

**Surveillance biologique
de l'exposition de pompiers
au benzo(a)pyrène et
aux amines aromatiques
à la suite d'un incendie
dans un dépotoir de pneus**

**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

Claude Viau
Claude Tremblay

Mars 1998

R-184

RAPPORT



IRSST
Institut de recherche

La recherche, pour mieux comprendre

L'Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec (IRSST) est un organisme de recherche scientifique voué à l'identification et à l'élimination à la source des dangers professionnels, et à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes. Financé par la CSST, l'Institut réalise et finance, par subvention ou contrats, des recherches qui visent à réduire les coûts humains et financiers occasionnés par les accidents de travail et les maladies professionnelles.

Pour tout connaître de l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par la CSST et l'Institut.

Les résultats des travaux de l'Institut sont présentés dans une série de publications, disponibles sur demande à la Direction des communications.

Il est possible de se procurer le catalogue des publications de l'Institut et de s'abonner à *Prévention au travail* en écrivant à l'adresse au bas de cette page.

ATTENTION

Cette version numérique vous est offerte à titre d'information seulement. Bien que tout ait été mis en œuvre pour préserver la qualité des documents lors du transfert numérique, il se peut que certains caractères aient été omis, altérés ou effacés. Les données contenues dans les tableaux et graphiques doivent être vérifiées à l'aide de la version papier avant utilisation.

Dépôt légal
Bibliothèque nationale du Québec

IRSST - Direction des communications
505, boul. de Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : (514) 288-1 551
Télécopieur: (514) 288-7636
Site internet : www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche en santé
et en sécurité du travail du Québec,

**Surveillance biologique
de l'exposition de pompiers
au benzo(a)pyrène et
aux amines aromatiques
à la suite d'un incendie
dans un dépotoir de pneus**

Claude Viau
Université de Montréal

Claude Tremblay
Régie régionale de la santé et des services sociaux de la Montérégie

Avec la collaboration de :
Michel Bertrand, Jules Brodeur, Gaëtan Carrier, Louis Jacques et Rda Vyskocil

**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

RAPPORT

SOMMAIRE

Un incendie a eu lieu dans un dépotoir de pneus usagés à Saint-Amable entre le 16 et le 20 mai 1990. Certaines mesures de protection ont alors été prises à l'égard de la population générale habitant dans le voisinage immédiat de ce site. Puisque lors d'un tel événement plusieurs contaminants potentiellement toxiques peuvent se dégager du brasier, il est apparu prudent aux autorités de la santé publique (le Département de santé communautaire de l'hôpital Charles LeMoyne, à l'époque) d'estimer le degré d'exposition des travailleurs ayant combattu le sinistre à certains de ces contaminants. En plus des tests de biochimie clinique usuels, il fut résolu de profiter de ce regrettable incident pour augmenter l'expertise québécoise en matière d'évaluation de l'exposition à de dangereux contaminants par une collaboration étroite avec une équipe de chercheurs de l'Université de Montréal.

Des mesures de l'exposition à un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), le benzo(a)pyrène et à deux amines aromatiques, la 2-naphtylamine et le 4-aminobiphényle, tous des cancérogènes reconnus, furent entreprises à l'aide d'outils de mesure à la fine pointe des connaissances toxicologiques. Ces outils consistent en la mesure des «adduits» formés entre ces substances et l'hémoglobine qui est la principale protéine de nos globules rouges. En effet, certaines substances ont cette capacité de former des liens chimiques avec des protéines de notre sang (les adduits), ce qui offre alors l'avantage que nous conservons une trace de cette exposition dans notre sang pendant une période de plusieurs semaines, voire même de plusieurs mois.

Nous avons obtenu des prélèvements de sang de 44 travailleurs environ deux semaines après la fin de l'incendie puis environ 7 mois plus tard. Par après, nous avons obtenu des échantillons de sang de 88 sujets témoins qui n'avaient pas d'histoire d'exposition aux substances étudiées ici dans leur milieu de travail. Les adduits formés avec les trois contaminants indiqués au paragraphe précédent ont ensuite été mesurés.

Cette recherche a permis d'établir :

- 1- que l'exposition au benzo(a)pyrène attribuable au travail lors de l'incendie est peu importante en regard de l'exposition «habituelle» à ce contaminant fort répandu dans notre environnement;
- 2- que l'exposition aux amines aromatiques attribuable au travail lors de l'incendie est significativement plus importante que l'exposition que l'on rencontre habituellement dans notre environnement;
- 3- que 7 mois après l'exposition, les travailleurs n'ont pas plus d'adduits d'amines aromatiques dans leur sang que les sujets témoins indiquant qu'ils se sont effectivement «débarassés» de cette contamination au cours de cette période.

Nous en concluons que la mesure de ces adduits chez des populations de travailleurs exposés à des substances capables de former de tels liens chimiques avec l'hémoglobine représente un outil intéressant d'évaluation de l'importance de l'exposition à de dangereux contaminants et peut donc

contribuer à l'estimation du risque toxique associé à cette exposition.

Du point de vue de la santé publique, nous retenons que cette étude a conduit au développement d'une expertise québécoise permettant d'effectuer la surveillance biologique de certaines substances cancérogènes. Elle a permis également de mieux caractériser la réalité de l'exposition des pompiers à des substances cancérogènes lors d'incendies d'ampleur variable. Sur le plan de la signification des résultats, l'étude a permis de dégager une opinion à l'effet que l'incendie de Saint-Amable ne possédait pas les caractéristiques d'une situation dangereuse pour la santé des travailleurs. Enfin, l'étude permet de formuler des recommandations spécifiques à l'égard des pompiers lorsque ceux-ci seront exposés à des situations comparables.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
INTRODUCTION	1
Mise en contexte	1
Revue de la littérature	2
Contaminants émis lors d'un incendie de pneus	2
Les HAP	2
Les amines aromatiques, 2-naphtylamine et 4-aminobiphényle	3
Choix de la mesure des adduits aux protéines sanguines comme bioindicateurs de l'exposition	4
Objectifs	5
MATÉRIEL ET MÉTHODES	6
Type d'étude	6
Population	6
Groupe exposé	6
Groupe témoin	6
Collecte des données	6
Procédure pour les analyses toxicologiques	7
Préparation et conservation des spécimens biologiques	7
Méthodes de dosage	7
Analyses statistiques	8
Interprétation des données	8
Communication des résultats, suivi médical et surveillance de la cohorte	8
RÉSULTATS	9
Effectifs	9
Adduits BaPDE-hémoglobine	9
Adduits BaPDE-albumine	11
Adduits 2-NA-hémoglobine	11
Adduits 4-AMB-hémoglobine	11
Valeurs de référence : 99 ^e centile dans le groupe témoin	15
DISCUSSION	18
L'exposition au BaP	18
L'exposition aux amines aromatiques	18
Comparaison benzo(a)pyrène-amines aromatiques	20

Portée pratique des résultats	20
Retombées de la recherche sur le plan des outils d'évaluation de l'état de santé des populations	20
Signification des résultats pour la santé publique	20
Conduite à tenir face à une situation sensible	21
 CONCLUSION	 23
 REMERCIEMENTS	 24
 BIBLIOGRAPHIE	 25

INTRODUCTION

Mise en contexte

Le 16 mai 1990, un incendie éclate dans un dépotoir de pneus situé à Saint-Amable. Il sera maîtrisé quatre jours plus tard, soit le 20 mai 1990. Au moment de cet incident, des mesures d'évacuation et de confinement temporaire ont été proposées à certains résidents. Ces mesures ont été maintenues pour une durée limitée, soit le temps que le panache se disperse et que le niveau de contamination redevienne acceptable.

La cinquantaine de travailleurs qui étaient directement sur le site pour combattre le feu ont reçu des recommandations visant à limiter l'exposition et à utiliser des mesures de protection individuelle (port de masque, de vêtements de protection), consignes qui ont été plus ou moins suivies. Aucune mesure d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), d'amines aromatiques, de dioxines, de furanes ni de biphényles polychlorés n'a été faite sur le site, malgré les recommandations du groupe d'experts du Département de santé communautaire de l'hôpital Charles LeMoine (D.S.C. - entité administrative disparue depuis la réforme en matière de santé ayant conduit à la formation des régions régionales de la santé et des services sociaux). De nombreuses données étaient cependant disponibles afin de caractériser la contamination des autres milieux sur le site (huile, sol, suie, eau).

À la lumière du haut niveau de contamination observé et étant donné la probabilité que les travailleurs aient été fortement exposés à ces substances, les experts du D.S.C. ont alors mis sur pied un programme de surveillance biologique et médicale pour l'ensemble de ces travailleurs afin, principalement, de vérifier à partir de différents paramètres biologiques l'absorption de certains polluants cancérigènes. Le programme a été amorcé d'abord par un examen médical, suivi d'une prise de sang pour les tests de biochimie sanguine et en prévision de la quantification des métabolites de certains cancérigènes adduits sur les protéines sanguines. L'examen a été complété par une entrevue individuelle avec chaque travailleur.

À la demande du directeur de la santé publique de cette époque, le Dr Marc Dionne, la proposition du programme de surveillance a été analysé par un groupe d'experts indépendants. À la lumière de ces consultations, il a été considéré qu'il s'agissait là d'un projet de recherche à caractère « expérimental » et qu'on ne retrouvait pas les éléments d'un programme de surveillance médical « courant ». Selon l'avis des experts, il y avait un besoin réel de recherche et de développement dans ce domaine au Québec.

Parallèlement, un projet de recherche subventionné par l'I.R.S.S.T. et intitulé « Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les adduits aux protéines du sang » était en cours dans le laboratoire de Claude Viau, à l'Université de Montréal. Ce projet, dont le rapport final a été déposé à l'I.R.S.S.T. en novembre 1994, visait principalement la validation de l'utilisation de la mesure d'adduits aux protéines sanguines comme outil de surveillance biologique de l'exposition à des contaminants électrophiles ou pouvant être biotransformés en métabolites électrophiles. Le benzo(a)pyrène (BaP), un HAP cancérigène, était précisément utilisé comme substance modèle

dans ces études. Au moment de l'incendie, les premiers résultats expérimentaux qui avaient été obtenus chez l'animal de laboratoire confirmaient l'utilité de l'outil. La méthode d'analyse fut ensuite rapidement adaptée à l'examen d'échantillons de sang humain et montra de faibles concentrations d'adduits BaP-hémoglobine chez des personnes n'ayant pas d'exposition professionnelle aux HAP (Viau, 1994).

Il est donc apparu aux scientifiques de l'Université de Montréal et du D.S.C. de l'hôpital Charles LeMoyne qu'il existait des intérêts convergents entre les deux groupes. D'une part, l'«incident Saint-Amable» représentait une occasion unique d'application des concepts et outils de mesure développés notamment pour ce genre de situation et, d'autre part, les scientifiques du D.S.C. avaient besoin de tels outils dans l'évaluation de l'exposition des travailleurs en pareille situation. C'est donc dans le cadre d'une démarche de recherche que le projet fut proposé à l'I.R.S.S.T. puis réalisé avec l'appui financier de cet organisme.

Revue de la littérature

Contaminants émis lors d'un incendie de pneus

Lors d'un incendie de pneus, on distingue deux principaux groupes de contaminants qui peuvent être émis dans l'environnement (Jacques *et al.*, 1989; Carrier *et al.*, 1990). Le premier groupe est constitué de produits volatilisés dérivant de la combustion plus ou moins complète de la matière organique. Ainsi, le nuage peut contenir du CO, du CO₂, des oxydes d'azote (NO_x), des oxydes de soufre (SO_x), des oxydes de métaux, du benzène, du toluène, du xylène, des phénols, de l'ammoniac, des HAP (dont le BaP), des nitro-HAP (1-nitronaphtalène, 4-nitrobiphényle), des HAP halogénés (dioxines, furanes), des amines aromatiques (2-naphtylamine, 4-aminobiphényle). Le second groupe est constitué des produits de pyrolyse, soit ceux qui appartiennent au résidu huileux qui peut être formé par la fonte des pneus. Dans une publication récente, Lemieux et Ryan (1993) ont déterminé les quantités de certains contaminants émis lors d'un incendie simulé de pneus usagés. Ces auteurs ont notamment trouvé que les composés organiques dits semi-volatils étaient émis à raison de 10 à 50 g par kg de pneu. Les composés présents en concentrations les plus importantes parmi ceux qui furent identifiés sont les hydrocarbures mono et poly aromatiques monosubstitués, et les HAP. Les taux d'émission de ce groupe étaient de l'ordre de 4 000 mg de HAP totaux par kg de pneus et de 100 mg/kg pour le benzo(a)pyrène en particulier. Bien que de l'aveu même des auteurs, on ne peut nécessairement extrapoler les résultats de cet incendie simulé à ceux d'un incendie réel, cette étude montre néanmoins le potentiel important de génération de plusieurs contaminants aériens volatils et semi-volatils. Parmi ces composés, nous retiendrons les HAP (représentés par le benzo(a)pyrène) et les amines aromatiques (représentés par la 2-naphtylamine (2-NA) et le 4-aminobiphényle (4-AMB)).

Les HAP

Les HAP sont des contaminants répandus provenant de la combustion incomplète de matière

organique (Nikolaou *et al.*, 1984). Très hydrophobes, ils peuvent être biotransformés *in vivo* en une série de dérivés tels que des monohydroxy HAP, des dihydroxy HAP, des époxydes et des diolépoxydes (Dipple *et al.*, 1985). Dans le cas du benzo(a)pyrène, c'est le 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydro BaP (BaPDE) qui est considéré comme le métabolite cancérigène de ce HAP (Grimmer, 1983). Ce métabolite peut former des adduits avec les macromolécules de l'organisme comme l'ADN et les protéines (Santella, 1988). Cette caractéristique, couplée à la persistance des adduits formés entre les protéines sanguines, comme l'hémoglobine, et le BaPDE rend attrayante la mesure de ces derniers pour fins de surveillance biologique de l'exposition à un contaminant représentatif des HAP cancérigènes. Chez l'animal, seule une très faible proportion du BaP administré se retrouve sous forme d'adduits BaPDE-hémoglobine, bien que cette faible proportion n'empêche pas dans ce contexte une estimation adéquate de l'exposition. Ces proportions ont été évaluées à environ 0,0002 % chez la souris et à 0,00002 % chez le rat (Mercier, 1991).

Ces adduits peuvent être mesurés par diverses techniques. On a d'abord mis beaucoup d'espoir dans les techniques immunologiques faisant appel à des anticorps monoclonaux mais ceux-ci se sont révélés non spécifiques d'un HAP donné de sorte qu'on leur préfère souvent les méthodes chromatographiques couplées à une détection sensible comme celle qu'offre par exemple la fluorimétrie (Mercier et Viau, 1990; Viau, 1994).

Chez l'humain, quelques études ont démontré la présence d'adduits BaPDE-ADN dans le tissu pulmonaire de patients atteints de cancer ou subissant une chirurgie pulmonaire (Garner *et al.*, 1988; Perera *et al.*, 1982; Phillips *et al.*, 1990). Dans ce dernier cas, le niveau mesuré d'adduits était relié aux habitudes tabagiques des patients. Dans divers groupes de travailleurs, on a mesuré des adduits à l'ADN des globules blancs. Ces études touchaient notamment des fondeurs (Phillips *et al.*, 1988), des travailleurs de fours à coke (Weston *et al.*, 1988) et des couvreurs (Herbert *et al.*, 1990). On a également trouvé des adduits BaPDE dans une fraction non spécifique de protéines plasmatiques à un niveau plus élevé chez des fondeurs que dans un groupe témoin (Sherson *et al.*, 1990). Dans une autre étude, les niveaux d'adduits BaPDE-albumine étaient plus élevés chez des fondeurs et chez des couvreurs par comparaison avec leur groupe témoin respectif (Lee *et al.*, 1991). Dans les études récentes de Ferreira *et al.* (1994) et de Tas *et al.* (1994), les niveaux d'adduits BaPDE-hémoglobine et BaPDE-albumine étaient également plus élevés chez des fondeurs par comparaison avec leurs groupes témoins.

À cause de l'origine des HAP, il existe une contamination résiduelle par ces substances dans l'environnement général. Ainsi, la consommation d'aliments grillés, le chauffage au bois ou les habitudes tabagiques doivent être prises en considération en tant qu'éléments de l'environnement personnel susceptible d'influencer le niveau d'adduits chez les individus.

Les amines aromatiques, 2-naphtylamine et 4-aminobiphényle

La 2-NA et le 4-AMB constituent une classe de composés dans lesquels un groupe aminé est attaché à l'un de deux anneaux benzéniques formant la molécule. Leur relation avec le cancer de la vessie chez l'animal et chez l'humain est bien établie (IARC, 1979). Une exposition minimale

de 6 à 12 mois peut produire une tumeur à la vessie chez l'humain (Bryan, 1983). Peu importe la voie d'entrée, l'administration d'amines aromatiques marquées au ^{14}C montre que le produit se retrouve rapidement dans le compartiment sanguin. Elles subissent des oxydations et des conjugaisons dans le foie avant d'être excrétées dans la bile ou dans l'urine. Les expériences menées chez l'animal (chien, cochon d'Inde, souris, lapin, rat) montrent qu'au-delà de 90 % de la dose absorbée d'amine marquée au ^{14}C est excrétée en moins de 2 jours. L'excrétion se fait majoritairement par l'urine (62 % à 87 %, selon l'espèce). De 5 % à 10 % de la dose s'accumule dans le compartiment sanguin et c'est principalement au niveau des érythrocytes que l'activité est mesurée et ce, pendant plusieurs semaines après l'administration (Coldblatt *et al.*, 1960). Une autre publication plus récente suggère également une formation d'adduits d'amines aromatiques allant jusqu'à 10 % de la dose soulignant que ces adduits deviennent ainsi des bioindicateurs intéressants de l'exposition (Skipper et Stillwell, 1994). Dans les cas plus spécifiques du 4-AMB et de la 2-NA, la fraction de la dose se liant à l'hémoglobine a été respectivement estimée à 8 % et 0,04 % (Skipper et Tannenbaum, 1987). On a également observé une relation linéaire entre la dose d'amine, la quantité d'adduits à l'hémoglobine et la formation d'adduits à l'ADN dans différents tissus, le rapport adduits hémoglobine sur adduits ADN étant constant (Neumann, 1984). Il est proposé, à la lumière de ces résultats, que la mesure des adduits à l'hémoglobine puisse être utile dans l'évaluation du risque génotoxique (marqueur de la dose biologiquement active au niveau de l'ADN).

Des techniques chromatographiques ont été mises au point pour la mesure des adduits amines-aromatiques-hémoglobines tant chez l'humain que chez l'animal (Bryant *et al.*, 1987; Coldblatt *et al.*, 1960; Stillwell *et al.*, 1987).

Choix de la mesure des adduits aux protéines sanguines comme bioindicateurs de l'exposition

Puisque c'est l'ADN qui est la cible moléculaire critique des composés étudiés dans ce travail, on peut s'interroger sur la raison du choix des adduits aux protéines en tant que bioindicateurs. Les raisons principales tiennent à l'accessibilité relativement aisée aux protéines par rapport à l'ADN des tissus cibles et à la stabilité des adduits protéiques. Les quantités de protéines accessibles sont beaucoup plus grandes que celles de l'ADN. Si les quantités relatives d'adduits formés avec chacune de ces macromolécules sont comparables, les quantités de protéines disponibles pour l'analyse permettront de repousser les limites de détection. Par ailleurs, contrairement à l'ADN, les protéines ne subissent pas de processus de réparation, susceptible d'affecter variablement la relation entre l'exposition et la quantité d'adduits formés. Un des avantages théoriques de l'ADN réside évidemment dans le fait que cette macromolécule est la cible moléculaire critique mais puisque l'ADN du tissu cible est rarement accessible, on doit se rabattre sur une source autre d'ADN comme l'ADN lymphocytaire, perdant ainsi une bonne partie des avantages de la mesure. Si l'on peut démontrer la formation d'adduits stables aux protéines sanguines et si le taux de renouvellement de ces protéines est prédictible, il y aura une relation mathématique prévisible entre la dose et la concentration d'adduits protéiques (Skipper *et al.*, 1994; Shaw et Connell, 1994).

Dans le cas des adduits à l'hémoglobine, la durée de vie des érythrocytes chez l'humain est

d'environ 120 jours et l'on ne connaît pas de système de réparation de cette protéine de sorte que la mesure de ces adduits peut refléter l'exposition aux HAP intégrée sur la période d'environ 4 mois précédant le prélèvement sanguin (Ferreira, Jr. *et al.*, 1994). De plus amples informations sur la cinétique de ces adduits peut être trouvée dans des publications récentes (Fennell *et al.*, 1992; Viau et Carrier, 1995). Bien sûr, dans la présente étude, les travailleurs n'ont été exposés que pour une durée relativement brève, soit 5 jours. En ce qui concerne les adduits à l'albumine, on considère généralement que ceux-ci reflètent l'exposition survenue au cours des 24 jours précédant le prélèvement (Tas *et al.*, 1994).

Objectifs

Le projet de recherche proposait l'application des techniques développées à l'Université de Montréal pour l'identification et la mesure de certains cancérogènes (hydrocarbures aromatiques) dans le sang des travailleurs qui ont combattu l'incendie du dépôt de pneus de Saint-Amable. Le sang de ces travailleurs a été prélevé à deux moments soit deux semaines après l'incendie (temps 1) et six mois après l'incendie (temps 2).

Plus spécifiquement, le projet vise à :

- 1- évaluer quantitativement les adduits BaPDE-hémoglobine et BaPDE-albumine dans le sang des travailleurs au temps 1 et au temps 2;
- 2- évaluer quantitativement les adduits N-hydroxy-2-NA-hémoglobine et N-hydroxy-4-AMB-hémoglobine au temps 1 et au temps 2;
- 3- Comparer les concentrations d'adduits mesurées chez les travailleurs exposés (Saint-Amable) avec les concentrations mesurées dans un groupe de personnes non exposées (témoins).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Type d'étude

Il s'agit d'une étude descriptive de type transversal qui utilise à la fois les techniques de recherche en toxicologie et en épidémiologie. Deux groupes de travailleurs sont comparés, l'un composé d'individus exposés aux polluants lors de l'incendie et l'autre composé d'individus également recrutés en milieu de travail, mais non exposés professionnellement à ces contaminants. Les concentrations des adduits sont comparées chez les exposés et les non exposés (groupe témoin).

Population

Groupe exposé

Les individus qui ont travaillé sur le site de l'incendie entre le 16 et le 20 mai 1990 ont été invités par le DSC de l'hôpital Charles LeMoine à se soumettre à un examen médical comprenant un prélèvement sanguin quelques jours après l'incendie (temps 1). Au total, 44 travailleurs (sur une possibilité de 50) ont accepté de participer à l'étude après avoir dûment signé un formulaire de consentement. En décembre de la même année, tous les travailleurs se sont présentés au deuxième examen et un second échantillon de sang a été recueilli. Une personne de plus s'est alors présentée et un prélèvement a été réalisé.

Groupe témoin

Le groupe témoin a été recruté auprès de la population des travailleurs sur le territoire du DSC. Les témoins ont été appariés en fonction de l'âge et de leur statut tabagique (fumeurs, non-fumeurs). Les travailleurs ne devaient pas être exposés aux contaminants visés dans cette étude, dans leur milieu de travail ou au cours de leur loisirs.

Collecte des données

La saisie de l'information a été faite à l'aide d'un formulaire de codage qui contient les éléments suivants : nom, prénom, adresse, occupation, employeur, description des fonctions et activités au moment de l'incendie, le temps d'exposition sous le panache, les mesures de protection individuelle utilisées, la consommation de viande fumée, l'utilisation d'une cuisinière au gaz et d'un poêle à combustion. Le premier questionnaire a été complété par une évaluation médicale comprenant un bilan des symptômes et des antécédents personnels et professionnels ainsi que les habitudes de vie (tabagisme, alcool). Un formulaire comparable a été rempli au moment de la deuxième visite afin d'évaluer l'exposition subie après l'incendie et de décrire les modifications dans les habitudes de vie.

Les mêmes variables ont été documentées par une infirmière-enquêtrice au moment du prélèvement sanguin dans le groupe témoin.

Procédure pour les analyses toxicologiques

Les échantillons de sang veineux ont été prélevés à l'hôpital Charles LeMoyne dans des tubes sous vide contenant un anticoagulant. La quantité requise pour l'évaluation des adduits est de 30-40 ml. La même quantité fut prélevée chez les individus du groupe témoin dans leur milieu de travail par une infirmière de l'unité de prélèvement de l'hôpital Charles LeMoyne.

Tous les échantillons ont été expédiés à l'Université de Montréal pour traitement le jour même du prélèvement. La procédure fut la même pour le groupe témoin.

Préparation et conservation des spécimens biologiques

À l'intérieur d'une période de huit heures suivant les prélèvements, les échantillons sanguins ont été centrifugés. Le plasma fut prélevé et conservé à -20°C dans un tube de polycarbonate. La fraction cellulaire fut lavée trois fois avec une solution saline isotonique héparinée. Après la dernière centrifugation, la couche de cellules blanches ("buffy coat") fut éliminée. Les érythrocytes furent lysés avec de l'eau et du CCl₄ et la solution d'hémoglobine séparée des débris membranaires par centrifugation. L'hémoglobine fut ensuite conservée à -20°C dans des bouteilles de polypropylène. Mentionnons ici que des échantillons positifs de contrôle de qualité (adduits BaPDE-protéines sanguines de rat) ont été conservés dans des conditions semblables et nous ont toujours donné la même réponse dans le système CLHP-fluorescence.

Méthodes de dosage

Quel que soit l'adduit mesuré, la première étape du dosage consiste en une hydrolyse douce des adduits libérant soit le BaP tétraol (adduits BaPDE-protéines), soit les amines aromatiques elles-mêmes (adduits amines aromatiques-protéines). Par la suite, le dosage s'effectue par CLHP-fluorescence (adduits BaPDE-protéines; méthode adaptée de Rahn *et al.* (1982)) ou par CPG/SM (adduits amines aromatiques-protéines; méthode adaptée de Stillwell *et al.* (1987)). Les laboratoires respectifs où s'effectuent ces mesures sont de Claude Viau du Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu de l'Université de Montréal et de Michel Bertrand du Département de chimie de la même université. Les résultats sont corrigés en fonction de la concentration de protéines dans l'échantillon hydrolysé. Puisque la méthode CLHP/fluorescence ne permet pas une confirmation absolue de l'identité des pics chromatographiques enregistrés, chaque extrait d'échantillon était d'abord injecté tel quel dans le chromatographe puis immédiatement réinjecté après enrichissement avec l'analyte pur. La récupération moyenne de l'analyte ajouté fut de 98,1 % $\pm$ 16,8 % pour l'ensemble des échantillons analysés dans ce travail. Les limites de détection sont de 0,02 pmol/g hémoglobine pour les adduits BaPDE-hémoglobine et de 0,007 pmol/g hémoglobine pour les adduits amines aromatiques-hémoglobine.

Analyses statistiques

Les moyennes des valeurs quantitatives ont été calculées pour chaque groupe en fonction de l'exposition et comparées entre elles en tenant compte des autres variables d'intérêt. Les moyennes ont d'abord été comparées entre elles à l'aide d'un test de Student (test de t) et d'une analyse de variance (test F). Les variables potentiellement confondantes (âge, tabagisme) ont été contrôlées à l'aide d'une analyse de covariance. Une différence dans les moyennes est considérée comme statistiquement significative lorsque la valeur p du test est inférieure à 5 %.

Interprétation des données

Les concentrations d'adduits dans le groupe témoin ont été réparties en centile selon l'âge et le statut tabagique. Les concentrations du groupe exposé qui dépassent le 99^e centile des concentrations du groupe témoin sont considérées « déviantes ».

Communication des résultats, suivi médical et surveillance de la cohorte

Chacun des sujets à l'étude a déjà reçu les résultats des analyses de biochimie avec des recommandations lorsque requis. Il recevra également les résultats de la mesure des adduits au temps 1 et au temps 2 avec l'interprétation des résultats. Seuls les résultats non personnalisés feront l'objet de rapports et de publications.

RÉSULTATS

Effectifs

Un total de 44 travailleurs exposés ont fourni un échantillon de sang. Ils ont été appariés selon l'âge et les habitudes tabagiques avec 88 témoins. L'âge moyen ($\pm$ écart-type) est de $37,5 \pm 9,4$ ans chez les exposés et de $37,7 \pm 9,2$ ans chez les témoins. Les exposés comptent 40,9 % de fumeurs contre 37,5 % chez les témoins. Pour diverses raisons techniques (volume de sang limité, pannes instrumentales), les résultats présentés ici ne concernent pas tous les sujets. Le tableau 1 résume les effectifs disponibles dans chaque situation.

Tableau 1. Résumé des effectifs disponibles pour l'analyse statistique

Groupe	BaP			2-NA			4-AMB		
	F ¹	NF ¹	T ¹	F	NF	T	F	NF	T
Exposés (temps 1)	16	24	40	17	25	42	17	25	42
Exposés (temps 2)	17	24	41	18	25	43	18	25	43
Témoins	32	52	84	28	52	80	28	52	80

¹ F = fumeurs; NF = non-fumeurs; T = total

Adduits BaPDE-hémoglobine

La figure 1 présente la distribution des résultats d'adduits BaBDE-hémoglobine dans les deux groupes. On y constate que les résultats sont distribués semblablement chez les exposés au temps 1 et au temps 2 et que la distribution des résultats chez les témoins semble légèrement décalée vers les plus faibles valeurs. Le tableau 2 montre qu'il y a une différence statistiquement significative entre les exposés (temps 1 et 2) et les témoins. Il n'y a par ailleurs pas de différence entre les fumeurs et les non-fumeurs de chaque groupe.

