l'impossibilité d'évaluer précisément le risque cancérogène lié à l'exposition au BaP par le dosage du 1OHP uniquement. En revanche, les deux métabolites étaient bien corrélés dans chacun des secteurs, traduisant une certaine homogénéité des ratios

BaP/pyrène au sein d'une même industrie. Il est important de noter que ces résultats ont été obtenus à partir d'échantillons urinaires de FSFP, alors que la cinétique d'élimination du 3OHBaP est plus lente que celle du 1OHP. En effet, Gendre et al. a montré que la moyenne du temps de décalage entre leur pic d'excrétion respectif était de 15 heures [21]. En ce sens, l'INRS recommande de réaliser un prélèvement urinaire le lendemain matin de l'exposition (soit en fin de semaine fin de poste + 16 heures (FSFP+16)), pour la réalisation du dosage du 3OHBaP [50]. Dans l'étude de Forster et al., le risque est donc une sous-estimation de l'exposition des salariés au BaP. Pourtant, les niveaux urinaires relevés dans les secteurs étudiés sont de dix à plus de vingt fois supérieurs à ceux rencontrés chez des témoins fumeurs non exposés professionnellement.

Une valeur limite de 3OHBaP dans les urines de FSFP+16 égale à 0,4 nmol/mol a été proposée par l'INRS [50]. Cette valeur correspond aux niveaux attendus de 3OHBaP dans les urines de FSFP+16 de salariés exposés à une concentration en BaP égale à la valeur guide proposée par la CNAM, c'est à dire 150 ng/m<sup>3</sup>. Néanmoins, le défaut de cette approche est d'utiliser une corrélation mathématique entre des niveaux urinaires de 3OHBaP et des niveaux atmosphériques de BaP, alors que l'absorption cutanée au poste de travail est une voie importante d'exposition aux HAP.

Le but de notre travail est d'évaluer les niveaux biologiques de 3OHBaP issus de l'exposition aux HAP, dans le secteur de la fabrication du silicium et celui de la fabrication d'électrodes de carbone. La cinétique d'élimination de ce métabolite a également été étudiée par la comparaison des concentrations obtenues dans les urines de début de semaine début de poste après 48 h sans exposition (DSDP), de FSFP et de FSFP+16. Enfin, les résultats ont été comparés aux niveaux de 1OHP obtenus dans ces mêmes échantillons urinaires.

Par ce travail, l'utilisation en routine de la méthode analytique mise au point, la pertinence et les modalités d'utilisation du 3OHBaP urinaire en tant biomarqueur d'exposition aux HAP, ont été évaluées.

## **3.2 Matériel et méthode**

### **3.2.1 Population de l'étude**

Le groupe était constitué de 82 sujets de sexe masculin travaillant dans des usines de production de silicium (N=38) et d'électrodes de carbones (N=44) de la région Rhône-Alpes. La distribution de l'âge et la consommation de cigarettes étaient équivalentes dans les deux secteurs ( $p>0,05$ ).

### **3.2.2 Modalités de recueil des urines**

Chaque salarié a réalisé les prélèvements urinaires suivant :

- En DSDP à son arrivée sur le site industriel, le premier jour de sa semaine de travail et avant sa prise de fonction,
- En FSFP après son avant dernière journée de travail de la semaine et avant son départ du site,
- En FSFP+16 à son arrivée sur le site industriel, le dernier jour de sa semaine de travail et avant sa prise de fonction.

Les urines ont été prélevées dans des pots en polypropylène de 50 mL, puis stockées à +4°C sur site. Immédiatement après, elles ont été transportées en boîte isothermes et congelées à -80°C au CHU de Grenoble. Au total 246 échantillons urinaires ont été récoltés.

### 3.2.3 Réalisation des dosages

Les urines étaient précédemment décongelées à +4°C durant la nuit.

Sur chacun des prélèvements urinaires ont été dosés :

- Le 3OHBaP par la technique analytique détaillée dans le précédent chapitre [5].  
Brièvement, un aliquot urinaire de 10 mL est soumis à hydrolyse enzymatique et à une étape de SPE, puis le 3OHBaP est quantifié par HPLC-FLD,
- Le 1OHP par une technique analytique déjà décrite dans la littérature [40]. Brièvement, un aliquot urinaire de 2 mL est soumis à hydrolyse enzymatique puis le 1OHP est quantifié par HPLC-FLD,
- La créatinine par une méthode modifiée de la réaction de Jaffé.

Seuls les salariés dont les concentrations de créatinine urinaire, pour les trois moments de prélèvements, étaient comprises entre 0,3 g/L et 3 g/L ont été inclus dans l'étude. Au total 492 dosages de métabolites de HAP ont été réalisés en HPLC-FLD, dont 246 après une extraction en phase solide.

### 3.2.4 Statistiques utilisés

Les résultats du dosage des deux biomarqueurs à chaque moment de prélèvement et dans chacun des groupes de salariés ont été décrits par :

- La médiane, le minimum et le maximum,
- La moyenne géométrique et le 95<sup>ème</sup> percentile,
- L'effectif et le nombre de dosage inférieur à la LD.

Les concentrations urinaires qui étaient inférieures à la LD, quelle que soit l'analyse concernée, ont été remplacées par la moitié de la valeur de la LD. Le risque d'erreur ( $\alpha$ ) de tous les tests statistiques a été fixé à 5 % (0,05).

La distribution des concentrations urinaires n'était pas gaussienne, avec beaucoup de faibles valeurs et quelques valeurs extrêmes. C'est pourquoi les concentrations urinaires en nmol/mol ont été mathématiquement transformées en leur logarithme népérien. Le test non paramétrique de Shapiro-Wilk a été utilisé pour s'assurer que la distribution de ces valeurs transformées suivait une loi normale. Ainsi, à partir de ces valeurs transformées, la significativité des différences entre les moyennes des concentrations des groupes, a été évaluée par le test paramétrique de Student (séries indépendantes et appariées) et les relations entre les biomarqueurs ont été étudiées par le coefficient de corrélation linéaire de Pearson ( $r$ ).

### **3.3 Résultats**

#### **3.3.1 Concentrations urinaires de 3OHBaP**

Les niveaux urinaires de 3OHBaP, pour les deux secteurs industriels, sont synthétisés dans le tableau VI et représentés dans la figure 9 (l'échelle a été volontairement tronquée à 2,0 nmol/mol afin de faciliter la lecture graphique).

	3OHBaP DSDP (nmol/mol)	3OHBaP FSFP (nmol/mol)	3OHBaP FSFP+16 (nmol/mol)
		méd [min-max] m ; 95 <sup>ème</sup> N (n<LD)	
SILICIUM	0,02 [0,01-0,93] 0,03 ; 0,22 38 (9)	0,15 [0,01-1,09] 0,15 ; 0,74 38 (2)	0,16 [0,01-1,21] 0,17 ; 1,14 38 (1)
ELECTRODES DE CARBONE	0,10 [0,01-0,93] 0,09 ; 0,39 44 (0)	0,40 [0,03-14,00] 0,37 ; 2,89 44 (0)	0,40 [0,02-9,09] 0,38 ; 4,59 44 (0)

Tableau VI. Concentrations urinaires de 3OHBaP chez des salariés exposés aux HAP dans les secteurs de la production du silicium et d'électrodes de carbone. Méd, médiane ; min, minimum ; max, maximum ; m, moyenne géométrique ; 95<sup>ème</sup>, 95<sup>ème</sup> percentile ; N, effectif ; n<LD, nombre de concentrations inférieures à la limite de détection.