Tableau 2. Comparaison des valeurs moyennes des concentrations d'adduits BaPDE-hémoglobine chez les groupes à l'étude (pmol/g hémoglobine, moy. $\pm$ écart-type)

Groupe	Fumeurs	Non-fumeurs	Total
Exposés (temps 1)	0,161 $\pm$ 0,103	0,150 $\pm$ 0,100 *	0,155 $\pm$ 0,100*
Exposés (temps 2)	0,173 $\pm$ 0,102	0,152 $\pm$ 0,091 *	0,160 $\pm$ 0,095 *
Témoins	0,131 $\pm$ 0,152	0,094 $\pm$ 0,091	0,108 $\pm$ 0,118

* Significativement différent de la valeur témoin correspondante ($p < 0,05$)

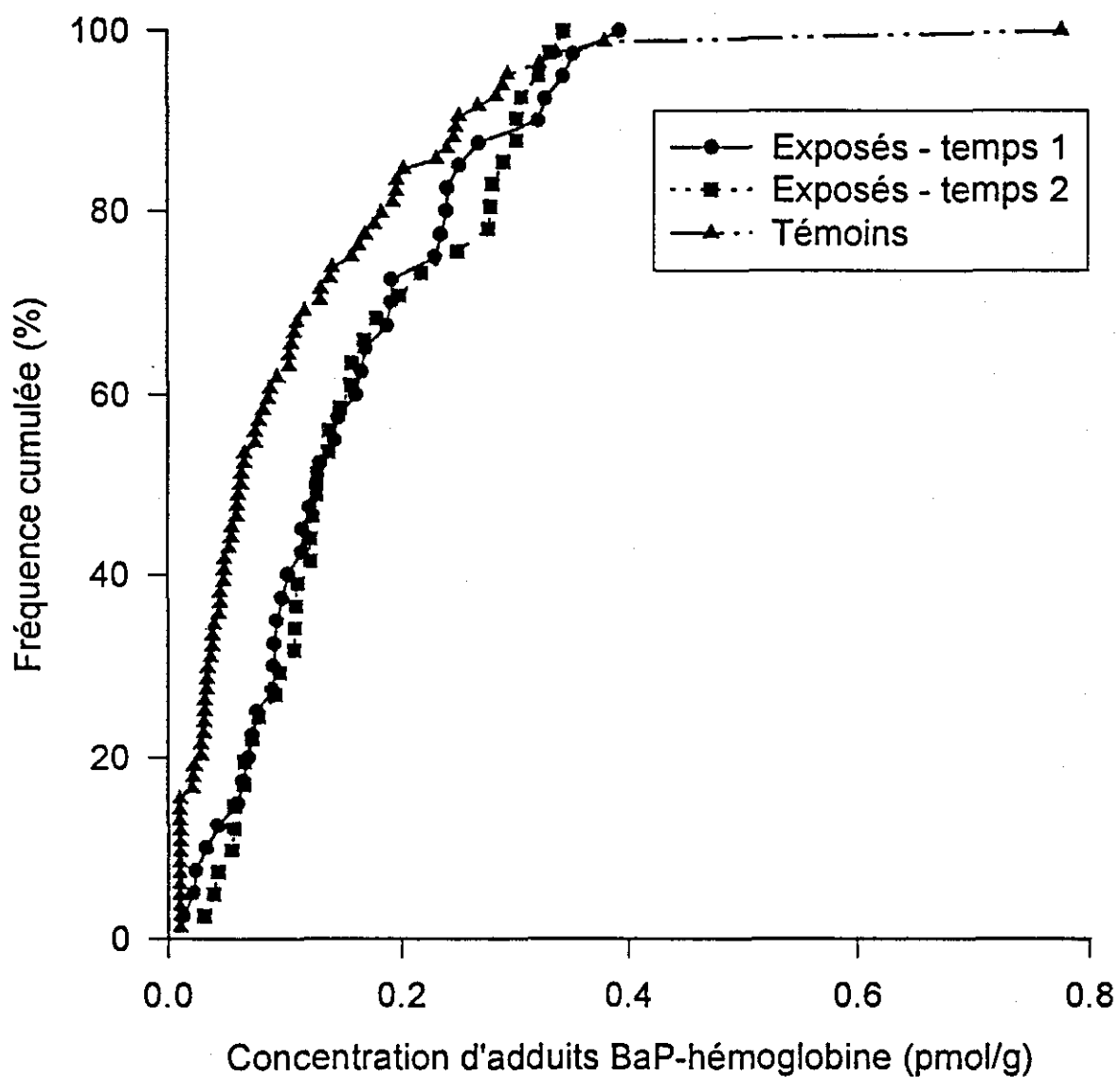


Figure 1. Distribution des résultats de mesures d'adduits benzo(a)pyrènediolépoxyde-hémoglobine dans les groupes à l'étude

Adduits BaPDE-albumine

La quasi totalité des mesures ont révélé des concentrations non décelables d'adduits BaPDE-albumine. Aussi, aucune analyse statistique ni même aucune description valable de ces résultats ne sont présentées ici.

Adduits 2-NA-hémoglobine

La figure 2 montre la distribution des résultats de mesure des adduits 2-NA-hémoglobine dans les divers groupes de l'étude. On y observe principalement le fait que les mesures réalisées au temps 1 chez les exposés sont clairement plus importantes que celles que l'on trouve au temps 2. De plus, les distributions des résultats des exposés au temps 2 est très semblable à celle que l'on observe chez les témoins. Le tableau 3 en présente une analyse statistique plus détaillée. On y constate surtout que les exposés au temps 1 présentent des concentrations d'adduits 2-NA-hémoglobine plus grandes à la fois que celles du groupe exposé au temps 2 et que celles du groupe témoin. Par contre, au temps 2, les exposés ne sont plus différents des témoins. Par ailleurs, comme pour le BaP, il n'y a pas de différence statistique entre fumeurs et non-fumeurs.

Tableau 3. Comparaison des valeurs moyennes des concentrations d'adduits 2-NA-hémoglobine chez les groupes à l'étude (pmol/g hémoglobine, moy. $\pm$ écart-type)

Groupe	Fumeurs	Non-fumeurs	Total
Exposés (temps 1)	0,688 $\pm$ 0,921 *	0,705 $\pm$ 0,742 *	0,698 $\pm$ 0,808 *
Exposés (temps 2)	0,146 $\pm$ 0,131 †	0,175 $\pm$ 0,147 †	0,163 $\pm$ 0,139 †
Témoins	0,160 $\pm$ 0,165	0,154 $\pm$ 0,166	0,156 $\pm$ 0,164

* Valeur statistiquement différente de celle du groupe témoin ($p < 0,05$)

† Valeur statistiquement différente de celle du groupe exposé au temps 1 ($p < 0,05$)

Adduits 4-AMB-hémoglobine

La figure 3 montre la distribution des résultats de mesure des adduits 4-AMB-hémoglobine dans les divers groupes de l'étude. Comme dans le cas de la 2-NA, on y observe principalement que les mesures réalisées au temps 1 chez les exposés sont clairement plus importantes que celles que l'on trouve au temps 2. De plus, les distributions des résultats des exposés au temps 2 est très semblable à celle que l'on observe chez les témoins. Le tableau 4 en présente une analyse statistique plus détaillée. Tel qu'observé pour la 2-NA, les exposés au temps 1 sont différents aussi bien des témoins que des exposés au temps 2. De plus, au temps 2, on ne trouve plus de différence entre exposés et témoins. Enfin, il n'y a pas davantage de différence entre les fumeurs et les non-fumeurs, quel que soit le groupe.

Tableau 4. Comparaison des valeurs moyennes des concentrations d'adduits 4-AMB-hémoglobine chez les groupes à l'étude (pmol/g hémoglobine, moy. $\pm$ écart-type)

Groupe	Fumeurs	Non-fumeurs	Total
Exposés (temps 1)	1,324 $\pm$ 1,479 [*]	0,981 $\pm$ 0,861 [*]	1,120 $\pm$ 1,147 [*]
Exposés (temps 2)	0,346 $\pm$ 0,226 [†]	0,288 $\pm$ 0,280 [†]	0,312 $\pm$ 0,258 [†]
Témoins	0,258 $\pm$ 0,197	0,250 $\pm$ 0,223	0,253 $\pm$ 0,213

^{*} Valeur statistiquement différente de celle du groupe témoin ($p < 0.05$)

[†] Valeur statistiquement différente de celle du groupe exposé au temps 1 ($p < 0,05$)

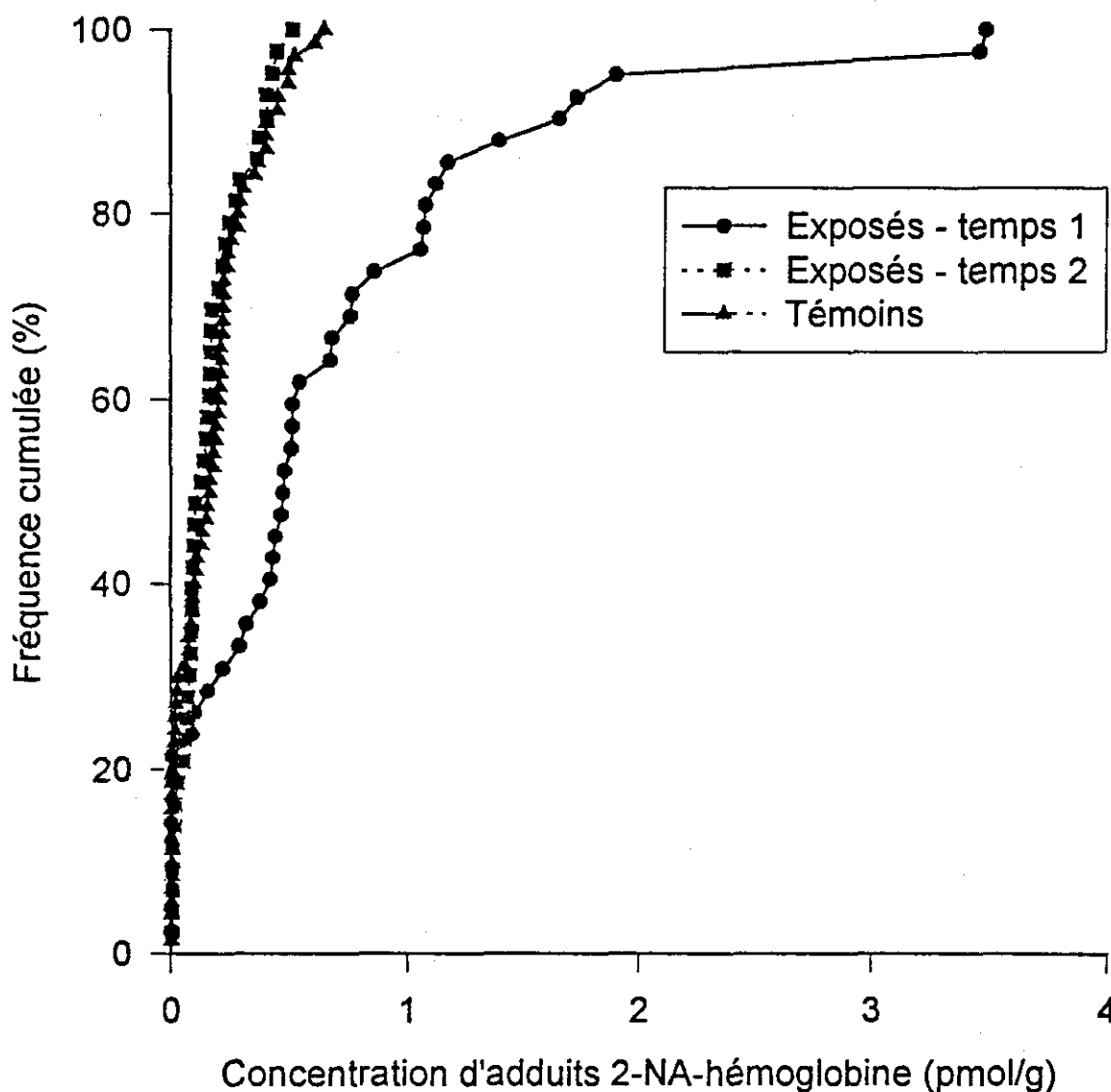


Figure 2. Distribution des résultats de mesures d'adduits 2-naphtylamine-hémoglobine dans les groupes à l'étude

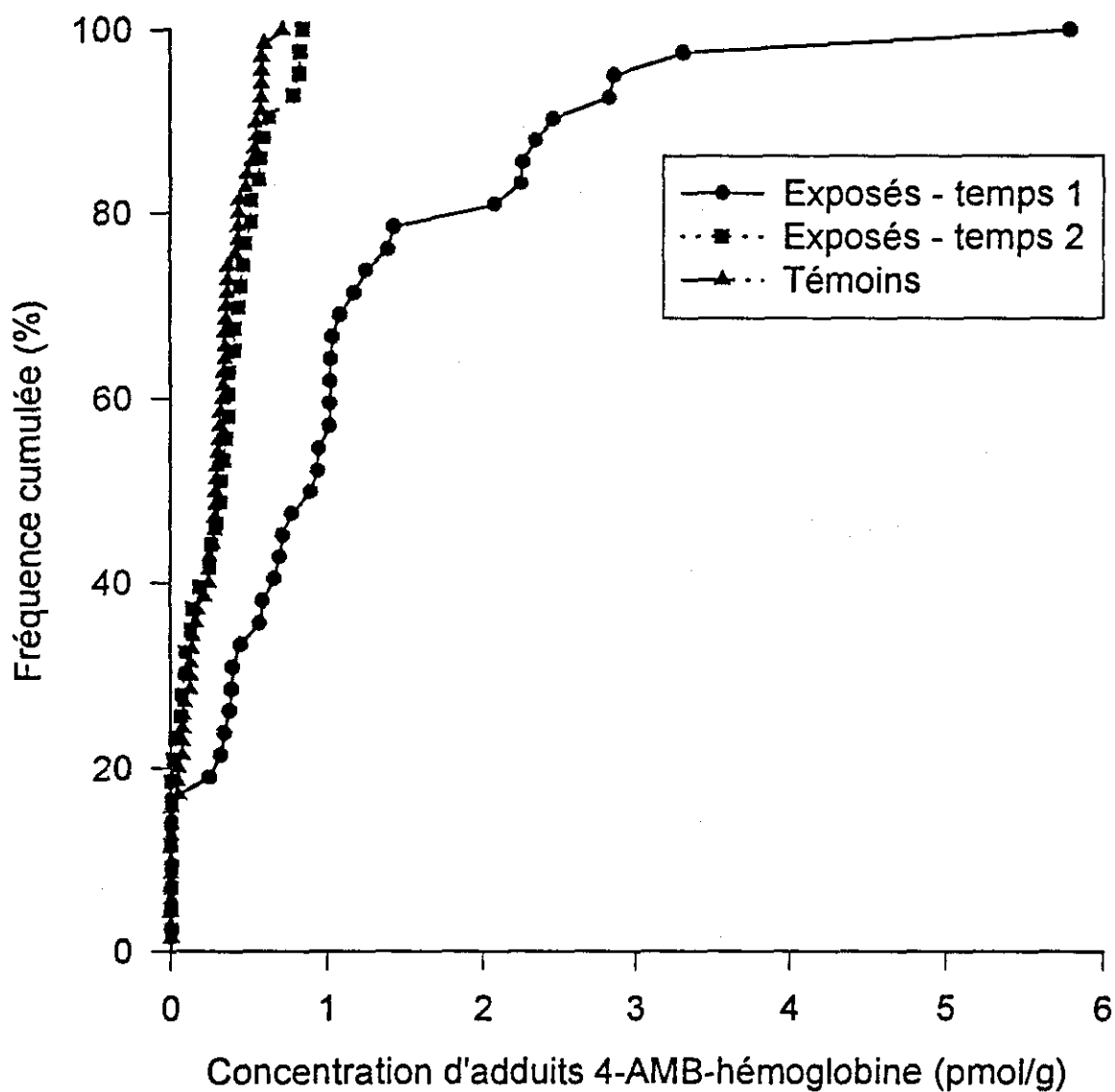


Figure 3. Distribution des résultats de mesures d'adduits 4-aminobiphényle-hémoglobine dans les groupes à l'étude

Valeurs de référence : 99^e centile dans le groupe témoin

Les valeurs de concentrations correspondant au 99^e centile pour les trois types d'adduits dans le groupe témoin sont présentées au tableau 5. Les données sont réparties selon l'âge médian (≤ 37 , > 37 ans) et le statut tabagique.

Tableau 5 : Concentrations d'adduits (pmol/g hémoglobine) correspondant au 99^e centile chez le groupe témoin en fonction de l'âge et du statut tabagique

	BaP		2-NA		4-AMB	
	≤ 37 ans	> 37 ans	≤ 37 ans	> 37 ans	≤ 37 ans	> 37 ans
Fumeurs	0,356	0,677	0,477	0,703	0,698	0,898
Non-fumeurs	0,192	0,445	0,605	0,700	1,002	0,845
Total	0,259	0,554	0,580	0,697	0,936	0,864

Au tableau 6, on retrouve le nombre de travailleurs qui dépassent le 99^e centile du groupe témoin selon chaque indicateur.

Tableau 6 : Nombre de travailleurs potentiellement exposés qui dépassent le 99^e centile

	BaP	2-NA	4-AMB
Temps 1	2	15	21
Temps 2	1	0	1

Si l'on considère l'ensemble des indicateurs, 28 travailleurs (64 %) ayant combattu l'incendie étaient déviants au temps 1, soit deux semaines après l'incendie. Ces données suggèrent qu'à ce moment, en raison de l'incendie vraisemblablement, ces travailleurs avaient été exposés à des substances pouvant donner ces adduits. La vie biologique de ces adduits étant approximativement celle des globules rouges porteurs (120 jours), il ne nous a pas été possible de suivre la courbe de décroissance des adduits formés à l'occasion de ces événements, puisque le prélèvement sanguin suivant (temps 2) a été effectué sept mois après l'incendie. L'intérêt d'un prélèvement aussi tardif n'est pas négligeable cependant puisqu'il permet vraiment, en l'absence de toute autre exposition intercurrente, d'estimer la différence entre l'« état » exposé et l'« état » non exposé.

Sept mois après l'événement (temps 2), deux travailleurs restent déviants, l'un à l'égard du BaP et l'autre à l'égard du 4-AMB. Dans les lignes qui suivent, nous décrivons l'exposition et les concentrations mesurées pour les métabolites au temps 1 et au temps 2 de ces pompiers.

Le premier pompier est un non-fumeur de 36 ans, exposé directement à la fumée sur le site mais porteur d'un appareil respiratoire autonome. Il est déviant pour la concentration en adduit BaP (au temps 2). Par contre, au temps 1, ce pompier a une faible concentration en adduit BaP (0,121 pmol/g), ce qui le place en deçà de la limite du groupe témoin (0,192 pmol/g). Entre le temps 1 et le temps 2, il augmente cette concentration pour atteindre 0,2493 pmol/g. Son histoire de travail montre qu'il a été exposé à d'autres incendies dans les sept mois qui ont suivi celui de Saint-Amable.

Le second pompier est un fumeur de 33 ans, ayant travaillé sur le site mais n'ayant pas été directement exposé à la fumée. Il est déviant à l'égard de sa concentration en adduit 4-AMB au temps 2 (0,8456 pmol/g), la référence se situant à 0,698. Au temps 1, il avait une concentration élevée de l'ordre de 5,7974 pmol/g. Entre le temps 1 et le temps 2, ce travailleur a également combattu d'autres incendies.

Dans le cadre de cette analyse, ces deux travailleurs montrent qu'ils restent déviants au temps 2. On peut cependant exclure la possibilité que ces résultats soient explicables par l'exposition à l'incendie. De fait, le premier pompier montre une faible concentration en adduit BaP immédiatement après l'incendie. Il en est de même pour les adduits 2-NA (0,0035 pmol/g) et les adduits 4-AMB (0,003 pmol/g). Il n'y a manifestement pas d'absorption de contaminants à cause de l'incendie. Entre les deux temps, toutes les concentrations augmentent, ce qui est possiblement associé à d'autres expositions professionnelles. Pour ce qui est du second pompier, son histoire démontre qu'il a exercé un travail de surveillance, qu'il n'a pas été exposé directement à la fumée et qu'il avait malgré tout revêtu l'équipement standard. Au temps 1, seule sa concentration en adduits 4-AMB est déviante alors que les concentrations en adduits BaP (0,0593 pmol/g) et en adduits 2-NA (0,0036 pmol/g) sont très faibles. Entre les deux temps, les concentrations en adduits BaP et en adduits 2-NA sont en augmentation alors que la concentration en adduits 4-AMB fléchit de 85 %.

De l'ensemble de l'analyse, nous retenons qu'au moment de l'incendie, soit au temps 1,

- les concentrations moyennes en adduits BaP, en adduits 2-NA et en adduits 4-AMB sont significativement supérieures chez les travailleurs exposés lors de l'incendie à celles mesurées dans un groupe de témoins non exposés ($p < 0,05$).

Également, pour les travailleurs exposés, nous retenons qu'entre le temps 1 et le temps 2,

- les concentrations moyennes en adduits BaP sont demeurées presque identiques (0,155 pmol/g c. 0,160 pmol/g)
- les concentrations moyennes en adduits 2-NA ont diminué de façon

significative (0,698 pmol/g c. 0,163 pmol/g), la valeur p étant inférieure à 0,0001

- les concentrations moyennes en adduits 4-AMB ont également diminué de façon significative; $p < 0,0001$ (1,120 pmol/g c. 0,312 pmol/g)
- l'ajustement sur l'âge et le statut tabagique ne modifie pas ces conclusions.

DISCUSSION

L'exposition au BaP

Nos résultats indiquent que les travailleurs ayant combattu l'incendie ont des concentrations d'adduits BaPDE-hémoglobine statistiquement plus élevées que celles qui ont été observées chez les témoins appariés quant à l'âge et aux habitudes tabagiques. Toutefois, les valeurs moyennes des exposés ne sont qu'environ 1,5 fois celles qu'on observe chez les témoins. Il est possible que le travail habituel de ces personnes les expose à une dose résiduelle de BaP qui soit plus importante que celle du groupe témoin. Par ailleurs, puisqu'il n'y a pas de différence entre le prélèvement au temps 1 et le prélèvement au temps 2 chez les travailleurs exposés, cela suggère que l'apport en BaP de l'incendie de Saint-Amable lui-même n'a pas été significatif tel que le révèle notre bioindicateur.

Ferreira *et al.* (1994) ont récemment observé une augmentation statistiquement significative des concentrations d'adduits BaPDE-hémoglobine chez des fondeurs lorsque l'exposition moyenne pondérée aux HAP excédait $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Les concentrations d'adduits BaPDE-hémoglobine étaient faiblement associées à la concentration totale de HAP dans l'air de l'usine mais n'étaient associées ni avec les concentrations de BaP lui-même dans l'air, ni avec les concentrations urinaires de 1-hydroxypyrene, ni avec la durée de l'exposition. Les travailleurs examinés par ces auteurs étaient en moyenne plutôt fortement exposés avec des valeurs atteignant parfois $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et leur exposition était, en principe, continue dans cette usine contrairement à l'exposition ponctuelle des travailleurs de notre étude. Par ailleurs, ces auteurs ont considéré qu'une élévation de la concentration de ces adduits était significative lorsqu'elle atteignait 70 pmol/g hémoglobine, une valeur quelque 100 fois plus élevée que la plus forte valeur enregistrée dans notre étude. Signalons enfin que Day *et al.* (1991) ont rapporté des valeurs comprises entre 0,05 et 1 pmol/g hémoglobine pour 85 % des 62 sujets qu'ils ont étudié. Ces valeurs correspondent assez bien à la gamme de valeurs retrouvées dans notre étude.

Dans ce qui semble être le même groupe de travailleurs exposés à une concentration moyenne de HAP de $17,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (de 0,13 à $1212 \mu\text{g}/\text{m}^3$), le même groupe de chercheurs (Tas *et al.*, 1994) a également rapporté des mesures d'adduits BaPDE-albumine. La concentration de ces adduits n'était pas mesurable chez environ 24 % des fondeurs et n'était significativement augmentée que chez les sujets exposés à plus de 0,2 mg de BaP par m^3 d'air. Rappelons que nous avons été incapables de mesurer cet adduit BaPDE-albumine sauf chez un nombre minime d'individus, ce qui est au moins logique avec les observations décrites pour l'autre groupe de chercheurs (et leur 24 % de non décelés).

L'exposition aux amines aromatiques

Les travailleurs exposés ont présenté une concentration d'adduits 2-NA-hémoglobine et 4-AMB-hémoglobine environ 4 fois plus élevée au temps 1 que les valeurs enregistrées dans le groupe témoin ou que les valeurs enregistrées chez ces travailleurs exposés eux-mêmes au temps 2. Il

semblerait donc que la mesure des adduits formés entre ces amines aromatiques et l'hémoglobine représente un bioindicateur d'exposition intéressant pour mettre en évidence même une exposition de courte durée (5 jours). Par ailleurs, le retour à la «ligne de base» pour les travailleurs exposés, 7 mois après l'incendie, correspond bien à ce qui est attendu selon les récents modèles toxicocinétiques de formation et de disparition des adduits formés avec l'hémoglobine (Fennell *et al.*, 1992; Viau et Carrier, 1995).

Une observation est par ailleurs quelque peu surprenante dans cette étude. En effet, nous n'avons pu mettre en évidence une différence entre les concentrations d'adduits amines-aromatiques-hémoglobine entre fumeurs et non-fumeurs. Nous présentons au tableau 7 quelques résultats de la littérature scientifique récente à ce sujet.

Tableau 7. Comparaison des concentrations d'adduits amines aromatiques-hémoglobines chez des fumeurs et des non-fumeurs (pmol/g, moyenne $\pm$ écart-type)

Amine aromatique	Fumeurs	Non-fumeurs	Référence
2-naphtylamine	0,120 $\pm$ 0,082	0,077 $\pm$ 0,038	(Bryant <i>et al.</i> , 1988)
	0,160 $\pm$ 0,165	0,154 $\pm$ 0,166	Témoins de cette étude
4-aminobiphényle	1,040 $\pm$ 0,465	0,301 $\pm$ 0,140	(Bryant <i>et al.</i> , 1988)
	0,745 $\pm$ 0,591	0,170 $\pm$ 0,063	(Falter <i>et al.</i> , 1994)
	0,258 $\pm$ 0,197	0,250 $\pm$ 0,223	Témoins de cette étude

Les concentrations d'adduits 2-NA-hémoglobine chez les témoins fumeurs de la présente étude sont assez proches de celles qui ont été publiées par Bryant *et al.* (1988). Par contre nos valeurs chez les non-fumeurs sont nettement plus élevées que celles observées par ce même auteur. En ce qui concerne les adduits 4-AMB-hémoglobine, nos valeurs chez les non-fumeurs correspondent bien à celles de Bryant *et al.* (1988) et à celles de Falter *et al.* (1994). Toutefois, nos valeurs chez les fumeurs ne sont pas différentes de celles des non-fumeurs alors que les deux autres groupes trouvent environ 3 ou 4 fois plus de ces adduits chez les fumeurs en comparaison avec les non-fumeurs. En fait, les seuls groupes qui se rapprochent de ces valeurs chez les fumeurs déjà publiées sont les fumeurs et les non-fumeurs exposés au temps 1! Ces résultats suggèrent donc que les travailleurs exposés, fumeurs et non-fumeurs, de notre étude ont été momentanément à peu près autant exposés aux amines aromatiques que les fumeurs sans exposition professionnelle de ces autres études.

Comparaison benzo(a)pyrène-amines aromatiques

Tel que mentionné en introduction, la proportion d'une dose d'amine aromatique formant des adduits avec l'hémoglobine peut atteindre 10 %. Les données disponibles suggèrent par contre qu'aussi peu que 0,00002 % à 0,0002 % d'une dose de BaP puisse se retrouver sous la forme d'un adduit à l'hémoglobine. Il est donc possible qu'une dose modérée reçue sur une relativement courte période de temps ne suffise pas à élever de manière significative les concentrations d'adduits BaPDE-hémoglobine alors qu'une dose équivalente d'amines aromatiques serait plus facilement mesurable sous forme de tels adduits. Par ailleurs, il est également probable que les sources de contamination diffuse de notre environnement soient plus importantes pour les HAP que pour les amines aromatiques. De cette façon, il serait plus difficile de mettre en évidence une exposition ponctuelle à un contaminant fort répandu qu'à un contaminant présent à une concentration moindre dans l'environnement général. Par conséquent, le fait que le «rendement» de la production d'adduits du BaP soit beaucoup plus faible que celui de la production d'amines aromatiques, couplé à l'observation que les concentrations d'adduits BaP et amines aromatiques exprimées en pmol/g hémoglobine sont assez voisines, n'indique pas nécessairement que l'exposition aux amines aromatiques ait pu être beaucoup plus élevée que l'exposition aux HAP (représentés ici par le BaP).

Portée pratique des résultats

Retombées de la recherche sur le plan des outils d'évaluation de l'état de santé des populations

La recherche a conduit au développement d'une expertise québécoise permettant de mesurer, de façon sensible et spécifique, la dose interne de trois substances cancérigènes, sous la forme d'adduits à l'hémoglobine; il est à noter que ce développement de marqueurs biologiques s'est fait dans le cadre d'expositions réelles à des contaminants générés lors d'un incendie.

Signification des résultats pour la santé publique

Une première constatation est qu'il y a eu, au cours de l'incendie, exposition des travailleurs à des substances cancérigènes et absorption de ces substances comme le suggère l'augmentation de la concentration des adduits à l'hémoglobine.

Une deuxième constatation est qu'en l'absence d'événements de l'envergure de ceux de l'incendie de Saint-Amable, les valeurs des marqueurs biologiques d'exposition (adduits à l'hémoglobine) retournent au niveau des valeurs rencontrées chez une population témoin, toutes choses étant, par ailleurs, égales sur le plan de la protection individuelle lors des expositions.

Ce qui précède nous permet de mieux saisir la réalité de l'exposition de pompiers à des substances cancérigènes lors d'incendies : exposition et absorption significatives à l'occasion d'incendies de type Saint-Amable; exposition et absorption non significatives à l'occasion d'expositions habituelles. Le protocole comportant un écart de sept mois entre les deux mesures d'adduits a

permis de bien faire ressortir cette réalité.

Un troisième point d'importance est qu'il a été possible de recueillir de solides données de référence pour les adduits chez une population témoin dont la contamination aux substances cancérogènes relève principalement des habitudes de vie.

Par ailleurs, l'examen de l'ensemble des données sur les adduits à l'hémoglobine nous permet de conclure que l'incendie de Saint-Amable ne possédait pas les caractéristiques d'une situation dangereuse pour la santé des travailleurs exposés. Notre conclusion s'appuie sur la conjonction des points suivants, soit le caractère ponctuel et le niveau relativement faible de l'exposition.

- L'exposition est ponctuelle : il semble s'agir d'un événement isolé, avec peu de possibilité d'expositions comparables en d'autres occasions. Les données de la littérature suggèrent qu'il faut des expositions de plus longue durée à des amines aromatiques cancérogènes pour qu'un cancer de la vessie se développe : Bryant et al. (1983) parlent d'une durée minimale de 6 à 12 mois; pour leur part, Armstrong et al. (1994) et Tremblay et al. (1995) présentent des résultats qui montrent que le cancer se développe après une période d'exposition minimale de 5 ans.
- L'exposition est relativement faible : bien que les mesures d'adduits effectuées chez les témoins n'aient pas permis de mettre en évidence une différence entre fumeurs et non-fumeurs, l'augmentation des valeurs d'adduits d'amines aromatiques chez les travailleurs de l'étude est comparable à celle observée par Bryant et al. (1988) et Falter et al. (1994) chez leurs fumeurs par rapport aux non-fumeurs; ceci nous apparaît effectivement correspondre à une situation d'exposition relativement faible.

Enfin, de cette évaluation, nous retenons que les pompiers qui combattent des incendies majeurs (de type industriel) sont potentiellement exposés à des substances chimiques cancérogènes et absorbent en partie ces substances malgré le port de l'équipement individuel de protection en usage courant. Il est possible que les masques utilisés soient en partie perméables à certaines de ces substances et il est probable que l'absorption cutanée soit non négligeable.

Conduite à tenir face à une situation semblable

Les substances cancérogènes qui ont fait l'objet de cette étude appartiennent à la catégorie des génotoxiques pour lesquels il est prudent de reconnaître qu'il n'existe pas de seuil cancérogène. À la lumière de cette donnée et sachant par ailleurs que la population en général est exposée à un bruit de fond de ces mêmes cancérogènes, il est évident qu'un objectif absolu de santé publique doit être de prévenir toute exposition et absorption qui s'ajouterait au bruit de fond, même de façon ponctuelle.

C'est pourquoi lors d'un incendie de la nature de celui de Saint-Amable, les travailleurs devront être munis d'appareils de protection individuelle assurant une protection totale contre l'exposition aérienne et cutanée.

Quant à la stratégie de surveillance biologique de l'exposition aux substances cancérogènes, nous recommandons d'effectuer des mesures des adduits à l'hémoglobine tel que réalisé dans la présente étude :

- une première, dans les deux semaines faisant suite à l'incendie;
- une deuxième, six à huit semaines plus tard;
- une troisième, quatre mois après l'incendie,

cette cédule reflétant la vie biologique des globules rouges porteurs des adduits.

CONCLUSION

Nous avons utilisé la mesure d'adduits formés entre, d'une part, le BaP, la 2-NA et le 4-AMB et, d'autre part, l'hémoglobine comme bioindicateurs d'exposition à ces cancérogènes dans un groupe de travailleurs ayant combattu un incendie majeur dans un dépôt de pneus. Dans le cas du BaP, nos résultats suggèrent soit que l'exposition des travailleurs n'a pas été suffisante pour élever de manière importante les concentrations de ces adduits soit que ces adduits BaPDE-hémoglobine n'offrent pas la sensibilité nécessaire pour estimer l'exposition dans ce contexte particulier. Dans le cas des amines aromatiques, nos résultats indiquent qu'il y a eu une élévation transitoire relativement importante (facteur de 4 environ) des concentrations d'adduits amines aromatiques-hémoglobine mesurables deux semaines après l'incendie avec un retour aux valeurs observées chez les témoins 7 mois plus tard. Les raisons pour lesquelles nous n'observons pas d'effet du tabagisme sur les concentrations sanguines d'adduits 4-AMB-hémoglobine restent à élucider.

L'étude a conduit au développement d'une expertise québécoise permettant d'effectuer la surveillance biologique de certaines substances cancérogènes. Elle a permis également de mieux caractériser la réalité de l'exposition des pompiers à des substances cancérogènes lors d'incendies d'ampleur variable. Sur le plan de la signification des résultats pour la santé publique, l'étude a permis de dégager une opinion à l'effet que l'incendie de Saint-Amable ne possédait pas les caractéristiques d'une situation dangereuse pour la santé des travailleurs. Enfin, l'étude permet de formuler des recommandations spécifiques à l'égard des pompiers lorsque ceux-ci seront exposés à des situations comparables.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'un ou l'autre des aspects de cette recherche. En particulier, nous sommes reconnaissants envers les travailleurs et les sujets témoins. Les analyses d'adduits des amines aromatiques ont été réalisées par Mme Suzanne Dumont sous la direction du professeur Michel Bertrand du département de chimie de l'Université de Montréal. Le travail professionnel de Mmes Micheline Pelletier et Eveline Savoie au laboratoire et à l'analyse statistique a été d'une valeur inestimable.

Les auteurs tiennent également à remercier l'Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du soutien financier qui a permis la réalisation de ces travaux de recherche en toxicologie industrielle.

BIBLIOGRAPHIE

- Armstrong, B., Tremblay, C., Barris, D., Thériault, G. (1994). Lung cancer and polynuclear aromatic hydrocarbons: Aluminium production workers in Arvida, Québec. *American Journal of Epidemiology*, vol. 139, n° 3: 250-262.
- Bryan, G.T. (1983). Pathogenesis of human urinary bladder cancer. *Environ. Health Perspect.* 49, 13-19.
- Bryant, M.S., Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R. et MacIure, M. (1987). Hemoglobin adduct 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers. *Cancer Res.* 47, 602-608.
- Bryant, M.S., Vineis, P., Skipper, P.L. et Tannenbaum, S.R. (1988). Hemoglobin adducts of aromatic amines: Associations with smoking status and type of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9788-9791.
- Carrier, G., Lefebvre, L. et Boivin, M.-C. 1990. Opinion sur les risques à la santé de la population du territoire de la C.U.M., reliés à un incendie potentiel des pneus de Saint-Amable.
- Coldblatt, M.W., Hensen, A.F. et Somerville, A.R. (1960). Metabolism of bladder carcinogens: The metabolic path of 2-naphtylamine in several animal species. *Biochem. J.* 77, 511-516.
- Day, B.W., Taghizadeh, K., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Caporaso, N.E. et Vineis, P. (1991). Benzo(a)pyrene diol epoxide-hemoglobin adducts in cohorts of human subjects determined by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 32, 528 (Résumé de communication).
- Dipple, A., Michejda, C.J. et Weisburger, E.K. (1985). Metabolism of chemical carcinogens. *Pharmacol. Ther.* 27, 265-296.
- Falter, B., Kutzer, C. et Richter, E. (1994). Biomonitoring of hemoglobin adducts: Aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin. Investig.* 72, 364-371.
- Fennell, T.R., Sumner, S.C.J. et Walker, V.E. (1992). A model for the formation and removal of hemoglobin adducts. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1, 213-220.
- Ferreira, M., Jr., Tas, S., dell'Omo, M., Goormans, G., Buchet, J.P. et Lauwerys, R. (1994). Determinants of benzo(a)pyrenediol epoxide adducts to haemoglobin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Occup. Environ. Med.* 51, 451-455.
- Garner, R.C., Dvorackova, I. et Tursi, F. (1988). Immunoassay procedures to detect exposure to aflatoxin B1 and benzo(a)pyrene in animals and man at the DNA level. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 60, 144-150.

Grimmer, G. (1983). *Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, CRC Press, Boca Raton.

Herbert, R., Marcus, M., Wolff, M.S., Perera, F.P., Andrews, L., Godbold, J.H., Rivera, M., Stefanidis, M., Lu, X.Q., Landrigan, P.J. et Santella, R.M. (1990). Detection of adducts of deoxyribonucleic acid in white blood cells of roofers by P-postlabeling. *Scand. J. Work Environ. Health* 16, 135-143.

IARC (1979). *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Suppl. 1*, IARC, Lyon.

Jacques, L., Lainesse, P. et Tremblay, C. 1989. L'entrepôt de pneus de Saint-Amable et ses impacts potentiels sur la santé publique.

Lee, B.M., Baoyun, Y., Herbert, R., Hemminki, K., Perera, F.P. et Santella, R.M. (1991). Immunologic measurement of polycyclic aromatic hydrocarbon-albumin adducts in foundry workers and roofers. *Scand. J. Work Environ. Health* 17, 190-194.

Lemieux, P.M. et Ryan, J.V. (1993). Characterization of air pollutants emitted from a simulated scrap tire fire. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 43, 1106-1115.

Mercier, M. 1991. Mise au point d'une méthode de surveillance de l'exposition au benzo(a)pyrène par la mesure des adduits aux protéines sanguines chez le rat (mémoire de maîtrise, Université de Montréal).

Mercier, M. et Viau, C. (1990). Nouvelles avenues dans la surveillance biologique de l'exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques. *Travail et Santé* 6, S2-S9.

Neumann, H.-G. (1984). Dosimetry and dose-response relationships. *IARC Sci. Publ.* 59, 115-126.

Nikolaou, K., Masclet, P. et Mouvier, G. (1984). Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere - A critical review. *Sci. Total Environ.* 32, 103-132.

Perera, F.P., Poirier, M.C., Yuspa, S.H., Nakayama, J., Jaretzki, A., Curnen, M.M., Knowles, D.M. et Weinstein, I.B. (1982). A pilot project in molecular cancer epidemiology: determination of benzo[a]pyrene-DNA adducts in animals and human tissues by immunoassays. *Carcinogenesis* 1405-1410.

Phillips, D.H., Hemminki, K., Alhonen, A., Hewer, A. et Grover, P.L. (1988). Monitoring occupational exposure to carcinogens: detection by ³²P-postlabelling of aromatic DNA adducts in white blood cells from iron foundry workers. *Mutat. Res.* 204, 531-541.

Phillips, D.H., Schoket, B., Hewer, A., Bailey, E., Kostic, S. et Vincze, I. (1990). Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int. J. Cancer* 46, 569-575.

Rahn, R., Chang, S., Holland, J. et Shugart, L. (1982). A fluorometric-HPLC assay for quantitating the binding of BaP metabolites to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 262-268.

Santella, R.M. (1988). Application of new techniques for the detection of carcinogen adducts to human population monitoring. *Mutat. Res.* 205, 271-282.

Shaw, G.R. et Connell, D.W. (1994). Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 135, 1-64.

Sherson, D., Sabro, P., Sigsgaard, T., Johansen, F. et Autrup, H. (1990). Biological monitoring of foundry workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Br. J. Ind. Med.* 47, 448-453.

Skipper, P.L., Peng, X.C., Soohoo, C.K. et Tannenbaum, S.R. (1994). Protein adducts as biomarkers of human carcinogen exposure. *Drug Metab. Rev.* 26, 111-124.

Skipper, P.L. et Stillwell, W.G. (1994). Aromatic amine-hemoglobin adducts. In *Methods in Enzymology - Volume 231 - Hemoglobins. Part B. Biochemical and Analytical Methods* (J. Everse, K.D. Vandegriff, and R.M. Winslow, Eds.), pp. 643-649. Academic Press, San Diego.

Skipper, P.L. et Tannenbaum, S.R. (1987). Protein adducts of carcinogens as indices of exposure and metabolism. *Comments Toxicol.* 1, 328317-328.

Stillwell, W.G., Bryant, M.S. et Wishnok, J.S. (1987). GC/MS analysis of biologically important aromatic amines. Application to human dosimetry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 14, 221-227.

Tas, S., Buchet, J.P. et Lauwerys, R. (1994). Determinants of benzo(a)pyrene diol epoxide adducts to albumin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 66, 343-348.

Tremblay, C., Armstrong, B., Brodeur, J., Thériault, G. (1995). Estimation of Risk of Developing Bladder Cancer Among Workers Exposed to Coal Tar Pitch Volatiles in the Primary Aluminum Industry. Accepté pour publication *American Journal of Industrial Medicine*, 27 : 335-348.

Viau, C. 1994. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les adduits aux protéines du sang (Rapport de recherche déposé à l'I.R.S.S.T.).

Viau, C. et Carrier, G. (1995). Kinetics of hemoglobin and albumin adducts in rabbits

subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Fundam. Appl. Toxicol.* 24, 140-144.

Weston, A., Rowe, M., Poirier, M., Trivers, G., Vahakangas, K., Newman, M., Haugen, A., Manchester, D., Mann, D. et Harris, C. (1988). The application of immunoassays and fluorometry to the detection of polycyclic hydrocarbon-macromolecular adducts and anti-adduct antibodies in humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 60, 157-162.

Annexe 1

LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES ET LES ADDUITS AUX PROTÉINES DU SANG

CLAUDE VIAU

INTRODUCTION

Ce rapport présente les principaux résultats obtenus des travaux de recherche effectués dans le cadre du projet intitulé "Les hydrocarbures polycycliques aromatiques et les adduits aux protéines du sang". Il convient de préciser ici que plusieurs étudiantes et un étudiant ont été impliqués dans la cueillette des données. Mme Marlène Mercier a réalisé les travaux de développement de la méthode d'analyse chez l'animal et établi le profil cinétique d'élimination des adduits après administration aiguë chez le rat. Mme Odette Blondin a collaboré à la caractérisation de la méthode par l'établissement des taux de récupération de l'analyte à diverses étapes de la procédure d'analyse. M. Serge Lamy a adapté la méthode d'analyse des adduits à des échantillons de sang humain. Mme Michèle Bouchard a réalisé les études cinétiques chez le rat exposés de manière sub-chronique. Cette étudiante a également mis au point dans notre laboratoire la méthode de dosage du principal métabolite urinaire du benzo(a)pyrène. Une grande partie des résultats ont été obtenus grâce à la compétence technique et à la minutie de Mme Micheline Pelletier, technicienne. Le Dr Gaétan Carrier fut un précieux collaborateur dans l'établissement du modèle cinétique de formation et d'élimination des adduits chez le lapin et dans l'élaboration d'un modèle sur la cinétique de l'excrétion urinaire du 1-hydroxypyrene chez l'humain. Enfin, la précieuse collaboration du Dr Ada Vyskočil est également digne de mention.

Au cours de la réalisation de ce projet, notre suivi de la littérature scientifique nous indiquait l'intérêt de la mesure de métabolites urinaires des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA) comme outil possible de surveillance biologique de l'exposition à ces composés. Aussi avons-nous jugé essentiel de nous ouvrir à cette approche. À ce titre, les travaux pivots de Mme Bouchard sur la mesure simultanée des adduits et des métabolites urinaires chez les mêmes animaux nous ont permis de comparer l'intérêt de ces deux outils d'évaluation de l'exposition. Le Dr Ada Vyskočil et Mme Caroline Dodd ont apporté une contribution irremplaçable à cette ouverture sur une approche performante. Nous décrivons donc également dans ce rapport les premiers résultats obtenus avec cet outil complémentaire qu'est la mesure de l'excrétion urinaire de métabolites mono-hydroxylés de deux HPA, le benzo(a)pyrène (BaP) et le pyrène.

SOMMAIRE À CARACTÈRE GRAND PUBLIC

Cette recherche visait à évaluer l'intérêt de la mesure d'adduits formés avec des protéines du sang pour mesurer l'exposition de travailleurs et de travailleuses à des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA). Un adduit est le produit d'une liaison entre un contaminant et une protéine comme l'hémoglobine de nos globules rouges. Comme le contaminant reste "accroché" à la protéine aussi longtemps que la protéine restera dans le sang, on peut donc dire que les adduits agissent comme une mémoire biologique de l'exposition passée. Les HPA sont des contaminants de plusieurs environnements industriels comme les fonderies, les alumineries et les usines de traitement du bois à la créosote. Ces contaminants sont aussi présents dans l'environnement général de sorte que tout le monde y est plus ou moins exposé. Dans cette étude, nous avons vérifié plusieurs aspects de la formation et de la disparition des adduits chez des animaux nous confirmant cette caractéristique de mémoire biologique. Toutefois, dans la population humaine qui n'a pas d'exposition professionnelle aux HPA, il est très difficile de mesurer la concentration de ces adduits dans le sang parce que cette concentration est très faible et qu'elle approche de notre limite de mesure en laboratoire. Des travaux complémentaires réalisés dans le cadre de cette subvention de recherche nous ont heureusement permis d'explorer un autre indicateur de l'exposition aux HPA qui s'est révélé plus intéressant. Il s'agit de la mesure de certains produits d'excrétion urinaire, appelés métabolites hydroxylés des HPA. Un de ces produits est le 1-hydroxypyrene. Il est facile à mesurer chez l'humain, même en l'absence d'exposition professionnelle aux HPA. Cette capacité de mesurer l'exposition des humains à la contamination environnementale générale par les HPA nous indique que cette approche est plus sensible que l'approche de mesure des adduits et qu'elle permettrait également une meilleure évaluation de l'exposition dans les milieux de travail où il y a de grandes différences dans les niveaux d'exposition d'un poste de travail à l'autre. Nous avons donc commencé un sérieux processus de validation de ce nouvel indicateur par des études expérimentales chez des animaux, chez des volontaires et dans certains milieux de travail. En conclusion, la mesure des adduits est utile pour l'évaluation de l'exposition à des contaminants qui se lient à des protéines, pourvu qu'il y ait suffisamment de molécules de contaminants qui se lient de cette façon, ce qui ne semble pas être le cas pour les HPA dans l'environnement général. Pour mesurer l'importance de l'exposition aux HPA, nous proposons plutôt d'utiliser la mesure des métabolites urinaires hydroxylés. Les travaux de validation sur ce nouvel outil sont en cours dans notre laboratoire●

RÉSUMÉ SCIENTIFIQUE

L'estimation de l'exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA) est compliquée du fait notamment de la difficulté d'évaluer la véritable dose absorbée dans le contexte de plusieurs processus industriels. Nous avons étudié deux approches de surveillance biologique de l'exposition aux HPA reposant sur la mesure des adduits formés entre, d'une part, un métabolite électrophile du benzo(a)pyrène (BaP), le BaPdiolépoxyde (BaPDE) et, d'autre part, l'hémoglobine et l'albumine. Chez le rat, nous avons démontré la plus grande persistance de l'adduit BaPDE-hémoglobine par rapport à l'adduit BaPDE-albumine avec des demi-vies respectives de 10,7 et 3,6 jours. Chez le lapin, des doses de 0,5 et 5 $\mu\text{mol/kg}$ par semaine administrées en 1, 2 ou 5 injections hebdomadaires ont permis de démontrer que le déterminant majeur des concentrations d'adduit à l'hémoglobine atteintes (0,3 et 3 pmol/g hémoglobine) après quelques semaines est la dose hebdomadaire, indépendamment du schéma d'administration. Chez l'humain qui n'a pas d'exposition professionnelle aux HPA, la concentration d'adduit BaPDE-hémoglobine est très faible, oscillant entre 0,04 et 0,32 pmol/g hémoglobine tout en n'étant pas influencée par le tabagisme. Dans certaines conditions, la mesure des métabolites urinaires hydroxylés de certains HPA présente une bonne corrélation avec les concentrations d'adduit BaPDE-hémoglobine. Nous concluons que (1) la mesure des adduits a sa place dans un programme de surveillance biologique de l'exposition à des substances électrophiles lorsque leur concentration est suffisamment élevée et (2) dans le cas particulier des HPA, la mesure des métabolites urinaires hydroxylés apparaît constituer un indicateur plus pratique de l'exposition humaine à ces importants contaminants.

RAPPEL DES OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le projet de recherche vise les objectifs suivants:

1. Valider la méthodologie analytique de mesure des adduits telle qu'utilisée dans notre modèle expérimental.
2. Démontrer l'existence d'une relation de type dose-effet entre l'administration d'une dose aiguë de benzo(a)pyrène (un hydrocarbure polycyclique aromatique ci-après nommé BaP) et la concentration d'adduits à l'hémoglobine et à l'albumine. De manière complémentaire, démontrer la persistance des adduits protéiques au niveau de chacune des deux protéines.
3. Démontrer que des doses répétées de BaP entraînent la formation d'une quantité croissante d'adduits protéiques et que cette croissance du niveau d'adduits atteint un plateau après un temps relié à la durée de vie des protéines sur lesquelles les adduits sont mesurés.
4. Démontrer l'existence d'un niveau d'adduits BaP-hémoglobine et BaP-albumine mesurable dans une population n'ayant pas d'exposition professionnelle au BaP.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Traitements des animaux

Trois espèces animales ont été utilisées dans le cadre de nos travaux soit le rat, la souris et le lapin. Les résultats obtenus chez la souris ne sont pas décrits dans ce rapport mais se retrouvent dans l'une de nos publications (Viau *et al.*, 1993a). Quatre types de traitements ont été utilisés, soit dans le but de produire des échantillons positifs pour la mise au point de la méthode d'analyse, soit pour étudier le devenir des adduits dans l'organisme des animaux. Ces traitements sont:

1. Administration de BaP dissous dans l'huile de maïs par injection intrapéritonéale (I.P.) (rat)
2. Administration du BaP dissous dans l'huile de maïs par intubation intragastrique (rat)
3. Administration du métabolite réactif du BaP, le BaPdiolépoxyde (BaPDE) dissous dans du sérum par injection intraveineuse (rat)
4. Administration du BaP dissous dans un mélange propylène glycol/acétone par injection sous-cutanée (lapin)

Chez le rat, selon l'expérience, les prélèvements sanguins ont été effectués soit à partir d'une veine de la queue chez l'animal immobilisé par contention, soit à partir de l'artère abdominale chez le rat anesthésié. Enfin, chez le lapin, des ponctions veineuses ont été effectuées dans l'oreille. Les prélèvements d'urine ont été réalisés en plaçant les animaux dans des cages à métabolisme individuelles en acier inoxydable.

Traitements des volontaires humains

Pour la mesure des niveaux de base d'adduits dans une population n'ayant pas d'exposition professionnelle aux HPA, des ponctions veineuses de 30 mL ont été réalisées à partir d'une veine du pli du coude.

Par ailleurs, deux volontaires bien informés ont accepté de s'exposer au pyrène dans les études sur la cinétique d'excrétion du 1-hydroxypyrene (1-OHP). Ils ont été exposés soit par application cutanée (surface interne des avant-bras) de pyrène dissous dans un faible volume de toluène, soit par ingestion d'une faible dose de pyrène dissous dans de l'huile d'olive. Notons, au passage, que la dose avait été calculée de façon à ne pas dépasser la dose quotidienne, hebdomadaire ou bihebdomadaire à laquelle des patients souffrant de psoriasis s'exposent de manière répétée. Dans ces études, toutes les mictions urinaires ont été recueillies jusqu'à 48 heures suivant l'administration du pyrène en enregistrant soigneusement le moment et le volume de chaque miction.

Approche analytique

Les adduits chez le rat

Les mesures d'adduits aux protéines sanguines ont été réalisées en s'appuyant sur la méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) publiée par Rahn *et al.* (1982) et faisant appel à une détection fluorimétrique. En ce qui concerne la méthode de prélèvement et de préparation des échantillons, elle est inspirée de Shugart (1985). Un échantillon de sang veineux est recueilli sur héparine puis centrifugé. Le plasma est transféré dans un second tube. Le culot de globule rouge est lavé trois fois avec le double de son volume de solution saline isotonique héparinée. Les érythrocytes sont ensuite lysés par addition de deux volumes d'eau déminéralisée et d'un demi volume de tétrachlorure de carbone. Après agitation vigoureuse, le mélange est centrifugé et le surnageant aqueux contenant l'hémoglobine est transféré dans des tubes de verre à bouchons vissés. De l'acide chlorhydrique est alors ajouté à une concentration finale de 0,12N et le mélange est hydrolysé à 90°C pendant trois heures. Entretemps, à un volume du plasma, on ajoute un volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. On laisse précipiter les immunoglobulines et autres protéines de grande taille et, après centrifugation on récupère le surnageant. À un volume de celui-ci, on ajoute un volume de sulfate d'ammonium saturé et tamponné à pH 4,6 (point isoélectrique de l'albumine). On laisse précipiter et on récupère, par centrifugation, le culot contenant majoritairement de l'albumine. Cette fraction protéique est également hydrolysée comme décrit ci-dessus. Les hydrolysats sont refroidis, puis passés à travers des mini-colonnes de C-18 (Sep-Pak de la compagnie Waters). Les tétraols, dérivés du benzo(a)pyrène et constituant le produit final de l'hydrolyse acide des adduits, sont ensuite élués avec du méthanol. Ce solvant est évaporé à sec sous courant d'azote et le résidu est partitionné entre une phase acétate d'éthyle et une phase aqueuse. L'extraction de cette dernière avec le solvant organique est répétée deux fois, les extraits combinés et le solvant est évaporé à sec. Le résidu est redissous dans un volume de méthanol auquel on ajoute un volume d'eau avant analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La séparation s'effectue à l'aide d'une pompe binaire (Perkin-Elmer, modèle 250) sur une colonne de 25 cm de C18 (5µm, Supelco) en phase mobile isocratique constituée d'un mélange eau: méthanol (50:50). La détection s'effectue à l'aide d'un détecteur de fluorescence (Perkin-Elmer, modèle LS-40) dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont réglées respectivement à 246 nm et 396 nm.

Les adduits chez l'humain

Le point de départ de la méthode d'analyse est le même que pour les adduits mesurés chez le rat. Toutefois, à cause des très faibles concentrations rencontrées chez l'humain, les volumes de sang qui doivent être traités sont plus importants de sorte que des essais de récupération spécifiques ont dû être effectués afin de nous assurer de la qualité de nos analyses. Par ailleurs, en ce qui concerne les adduits à l'albumine, la présence de nombreux fluorophores dans l'extrait final soumis à la chromatographie nous a obligés à recourir à une étape de séparation supplémentaire. Puisqu'il y a eu un développement important de cette méthodologie analytique, celle-ci sera présentée dans la section des résultats.

Les métabolites urinaires hydroxylés

Jongeneelen a proposé une méthode d'analyse par CLHP qui est plutôt simple d'utilisation (Jongeneelen *et al.*, 1987). Et effectivement, nous avons d'abord utilisé cette méthode avec beaucoup de facilité dans notre laboratoire pour le dosage du 1-hydroxypyrene (1-OHP), un métabolite majeur du pyrene. Toutefois, il est apparu, à l'usage, que la sensibilité de cette analyse semblait varier dans le temps sans que cela ne soit causé par une perte de sensibilité du détecteur. En incluant de fréquents échantillons de contrôle de qualité et en répétant fréquemment l'injection des standards dans le système, il a été possible de produire des résultats d'analyse fiables. Par contre, lorsque nous avons entrepris la mesure en routine du 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP), nous avons rencontré des difficultés beaucoup plus sérieuses comme un dédoublement du pic chromatographique du 3-OHBaP et une grande instabilité du signal d'une injection à la suivante. Croyant à la possibilité d'une oxydation du métabolite, nous avons entrepris une étude systématique de stabilisation avec deux antioxydants, l'acide ascorbique et l'hydroxytoluène butylé (BHT, selon l'acronyme anglais). Ce dernier s'est révélé sans effet alors que l'acide ascorbique permettait d'obtenir des signaux plus importants pour une même quantité de 3-OHBaP injectée. L'ensemble de nos tests nous a ensuite permis de constater que l'action stabilisante de l'acide ascorbique était due, non pas à son action antioxydante, mais plutôt à son effet de masquage de sites d'adsorption sur la colonne de chromatographie. Cela nous a amenés à préparer un solvant porteur dont la phase méthanolique contenait une faible concentration (1 mg/L) d'acide ascorbique. Les gains en stabilité et en sensibilité ont été spectaculaires. Cette phase mobile modifiée a d'ailleurs été utilisée par la suite pour les dosages de 1-OHP avec un gain intéressant de stabilité et de sensibilité. Cette modification de la méthode et ses avantages nous ont semblé assez significatifs pour en publier les détails dans un article qui a immédiatement été accepté (Bouchard *et al.*, 1994). On trouvera une copie de cet article en annexe à ce rapport.

Démonstration de l'origine des tétraols dosés

Nous avons vu que les adduits sont mesurés par la détermination du BaPtétraol libéré de l'hydrolyse enzymatique des fractions protéiques. Or, puisqu'il est possible que le BaPtétraol (une molécule hydrophobe) se trouve tel quel dans le sang, nous avons voulu nous assurer que le tétraol dosé dans notre procédure provenait véritablement d'un adduit. Il était en effet possible que des molécules de tétraol puissent être «cachées» dans les régions hydrophobes des protéines et que la dénaturation de ces dernières par l'hydrolyse acide à chaud ait permis à ces molécules de se retrouver libres en solution. Pour faire cette vérification, une protéolyse enzymatique a été réalisée sur les fractions hémoglobine et albumine afin de détruire la structure des protéines et par conséquent les régions hydrophobes qu'on peut normalement y trouver. Les protéolysats ont ensuite été divisés en deux: une partie a subi toutes les étapes de l'analyse à partir de la chromatographie sur Sep-Pak, l'autre partie subissant l'hydrolyse acide habituelle avant de passer par toutes les autres étapes de l'analyse. Les détails de ce protocole peuvent être retrouvés dans l'une de nos publications (Viau *et al.*, 1993a) qui apparaît en annexe.