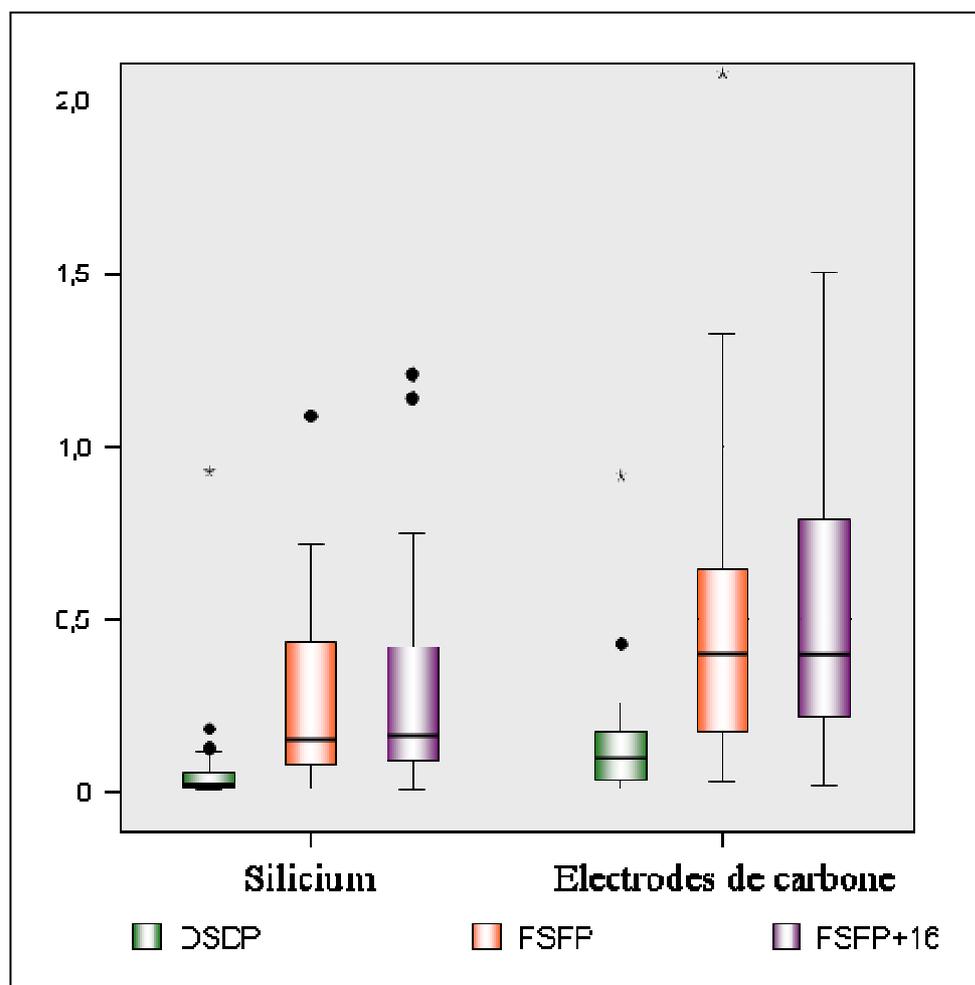


Figure 9. Boîtes à moustaches représentant les niveaux urinaires de 3OHBaP (nmol/mol). Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25<sup>ème</sup> percentile, la médiane, le 75<sup>ème</sup> percentile et le maximum, lorsque les valeurs extérieures (●) et extrêmes (\*), qui sont respectivement supérieures à 1,5 et 3 fois l'espace interquartile, sont écartées.

Dans le secteur de la production de silicium, 24 % des échantillons de DSDP sont inférieurs à la LD alors qu'ils ne sont que 5 % et moins de 3% à l'être, dans les échantillons de FSFP et FSFP+16, respectivement. Les niveaux en FSFP+16 sont environ 7 fois plus élevés qu'en DSDP ( $p < 0,001$ ). En revanche, ces mêmes niveaux de FSFP+16 ne diffèrent pas de ceux des urines de FSFP ( $p > 0,5$ ). La valeur maximum est retrouvée dans une urine de FSFP+16 avec une concentration de 3OHBaP égale à 1,21 nmol/mol.

Dans le secteur de la production d'électrodes de carbone, aucun échantillon n'est inférieur à la LD quel que soit le moment de prélèvement. Les niveaux en FSFP+16 sont environ 4 fois plus élevés qu'en DSDP ( $p < 0,001$ ). En revanche, de la même façon que dans le secteur du silicium, ces niveaux de FSFP+16 ne diffèrent pas de ceux des urines de FSFP ( $p > 0,5$ ). La valeur maximum est retrouvée dans une urine de FSFP avec une concentration de 3OHBaP égale à 14 nmol/mol.

Les concentrations urinaires de 3OHBaP sont 2 à 3 fois plus élevées dans le secteur de la production d'électrodes de carbone que dans celui de la production de silicium aux trois moments de prélèvements (respectivement  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,01$ ). De plus, dans ce secteur de production d'électrodes de carbone, 50 % des salariés avaient un niveau de 3OHBaP en FSFP+16 supérieur à la valeur guide de 0,4 nmol/mol, contre 26 % dans le secteur de la production de silicium.

### 3.3.2 Concentrations urinaires de 1OHP

Les niveaux de 1OHP urinaire pour les deux secteurs industriels sont synthétisés dans le tableau VII et représentés dans la figure 10 (l'échelle a été volontairement tronquée à 3000 nmol/mol afin de faciliter la lecture graphique).

	1OHP DSDP (nmol/mol)	1OHP FSFP (nmol/mol)	1OHP FSFP+16 (nmol/mol)
		méd [min-max] m ; 95 <sup>ème</sup> N (n<LD)	
SILICIUM	150 [10-590] 135 ; 505 38 (0)	520 [90-2870] 522 ; 2785 38 (0)	330 [60-1500] 364 ; 1386 38 (0)
ELECTRODES DE CARBONE	280 [50-3780] 303 ; 2425 44 (0)	1150 [210-12270] 1258 ; 9338 44 (0)	620 [90-9690] 797 ; 5793 44 (0)

Tableau VII. Concentrations urinaires de 1OHP chez des salariés exposés aux HAP dans les secteurs de la production du silicium et d'électrodes de carbone. méd, médiane ; min, minimum ; max, maximum ; m, moyenne géométrique ; 95<sup>ème</sup>, 95<sup>ème</sup> percentile ; N, effectif ; n<LD, nombre de concentrations inférieures à la limite de détection.