Persistance des adduits après administration aiguë de BaPdiolépoxyde

Dans cette expérience, la persistance des adduits formés entre le BaPdiolépoxyde (BaPDE), un

métabolite électrophile du BaP, et des protéines sanguines fut évaluée chez des rats. Nous avons administré le BaPDE en injection intraveineuse. Cette procédure permet la formation très rapide d'adduits à l'hémoglobine et à l'albumine, en concentrations suffisantes pour permettre le suivi des concentrations d'adduits protéiques pendant plusieurs jours. Des échantillons de sang furent prélevés chez les rats pendant une période totale de 20 jours.

Formation et élimination des adduits dans un traitement subchronique au BaP

Dans cette expérience, des lapins furent traités par injections sous-cutanées avec 0,5 et 5 μmol de BaP par kg de poids corporel par semaine pendant 11 semaines consécutives. Chacune de ces doses hebdomadaires était administrée en 1, 2 ou 5 injections à autant de sous-groupes d'animaux. Ce protocole visait à vérifier si le scénario d'administration influençait la concentration sanguine d'adduits à l'hémoglobine, atteinte après quelques semaines, ou si le seul déterminant de cette dernière était la dose totale reçue par semaine. Nous penchions vers la dernière hypothèse et avons ainsi développé un modèle de formation et d'élimination des adduits (Viau and Carrier, 1992) s'appuyant sur les éléments suivants:

- 1- les adduits à l'hémoglobine se forment de manière uniforme et en quantités proportionnellement égales dans tous les érythrocytes du sang;
- 2- une molécule d'adduit à l'hémoglobine persistera dans le flux sanguin aussi longtemps que l'érythrocyte à l'intérieur duquel il se trouve et la durée de vie de cet érythrocyte n'est pas influencée par la présence de l'adduit (tant que la concentration érythrocytaire d'adduit est faible, ce qui se vérifie dans nos expériences).

La traduction d'un modèle semblable en systèmes d'équations a été réalisée par Fennell (Fennell *et al.*, 1992) et nous avons comparé nos résultats expérimentaux aux résultats prévus par ce modèle mathématique.

Relation entre la formation d'adduits à l'hémoglobine et l'excrétion urinaire de métabolites hydroxylés dans l'exposition subchronique au BaP

Des rats ont reçu, pendant 4 semaines, des doses intrapéritonéales de 1,25, 6,25 et 31,25 μmol de BaP par kg, du mardi au vendredi. Des prélèvements sanguins ont été effectués les mardis et des prélèvements urinaires de 24 heures ont été recueillis les lundis et les jeudis. Les adduits BaPDE-hémoglobine et l'excrétion urinaire de 3-OHBaP (3-OHBaP) ont été mesurés selon les méthodes décrites précédemment. La relation entre ces deux indicateurs biologiques de l'exposition a reçu une attention particulière.

Application de la méthode de mesure des adduits à des échantillons de sang humain

Nous avons recruté 19 fumeurs et 35 non-fumeurs âgés respectivement de $39,9 \pm 9,8$ ans et de $29,3 \pm 7,0$ ans afin de déterminer la concentration d'adduit BaPDE-hémoglobine selon la méthode décrite plus loin dans la section Résultats. Ces personnes habitent à Montréal ou dans les environs immédiats de la ville.

Excrétion urinaire de 1-OHP chez des travailleurs exposés à des HPA, valeur de base de cette excrétion dans la population générale et effet du tabagisme

Dix-neuf travailleurs d'une usine de traitement de bois ont accepté de participer à une étude sur leur exposition au pyrène. Cette usine fait notamment l'imprégnation de poteaux de bois et de dormants de chemin de fer avec de la créosote. Des données obtenues d'un rapport d'hygiène industrielle produit il y a environ 5 ans avaient indiqué des concentrations ambiantes de pyrène allant de non décelées à $0,12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les divers postes de travail de cette section de l'usine. Un premier échantillon d'urine a été recueilli au milieu d'une semaine de travail et un second au retour d'une période de non exposition d'au moins 64 heures.

Le second groupe est constitué de travailleurs ayant participé à la décontamination du site de l'incendie de pneus de Saint-Amable. Des mesures de matières solubles dans le benzène (MSB) ayant révélé des concentrations ambiantes se situant autour de $0,2 \text{ mg}/\text{m}^3$ (la norme actuelle) à certains postes, une équipe de santé au travail du Département de Santé communautaire de l'hôpital Charles-Lemoyne a souhaité évaluer l'exposition de ces personnes à l'aide d'une approche de surveillance biologique. Des échantillons d'urine ont donc été recueillis à plusieurs occasions afin d'y déterminer la concentration de 1-OHP. Nous rapportons ici les résultats obtenus chez 29 de ces personnes pour lesquelles nous avons pu obtenir 3 prélèvements séquentiels le vendredi matin (début de la journée de travail) d'une première semaine puis les lundi matin (début de la journée de travail) et jeudi après-midi (fin de la journée de travail) de la semaine suivante. Sur la base des mesures de MSB et de leur description de tâche, ces personnes ont été classées comme peu ou très exposées. Il faut cependant noter que les personnes travaillant sur le terrain portaient des moyens de protection personnelle (gants et masques).

Nous avons également mesuré l'excrétion urinaire de 1-OHP chez 10 travailleurs affectés à des opérations de coupe mécanique de végétation avec des débroussailleuses fonctionnant à l'aide de moteurs à deux temps utilisant un mélange d'essence et d'huile de lubrification comme carburant. Les échantillons ont été prélevés en début de semaine mais à la fin du quart de travail. Nous ne possédons aucune mesure de la concentration ambiante de HPA pour ces travailleurs.

Finalement, nous avons obtenu des échantillons d'urine d'un groupe indépendant de personnes n'ayant pas d'exposition professionnelle aux HPA. Ces personnes ne sont pas appariées aux travailleurs décrits ci-dessus et ont simplement servi à établir une valeur d'excrétion de base du 1-OHP dans notre laboratoire. Il s'agit de 12 hommes et de 9 femmes recrutés parmi les étudiants, professeurs et employés du Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu de l'Université de Montréal et de 7 cadres d'une usine de carbure de silicium. À ces personnes qui peuvent être considérées comme de vrais témoins, nous avons ajouté les valeurs d'excrétion du 1-OHP dans les échantillons d'urine prélevés le lundi matin (après une fin de semaine de congé) chez 83 travailleurs de l'usine de carbure de silicium de même que chez les 29 travailleurs de la décontamination du site de l'incendie de pneus de Saint-Amable. Nous avons pu procéder ainsi dans l'estimation de la valeur d'excrétion de base du 1-OHP sur la base de la connaissance du faible niveau d'exposition de ces deux groupes de travailleurs et sur la base de notre connaissance de la cinétique de l'excrétion urinaire du 1-OHP qui nous indique que ces personnes doivent avoir atteint un niveau de base après une fin de semaine hors du milieu de

travail. Ceci nous fournit donc un collectif de 140 personnes (45 fumeurs et 95 non-fumeurs) à partir duquel nous avons également estimé la contribution du tabagisme à partir d'une classification dichotomique (fumeur/non-fumeur).

Sitôt après la miction, du thymol (un bactériostatique) était ajouté aux prélèvements et les échantillons envoyés au laboratoire dans une glacière portative au plus 24 heures après le prélèvement. Ces conditions assurent une excellente stabilité à long terme du 1-OHP (non publié).

Étude de la cinétique de l'excrétion urinaire du 1-OHP

Dans une première expérience, on a badigeonné 100 cm² de la peau de la face interne de chaque avant-bras avec 250 µg de pyrène dissous dans 100 µL de toluène (dose totale = 500 µg). Une heure après l'application, les avant-bras ont été lavés à l'eau tiède et au savon. Toutes les mictions urinaires ont ensuite été recueillies pendant 48 heures, leur volume mesuré et un aliquot conservé à 4°C ou à -20°C avec un peu de thymol, un bactériostatique. Nous avons confirmé la stabilité à long terme du 1-OHP dans des échantillons ainsi conservés (non publié).

Dans une seconde expérience, ces volontaires ont été exposés de la même manière et à la même dose que précédemment mais l'exposition a été répétée 5 jours consécutifs. Toutes les mictions urinaires ont été recueillies jusqu'à 48 heures après la dernière application.

Finalement, dans une dernière expérience, les volontaires ont ingéré 500 µg de pyrène dissous dans 3 mL d'huile d'olive. Prévoyant une phase initiale d'excrétion beaucoup plus rapide dans ce cas, une diurèse aqueuse a été induite par absorption abondante de boissons diverses (eau, café, tisane). Cette stimulation de la diurèse a permis de recueillir des échantillons d'urine toutes les 30 minutes pendant les 8 premières heures de l'expérience. Comme précédemment, les collectes ont été effectuées pendant 48 heures. Des déterminations de 1-hydroxypyrène ont été réalisées sur ces échantillons. Cette dernière expérience surtout a permis l'élaboration d'un modèle toxicocinétique de l'excrétion urinaire du 1-OHP chez l'humain. Il s'agit d'un modèle non linéaire dont il serait trop long de donner les détails ici. Le lecteur intéressé pourra consulter, en annexe, le manuscrit qui a été accepté pour publication (Viau *et al.*, 1994a).

RÉSULTATS

Démonstration de l'origine des tétraols dosés

Chez des animaux injectés avec le BaPDE, nous avons trouvé que de 70 à 100 % des tétraols dosés proviennent de la liaison covalente du diolépoxyde à ces protéines. La détermination de la demi-vie de disparition des adduits en utilisant un protocole de détermination du tétraol qui ne cherche pas à distinguer entre celui qui provient d'une véritable liaison covalente et celui qui est déjà présent dans l'échantillon produit des mesures fiables (Viau *et al.*, 1993a). On trouvera une illustration de ces données à la figure 1.

Persistance des adduits après administration aiguë de BaPdiolépoxyde

À la figure 1, les résultats de disparition des adduits formés tant avec l'hémoglobine qu'avec l'albumine sont présentés en pourcentage de la valeur mesurée 24 heures après l'administration intraveineuse du BaPDE. Ce mode d'expression des résultats permet une comparaison directe de la vitesse de disparition de chacun de ces adduits. Si l'on suppose une cinétique de disparition de premier ordre et que l'on calcule la demi-vie des adduits, on trouve une valeur de 3,6 jours pour l'adduit formé avec l'albumine et 10,7 jours pour l'adduit formé avec l'hémoglobine.

Formation et élimination des adduits dans un traitement subchronique au BaP

Chez les lapins injectés avec le BaP, le scénario d'administration des doses au cours d'une semaine n'influence pas la concentration plateau d'adduits obtenue après environ 6 semaines d'exposition (figure 2). Par contre, la dose hebdomadaire détermine cette concentration avec des valeurs de 0,3 et 3 pmol/g hémoglobine pour les doses de 0,5 et 5 μ mol par kg par semaine, respectivement. La figure 3 montre les données expérimentales combinées (tous les sous-groupes) pour la dose hebdomadaire de 5 μ mol/kg. Les traits discontinus représentent une simulation mathématique des données selon un modèle de formation et de disparition des adduits. Bien qu'il soit hors du cadre de ce document d'aborder les détails de cette comparaison entre les données empiriques et le modèle, mentionnons que des travaux sont en cours sur de possibles explications de la moindre concordance observée en début et en fin d'exposition.

Relation entre la formation d'adduits à l'hémoglobine et l'excrétion urinaire de métabolites hydroxylés dans l'exposition subchronique au BaP

La figure 4 montre les résultats de la mesure de l'adduit à l'hémoglobine formé chez le rat traité pendant 4 semaines avec le BaP en injections intrapéritonéales. Le profil est globalement semblable à ce qu'on avait pu observer dans l'expérience menée avec les lapins. À la plus faible dose de BaP, l'adduit n'est mesurable qu'à la toute fin de l'expérience, au moment de l'euthanasie car le volume de sang prélevé est alors suffisant pour permettre la quantification.

À la figure 5, qui présente les données d'excrétion du 3-OHBaP, on voit un tracé qui présente des minima et des maxima. Rappelons à cet effet que les maxima correspondent aux prélèvements urinaires du jeudi, soit en pleine période d'exposition, alors que les minima correspondent aux prélèvements du lundi, soit trois jours (72 heures) après la dernière

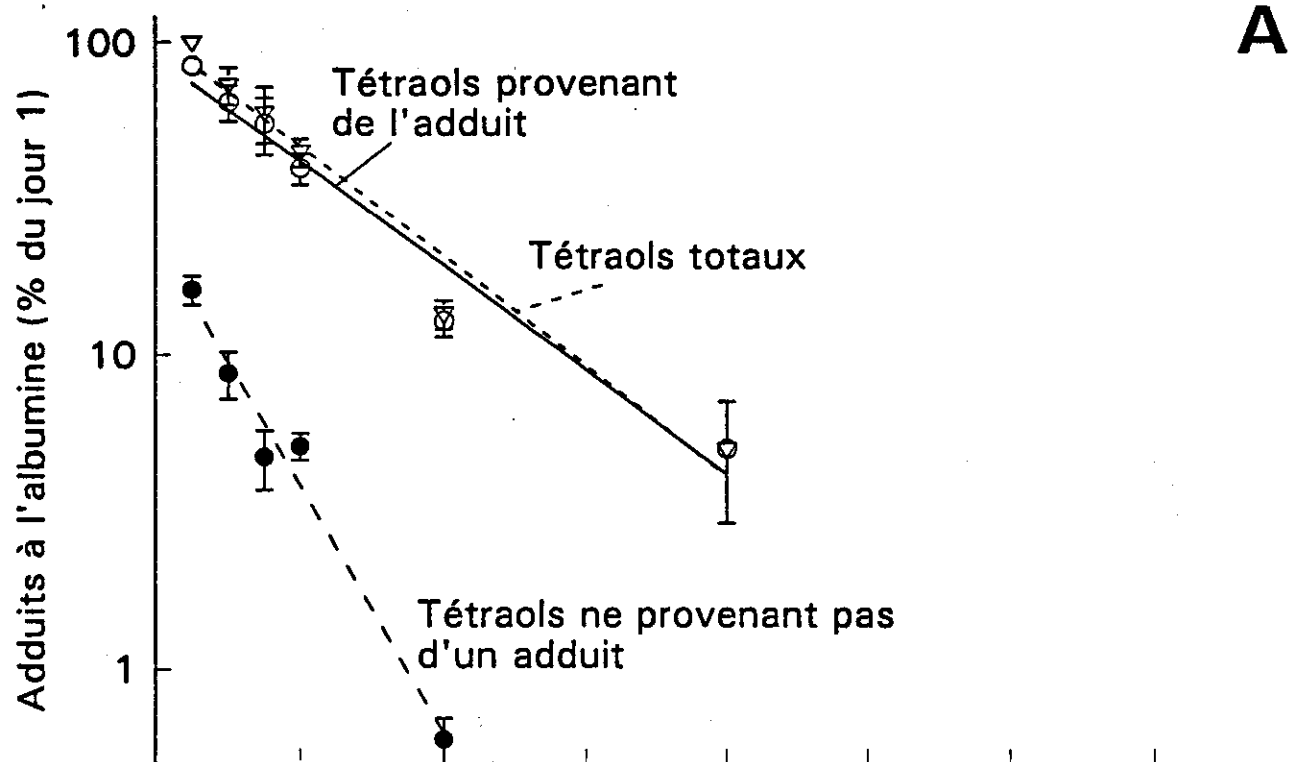
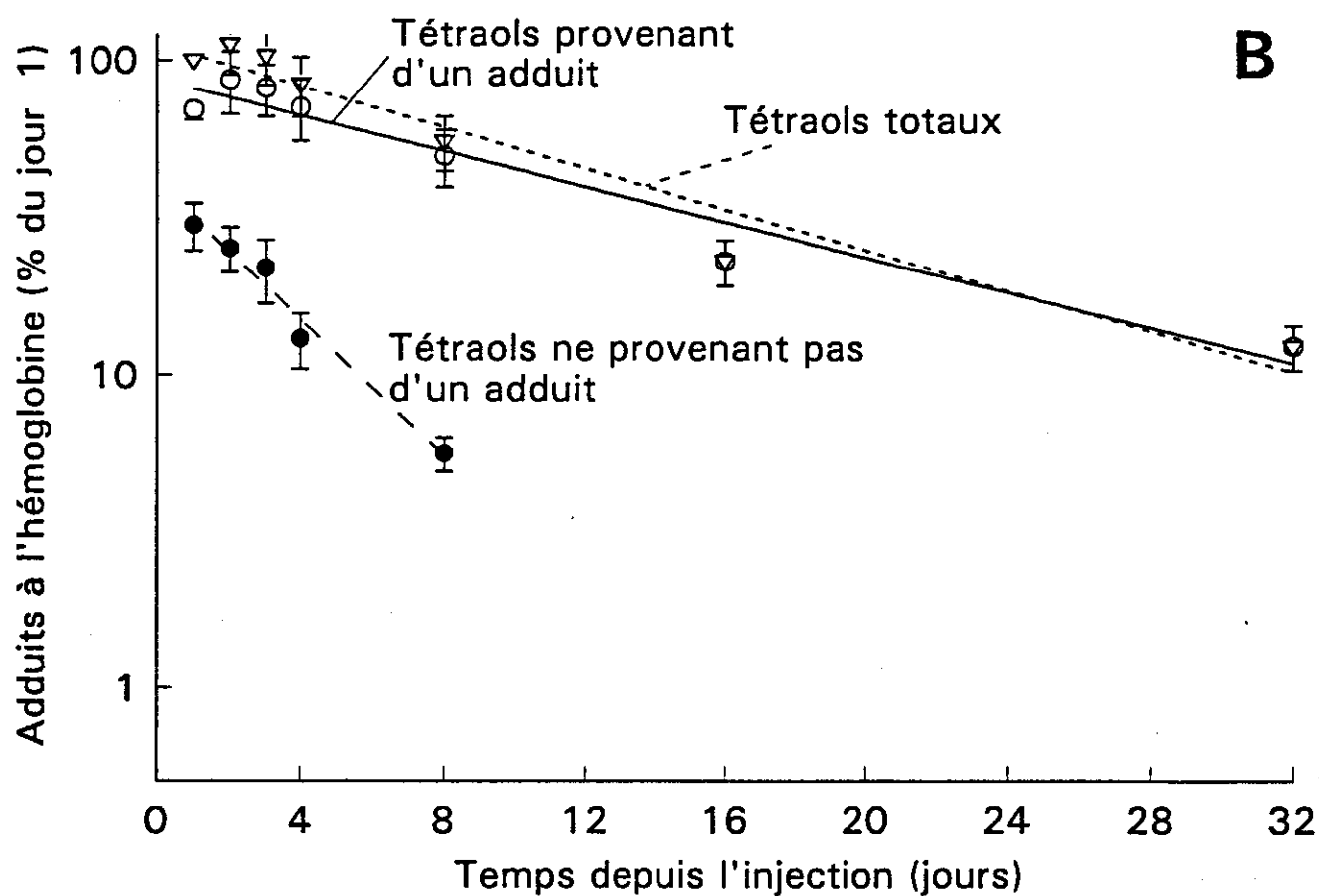
A**B**

Figure 1. Disparition d'adduits BaPDE-albumine (A) et BaPDE-hémoglobine (B) chez des rats injectés en intraveineuse avec le BaPDE.

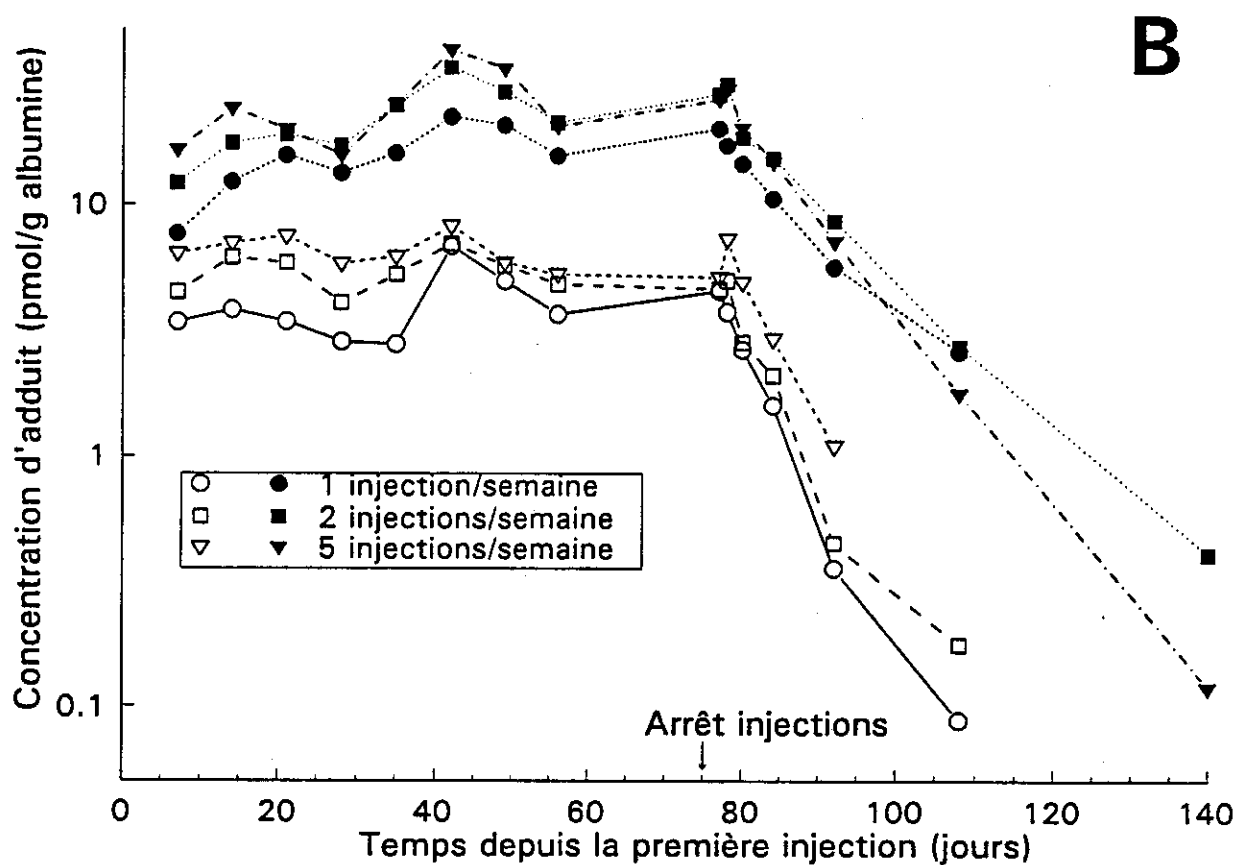
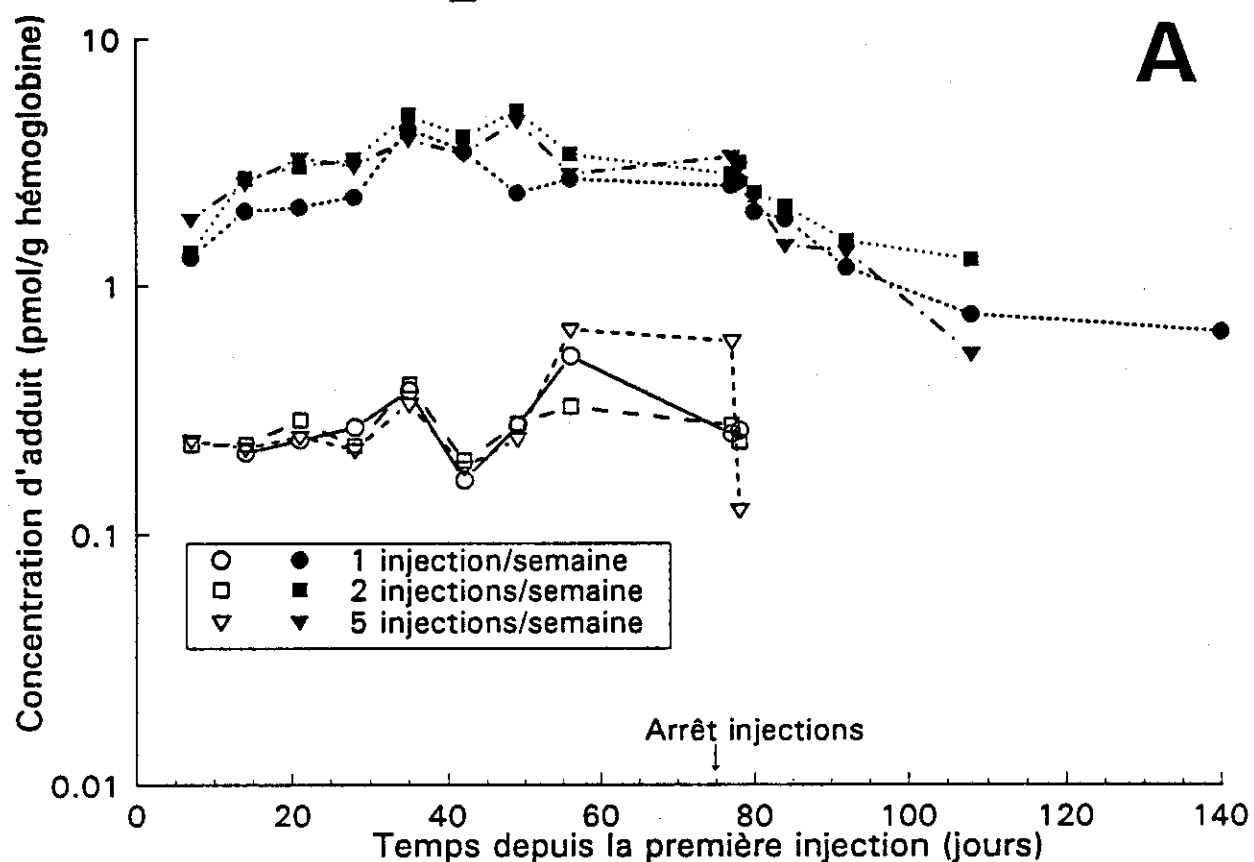


Figure 2. Formation et disparition d'adduits BaPDE-hémoglobine et BaPDE-albumine chez des lapins recevant du BaP en injections sous-cutanées pendant 11 semaines. Les doses sont de 0,5 (symboles ouverts) et 5 (symboles fermés) μmol par kg par

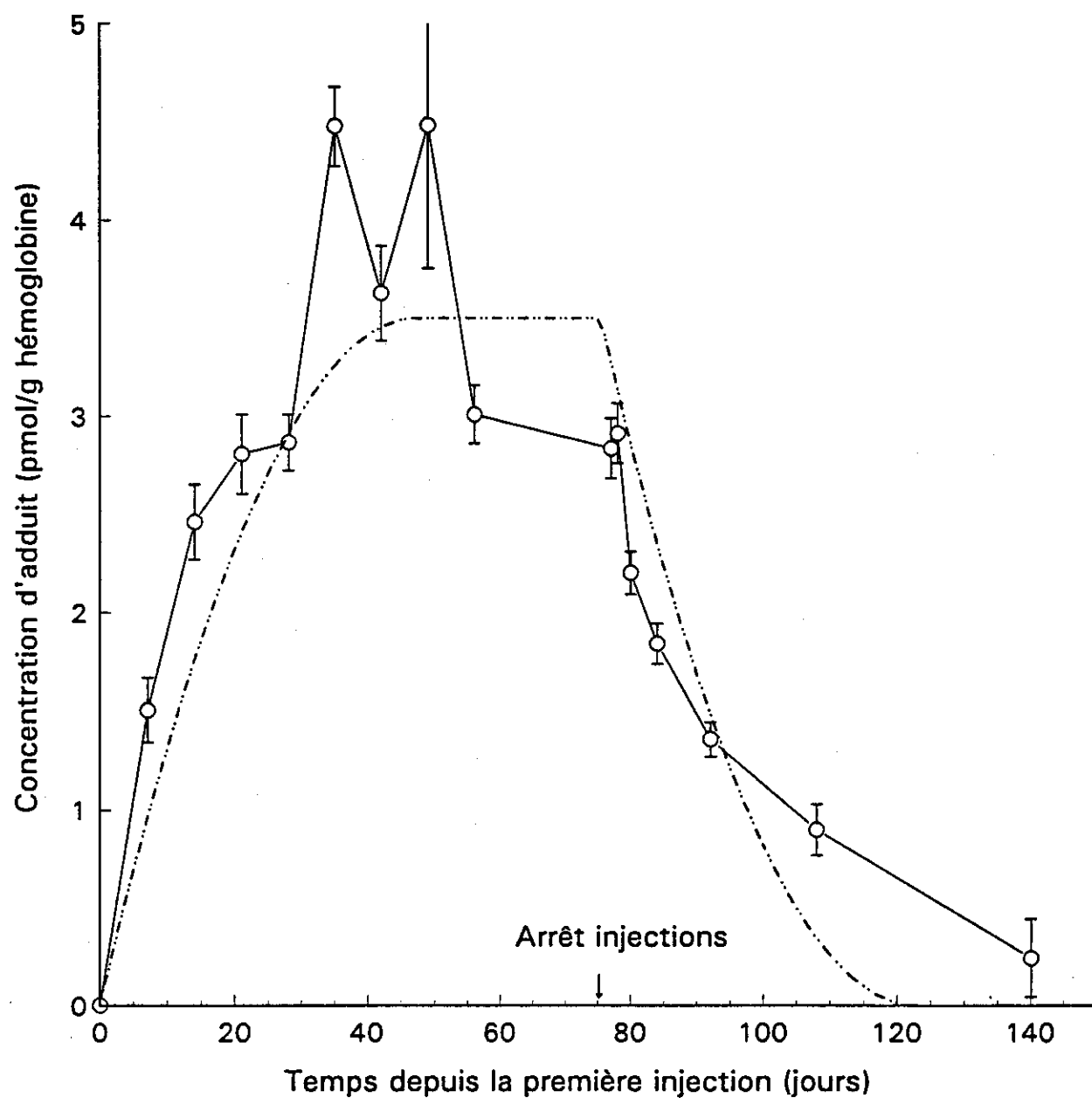


Figure 3. Comparaison des résultats expérimentaux de formation et de disparition d'adduit BaPDE-hémoglobine chez des lapins en traitements subchronique avec le BaP avec un modèle mathématique de simulation.