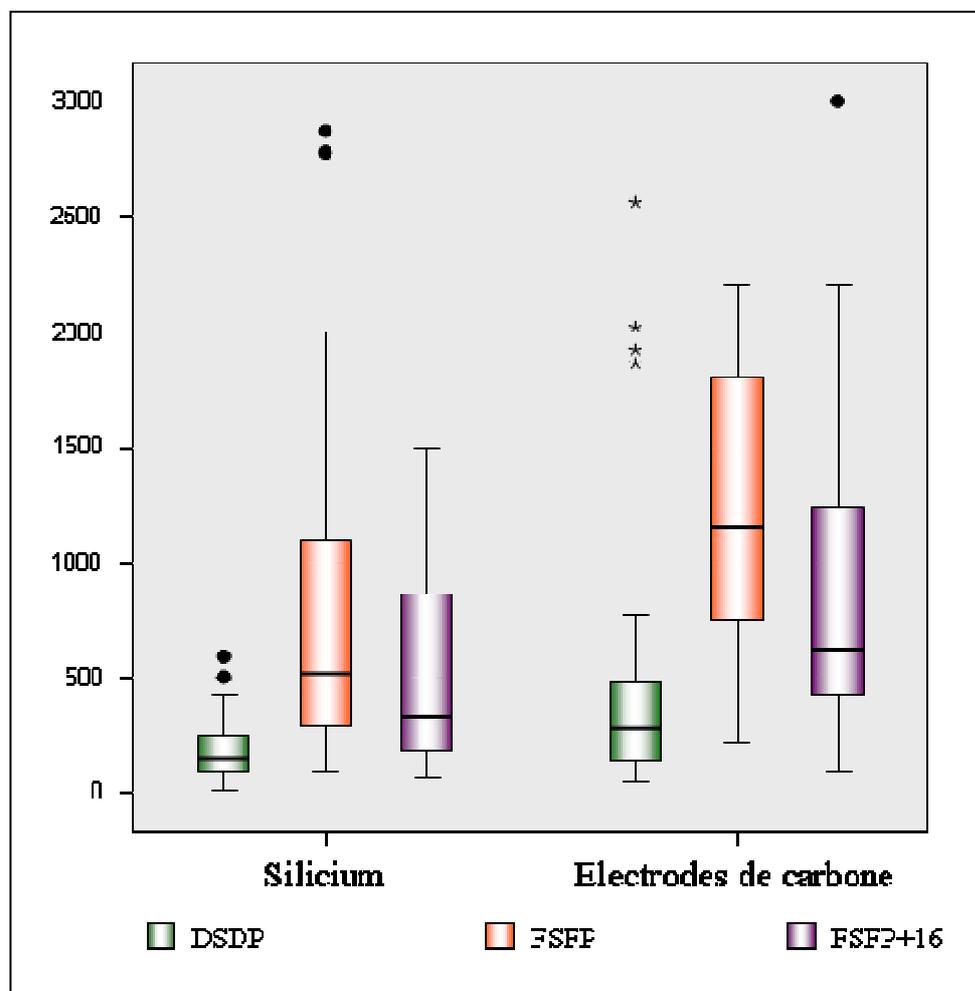


Figure 10. Boîtes à moustaches représentant les niveaux urinaires de 1OHP (nmol/mol). Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25<sup>ème</sup> percentile, la médiane, le 75<sup>ème</sup> percentile et le maximum, lorsque les valeurs extérieures (•) et extrêmes (\*), qui sont respectivement supérieures à 1,5 et 3 fois l'espace interquartile, sont écartées.

Dans le secteur de la production de silicium, aucun échantillon n'est inférieur à la LD quel que soit le moment de prélèvement. Les niveaux en FSFP sont environ 3,5 fois plus élevés qu'en DSDP ( $p < 0,001$ ). Les niveaux en FSFP+16 sont environ 2,5 fois plus élevés qu'en DSDP ( $p < 0,001$ ) et 1,5 fois plus faibles qu'en FSFP ( $p < 0,001$ ). La valeur maximum est retrouvée dans une urine de FSFP avec une concentration de 1OHP égale à 2870 nmol/mol.

De façon identique, aucun échantillon n'est inférieur à la LD quel que soit le moment de prélèvement dans le secteur de la production d'électrodes de carbone. Les niveaux en FSFP sont

environ 4 fois plus élevés qu'en DSDP ( $p < 0,001$ ). Les niveaux en FSFP+16 sont environ 2,5 fois plus élevés qu'en DSDP ( $p < 0,001$ ) et 1,5 fois plus faibles qu'en FSFP ( $p < 0,001$ ). La valeur maximum est retrouvée dans une urine de FSFP avec une concentration de 1OHP égale à 12270 nmol/mol.

Les concentrations urinaires de 1OHP sont environ 2 fois plus élevées dans le secteur de la production d'électrodes de carbone que dans celui de la production de silicium aux trois moments de prélèvements (respectivement  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  et  $p < 0,001$ ).

### **3.3.3 Influence du tabac sur les niveaux**

Quel que soit le secteur étudié, les concentrations urinaires de 3OHBaP ne diffèrent pas entre les salariés fumeurs et les salariés non fumeurs pour les prélèvements de DSDP, FSFP et FSFP+16 ( $p > 0,05$ ). La même constatation est faite pour les concentrations urinaires de 1OHP, sauf pour les prélèvements de DSDP dans le secteur de la production de silicium, où les niveaux sont significativement plus élevées chez les sujets fumeurs ( $p < 0,05$ ).

### **3.3.4 Etude des ratios 1OHP/3OHBaP**

Les ratios des concentrations de 1OHP en FSFP sur les concentrations en 3OHBaP en FSFP+16 ( $1OHP_{FSFP}/3OHBaP_{FSFP+16}$ ) et des concentrations de 1OHP en FSFP sur les concentrations de 3OHBaP en FSFP ( $1OHP_{FSFP}/3OHBaP_{FSFP}$ ) ont été calculés dans chacun des secteurs industriels (tableau VIII et figure 11).

	1OHP <sub>FSFP</sub> /3OHBaP <sub>FSFP+16</sub>	1OHP <sub>FSFP</sub> /3OHBaP <sub>FSFP</sub>
	méd [min-max]	
SILICIUM	3709 [157-21264]	3590 [415-24012]
ELECTRODES DE CARBONE	3372 [202-18928]	3665 [723-13969]

Tableau VIII. Ratios 1OHP/3OHBaP à différents temps de prélèvement dans le secteur du silicium et des électrodes de carbone. Méd, médiane ; min, minimum ; max, maximum.

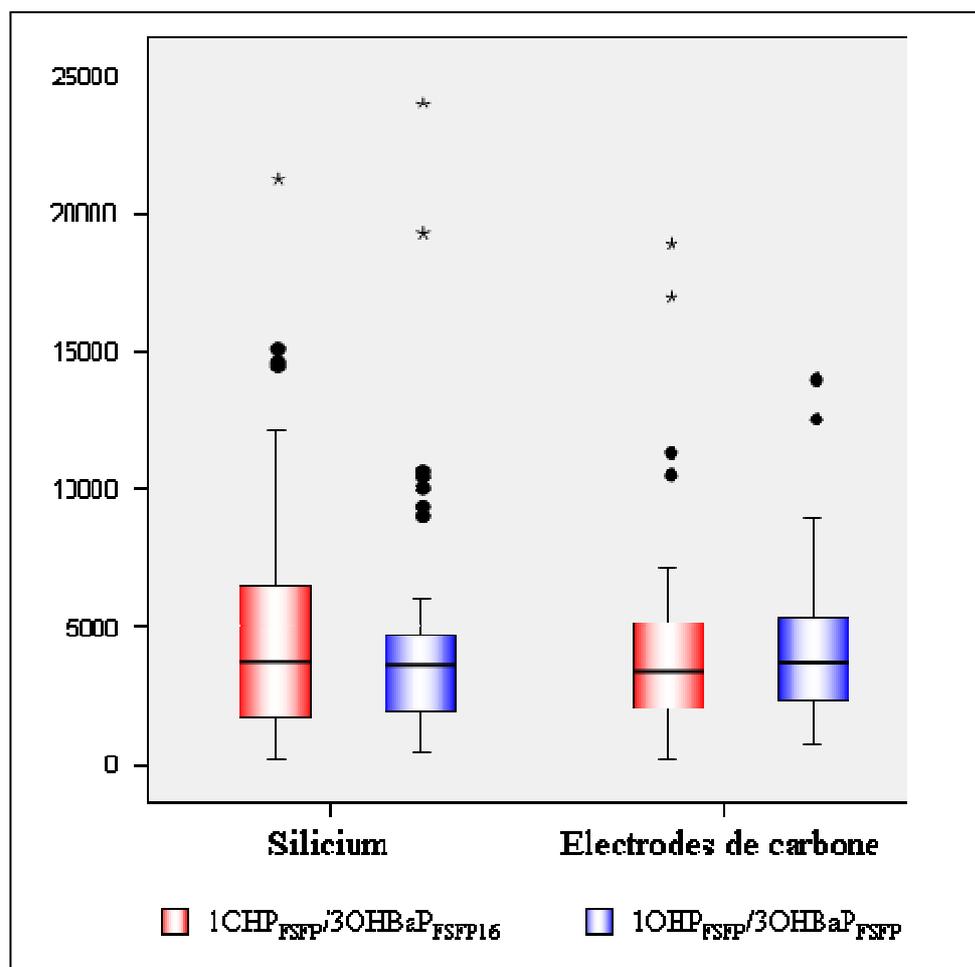


Figure 11. Boîtes à moustaches représentant les ratios 1OHP/3OHBaP. Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25<sup>ème</sup> percentile, la médiane, le 75<sup>ème</sup> percentile et le maximum, lorsque les valeurs extrêmes (●) et extrêmes (\*), qui sont respectivement supérieures à 1,5 et 3 fois l'espace interquartile, sont écartées.

Aucune différence significative n'a été observée, ni entre les deux secteurs pour chacune des variables ( $p > 0,5$ ), ni entre les deux variables dans chacun des secteurs ( $p > 0,5$ ).

### 3.3.5 Corrélations ente les niveaux de 3OHBaP et de 1OHP

Les concentrations de 3OHBaP en FSFP+16 ont été corrélées à celles de 1OHP en FSFP (figure 12). Pour les deux secteurs industriels, la corrélation était significative. Néanmoins, elle était meilleure pour le groupe de la production d'électrodes de carbone ( $r=0,739$  ;  $n=44$ ,  $p<0,001$ ), que pour celui de la production de silicium ( $r=0,414$  ;  $n=38$ ,  $p<0,01$ ).

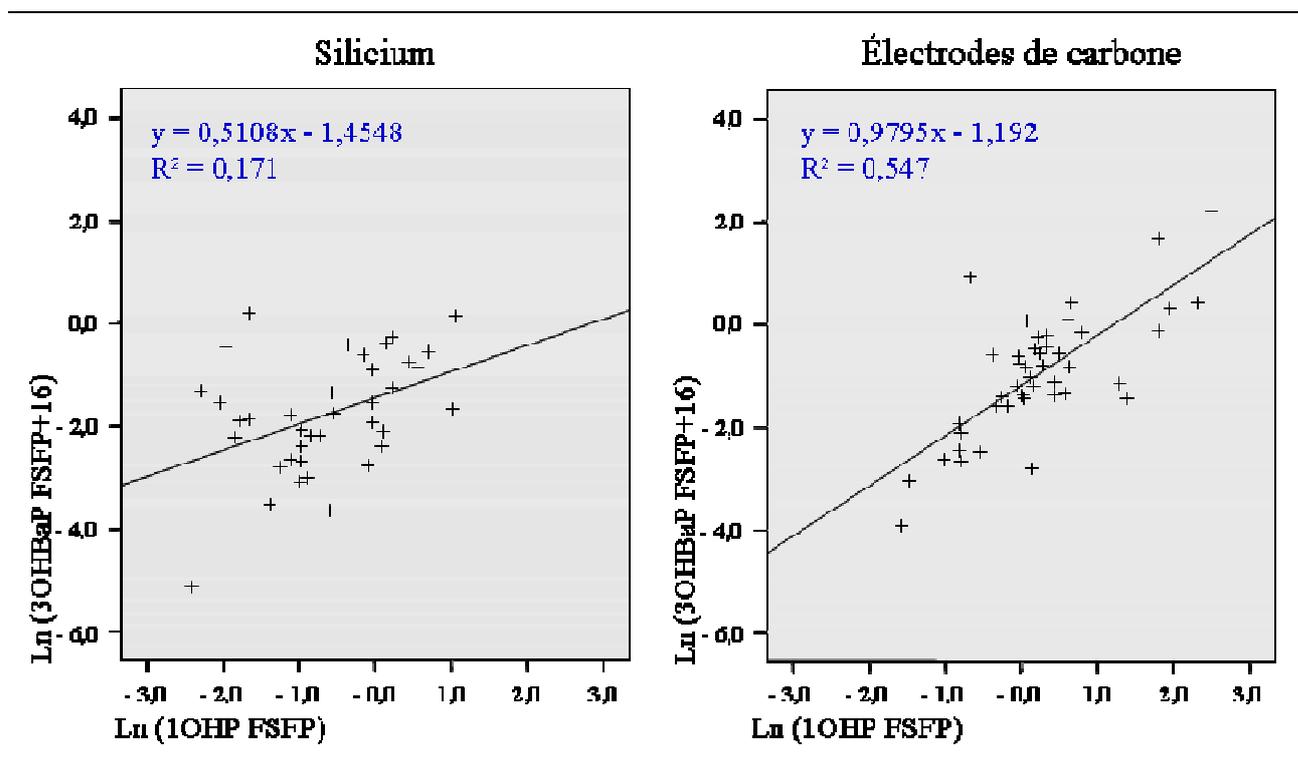


Figure 12. Corrélations, pour chaque secteur industriel, des logarithmes népériens des concentrations de 3OHBaP en FSFP+16 et de 1OHP en FSFP. Les équations des droites de régression sont affichées en haut à gauche des graphiques, suivies des coefficients de détermination ( $R^2$ ).

Les concentrations de 3OHBaP en FSFP ont également été corrélées à celles de 1OHP en FSFP (figure 13). Pour les deux secteurs industriels, la corrélation était significative et meilleure que la précédente. Encore une fois, elle était plus forte pour le groupe de la production d'électrodes de carbone ( $r=0,835$  ;  $n=44$ ,  $p<0,001$ ) que pour celui de la production de silicium ( $r=0,706$  ;  $n=38$ ,  $p<0,001$ ).