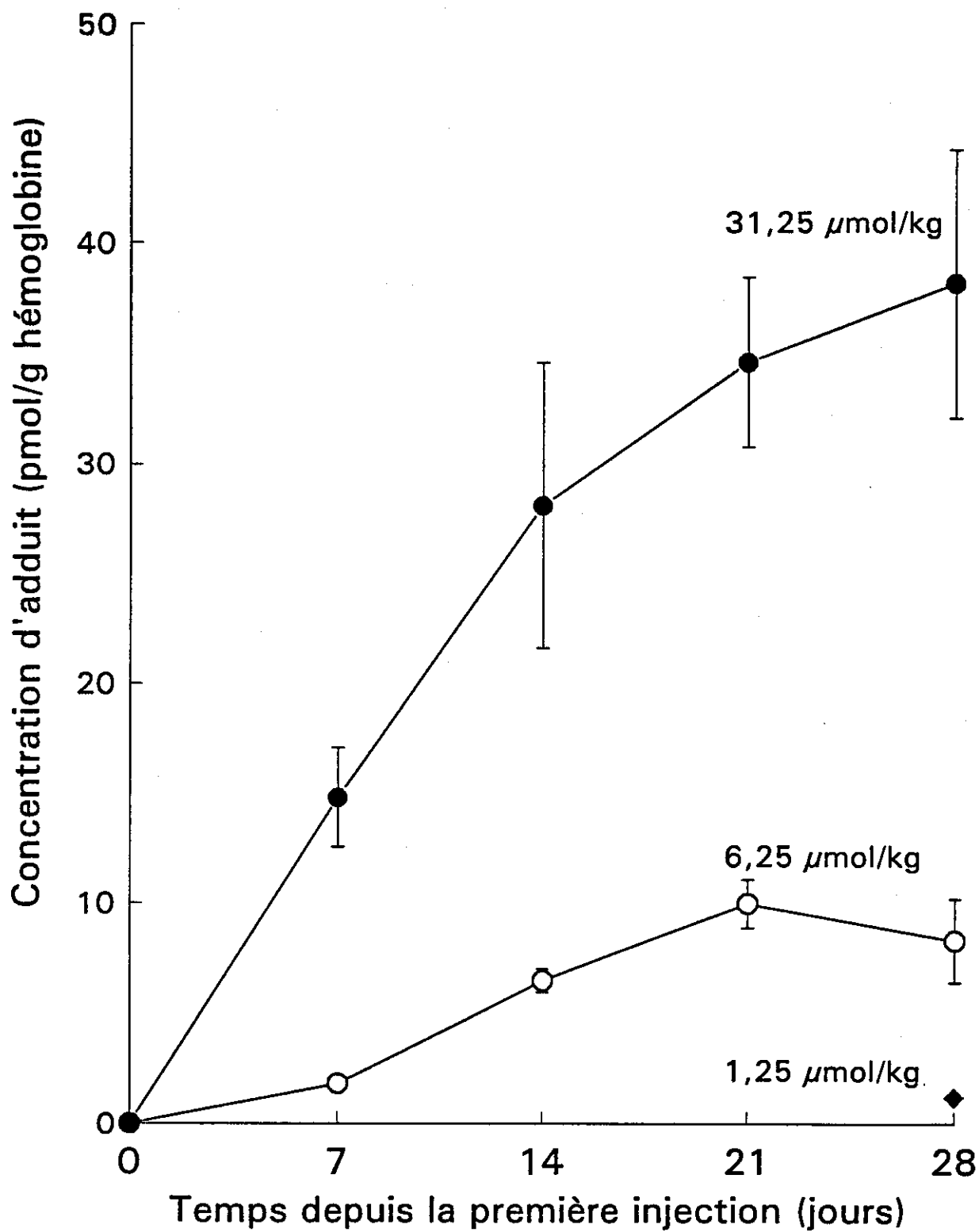


Figure 4. Profil de formation d'adduit BaPDE-hémoglobine chez des rats recevant des injections répétées de BaP à raison de 4 jours par semaine pendant 4 semaines.

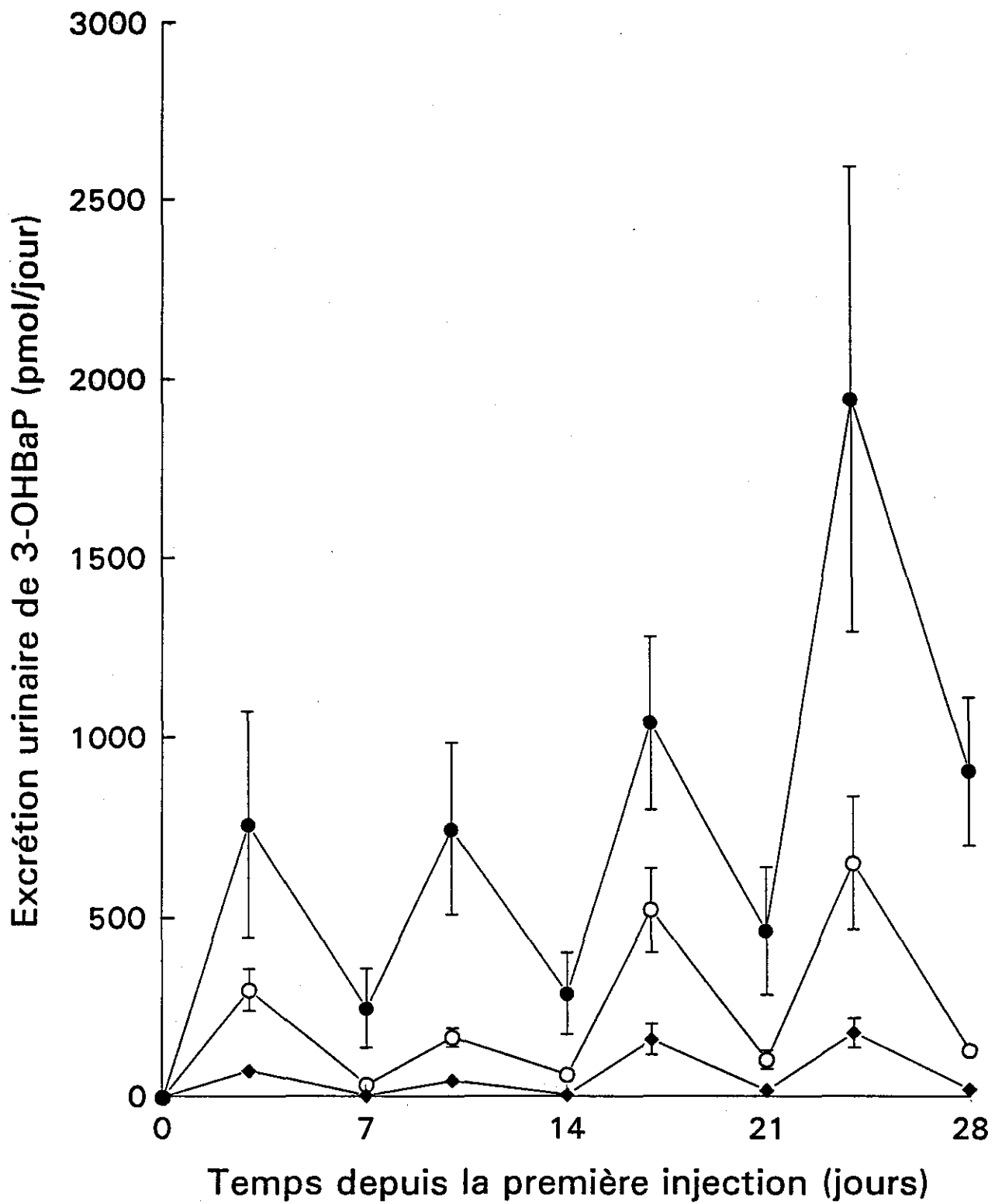


Figure 5. Profil d'excrétion urinaire de 3-OHBaP chez des rats recevant des injections répétées de BaP à raison de 4 jours par semaine pendant 4 semaines.

administration de BaP. Précisons ici que nous avons par ailleurs déterminé une demi-vie apparente de premier ordre de 25 heures pour l'élimination du 3-OHBaP suite à l'injection aiguë d'une dose unique de BaP (ces résultats ne sont pas montrés ici mais apparaissent dans un article soumis pour publication et dont on trouvera une copie en annexe (Bouchard et Viau, soumis pour publication)).

Enfin, la figure 6 présente la corrélation obtenue entre les valeurs d'excrétion urinaire totale (prélèvement de 24 heures) de 3-OHBaP mesurées le dernier jour de l'expérience et la concentration des adduits BaPDE-hémoglobine mesurée dans le prélèvement sanguin obtenu au moment de l'euthanasie. La corrélation est statistiquement significative ($R^2 = 0,94$, $p < 0,0001$).

Modifications de la méthode de dosage des adduits pour application aux échantillons de sang humain

Étant donné que les niveaux d'adduits retrouvés chez l'humain sont de l'ordre de la pmole par gramme de protéine, cette mesure a posé un défi particulier. En effet, nous avons d'abord trouvé dans le sang humain la présence de substances, interférant avec la quantification en chromatographie, qui ne se retrouvaient pas dans le sang de rat ou de lapin. Ensuite, la quantité de sang requise pour le dosage (environ 30 mL) était beaucoup plus importante qu'avec les animaux et a donc exigé certaines vérifications quant aux conditions d'hydrolyse des adduits et de nettoyage subséquent des échantillons. Les résultats de ce développement sont succinctement présentés ci-après. Afin de permettre au lecteur une meilleure compréhension, nous indiquons à la figure 7 les étapes d'analyse.

Isolement de l'hémoglobine

L'isolement de l'hémoglobine s'est effectué essentiellement comme pour le sang des animaux. La seule particularité concerne le volume de sang utilisé (30 à 40 mL au lieu de 0,3 à 5 mL). Par ailleurs, la lyse des globules rouges humains permet une récupération plus complète de l'hémoglobine que dans le cas des érythrocytes de rats.

Conditions d'hydrolyse des adduits

Rappelons que lors de la formation des adduits, le carbone # 10 du BaPDE engagé dans une liaison de type époxyde réagit avec un site nucléophile d'une protéine. Le dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) requiert l'hydrolyse préalable de l'adduit conduisant à la "libération" d'une molécule de benzo(a)pyrènetétraol (BaPT). Rigoureusement parlant, cette appellation répandue est incorrecte puisque le cycle benzénique comportant les quatre substituants hydroxyles a alors perdu son aromaticité. Nous référerons néanmoins à cet analyte sous l'acronyme de BaPT.

Une observation fortuite nous ayant permis d'observer que le degré de dilution aqueuse de la solution d'hémoglobine avant l'hydrolyse acide pouvait influencer l'efficacité de récupération du BaPT, des essais ont été effectués à des dilutions correspondant à 10, 20 et 40 fois le volume cellulaire. Ces résultats apparaissent à la figure 8. La récupération est significativement plus

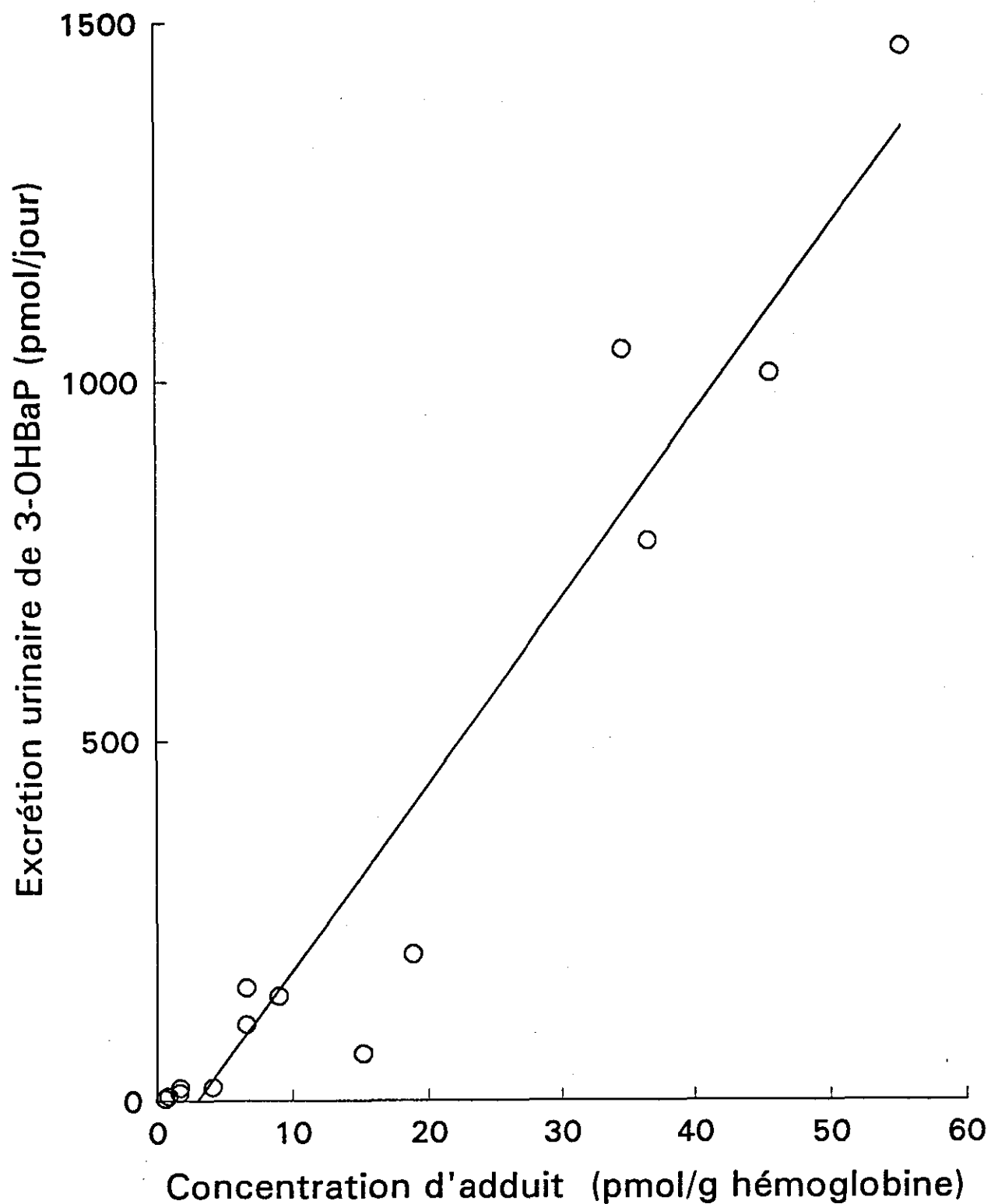


Figure 6. Corrélation entre l'excrétion urinaire de 3-OHBaP et la concentration d'adduit BaPDE-hémoglobine chez des rats recevant des injections répétées de BaP à raison de 4 jours par semaine pendant 4 semaines.

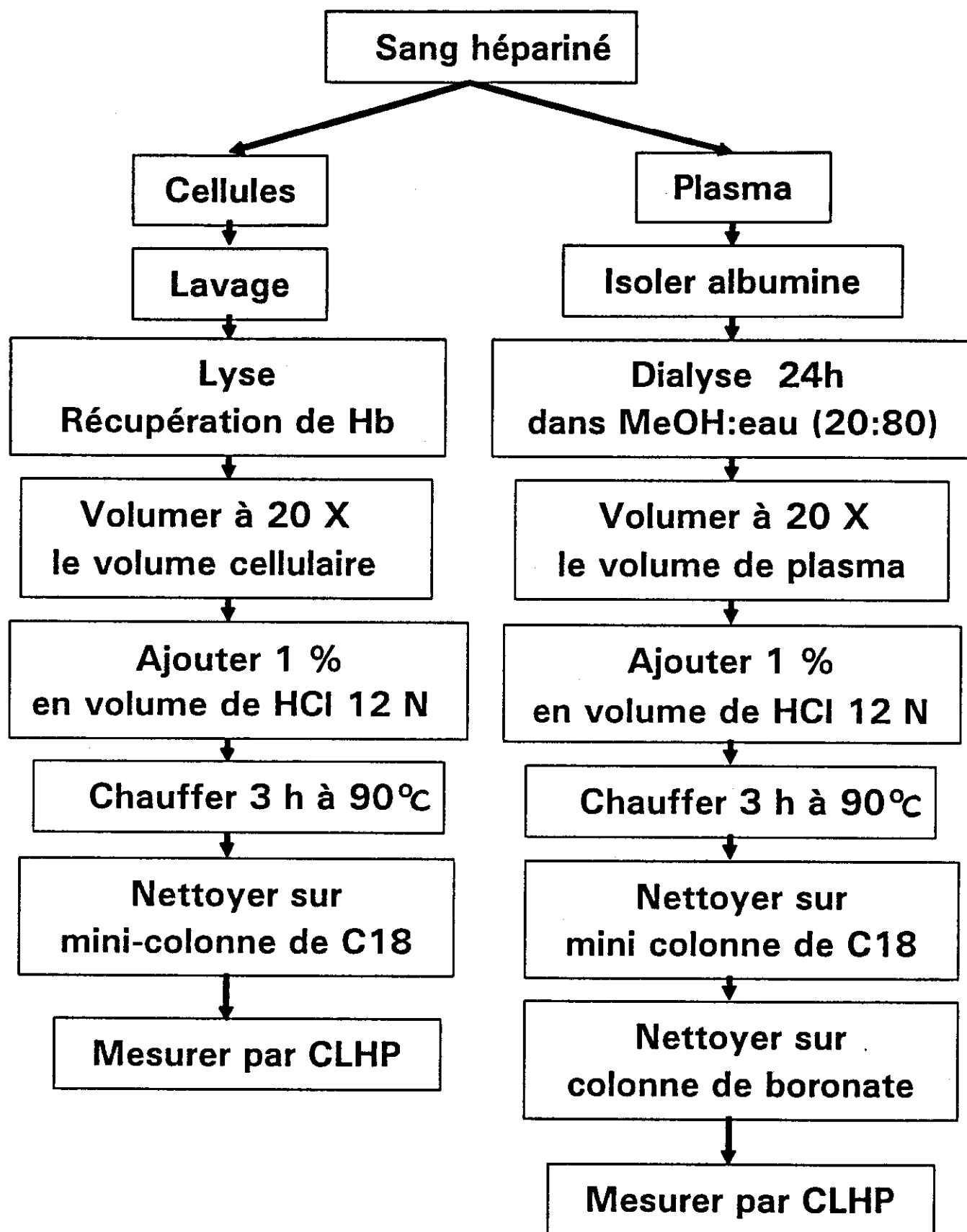


Figure 7. Étapes de l'analyse des adduits BaPDE-hémoglobine et BaPDE-albumine dans des échantillons de sang humain.

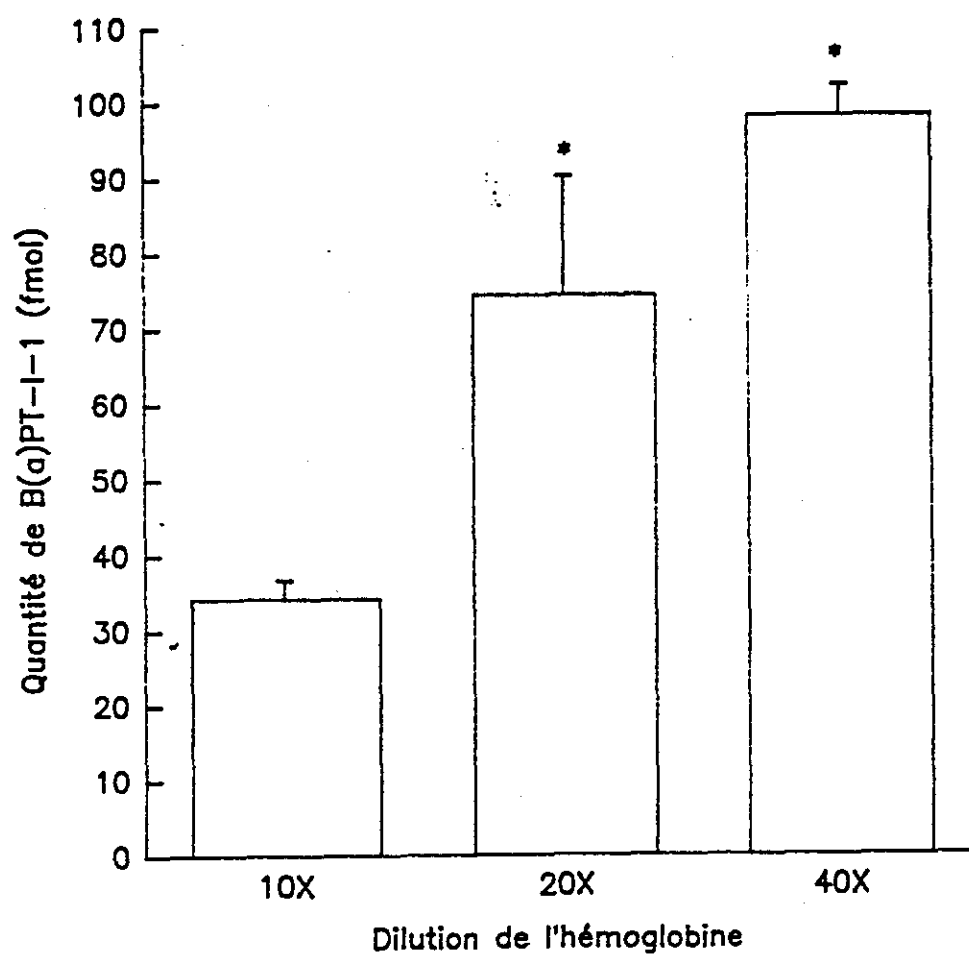


Figure 8. Effet de la dilution de la solution d'hémoglobine humaine sur la récupération de benzo(a)pyrènetétraol (B(a)PT). Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la dilution 10 X

importante à la dilution 20X par rapport à la dilution 10X. La récupération supplémentaire à la dilution 40X n'étant pas significativement différente de celle de la dilution 20X, nous avons adopté cette dernière pour des raisons pratiques (à 40X, le volume total à hydrolyser serait de 600 mL par échantillon).

Nous avons également voulu voir si une meilleure récupération de BaPT pouvait être obtenue en modifiant le degré d'acidité du mélange hydrolysé. Chez l'animal, nous utilisons une concentration finale en HCl de 0,12 M. Nous avons testé ici des concentrations finales de 0,06, 0,12, 0,24 et 0,36 M. La figure 9 montre que les conditions initiales (0,12 M) demeuraient les meilleures.

Tel que mentionné précédemment, les chromatogrammes obtenus avec le sang humain contiennent davantage de pics que ceux que nous avons obtenus avec le sang animal. Nous avons alors voulu savoir s'il était possible d'éliminer certaines des substances produisant ces pics par élution sélective sur la mini-colonne de C18 (Seppak[®]). Après rétention du BaPT sur cette colonne, cette dernière fut rincée soit avec de l'eau (procédure habituelle) ou avec une solution eau:méthanol à des proportions 90:10 ou 80:20 (v/v). En nous écartant de la procédure habituelle, nous obtenions une perte de BaPT (figure 10) sans pour autant améliorer l'apparence du chromatogramme. Nous nous en sommes donc tenus à la procédure habituelle. Par ailleurs, les volumes appliqués sur ces mini-colonnes étant très importants, nous nous sommes assurés qu'il ne se produisait pas de perte lors de l'application.

Finalement, le pic de BaPT que nous obtenions par enrichissement de sang humain (échantillons périmés obtenus en volumes de 450 mL auprès de la Croix-Rouge) apparaissait avec une largeur à la base plus importante que lorsque le standard seul était injecté dans le chromatographe. Il était manifeste que nous faisons face à un problème de résolution chromatographique. Celui-ci fut réglé par l'ajout d'environ un demi pourcent (v/v) de tétrahydrofurane au solvant d'élution tel que montré à la figure 11.

Détermination des adduits à l'albumine

Plusieurs des remarques précédentes touchant notamment le volume de sang utilisé et la complexité du signal chromatographique s'appliquent également à l'albumine. Au-delà des modifications rapportées à la section précédente, nous avons également dû ajouter une étape de nettoyage de la matrice par chromatographie sur gel d'affinité au boronate. Ce type de gel retient en effet les molécules possédant une structure de diol en position *cis* sur des carbones voisins, ce qui est le cas des molécules de BaPT. Lorsqu'on effectue l'ensemble de la procédure, nous faisons toutefois face à une perte d'analyte de 50 %. Cette perte est importante mais s'est révélée constante tout au long de la procédure telle que vérifiée par l'analyse des nombreux échantillons de contrôle testés. La figure 12 montre des exemples de chromatogrammes excluant et incluant l'étape de chromatographie d'affinité sur gel de boronate.

Application de la méthode de mesure des adduits à des échantillons de sang humain

La figure 13 montre la distribution des résultats de mesure d'adduit à l'hémoglobine dans la population de 19 fumeurs et de 35 non-fumeurs qui n'avaient pas d'exposition professionnelle

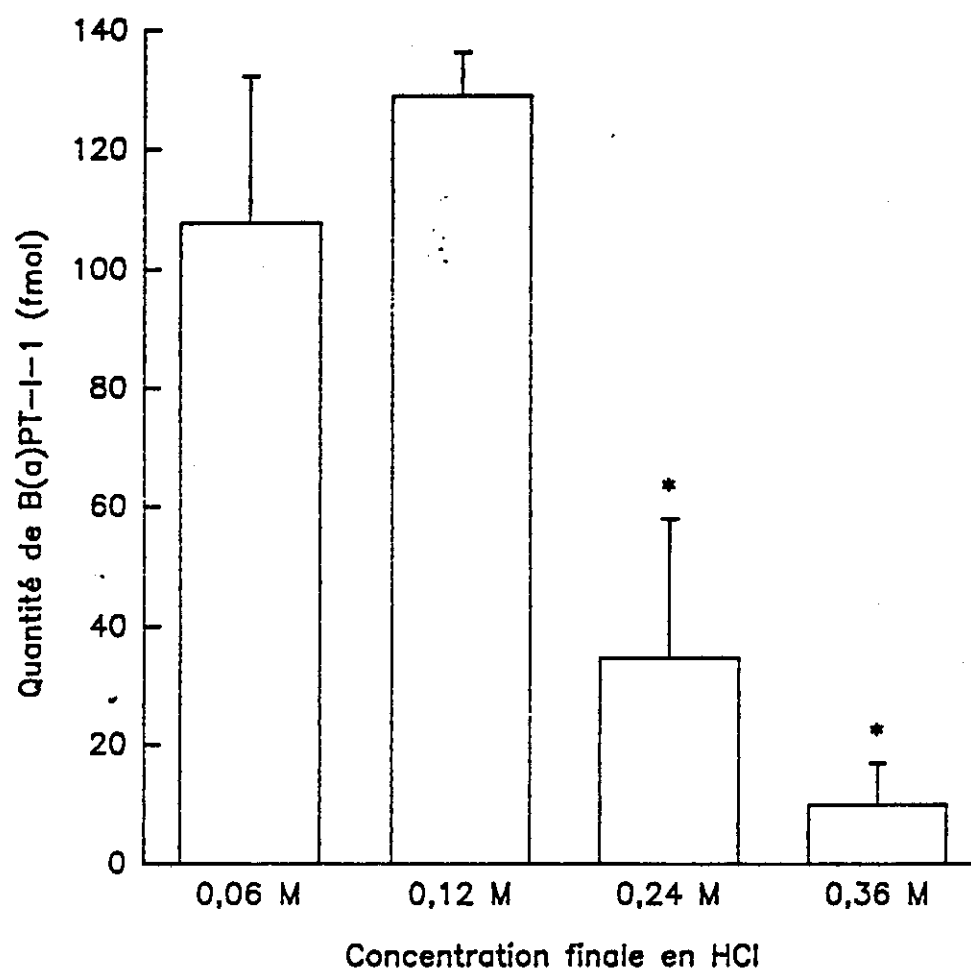


Figure 9. Effet de la concentration d'acide chlorhydrique lors de l'hydrolyse des adduits sur la récupération de benzo(a)pyrènetétraol (B(a)PT). Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la concentration de 0.12 M.