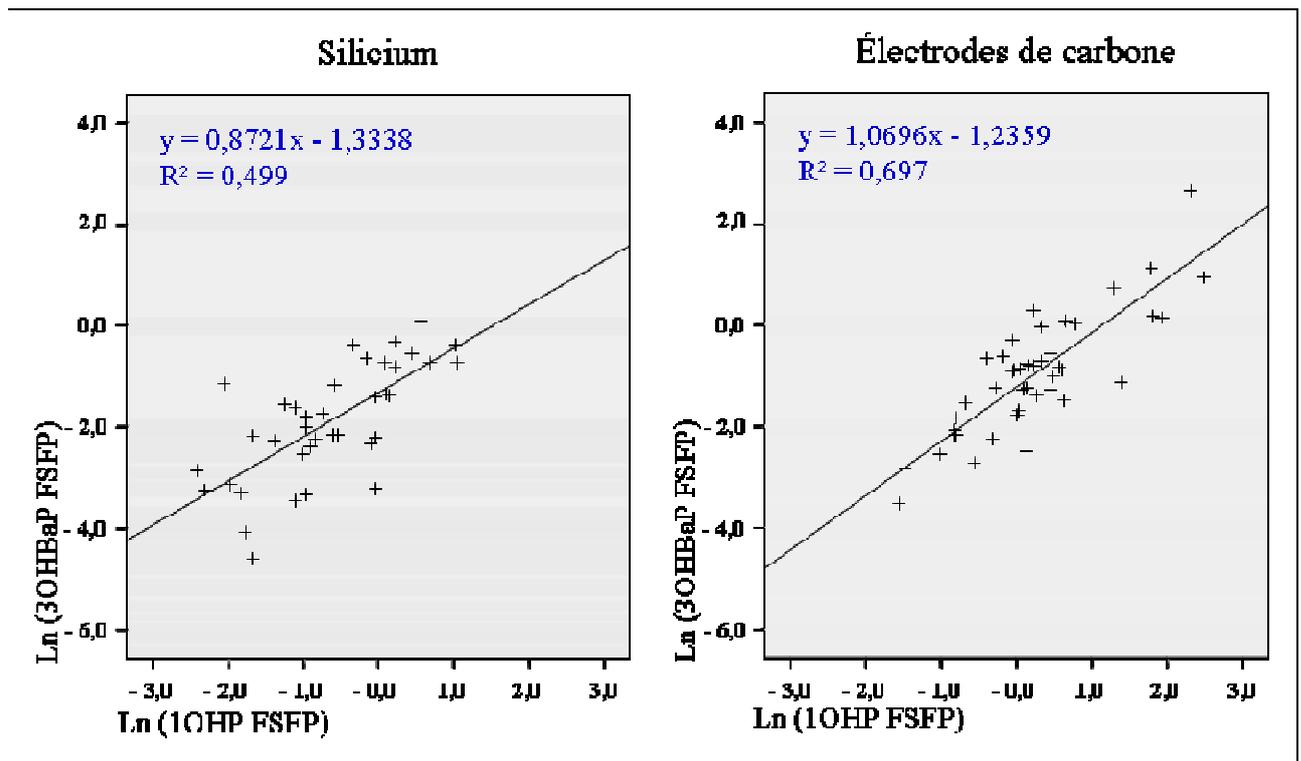


Figure 13. Corrélations, pour chaque secteur industriel, des logarithmes népériens des concentrations de 3OHBaP et de 1OHP en FSFP. Les équations des droites de régression sont affichées en haut à gauche des graphiques, suivies des coefficients de détermination ( $R^2$ ).

A partir de l'équation des droites de régression, la valeur de 1OHP urinaire correspondant à une concentration en 3OHBaP en FSFP+16 égale à 0,4 nmol/mol a été calculée. Dans le secteur de la production de silicium, la concentration attendue de 1OHP était de 2,87  $\mu\text{mol/mol}$  en FSFP, tandis que dans le secteur de la production d'électrodes de carbone, la concentration attendue de 1OHP était de 1,33  $\mu\text{mol/mol}$  en FSFP.

### 3.4 Discussion

Sur les 492 dosages réalisés dans cette étude, moins de 3 % des échantillons avaient une concentration urinaire en 3OHBaP ou en 1OHP inférieure aux LD. Seules les concentrations de 3OHBaP issus du secteur de la production de silicium étaient concernées et 75 % d'entre elles (N=9) ont été retrouvés dans les urines de DSDP. Ce résultat est expliqué par l'élimination des métabolites pendant la période de 48 heures sans activité qui précède les dosages de DSDP. Les techniques analytiques utilisées ont donc démontré leur capacité à réaliser la surveillance biologique de l'exposition professionnelle aux HAP dans les secteurs étudiés.

Par rapport aux niveaux obtenus chez des sujets fumeurs [5], les concentrations de 3OHBaP sont respectivement 7 fois plus élevés dans le secteur du silicium et 17 fois plus élevés dans celui des électrodes de carbone. Les niveaux de 1OHP sont respectivement 2,5 fois et 4,5 fois plus élevés. La différence d'augmentation des concentrations urinaires des deux biomarqueurs s'explique principalement par la proportion de BaP plus importante dans les sources d'émission industrielles étudiées que dans le mélange issu de la combustion du tabac, et dans une moindre mesure par la quantité de pyrène plus élevée que celle de BaP dans la fumée de cigarette [15]. Cet accroissement plus marqué des niveaux de 3OHBaP prouve sa spécificité en tant que biomarqueur d'exposition aux HAP dans les secteurs étudiés, avec une influence négligeable du facteur tabac sur ses niveaux urinaires.

Pour le secteur de la production des électrodes de carbone, les quantités urinaires de 3OHBaP mesurées sont comparables à celles relevées dans la littérature. En effet, dans notre travail, la médiane des concentrations en FSFP est égale à 0,40 nmol/mol alors que Forster et al. trouve une médiane égale à 0,54 nmol/mol au même moment de prélèvement dans les urines d'un groupe de 26 salariés de ce même secteur industriel [19]. L'intervalle des niveaux de 1OHP

mesuré dans notre travail (min = 210 nmol/mol ; max = 12270 nmol/mol) est proche des intervalles rapportés dans une revue de la littérature, bien que les niveaux maximum y soient souvent supérieurs [28]. Néanmoins, dix années séparent notre travail de l'étude la plus récente de cette revue de la littérature, laps de temps durant lequel des améliorations techniques ont pu être apportées aux postes de travail, diminuant ainsi l'exposition aux HAP.

A notre connaissance, aucune donnée concernant les niveaux de 3OHBaP dans le secteur du silicium n'a été publiée. Par contre, les médianes des concentrations de 1OHP en DSDP et en FSFP, respectivement égales à 150 et 520 nmol/mol dans notre étude, sont équivalentes à celles retrouvées par Marie et al. dans ce même secteur industriel [44].

En revanche, les résultats de la cinétique d'élimination des deux biomarqueurs présentés ici, diffèrent des données de la littérature. En effet, pour les deux secteurs industriels étudiés, les concentrations de 3OHBaP sont identiques entre les urines de FSFP et celles de FSFP+16, alors que Gendre et al. rapporte un maximum d'excrétion urinaire de ce métabolite 25,5 heures après l'exposition, soit le lendemain matin, dans un groupe de 42 salariés exposés [21]. De plus, Lafontaine et al. calcule une demi-vie d'élimination moyenne du 3OHBaP faisant suite à son maximum d'excrétion urinaire, égale à 8,8 heures dans un groupe de 38 salariés exposés [39]. Dans notre étude, les niveaux de 3OHBaP dans les urines de FSFP, soit 16 heures après le maximum d'excrétion lié à l'exposition de la veille, devraient donc être en moyenne 4 fois plus faibles que ceux de FSFP+16. De la même façon, Lafontaine et al., calcule une demi-vie d'élimination moyenne du 1OHP de 7,3 heures, ce qui implique des niveaux urinaires de ce métabolite dans les urines de FSFP+16 logiquement 4 fois plus faibles que ceux de FSFP, alors que dans notre travail ils ne le sont que de 1,5 fois. Nos résultats s'expliquent par l'accumulation des HAP dans l'organisme lors de la semaine de travail. En effet, dans notre étude, les salariés

ont été exposés aux HAP pendant une semaine complète d'activité professionnelle tandis que les études de Gendre et al. et de Lafontaine et al. ont été réalisées lors d'une unique journée de travail après 36 heures d'inactivité. Ainsi, une fois distribués dans l'organisme, et en particulier dans le tissu adipeux, les métabolites des HAP subissent un lent relargage dans la circulation générale, responsable d'une exposition diffuse et retardée dans le temps. Les niveaux mesurés en FSFP et en FSFP+16 sont donc liés aux expositions cumulées des différents jours de la semaine. Puisque le 1OHP possède un caractère hydrophobe moins marqué que le 3OHBaP (nombre de cycles aromatiques inférieur), son affinité pour le tissu adipeux est moindre, son élimination est donc plus rapide et ses niveaux varient entre les moments de prélèvements de FSFP et de FSFP+16 malgré l'accumulation durant la semaine. Cette affirmation semble néanmoins ne s'appliquer qu'en cas d'expositions à des niveaux élevés, puisque d'importantes variations dans les concentrations de 3OHBaP apparaissent entre les urines prélevées le soir et le lendemain matin chez des sujets fumeurs, alors que leur exposition est par définition chronique (résultats non publiés issus de la population générale).

L'effet du tabac sur les concentrations urinaires des deux biomarqueurs étudiés n'est visible que pour le dosage du 1OHP dans les prélèvements de DSDP des salariés du secteur de la production de silicium. Ceci s'explique par une augmentation des métabolites urinaires liée à l'exposition durant la semaine de travail plus importante que la hausse des niveaux induit par la consommation de cigarettes. Le 3OHBaP étant éliminé très lentement de l'organisme, sa concentration après 48 heures d'inactivité (après le repos hebdomadaire) est encore majoritairement issue de l'exposition de la semaine précédente, tandis que le 1OHP, éliminé plus rapidement, montre des niveaux en DSDP lié au tabagisme des sujets. Néanmoins, dans le secteur des électrodes de carbone, aucune différence n'est retrouvée dans les concentrations urinaires de 1OHP en DSDP chez les sujets fumeurs et non fumeurs, car les niveaux d'exposition

aux HAP y sont plus élevés que dans le secteur du silicium et la dose interne en 1OHP des salariés en fin de semaine plus importante, donc plus longue à être totalement éliminée de l'organisme. Ainsi, non seulement l'effet du tabac n'est observable durant la semaine de travail qu'en cas d'exposition professionnelle faible [12], mais également après le repos hebdomadaire, ce qui confirme l'accumulation des métabolites des HAP dans l'organisme lors de fortes expositions répétées.

Pour les deux secteurs étudiés, la moyenne des ratios 1OHP/3OHBaP ne diffère pas lorsque les dosages sont réalisés au même temps de prélèvement ou après la prise en compte du décalage dans la cinétique d'élimination urinaire du 3OHBaP. Ce résultat est facilement compréhensible du fait d'une absence de différence entre les niveaux de 3OHBaP en FSFP et en FSFP+16. Ces ratios sont relativement faibles et ne diffèrent pas en fonction du secteur étudié. Ceci confirme l'exposition des salariés à des mélanges d'HAP contenant une forte proportion de BaP au sein de ces activités, avec un risque cancérigène important. A titre de comparaison, les expositions à la créosote, dans lesquelles le BaP est moins présent, produisent des ratios de plus de 30 000, alors que dans les industries de l'électrometallurgie, ses derniers peuvent être inférieurs à 2000 [39].

Dans le secteur du silicium, les coefficients de détermination entre le 3OHBaP, dosé en FSFP+16 ou en FSFP, et le 1OHP dosé en FSFP sont inférieurs à 0,5. Ceci traduit une hétérogénéité des sources, et donc des mélanges d'HAP, auxquels les salariés sont exposés à travers les différentes activités de ce secteur. Il semble donc important de mieux caractériser les différentes tâches réalisées dans cette industrie, afin de connaître les postes les plus exposés au BaP. Gendre et al. fait la même constatation dans une usine de fabrication de pigeons d'argile avec un coefficient égal à 0,22 [22]. Pour l'industrie des électrodes, les coefficients de

détermination sont systématiquement supérieurs à 0,5 dans notre étude, indiquant une relative homogénéité des sources d'exposition. De plus, la valeur du coefficient issu de la corrélation des deux métabolites dosés au même temps de prélèvement (en FSFP) est proche de celle retrouvée par Forster et al dans les mêmes conditions de prélèvement au sein du secteur des électrodes de graphite [19]. En revanche, contrairement aux données de la littérature, nos corrélations sont meilleures lors du dosage des deux métabolites en FSFP que lors du dosage du 3OHBaP en FSFP+16 et du 1OHP en FSFP, pour les deux secteurs étudiés. En effet, Gendre et al. montre que l'analyse du 3OHBaP dans les échantillons de FSFP+16 permet d'obtenir une corrélation significative ( $r=0,59$ ) proche de celle obtenue en utilisant les prélèvements correspondant au maximum d'excrétion de chacun des métabolites ( $r=0,80$ ), alors qu'il ne trouve pas de corrélation lors du dosage des deux métabolites en FSFP ( $r=0,22$ ) [22]. Mais cette étude évalue l'exposition lors d'une unique journée de travail après un repos hebdomadaire, or, dans ce cas, le maximum d'excrétion du 3OHBaP se situe 25,5 heures après le début de l'exposition et les niveaux en fin de poste ne diffèrent pas de ceux de début de journée. Nos résultats montrent donc que pour les secteurs industriels étudiés, la dose interne de l'organisme en HAP liée à l'accumulation durant la semaine de travail est mieux évaluée par le dosage des deux biomarqueurs en FSFP, plutôt que lors de la prise en compte du retard d'élimination du 3OHBaP.

Bien que les corrélations entre les deux métabolites soient significatives, les équations des droites de régression varient entre les deux secteurs industriels. Ainsi, la concentration en 1OHP dans les urines de FSFP, calculée à partir des valeurs de 3OHBaP en FSFP+16, varie de plus de 100 % d'un secteur à l'autre. Ce résultat démontre l'impossibilité de l'utilisation unique du 1OHP dans la surveillance biologique des salariés, pour évaluer les risques sanitaires cancérigènes liés à l'exposition aux HAP.

## **4. CONCLUSION**

**THESE SOUTENUE PAR :** Damien Barbeau

**TITRE :** Mise au point du dosage du 3-hydroxybenzo[a]pyrène urinaire et utilisation de ce métabolite comme biomarqueur d'exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en populations générale et professionnellement exposée.