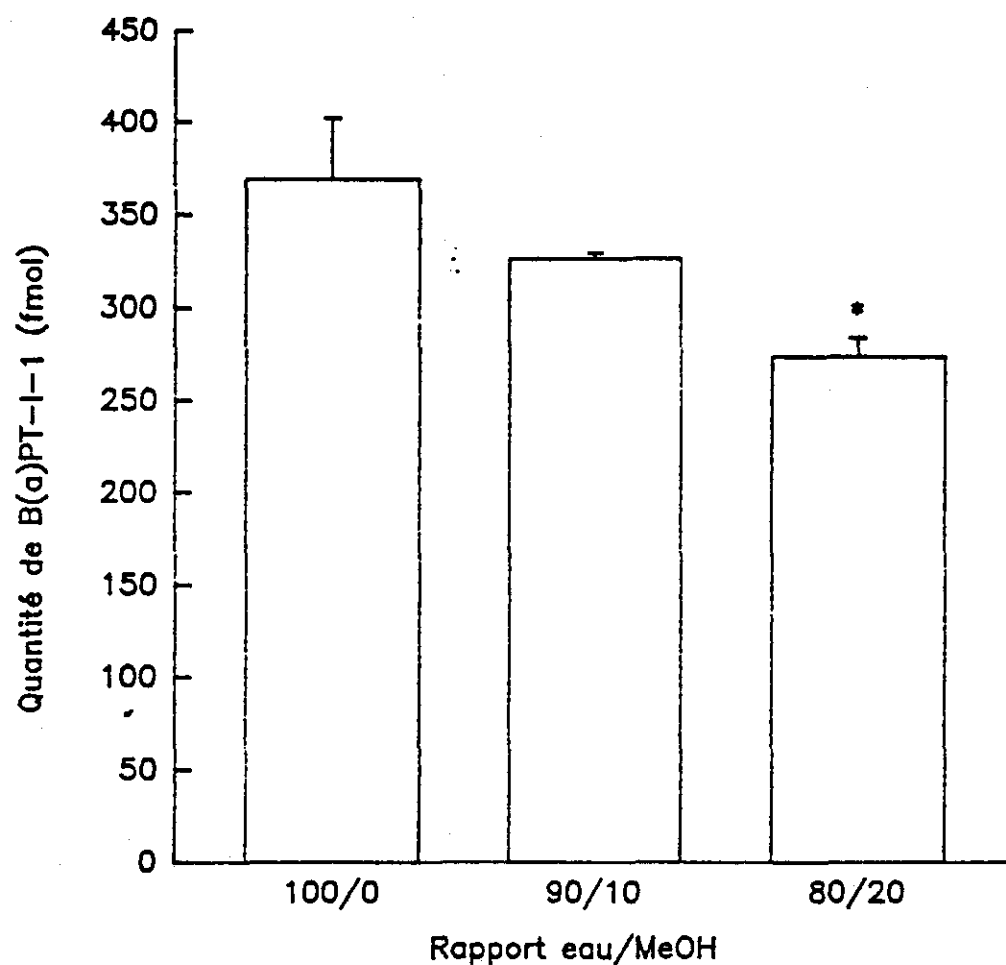


Figure 10. Effet du rinçage de la mini-colonne de C18 avec différentes solutions (avant l'élution du BaPtétraol (B(a)PT) avec 100 % de méthanol) sur la récupération de

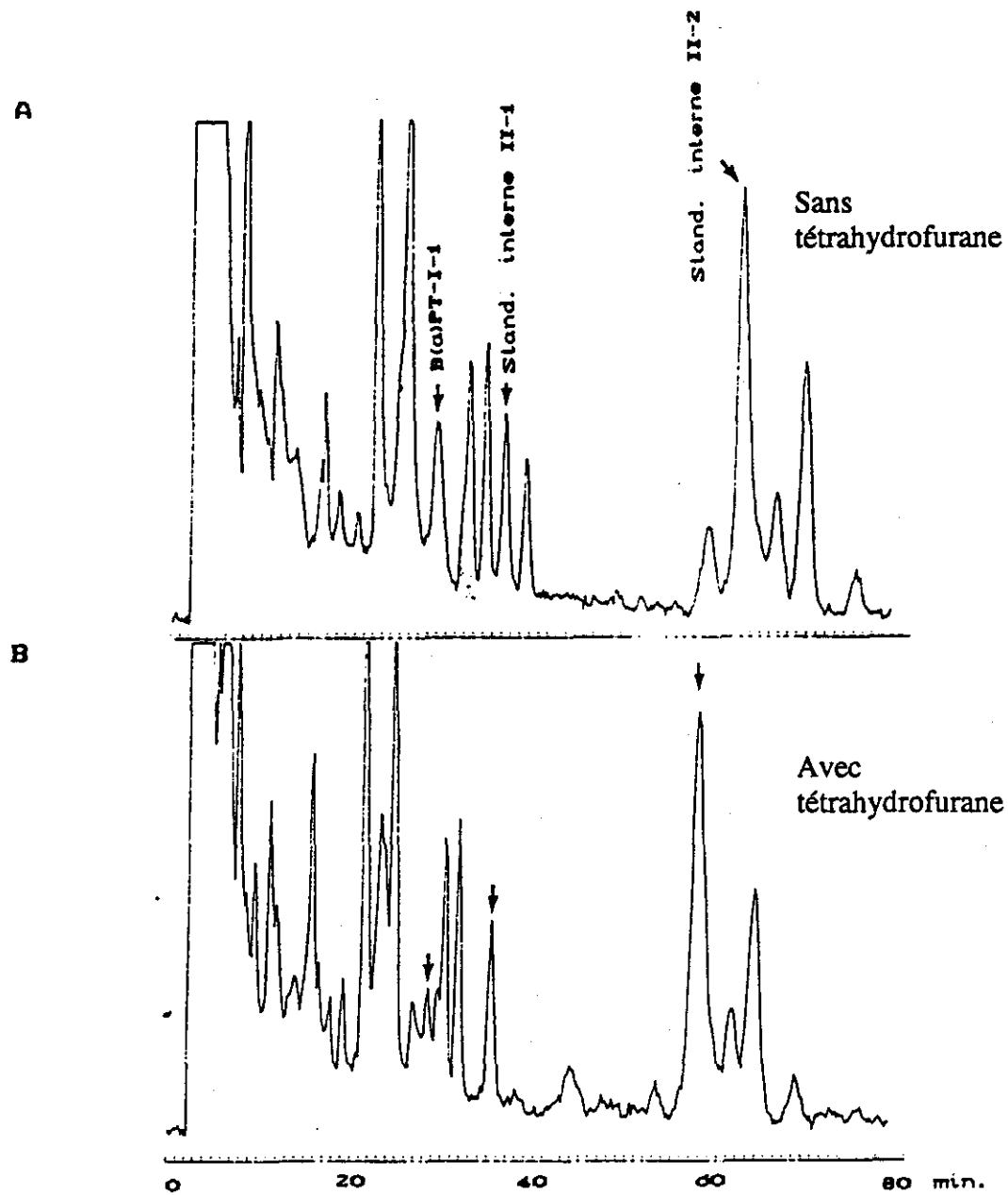


Figure 11. Effet de l'ajout de 0,5 % de tétrahydrofurane sur la résolution chromatographique du pic de BaPtétraol (B(a)PT-I-1).

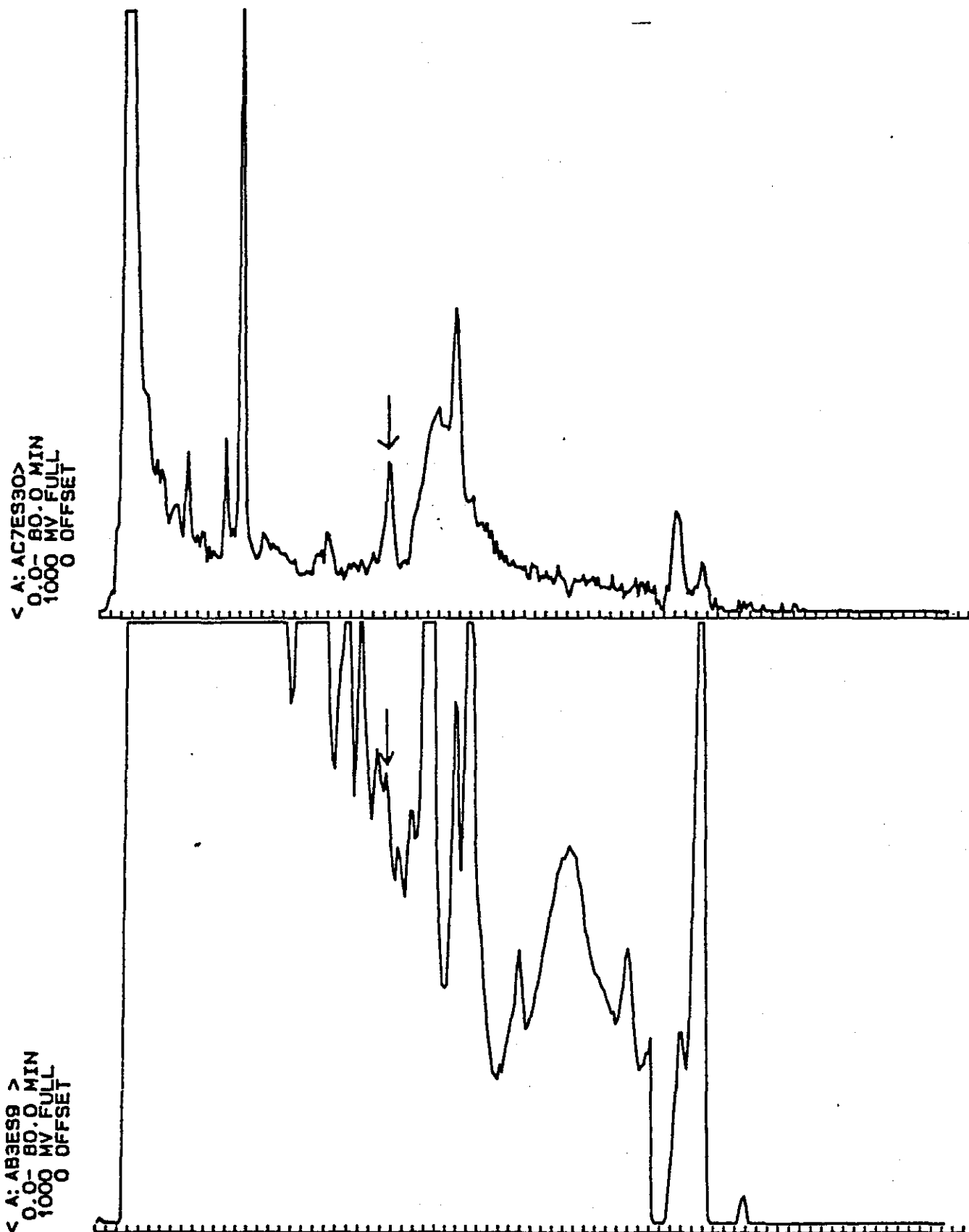


Figure 12. Effet de l'étape de chromatographie d'affinité sur gel de boronate dans l'analyse de l'adduit BaPDE-albumine dans le sang humain. Chromatogramme du haut = avec chromatographie d'affinité. Chromatogramme du bas = sans chromatographie

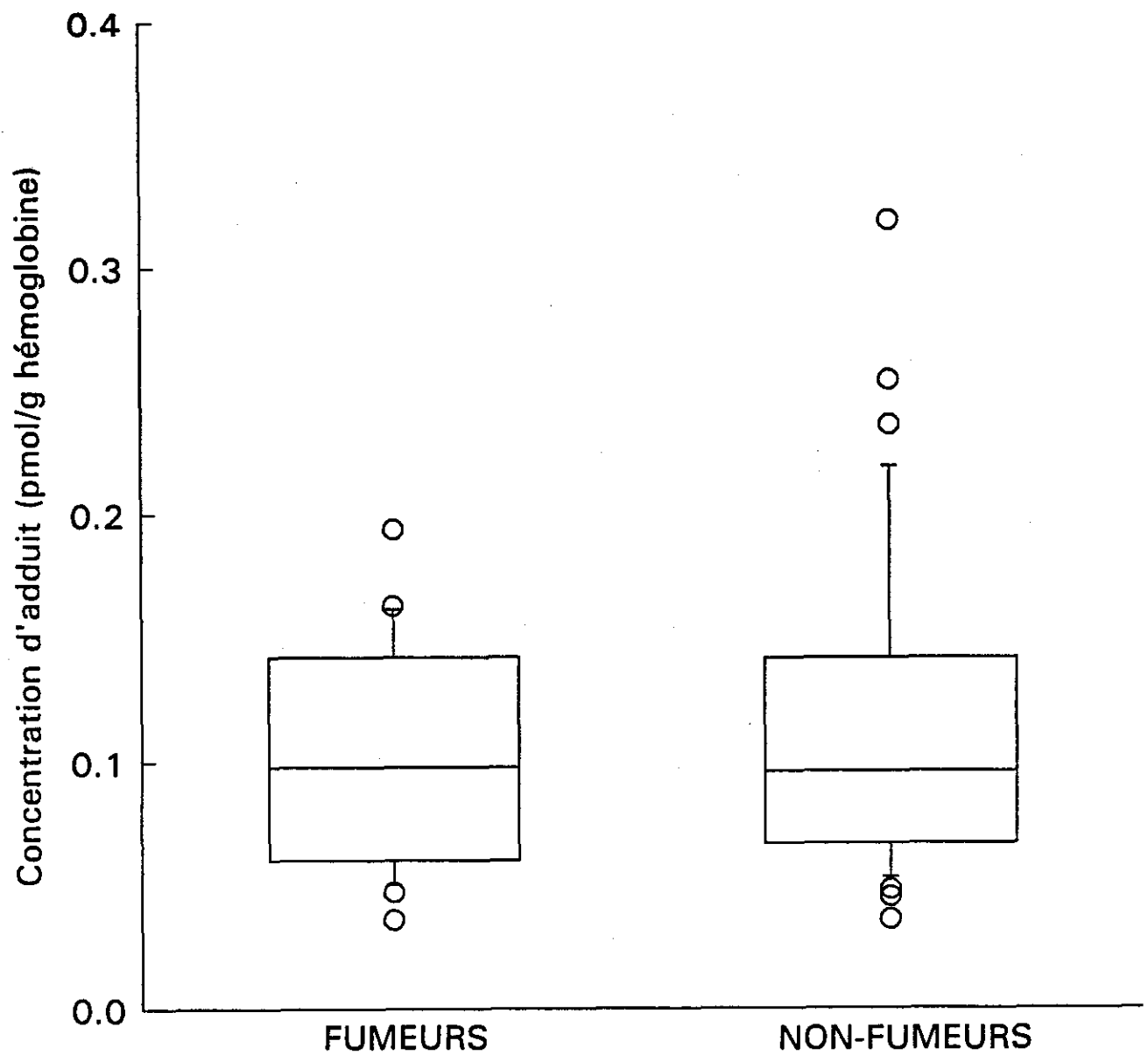


Figure 13. Distribution des concentrations d'adduit BaPDE-hémoglobine chez 19 fumeurs et 35 non-fumeurs n'ayant pas d'exposition professionnelle aux HPA. La ligne au

aux HPA. Les moyennes géométriques sont de 0,092 (0,036 à 0,194) pmol/g hémoglobine pour les fumeurs et de 0,102 (0,036 à 0,318) pmol/g hémoglobine pour les non-fumeurs. Cette différence n'est pas statistiquement significative.

Excrétion urinaire de 1-OHP chez des travailleurs exposés à des HPA, valeur de base de cette excrétion dans la population générale et effet du tabagisme

Chez les travailleurs exposés à la créosote, nous observons une diminution moyenne de l'excrétion urinaire de 1-OHP de 67 % entre le premier et le second prélèvement. La figure 14, présentant une échelle logarithmique pour l'ordonnée, fait ressortir une assez grande similitude dans les pourcentages individuels de cette diminution quelle que soit la valeur initiale obtenue pendant la période de travail. Il est à noter cependant que même après une période sans exposition ces travailleurs excrètent plus de 1-OHP que le groupe de référence.

À la figure 15 on peut voir que les travailleurs ayant effectué la décontamination du site de l'incendie de Saint-Amable ont, en moyenne, des concentrations peu élevées de 1-OHP urinaire. On observe que les sous-groupes faiblement et fortement exposés ont une excrétion très semblable le lundi matin. Par ailleurs, dans le sous-groupe classé "fortement" exposé, on observe un profil d'excrétion qui passe par un minimum le lundi matin avant de remonter le jeudi après-midi suivant.

Tableau 1. Excrétion urinaire de 1-OHP ($\mu\text{mol/mol}$ créatinine) dans divers groupes de travailleurs exposés aux HAP et dans un groupe de référence

Groupe	Moyenne géométrique	Étendue
Créosote pendant le travail	1,63	0,18 - 10,47
Créosote - retour congé	0,53	0,08 - 2,47
Saint-Amable faiblement exposés - jeudi P.M.	0,07	0,01 - 0,22
Saint-Amable fortement exposés - jeudi P.M.	0,23	0,09 - 0,75
Débroussailleurs	0,49	0,27 - 1,03
Référence	0,08	0,002 - 0,57

Finalement, la figure 16 illustre la distribution des résultats d'excrétion de 1-OHP chez les travailleurs opérant les débroussailleuses de même que chez les individus du groupe de référence. Les résultats des travailleurs exposés à la créosote et ceux des travailleurs de Saint-Amable (prélèvement du lundi matin) ont également été ajoutés à cette figure pour fins de comparaison. On constate que la distribution des résultats des travailleurs opérant les débroussailleuses est déplacée vers la droite c'est-à-dire vers des excrétions plus élevées. Toutefois, ces valeurs sont plus faibles que celles qui ont été mesurées dans le groupe de travailleurs exposés à la créosote au milieu de la semaine de travail. Le tableau 1 présente les valeurs moyennes et l'étendue des valeurs obtenues dans divers groupes de l'étude (Viau *et al.*, 1993b).

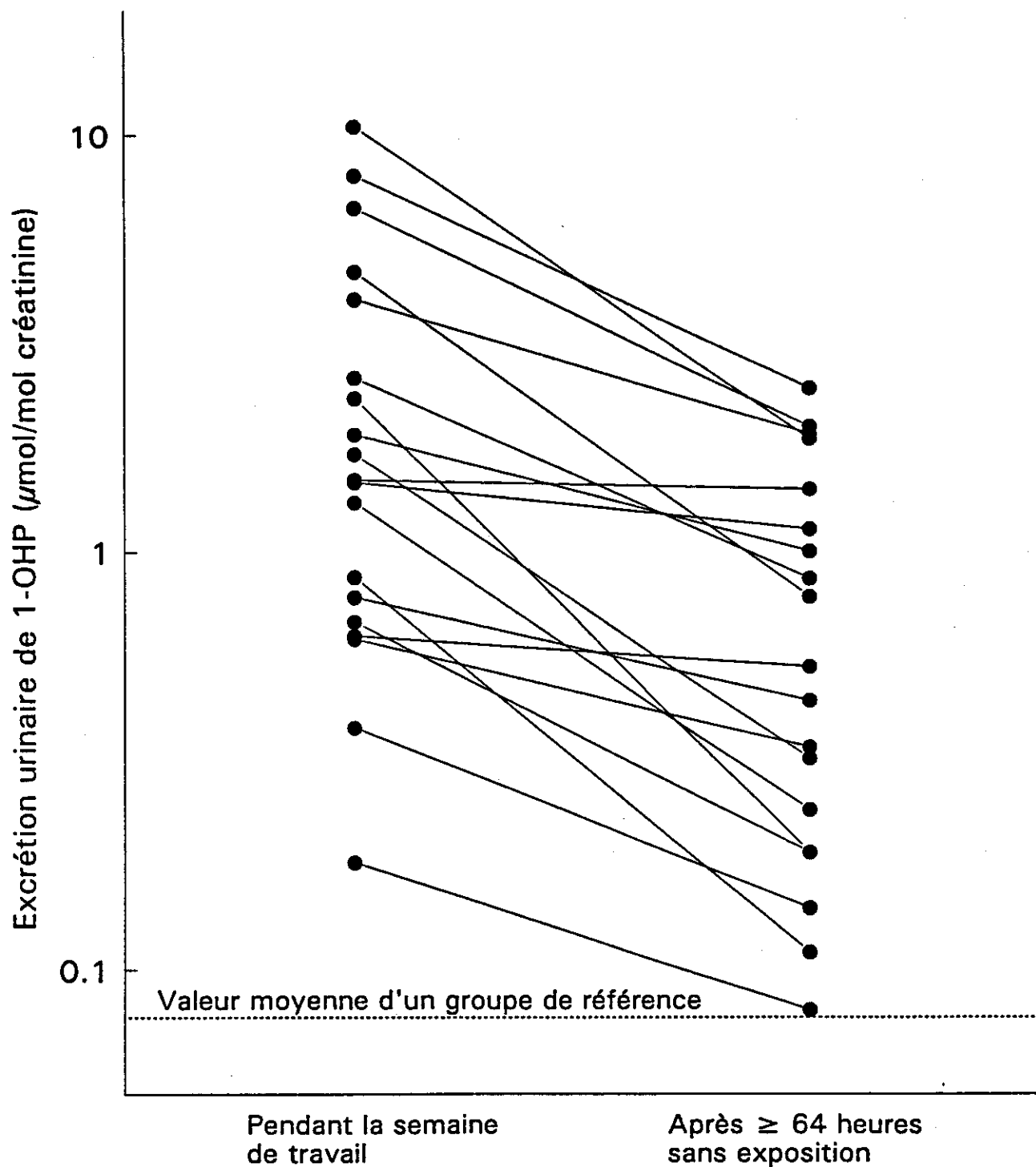


Figure 14. Valeurs paires de l'excrétion urinaire de 1-OHP chez des travailleurs exposés à de la créosote pendant la semaine de travail et au retour d'un congé d'au moins 64 heures.

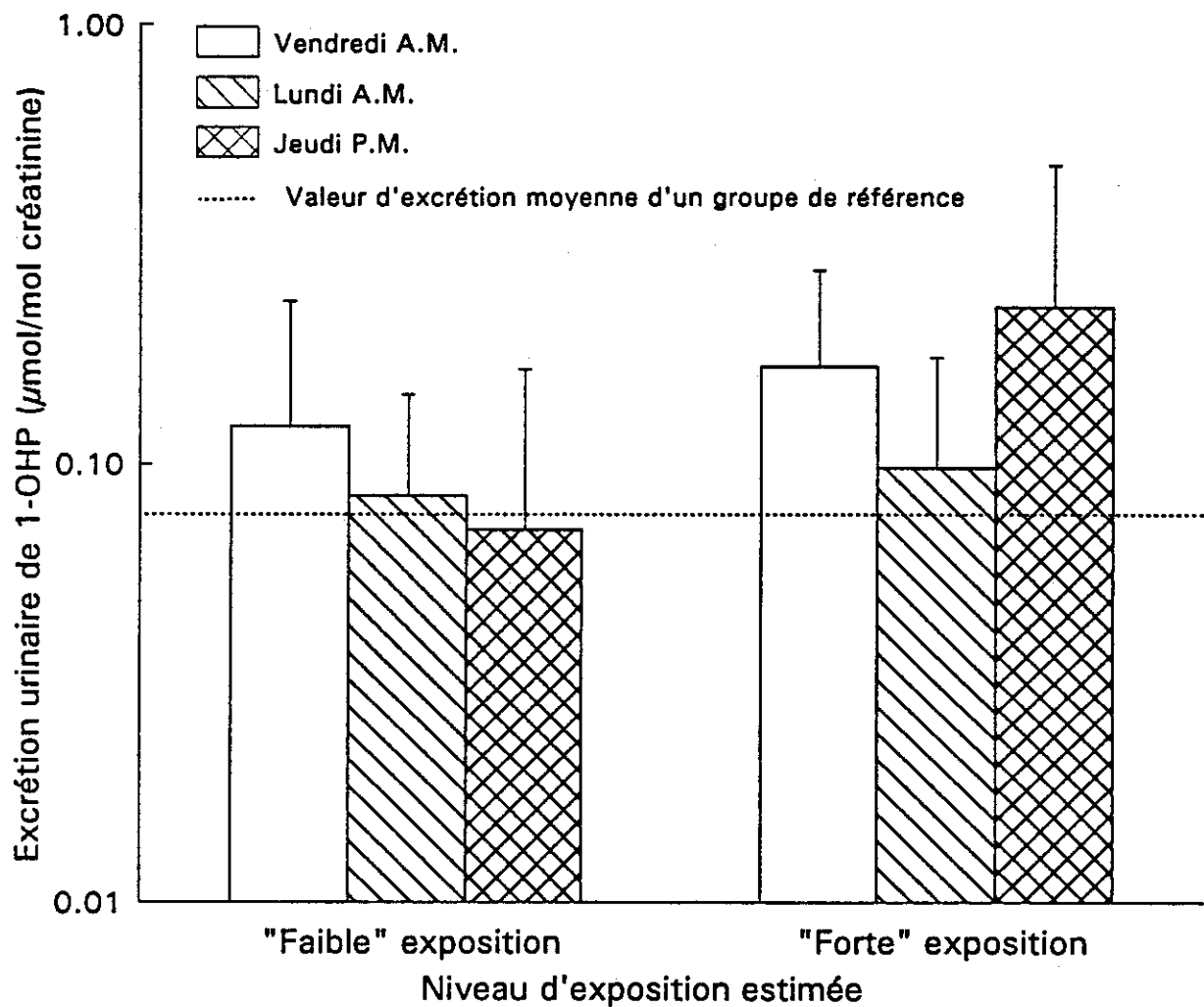


Figure 15. Excrétion urinaire de 1-OHP à trois moments chez des travailleurs ayant participé à la décontamination d'un site souillé par des HPA. La classification en exposition "faible" et "forte" a été effectuée sur la base de la description de tâches et de

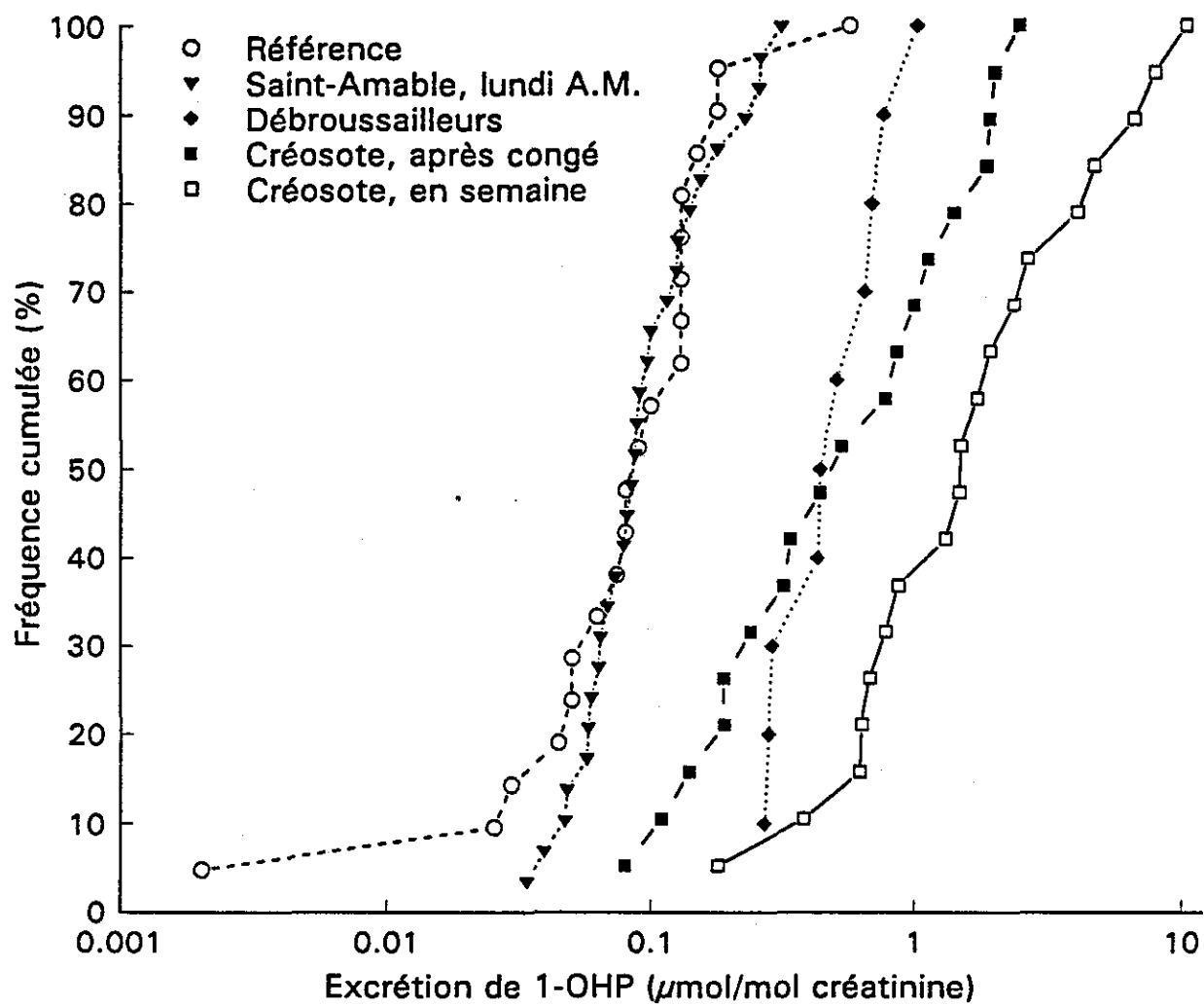


Figure 16. Distribution des valeurs d'excrétion urinaire de 1-OHP dans divers groupes de travailleurs. Pour une description de ces groupes, voir le texte.

L'excrétion moyenne de base de 1-OHP estimée à partir du collectif de 140 personnes décrit dans la section Matériel et méthodes est de $0,08 \mu\text{mol/mol}$ créatinine (moyenne géométrique) avec des 5^e, 50^e et 95^e centiles de 0,02, 0,09 et $0,32 \mu\text{mol/mol}$ créatinine. Les 45 fumeurs de ce groupe ont une excrétion moyenne (géométrique) de $0,12 \mu\text{mol/mol}$ créatinine contre $0,07 \mu\text{mol/mol}$ créatinine pour les non fumeurs (test de t sur les moyennes géométriques, $p < 0,001$) (Viau *et al.*, 1994b).