## CONCLUSION

La méthode de dosage mise au point lors de ce travail présente les caractéristiques de sensibilité, de fidélité et de justesse requises pour l'analyse du 3-hydroxybenzo[a]pyrène (3OHBaP) urinaire. La limite de détection est de 0,02 ng/L et la limite de quantification de 0,05 ng/L. Le coefficient de répétabilité est inférieur à 3%, le coefficient de fidélité intermédiaire inférieur à 4% et la déviation de la valeur cible est de 8% pour une concentration urinaire de 0,2 ng/L. Contrairement aux méthodes publiées, le système chromatographique utilisé est simple et commercialement disponible, permettant l'utilisation de cette technique en routine par de nombreux laboratoires de toxicologie.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) étant des polluants ubiquitaires, la connaissance des niveaux biologiques de 3OHBaP dans la population générale non exposée professionnellement est essentielle pour l'interprétation des résultats de salariés exposés. Les concentrations urinaires mesurées chez les sujets fumeurs sont faibles mais significativement plus élevées que celles des sujets non fumeurs, avec des médianes respectivement de 0,023 nmol/mol de créatinine (nmol/mol) et de 0,009 nmol/mol. En complément, l'utilisation de cette technique de dosage pour la surveillance biologique de populations professionnellement exposées aux HAP, a montré des niveaux 7 fois plus élevés dans le secteur de la production de silicium et 17 fois plus élevés dans celui de la production d'électrodes de carbone, que ceux des sujets fumeurs, confirmant le risque sanitaire lié à ces activités professionnelles. De plus, les

valeurs relativement basses des ratios 1-hydroxypyrrène/3-hydroxybenzo[a]pyrrène, attestent de la prépondérance du benzo[a]pyrrène au sein des sources d'exposition présentes dans ces deux secteurs industriels et donc, de leur caractère cancérogène.

Le dosage du 3OHBaP sur différentes mictions a permis d'affirmer que le moment optimal de prélèvement des urines se situait en fin de semaine fin de poste, lorsque l'exposition professionnelle se prolongeait pendant une semaine de travail.

Enfin, à partir des droites de régression issues de la corrélation entre les niveaux de 3OHBaP et de 1-hydroxypyrrène (1OHP) dans chacun des secteurs, la concentration calculée de 1OHP correspondant à la valeur limite de 0,4 nmol/mol proposée pour le 3OHBaP, était de 2,9 µmol/mol pour l'industrie du silicium et de 1,3 µmol/mol pour l'industrie des électrodes de carbone. Cette grande variabilité réaffirme le caractère sources dépendant de la composition des mélanges atmosphériques d'HAP et les limites de l'utilisation du 1OHP urinaire seul, mais souligne tout l'intérêt du dosage du 3OHBaP urinaire, comme biomarqueur d'exposition professionnelle aux HAP cancérogènes.

#### VU ET PERMIS D'IMPRIMER

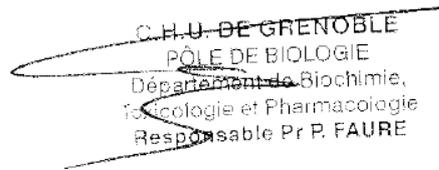
Grenoble, le 19/10/2011

LE DOYEN

  
Professeur Christophe Ribaud



LE PRESIDENT DE LA THESE

  
C.H.U. DE GRENOBLE  
PÔLE DE BIOLOGIE  
Département de Biochimie,  
Toxicologie et Pharmacologie  
Responsable Pr P. FAURE

Professeur Patrice Faure

## **BIBLIOGRAPHIE**

- [1] Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health*. 2007 May;210(3-4):201-28.
- [2] Ariese F, Verkaik M, Hoornweg GP, et al. Trace analysis of 3-hydroxy benzo[a]pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of analytical toxicology*. 1994 Jul-Aug;18(4):195-204.
- [3] ATDSR. Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons 1995.
- [4] Baek S, Field R, Goldstone M, Kirk P, Lester J, Perry R. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, Air, Soil Pollution*. 1991;60:279-300.
- [5] Barbeau D, Maitre A, Marques M. Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst*. 2011 Mar 21;136(6):1183-91.
- [6] Bauer E, Guo Z, Ueng YF, Bell LC, Zeldin D, Guengerich F. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*. 1995;8(1):136-42.
- [7] Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*. 1997 May;8(3):444-72.
- [8] Bouchard M, Viau C. Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicology and applied pharmacology*. 1996 Aug;139(2):301-9.
- [9] Bouchard M, Viau C. Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1997 Mar;75(3):185-92.
- [10] Bouchard M, viau C. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers*. 1999;4(3):159-87
- [11] Buening MK, Levin W, Karle JM, Yagi H, Jerina DM, Conney AH. Tumorigenicity of bay-region epoxides and other derivatives of chrysene and phenanthrene in newborn mice. *Cancer Res*. 1979 Dec;39(12):5063-8.
- [12] Buratti M, Campo L, Fustinoni S, et al. Urinary hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons as biomarkers of exposure in asphalt workers. *Biomarkers*. 2007 May-Jun;12(3):221-39.
- [13] Campo L, Rossella F, Fustinoni S. Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *Journal of chromatography*. 2008;875(2):531-40.

- [14] Campo L, Rossella F, Pavanello S, et al. Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers. *Toxicol Lett.* 2010;192(1):72-8.
- [15] Ding YS, Trommel JS, Yan XJ, Ashley D, Watson CH. Determination of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from domestic cigarettes. *Environ Sci Technol.* 2005 Jan 15;39(2):471-8.
- [16] Dipple A. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *IARC Sci Publ.* 1994(125):107-29.
- [17] Douki T, Ksoury Z, Marie C, Favier A, Ravanat JL, Maitre A. Genotoxicity of combined exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UVA--a mechanistic study. *Photochem Photobiol.* 2008 Sep-Oct;84(5):1133-40.
- [18] Fan R, Dong Y, Zhang W, et al. Fast simultaneous determination of urinary 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography.* 2006 May 19;836(1-2):92-7.
- [19] Forster K, Preuss R, Rossbach B, Bruning T, Angerer J, Simon P. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occupational and environmental medicine.* 2008 Apr;65(4):224-9.
- [20] French-Standardized-Technical-Specifications. Standard International Organization for Standardization (ISO) 15189:2003. Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence. Geneva: ISO 2003.
- [21] Gendre C, Lafontaine M, Delsaut P, Simon P. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene : Assessment of an appropriate sampling time. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 2004;24:433-9.
- [22] Gendre C, Lafontaine M, Morele Y, Payan JP, Simon P. Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 2002;22:761-9.
- [23] Gerde P, Muggenburg BA, Henderson RF. Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. III. Mechanisms of the dosimetry. *Toxicology and applied pharmacology.* 1993 Aug;121(2):328-34.
- [24] Grimmer G, Dettbarn G, Jacob J. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenanthrene and pyrene metabolites (phenols and dihydrodiols). *International archives of occupational and environmental health.* 1993;65(3):189-99.
- [25] Guignon N, Sandret N. Les expositions aux produits cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques. Paris: INRS; 2005.
- [26] Gundel J, Angerer J. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenz[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Jan 28;738(1):47-55.

- [27] Hagedorn H, Scherer G, Engl J, et al. Urinary excretion of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in nonsmokers and in smokers of cigarettes with different ISO tar yields. *J Anal Toxicol.* 2009;33(6):301-9.
- [28] Hansen AM, Mathiesen L, Pedersen M, Knudsen LE. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies--a review. *Int J Hyg Environ Health.* 2008 Oct;211(5-6):471-503.
- [29] Harvey RG. Activated metabolites of carcinogenic hydrocarbons. *Accounts of chemical research.* 1981;14(7):218-26.
- [30] Hemon-Delsaux J. Evaluation des niveaux d'exposition professionnelle aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et des pathologies cancéreuses associées. Grenoble: Université Joseph Fourier; 2004.
- [31] Hollender J, Koch B, Dott W. Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene hydroxides. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Feb 28;739(1):225-9.
- [32] IARC. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* WHO Press ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010:856.
- [33] Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *The Science of the total environment.* 1997 Jun 20;199(1-2):141-9.
- [34] Jongeneelen FJ, Bos RP, Anzion RB, Theuws JL, Henderson PT. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Metabolites in urine. *Scandinavian journal of work, environment & health.* 1986 Apr;12(2):137-43.
- [35] Kuklenyik Z, Ye X, Needham L, Calafat A. Automated solid-phase extraction approaches for large scale biomonitoring studies. *J Chromatogr Sci.* 2009;47(1):12-8.
- [36] Kuusimäki L, Peltonen Y, Mutanen P, Peltonen K, Savela K. Urinary hydroxy-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004;77(1):23-30.
- [37] Lafontaine M. Recherche de métabolites urinaires chez les ouvriers exposés aux HAP. In: procédés Id, ed.: INRS 2000.
- [38] Lafontaine M, Champmartin C, Simon P, Delsaut P, Funck-Brentano C. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers. *Toxicology letters.* 2006 Apr 10;162(2-3):181-5.
- [39] Lafontaine M, Gendre C, Delsaut P, Simon P. Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons : an approach for determining a biological limit value. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 2004;24:441-50.
- [40] Leroyer A, Jeandel F, Maitre A, et al. 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. *The Science of the total environment.* 2010 Feb 1;408(5):1166-73.

- [41] Marchand N, Besombes J, Masclet P, Jaffrezo J. Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Two French Alpine Valleys. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D, eds. *Environmental chemistry*. Berlin Heidelberg Germany: Springer 2005:409-17.
- [42] Marie-Desvergne C, Maitre A, Bouchard M, Ravanat JL, Viau C. Evaluation of DNA adducts, DNA and RNA oxidative lesions, and 3-hydroxybenzo(a)pyrene as biomarkers of DNA damage in lung following intravenous injection of the parent compound in rats. *Chem Res Toxicol*. 2010 Jul 19;23(7):1207-14.
- [43] Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, Viau C, Maitre A. A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. *J Appl Toxicol*. 2010;30(5):402-10.
- [44] Marie C, Ravanat JL, Badouard C, Marques M, Balducci F, Maitre A. Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. *Environ Mol Mutagen*. 2009 Mar;50(2):88-95.
- [45] Mastral AM, Lopez JM, Callen MS, Garcia T, Murillo R, Navarro MV. Spatial and temporal PAH concentrations in Zaragoza, Spain. *The Science of the total environment*. 2003 May 20;307(1-3):111-24.
- [46] Onyemauwa F, Rappaport S, Sobus J, Gajdosová D, Wu R, Waidyanatha S. Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of chromatography*. 2009;877(11-12):1117-25.
- [47] Papageorgopoulou A, Manoli E, Touloumi E, Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of Greek towns in relation to other atmospheric pollutants. *Chemosphere*. 1999 Dec;39(13):2183-99.
- [48] Peltonen K, Dipple A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. *J Occup Environ Med*. 1995;37(1):52-8.
- [49] Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):517-24.
- [50] Pillière F, Conso F. BIOTOX Guide biotoxicologique pour les médecins du travail. 4 ed. Paris: INRS 2007.
- [51] Prevedouros K, Brorstrom-Lunden E, C JH, Jones KC, Lee RG, Sweetman AJ. Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations: evidence and implications. *Environ Pollut*. 2004;128(1-2):17-27.
- [52] Ramond B, Gaillandre A, Gibelin N, et al. Guide de validation des méthodes de dosage biologique. *STP Pharma Pratiques*. 2002;12(6):317-36.
- [53] Raulf-Heimsoth M, Angerer J, Pesch B, et al. Biological monitoring as a useful tool for the detection of a coal-tar contamination in bitumen-exposed workers. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(11-12):746-50.

- [54] Rehwagen M, Müller A, Massolo L, Herbarth O, Ronco A. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *The Science of the total environment*. 2005;348(1-3):199-210.
- [55] Romanoff LC, Li Z, Young KJ, Blakely NC, 3rd, Patterson DG, Jr., Sandau CD. Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of chromatography*. 2006 May 1;835(1-2):47-54.
- [56] Rossella F, Campo L, Pavanello S, Kapka L, Siwinska E, Fustinoni S. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers. *Occupational and environmental medicine*. 2009 Aug;66(8):509-16.
- [57] Rossi C, Poli P, Buschini A, Cassoni F, Cattani S, DeMunari E. Comparative investigations among meteorological conditions, air chemical-physical pollutants and airborne particulate mutagenicity: a long-term study (1990-1994) from a northern Italian town. *Chemosphere*. 1995 May;30(10):1829-45.
- [58] Sarkar M, Liu J, Koval T, et al. Evaluation of biomarkers of exposure in adult cigarette smokers using Marlboro snus. *Nicotine Tob Res*. 2010 Feb;12(2):105-16.
- [59] Simon P, Lafontaine M, Delsaut P, Morele Y, Nicot T. Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000 Oct 10;748(2):337-48.
- [60] Simpson CD, Wu MT, Christiani DC, Santella RM, Carmella SG, Hecht SS. Determination of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in human urine by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2000 Apr;13(4):271-80.
- [61] Tarantini A. Modulation de la génotoxicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) en mélanges. Grenoble: Université Joseph Fourier; 2009.
- [62] Toriba A, Nakamura H, Chetiyankornkul T, et al. Method for determining monohydroxybenzo[a]pyrene isomers using column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*. 2003 Jan 1;312(1):14-22.
- [63] Upadhyaya P, Hochalter JB, Balbo S, McIntee EJ, Hecht SS. Preferential glutathione conjugation of a reverse diol epoxide compared with a bay region diol epoxide of benzo[a]pyrene in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2010 Sep;38(9):1397-402.
- [64] Van Rooij JG, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *British journal of industrial medicine*. 1993 Jul;50(7):623-32.
- [65] Viau C. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicology letters*. 2002 Aug 5;134(1-3):9-16.
- [66] Viau C, Vyskocil A, Bouchard M, Carrier G. La surveillance biologique de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Travail et santé*. 1995;11(2):S-7.

- [67] Wang H, Wilson WB, Campiglia AD. Using gold nanoparticles to improve the recovery and the limits of detection for the analysis of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples. *J Chromatogr A*. 2009 Jul 31;1216(31):5793-9.
- [68] Wang Y, Zhang W, Dong Y, Fan R, Sheng G, Fu J. Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005 Nov;383(5):804-9.
- [69] Whitlock JP, Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:103-25.
- [70] Whiton RS, Witherspoon CL, Buckley TJ. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1995 Mar 24;665(2):390-4.
- [71] Withey JR, Law FC, Endrenyi L. Percutaneous uptake, distribution, and excretion of pyrene in rats. *Journal of toxicology and environmental health*. 1993 Dec;40(4):601-12.
- [72] Withey JR, Shedden J, Law FC, Abedini S. Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *J Appl Toxicol*. 1993 May-Jun;13(3):193-202.
- [73] Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005 Aug 1;206(1):73-93.
- [74] Zhong Y, Carmella SG, Upadhyaya P, et al. Immediate Consequences of Cigarette Smoking: Rapid Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Diol Epoxides. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(2):246-52.