Étude de la cinétique de l'excrétion urinaire du 1-OHP

La figure 17 montre l'excrétion urinaire de 1-OHP, exprimée en pmol/heure, chez les volontaires après absorptions cutanée et orale de pyrène. On constate sur ce graphique, dont l'ordonnée présente une échelle logarithmique, que l'excrétion est plus importante dans le cas de l'exposition par voie orale. Ainsi, l'excrétion maximale obtenue par cette voie est plus d'un ordre de grandeur supérieure à celle qui est obtenue par voie cutanée même si la dose est la même dans les deux cas. Lorsqu'on ne considère que la phase plus tardive de l'excrétion, on constate que toutes les courbes sont plus ou moins parallèles et présentent une demi-vie apparente moyenne de $11,5 \pm 2,5$ heures. Les symboles ouverts et fermés correspondent respectivement aux données des volontaires 1 et 2.

Dans le cas de l'exposition cutanée répétée, nous avons choisi de représenter les résultats corrigés pour la créatinine pour faciliter la comparaison avec des résultats qui seraient obtenus chez des travailleurs exposés de manière répétée à des HAP. Les résultats du volontaire 1 apparaissent à la figure 18. On constate une augmentation progressive des maxima et des minima d'excrétion jusqu'au quatrième jour d'application.

Le lecteur intéressé trouvera une analyse cinétique beaucoup plus fouillée dans l'un de nos articles accepté pour publication et dont une copie du manuscrit est présentée en annexe (Viau *et al.*, 1994a).

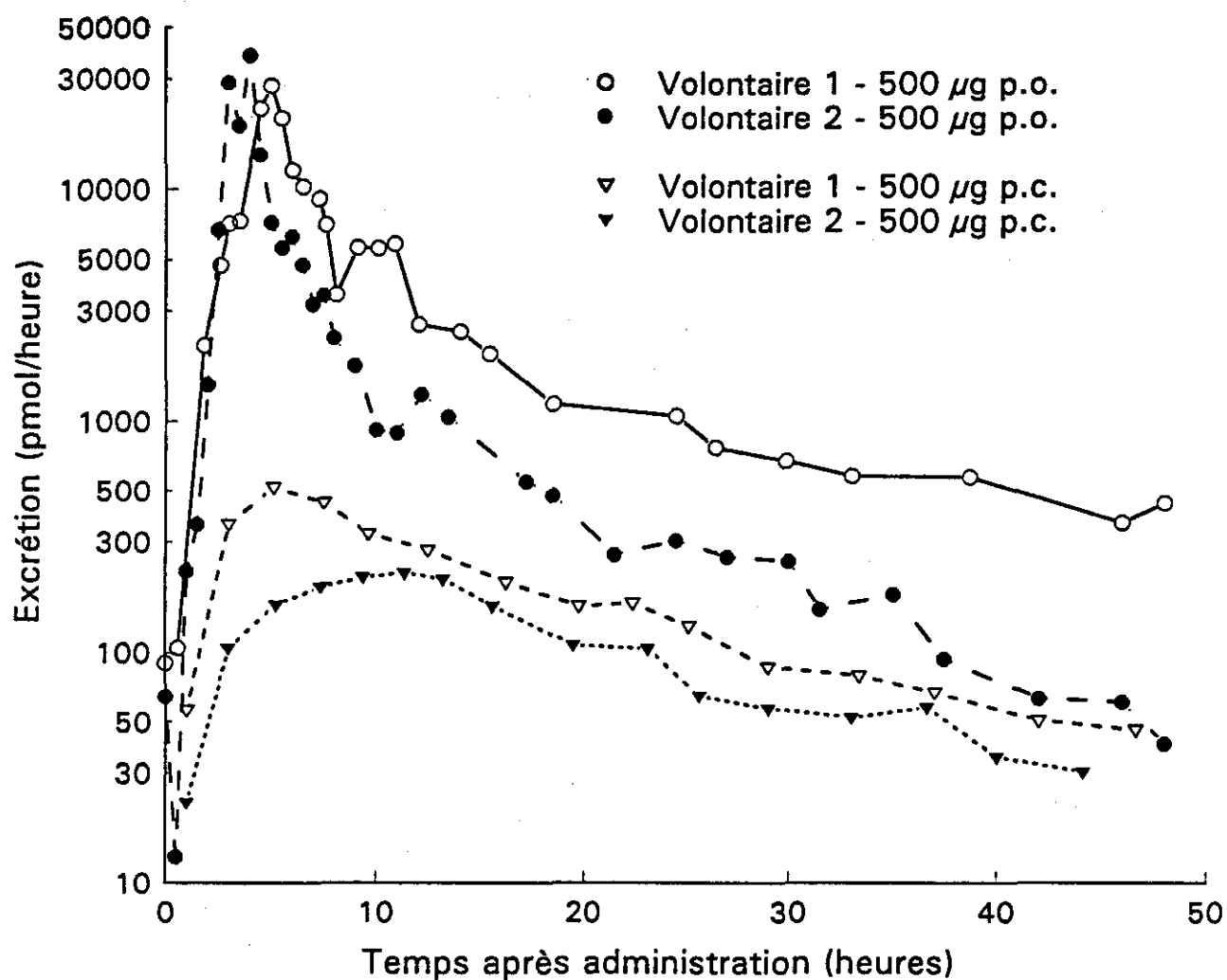


Figure 17. Profil d'excrétion urinaire de 1-OHP chez deux volontaires exposés à 500 µg de pyrène par les voies cutanée (p.c) et digestive (p.o.).

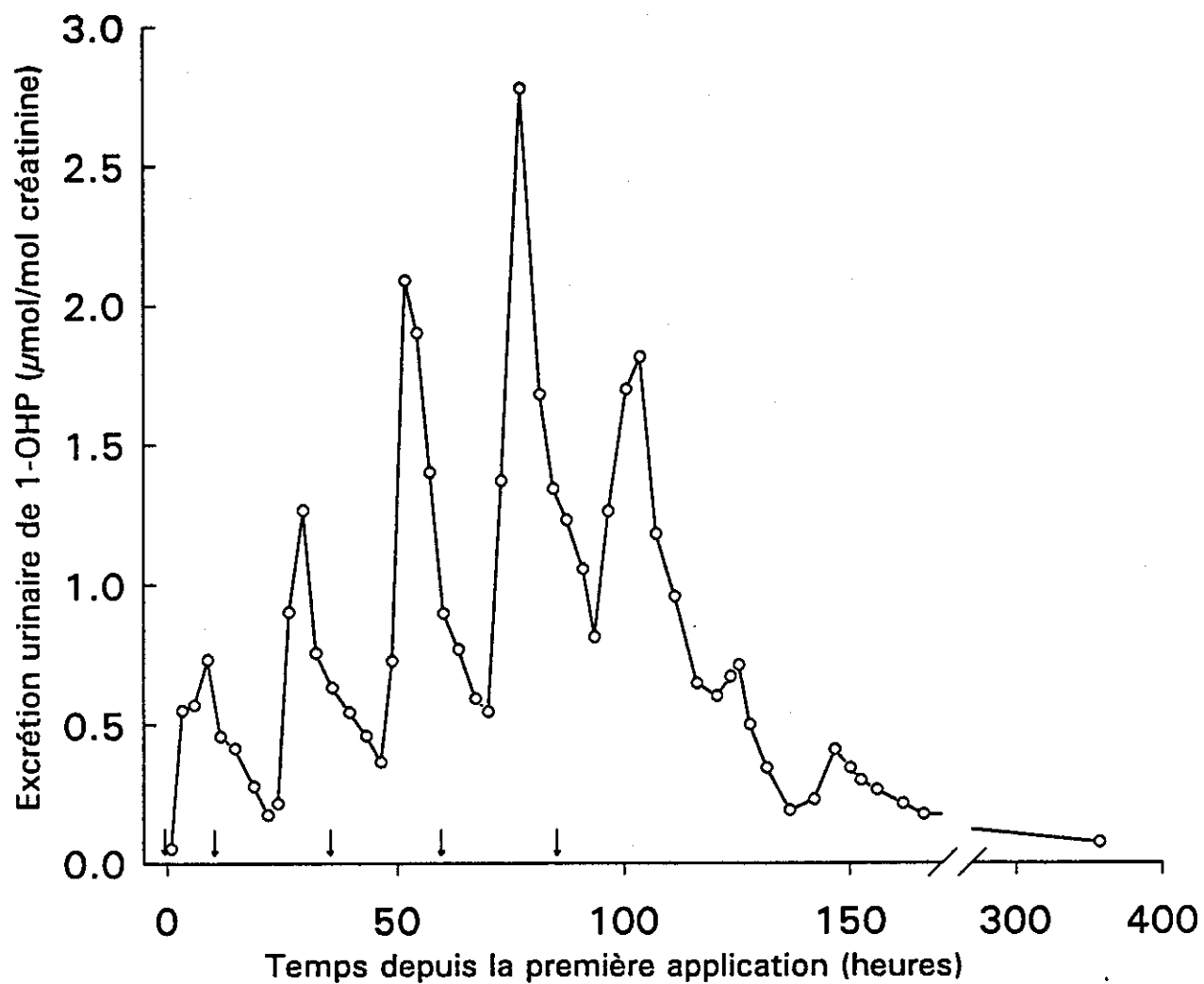


Figure 18. Profil d'excrétion urinaire de 1-OHP chez un volontaire exposé à 500 μg de pyrène par voie cutanée chaque jour pendant 5 jours consécutifs.

DISCUSSION

Puisqu'on peut retrouver dans nos articles publiés, acceptés ou soumis pour publication une discussion étoffée sur les divers aspects de ce projet de recherche et compte tenu de l'espace limité disponible pour la présentation de ce rapport, nous avons choisi de présenter une discussion générale de l'ensemble du projet en insistant davantage sur les implications quant à l'intérêt pour le milieu de travail des outils proposés.

Les adduits chez les rats et chez les lapins

Au moment où ce projet a débuté, les chercheurs intéressés à la mesure des adduits aux protéines sanguines étaient encore peu nombreux. Il était donc nécessaire de préciser la persistance des adduits formés avec chacune des deux protéines: hémoglobine et albumine. Nous avons aisément démontré que l'adduit à l'hémoglobine était plus persistant que l'adduit à l'albumine grâce à notre étude réalisée chez le rat (Viau *et al.*, 1993a). Toutefois, si l'on suppose que l'adduit à l'hémoglobine se forme de façon uniforme dans toutes les populations d'érythrocytes, on doit supposer qu'il disparaît chaque jour un $x^{\text{ième}}$ de la concentration d'adduit présente au départ où x est la durée de vie des érythrocytes de l'espèce à l'étude. Or, ceci ne s'est pas vérifié et le profil de disparition d'adduit à l'hémoglobine suivant l'administration d'une dose aiguë de BaPDE se rapprochait davantage d'une cinétique de premier ordre que de la cinétique d'ordre zéro attendue. Ce point reste encore à éclaircir, dans le contexte d'expositions aiguës.

Chez le lapin, nous considérons avoir réalisé un protocole de recherche tout à fait original en adoptant des protocoles d'administration différents pour une même dose hebdomadaire (Viau and Carrier, 1995). Cette étude est l'une des seules de la littérature scientifique où l'on ait suivi le profil de formation et de disparition d'adduits pendant une période aussi longue (11 semaines d'injections plus 9 semaines de suivi de la disparition des adduits à l'hémoglobine et à l'albumine). Elle nous a permis de tirer l'importante conclusion que, aux doses utilisées dans notre étude, le profil qualitatif d'exposition a peu d'importance sur la concentration d'adduit à l'hémoglobine atteinte à l'état stationnaire. La dose hebdomadaire est, dans ce contexte, le déterminant majeur de la concentration d'adduit. Transposé au contexte du milieu de travail, cette étude permet de supposer que des mesures d'adduits réalisées chez des personnes exposées à des électrophiles ou à des substances biotransformées en électrophiles, permet d'apprécier l'exposition globale moyenne à ces substances. Ces mesures ne seraient pas influencées par des pics ou par des creux d'exposition dus, par exemple, à la discontinuité de certains procédés de production par lots, plutôt que de production continue.

La mesure des adduits chez l'humain

Dans la mesure des concentrations d'adduits formés entre le BaPDE et, d'une part l'hémoglobine et, d'autre part, l'albumine chez l'humain, il s'est présenté certaines difficultés techniques liées notamment aux faibles concentrations de ces adduits chez l'humain. Ainsi, nous avons dû recourir à des volumes sanguins relativement importants (30 à 40 mL), ce qui compliquerait l'application de telles mesures en routine chez des personnes exposées en milieu de travail.

Nous avons tout de même réussi à déterminer la concentration d'adduit BaPDE-hémoglobine chez 19 fumeurs et 35 non-fumeurs. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre ces deux groupes, ce qui suggère que la contribution à l'absorption systémique due à l'exposition environnementale générale est plus importante que la contribution à l'absorption systémique due au tabagisme. Une remarque importante s'impose ici quant à cette détermination d'adduit BaPDE-hémoglobine chez l'humain. Dans une étude récemment publiée, Ferreira *et al.* (1994) rapportent des concentration allant de 5 à 170 pmol adduit/g hémoglobine alors que nos valeurs oscillent entre 0,04 et 0,3 pmol adduit/g hémoglobine. Bien que leur population soit constituée de travailleurs de fonderie alors que nos volontaires sont des témoins, cette différence semble considérable et difficile à expliquer. Par contre, des résultats publiés par Day *et al.* (1991) chez 62 sujets montrent des valeurs qui vont de 0,05 à 1 pmol adduit/g hémoglobine pour 85 % des valeurs. De plus, tout comme nous, ces chercheurs n'ont pas trouvé de différence statistiquement significative entre fumeurs et non-fumeurs. Nous n'avons pas trouvé d'autres études rapportant des données de concentration d'adduit BaPDE-hémoglobine chez l'humain. Il reste que la différence apparente entre, d'une part, Ferreira *et al.* et, d'autre part, Day *et al.* et nous suggère qu'il conviendrait d'établir un bon programme de contrôle de la qualité des résultats d'analyse de cet adduit chez l'humain.

Les métabolites hydroxylés dans l'urine

Puisque non seulement l'aspect «adduits et surveillance biologique de l'exposition» mais aussi l'aspect «surveillance biologique de l'exposition aux HPA» présentait un intérêt dans ce travail, nous avons exploré d'autres avenues que les adduits. Jongeneelen *et al.* (1985; 1986) a proposé la mesure de l'excrétion urinaire du 1-OHP pour évaluer la dose d'exposition systémique au pyrène. Par extension, puisque ce dernier compte pour une large proportion des HPA totaux de la majorité des mélanges, on a aussi suggéré que la mesure de ce métabolite urinaire peut servir à apprécier l'exposition globale aux HPA. Toutefois, bien que plusieurs auteurs aient depuis proposé la mesure de 1-OHP dans la surveillance biologique de l'exposition aux HPA (Zhao *et al.*, 1990; Grimmer *et al.*, 1991; Tolos *et al.*, 1991; Buchet *et al.*, 1992; Elovaara *et al.*, 1992; Gardiner *et al.*, 1992; Granella and Clonfero, 1993; Kanoh *et al.*, 1993; Boogaard and Van Sittert, 1994; Omland *et al.*, 1994), on reste étonné devant la pauvreté des informations concernant la toxicocinétique de ce métabolite. Or, cette connaissance de la toxicocinétique d'un métabolite est essentielle à son utilisation efficiente dans une démarche de surveillance biologique.

C'est pourquoi, après avoir exploré nous aussi l'intérêt potentiel de ce bioindicateur d'exposition (Viau *et al.*, 1993b), nous avons résolu d'entreprendre une série d'études visant à bien documenter l'excrétion de base de 1-OHP dans la population générale et l'effet du tabagisme (Viau *et al.*, 1994b), à examiner attentivement le profil d'excrétion urinaire du métabolite suite à l'exposition par voie cutanée, fréquente en milieu de travail (Viau and Vyskocil, 1994), et à proposer un modèle toxicocinétique détaillé de l'excrétion du 1-OHP suite à l'exposition par les voies orale et cutanée (Viau *et al.*, 1994a).

Nous entendons, d'une part, poursuivre des études à caractère plus fondamental touchant la toxicocinétique du pyrène lui-même et de son métabolite principal, le 1-OHP dans l'organisme et dans l'urine et, d'autre part, entreprendre des études à caractère appliqué visant à proposer

un indice biologique d'exposition aux HPA (valeur seuil de 1-OHP urinaire) pour différentes situations de travail dans lesquelles les HPA apparaissent comme d'importants contaminants.

Le lien entre les adduits et les métabolites urinaires des HPA

L'excrétion urinaire de métabolites de contaminants organiques est généralement considérée comme un reflet d'une exposition récente à ce contaminant. Nos travaux démontrent que cela est vrai lorsque le prélèvement urinaire est effectué immédiatement après la période d'exposition. Mais certaines d'observations nous avaient fait soupçonner que l'excrétion urinaire de 1-OHP avait peut-être une signification différente dans certaines circonstances. Ainsi, dans l'étude que nous avons réalisée auprès de travailleurs exposés à de la créosote, l'observation d'une excrétion urinaire de 1-OHP nettement supérieure à celle qui est observée chez des témoins, même 2 semaines après éloignement du milieu de travail pour le congé annuel, suggérait que cette valeur de 1-OHP reflétait peut-être la charge corporelle de HPA. Dans l'étude expérimentale qui a examiné en parallèle la formation d'adduit BaPDE-hémoglobine et l'excrétion urinaire de 3-OHBaP, nous avons vu que, si l'on utilise les prélèvements urinaires obtenus après 3 jours sans exposition, il y a une excellente corrélation entre ces deux indicateurs (Bouchard et Viau, soumis pour publication). Il est donc possible qu'en choisissant soigneusement le moment du prélèvement urinaire, le métabolite urinaire traduise le niveau d'exposition moyen à l'état stationnaire, tout comme l'adduit à l'hémoglobine. Des travaux additionnels en ce sens devraient ouvrir une voie à la fois originale et pratique pour réaliser une surveillance biologique de l'exposition aux HPA.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons démontré que la mesure des adduits à l'hémoglobine et à l'albumine a sa place dans une stratégie de surveillance de l'exposition à certains contaminants électrophiles ou biotransformés en métabolites électrophiles. Toutefois, dans le cas des HPA, il appert que la concentration de l'adduit BaPDE-hémoglobine formé est trop faible pour présenter un réel intérêt d'évaluation de l'exposition résiduelle dans l'environnement chez des personnes qui n'ont pas d'exposition professionnelle ou pour évaluer l'exposition professionnelle de personnes qui ne sont exposées qu'à de faibles doses de HPA. Dans ce cas, les travaux supplémentaires que nous avons réalisés dans le cadre de cette recherche nous ont permis de démontrer l'intérêt des métabolites urinaires de certains HPA, plus particulièrement du 1-OHP, comme bioindicateurs de l'exposition à ces contaminants. Des travaux supplémentaires devront être réalisés pour raffiner davantage le profil cinétique du pyrène et du 1-OHP, d'une part, et pour proposer un indice biologique d'exposition (IBE) aux HPA, en relation avec la nature du milieu de travail (fonderie, aluminerie, créosotage, ...etc.), par la mesure du 1-OHP, d'autre part.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier l'Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du soutien financier qui a permis la réalisation de ces travaux de recherche en toxicologie industrielle.

BIBLIOGRAPHIE

- Boogaard, P.J. et Van Sittert, N.J. (1994). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in petrochemical industries by measurement of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup. Environ. Med.* 51, 250-258.
- Bouchard, M., Dodd, C. et Viau, C. (1994). Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monohydroxylated PAH metabolites in urine. *J. Anal. Toxicol.* 18, 261-264.
- Bouchard, M. et Viau, C. Benzo(a)pyrenedirolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxybenzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. Soumis pour publication.
- Buchet, J.P., Gennart, J.P., Mercado-Calderon, F., Delavignette, J.P., Cupers, L. et Lauwerys, R. (1992). Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a coke production and a graphite electrode manufacturing plant: assessment of urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biological indicator of exposure. *Br. J. Ind. Med.* 49, 761-768.
- Day, B.W., Taghizadeh, K., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Caporaso, N.E. et Vineis, P. (1991). Benzo(a)pyrene diol epoxide-hemoglobin adducts in cohorts of human subjects determined by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 32, 528(Abstract)
- Elovaara, E., Heillila, P. et Riihimäki, V. (1992). Biomonitoring of creosote exposure by analysis of 1-hydroxypyrene. *Hum. Exp. Toxicol.* 11, 396-397. (Abstract)
- Fennell, T.R., Sumner, S.C.J. et Walker, V.E. (1992). A model for the formation and removal of hemoglobin adducts. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1, 213-220.
- Ferreira, M., Jr., Tas, S., dell'Omo, M., Goormans, G., Buchet, J.P. et Lauwerys, R. (1994). Determinants of benzo(a)pyrenediol epoxide adducts to haemoglobin in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Occup. Environ. Med.* 51, 451-455.
- Gardiner, K., Hale, K.A., Calvert, A., Rice, C. et Harrington, J.M. (1992). The suitability of the urinary metabolite 1-hydroxypyrene as an index of polynuclear aromatic hydrocarbon bioavailability from workers exposed to carbon black. *Ann. Occup. Hyg.* 36, 681-688.
- Granella, M. et Clonfero, E. (1993). Urinary excretion of 1-pyrenol in automotive repair workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65, 241-245.
- Grimmer, G., Dettbarn, G., Naujack, K.-W. et Jacob, J. (1991). Excretion of hydroxy derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons of the masses 178, 202, 228 and 252 in the urine of coke and road workers. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 43, 177-186.
- Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Leijdekkers, C.M., Bos, R.P. et Henderson, P.T. (1985).

1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 57, 47-55.

Jongeneelen, F.J., Bos, R.P., Anzion, R.B.M., Theuws, J.L.G. et Henderson, P.T. (1986). Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolites in urine. *Scand. J. Work Environ. Health* 12, 137-143.

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

Kanoh, T., Fukuda, M., Onozuka, H., Kinouchi, T. et Ohnishi, Y. (1993). Urinary 1-hydroxypyrene as a marker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in environment. *Environ. Res.* 62, 230-241.

Omland, O., Sherson, D., Hansen, A.M., Sigsgaard, T., Autrup, H. et Overgaard, E. (1994). Exposure of iron foundry workers to polycyclic aromatic hydrocarbons: Benzo(a)pyrene-albumin adducts and 1-hydroxypyrene as biomarkers for exposure. *Occup. Environ. Med.* 51, 513-518.

Rahn, R., Chang, S., Holland, J. et Shugart, L. (1982). A fluorometric-HPLC assay for quantitating the binding of BaP metabolites to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 262-268.

Shugart, L. (1985). Quantitating exposure to chemical carcinogens: in vivo alkylation of hemoglobin by benzo[a]pyrene. *Toxicology* 34, 211-220.

Tolos, W.P., Lowry, L.K. et MacKenzie, B.A. (1991). 1-Pyrenol in urine: A biological monitoring method to assess exposure to polynuclear aromatic hydrocarbons containing pyrene. In *Polynuclear aromatic hydrocarbons: Measurement, means, and metabolism* (M. Cooke, K. Loening et J. Merrit, Eds.), pp. 913-926. Battelle Press, Columbus.

Viau, C., Mercier, M. et Blondin, O. (1993a). Measurement of hemoglobin and albumin adducts of benzo(a)pyrenediolepoxide and their rate of elimination in the female Sprague-Dawley rat. *Arch. Toxicol.* 67, 468-472.

Viau, C., Vyskocil, A., Tremblay, C. et Morissette, L. (1993b). Urinary excretion of 1-hydroxypyrene in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2, 267-276.

Viau, C., Carrier, G., Vyskocil, A. et Dodd, C. (1994a). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *Sci. Total Environ.* (sous presse)

Viau, C., Vyskocil, A. et Martel, L. (1994b). Background urinary 1-hydroxypyrene in non-occupationally exposed individuals in the Province of Québec, Canada, and comparison with its excretion in workers exposed to PAH mixtures. *Sci. Total Environ.* (sous presse)

Viau, C. et Carrier, G. (1992). Blood proteins adducts formation in rabbits subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Toxicologist* 12, 190 (résumé)

Viau, C. et Carrier, G. (1995). Kinetics of hemoglobin and albumin adducts in rabbits subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Fundam. Appl. Toxicol.* (sous presse)

Viau, C. et Vyskocil, A. (1994). Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. *Sci. Total Environ.* (sous presse)

Zhao, Z.-H., Quan, W.-Y. et Tian, D.-H. (1990). Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator of human exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal-burning environment. *Sci. Total Environ.* 92, 145-154.

ANNEXES

Articles scientifiques produits dans le cadre de cette subvention:

Bouchard, M., Dodd, C. et Viau, C. (1994). Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monohydroxylated PAH metabolites in urine. *J. Anal. Toxicol.* 18, 261-264.

Bouchard, M. et Viau, C. (19XX). Benzo(a)pyrenedirolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxybenzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Soumis pour publication*.

Viau, C., Mercier, M. et Blondin, O. (1993a). Measurement of hemoglobin and albumin adducts of benzo(a)pyrenedirolepoxide and their rate of elimination in the female Sprague-Dawley rat. *Arch. Toxicol.* 67, 468-472.

Viau, C., Vyskocil, A., Tremblay, C. et Morissette, L. (1993b). Urinary excretion of 1-hydroxypyrene in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2, 267-276.

Viau, C., Carrier, G., Vyskocil, A. et Dodd, C. (19XXa). Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *Sci. Total Environ.* (In Press)

Viau, C., Vyskocil, A. et Martel, L. (19XXb). Background urinary 1-hydroxypyrene in non-occupationally exposed individuals in the Province of Québec, Canada, and comparison with its excretion in workers exposed to PAH mixtures. *Sci. Total Environ.* (In Press)

Viau, C. et Carrier, G. (1995). Kinetics of hemoglobin and albumin adducts in rabbits subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Fundam. Appl. Toxicol.* (In Press)

Viau, C. et Vyskocil, A. (19XX). Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. *Sci. Total Environ.* (In Press)

Annexe 2

Mesure des adduits benzo(a)pyrène-hémoglobine chez l'humain

**Rapport sur le développement de la méthode et son application
chez des volontaires témoins**

Claude Viau

INTRODUCTION

L'auteur de ce rapport est détenteur d'une subvention de recherche de l'I.R.S.S.T. portant le titre "La mesure des adduits protéiques dans la surveillance biologique de l'exposition". Par ailleurs, l'auteur a également déposé avec M. Claude Tremblay (D.S.C. Hôpital Charles-Lemoyne) un protocole de recherche concernant la surveillance biologique de l'exposition de pompiers au benzo(a)pyrène et aux amines aromatiques à la suite d'un incendie dans un dépotoir de pneus. Suite au dépôt de ce document, M. François-Pierre Dussault, directeur de la recherche externe de l'IRSST, nous a informés que ce protocole ne serait évalué qu'au moment du dépôt d'un rapport préliminaire sur le développement de la méthode de dosage des adduits chez l'humain. C'est là le sujet du présent document.

RAPPEL DES TRAVAUX SUR LES ADDUITS AU LABORATOIRE DE C. VIAU

Dans un rapport d'étape déposé à l'I.R.S.S.T. en novembre 1990, nous avons rapporté les conditions d'analyse des adduits benzo(a)pyrène-protéine (rat) et indiqué que nous obtenions des coefficients de variation intra-essai de l'ordre de 10%. De plus, des essais de récupération avaient montré des taux supérieurs à 80%. Ensuite, nous avons montré que la concentration d'adduits obtenue suite à une administration aiguë chez le rat de benzo(a)pyrènediolépoxyde (BaPDE) était reliée à la dose de ce métabolite électrophile. Enfin, nous avons montré que, conformément à nos prédictions, les adduits BaPDE-hémoglobine étaient plus persistants dans l'organisme des rats que les adduits BaPDE-albumine.

Depuis le dépôt de ce rapport d'étape, nous avons réalisé d'importants travaux sur la cinétique de formation des adduits chez des lapins exposés de manière répétée au benzo(a)pyrène. Nous avons clairement démontré que:

- 1) en administration répétée, la concentration d'adduits augmente progressivement pour atteindre un plateau après quelques semaines d'exposition;
- 2) le niveau de ce plateau augmente avec la dose hebdomadaire reçue par les animaux;
- 3) pour une dose hebdomadaire donnée, le niveau de ce plateau est indépendant de la fréquence hebdomadaire d'administration du benzo(a)pyrène (p. ex. $1 \times 5 \mu\text{mol/kg}$

par semaine par rapport à $5 \times 1 \mu\text{mol/kg}$ par semaine).

- 4) il est possible de modéliser les résultats de tels scénarios d'exposition répétée à partir d'hypothèses biologiquement plausibles.

Ces résultats, présentés au Congrès de février 1992 de la Society of Toxicology à Seattle, ont été très bien accueillis par les chercheurs de ce domaine. Le résumé de cette communication apparaît en annexe et un article est en préparation sur ce sujet.

APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE MESURE DES ADDUITS AU SANG HUMAIN

Ajustements de la méthode

Un boursier de l'I.R.S.S.T., M. Serge Lamy, a effectué son travail de maîtrise sur l'application de la technique de mesure des adduits au sang humain. Etant donné que les niveaux d'adduits retrouvés chez l'humain sont de l'ordre de la pmole par gramme de protéine, cette mesure a posé un défi particulier. En effet, nous avons d'abord trouvé dans le sang humain la présence de substances, interférant avec la quantification en chromatographie, qui ne se retrouvaient pas dans le sang de rat ou de lapin. Ensuite, la quantité de sang requise pour le dosage (environ 30 mL) était beaucoup plus importante qu'avec les animaux et a donc exigé certaines vérifications quant aux conditions d'hydrolyse des adduits et de nettoyage subséquent des échantillons. Les résultats de ce développement sont succinctement présentés ci-après. Afin de permettre au lecteur une meilleure compréhension, nous indiquons d'abord à la figure 1 les étapes d'analyse déjà déterminées pour le sang animal.

Isolement de l'hémoglobine

L'isolement de l'hémoglobine s'est effectué essentiellement comme pour le sang des animaux. La seule particularité concerne le volume de sang utilisé (30 à 40 mL au lieu de 0,3 à 5 mL). Par ailleurs, la lyse des globules rouges humains permet une récupération plus complète de l'hémoglobine que dans le cas des érythrocytes de rats.

Conditions d'hydrolyse des adduits

Rappelons que lors de la formation des adduits, le carbone # 10 du

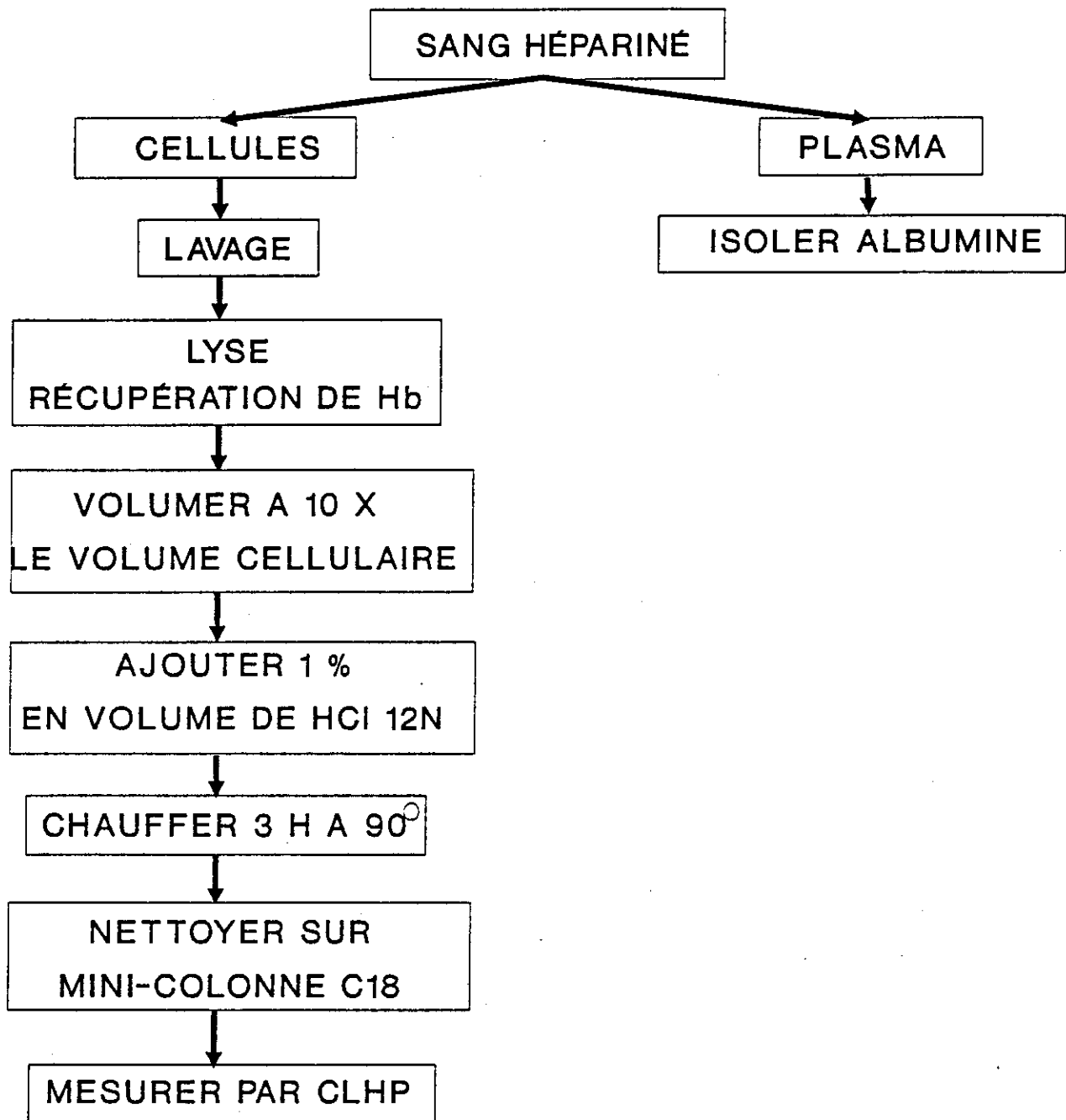


Figure 1. Étapes du dosage des adduits BaPDE-hémoglobine chez l'animal

BaPDE engagé dans une liaison de type époxyde réagit avec un site nucléophile d'une protéine. Le dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) requiert l'hydrolyse préalable de l'adduit conduisant à la "libération" d'une molécule de benzo(a)pyrènetétraol (BaPT). Rigoureusement parlant, cette appellation répandue est incorrecte puisque le cycle benzénique comportant les quatre substituants hydroxyles a alors perdu son aromaticité. Nous référerons néanmoins à cet analyte sous l'acronyme de BaPT.

Une observation fortuite nous ayant permis d'observer que le degré de dilution aqueuse de la solution d'hémoglobine avant l'hydrolyse acide pouvait influencer l'efficacité de récupération du BaPT, des essais ont été effectués à des dilutions correspondant à 10, 20 et 40 fois le volume cellulaire. Ces résultats apparaissent à la figure 2. La récupération est significativement plus importante à la dilution 20X par rapport à la dilution 10X. La récupération supplémentaire à la dilution 40X n'étant pas significativement différente de celle de la dilution 20X, nous avons adopté cette dernière pour des raisons pratiques (à 40X, le volume total à hydrolyser serait de 600 mL par échantillon).

Nous avons également voulu voir si une meilleure récupération de BaPT pouvait être obtenue en modifiant le degré d'acidité du mélange hydrolysé. Chez l'animal, nous utilisons une concentration finale en HCl de 0,12 M. Nous avons testé ici des concentrations

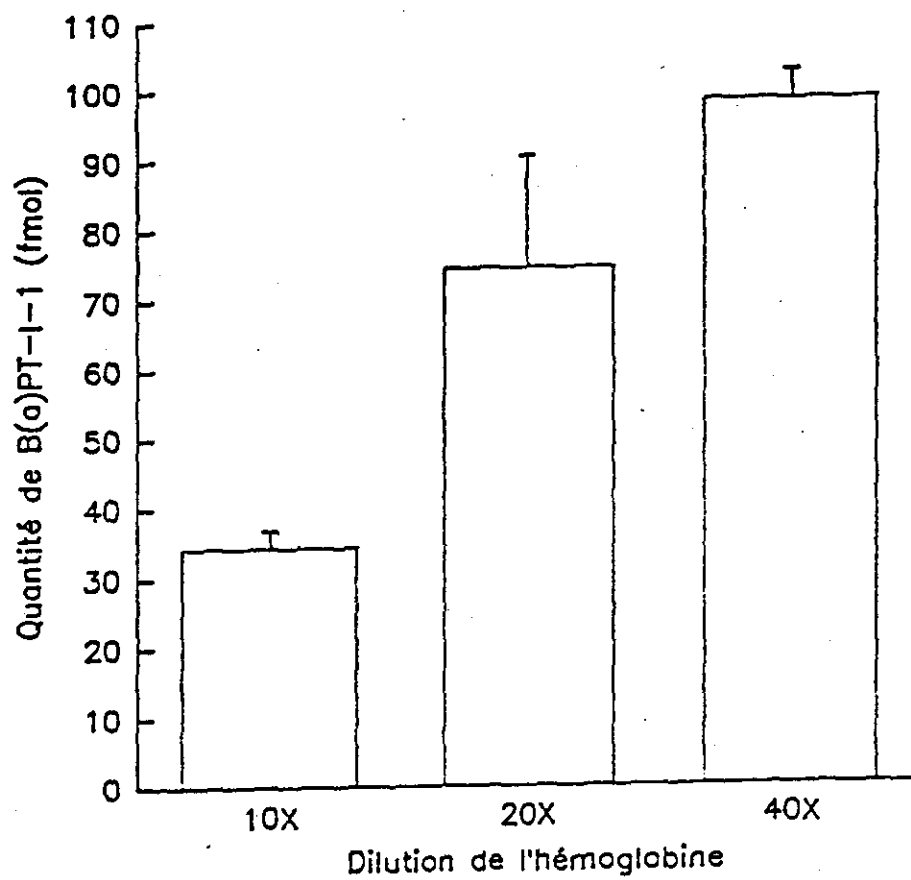


Figure 2. Quantité de BaPT récupérée d'un échantillon d'hémoglobine à différentes dilutions. Les différences sont statistiquement significatives entre 10X et les deux autres dilutions seulement.

finales de 0,06, 0,12, 0,24 et 0,36 M. La figure 3 montre que les conditions initiales (0,12 M) demeuraient les meilleures.

Tel que mentionné précédemment, les chromatogrammes obtenus avec le sang humain contiennent davantage de pics que ceux que nous avons obtenus avec le sang animal. Nous avons alors voulu savoir s'il était possible d'éliminer certaines des substances produisant ces pics par élution sélective sur la mini-colonne de C18 (Seppak®). Après rétention du BaPT sur cette colonne, cette dernière fut rincée soit avec de l'eau (procédure habituelle) ou avec une solution eau:méthanol à des proportions 90:10 ou 80:20 (v/v). En nous écartant de la procédure habituelle, nous obtenions une perte de BaPT (figure 4) sans pour autant améliorer l'apparence du chromatogramme. Nous nous en sommes donc tenus à la procédure habituelle. Par ailleurs les volumes appliqués sur ces mini-colonnes étant très importants, nous nous sommes assurés qu'il ne se produisait pas de perte lors de l'application.

Finalement, le pic de BaPT que nous obtenions par enrichissement de sang humain (échantillons périmés obtenus en volumes de 450 mL auprès de la Croix-Rouge) apparaissait avec une largeur à la base plus importante que lorsque le standard seul était injecté dans le chromatographe. Il était manifeste que nous faisions face à un problème de résolution chromatographique. Celui-ci fut réglé par l'ajout d'environ un demi pourcent (v/v) de tétrahydrofurane au solvant d'élution tel que montré à la figure 5.

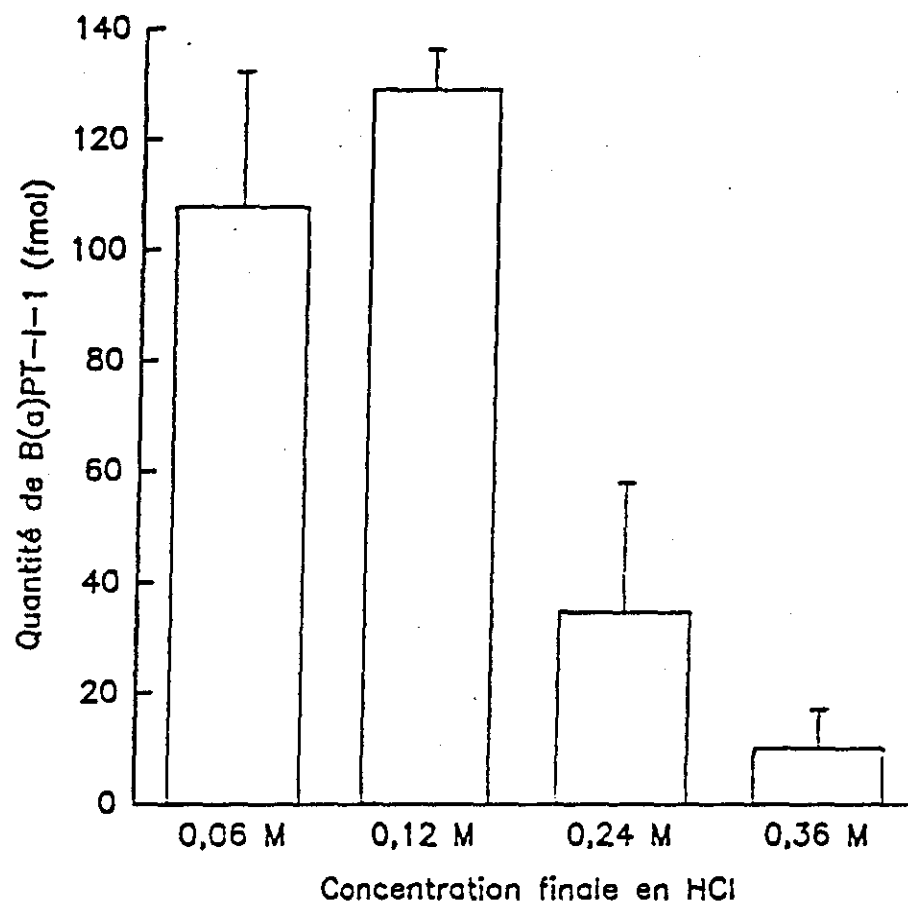


Figure 3. Quantité de BaPT récupérée d'un échantillon d'hémoglobine à diverses concentrations d'acide chlorhydrique utilisé pour réaliser l'hydrolyse des adduits.

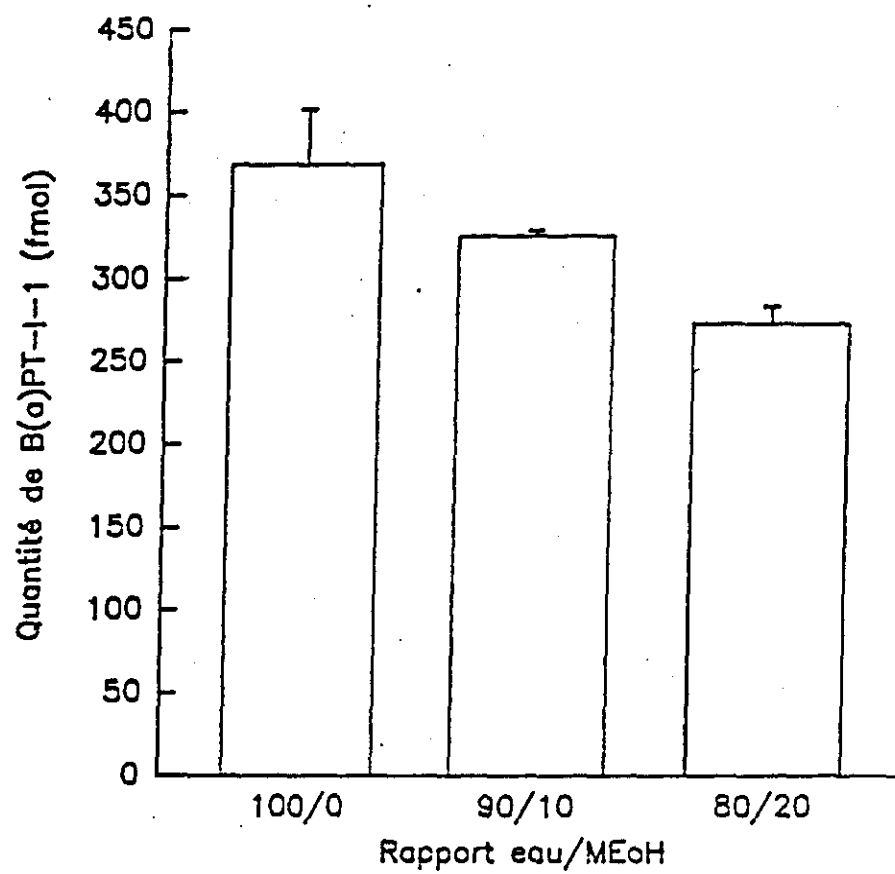


Figure 4. Quantité de BaPT récupérée d'un échantillon d'hémoglobine selon la composition du solvant de rinçage de la mini-colonne de C18.

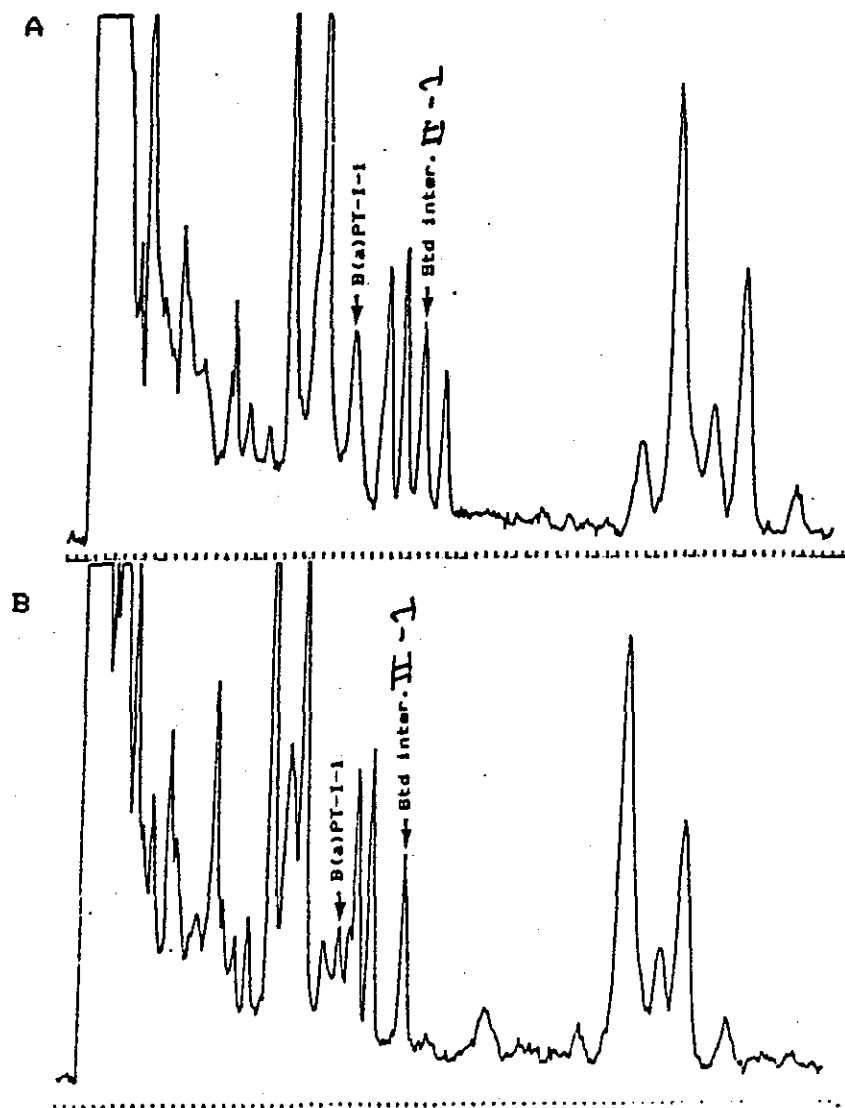


Figure 5. Chromatogrammes d'un échantillon d'hémoglobine obtenu avec deux phases mobiles différentes constituées de (A) eau:méthanol (57:43) ou (B) eau:méthanol:tétrahydrofurane (57:42,53:0,47). Le pic identifié B(a)PT-I-1 est notre analyte

DOSAGE DES ADDUITS BaPDE-HEMOGLOBINE CHEZ DES SUJETS TEMOINS

Ce travail fut réalisé par M. Serge Lamy en collaboration avec Mme Micheline Pelletier, technicienne de notre laboratoire.

Origine des échantillons

Vingt personnes de sexe masculin, âgées entre 21 et 43 ans, ont accepté de fournir un échantillon de 30 mL de sang. Le jour même du prélèvement, l'hémoglobine a été isolée selon la procédure décrite précédemment. Ce groupe ne comprenait que 2 fumeurs.

Dosage des adduits BaPDE-hémoglobine

Les échantillons d'hémoglobine furent préparés pour l'analyse en suivant les étapes décrites à la figure 1 auxquelles les modifications décrites à la section précédente avaient été apportées. L'extrait final injecté dans le chromatographe était d'abord analysé tel quel puis réinjecté après addition de standard pur de BaPT. Cette procédure nous donnait l'assurance que le pic repéré sur le chromatogramme était effectivement celui du BaPT en même temps qu'il nous permettait de quantifier la récupération analytique du BaPT à cette dernière étape de la procédure. La figure 6 permet de comparer les 2 chromatogrammes ainsi obtenus avec un échantillon type. La concentration moyenne d'adduits à l'hémoglobine dans ce groupe était de 0,13 pmol/g de protéine avec un écart-type de 0,05 pmol/g. Nous avons regardé s'il existait une corrélation ($R^2 = 0,006$) entre la concentration d'adduits et l'âge du sujet mais tel n'était pas le cas comme le montre la figure 7. Les concentrations mesurées chez les 2 fumeurs se situaient au niveau de la moyenne du groupe.

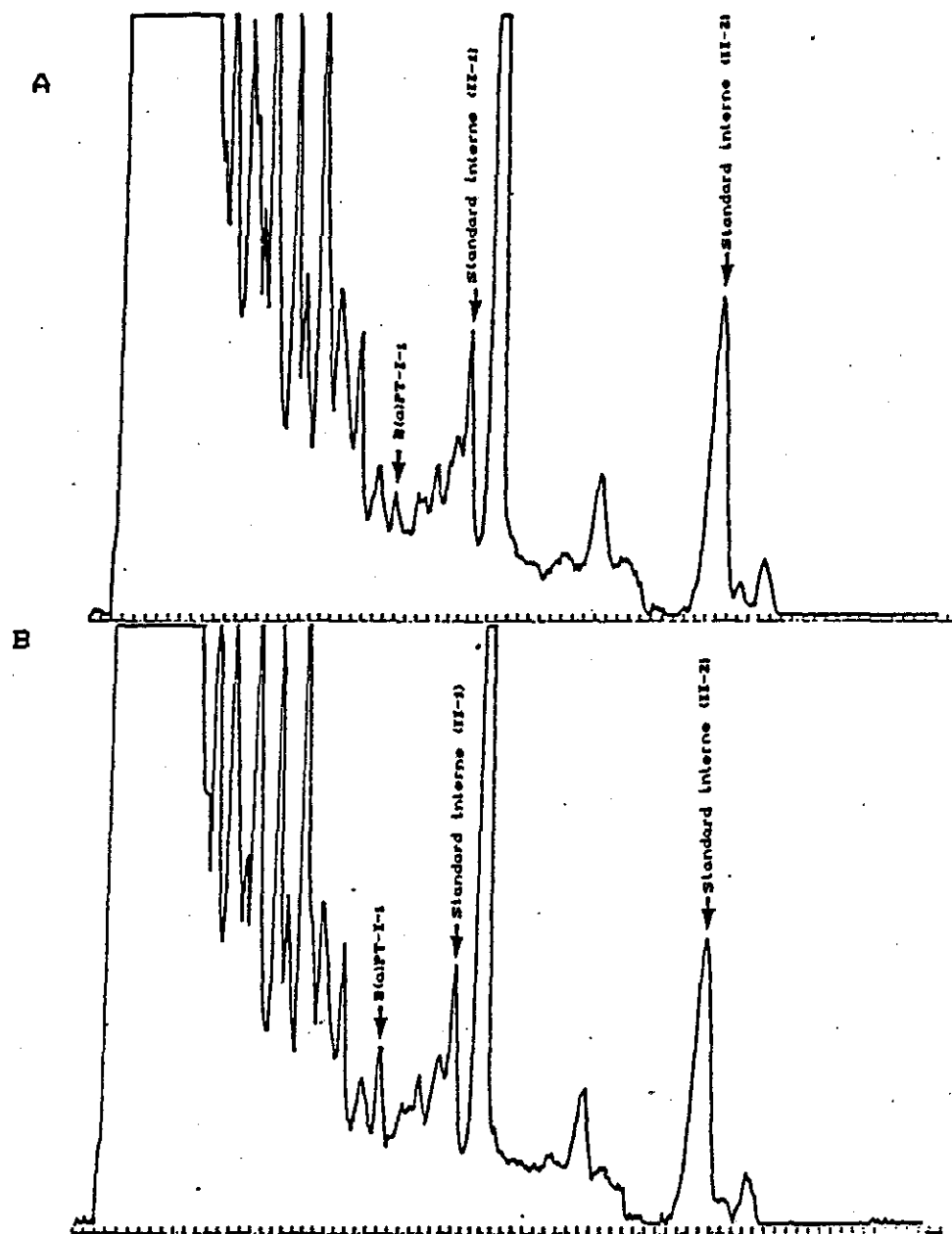


Figure 6. Chromatogrammes d'un échantillon de sang humain (A) avant et (B) après enrichissement de la solution injectée avec le BaPT pur.

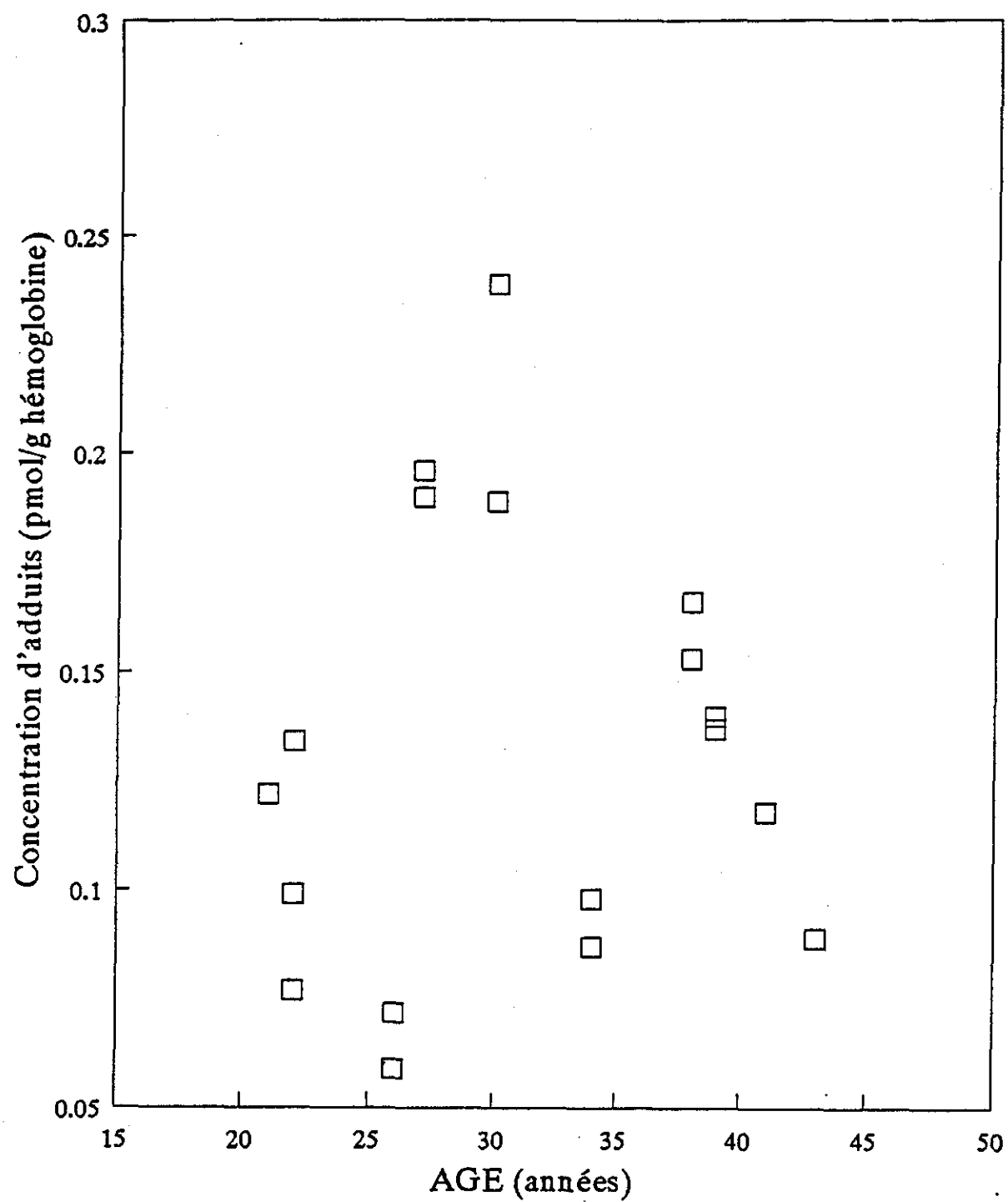


Figure 7. Examen de la relation entre la concentration d'adduits et l'âge

Examen de la reproductibilité de la méthode

Nous avons vérifié la reproductibilité intra-essai et inter-essai de la procédure d'analyse pour un échantillon renfermant une faible concentration d'adduits puisque visiblement les concentrations attendues chez des témoins sont effectivement faibles comme nous venons de le voir. Le tableau 1 montre les résultats obtenus.

Tableau 1. Variabilité intra-essai et inter-essai du dosage d'adduits dans un échantillon d'hémoglobine faiblement contaminé

Mesure	Concentration moyenne mesurée (pmol/g protéine)	Ecart-type	Coefficient de variation %	n
Intra-essai	0,066	0.007	10,6	5
Inter-essai	0,068	0,013	19,1	7

Nous considérons comme tout à fait acceptable ces coefficients de variation de 10,6% (intra-essai) et 19,1% (inter-essai) pour un échantillon aussi faiblement contaminé. Rappelons à cet effet que des coefficients de variation de l'ordre de 6-8% avaient préalablement été obtenus par notre laboratoire pour des échantillons de sang de rat qui étaient 1000 fois plus contaminés. Bien sûr dans ce dernier cas, le volume de sang utilisé pour l'analyse était 100 fois moindre (environ 0,3 mL contre 30 mL dans la présente procédure).

CONCLUSION

La mesure de la concentration d'adduits formés entre le métabolite électrophile du benzo(a)pyrène, le BaPDE, et l'hémoglobine représentait un véritable défi technique pour des échantillons de sang provenant de personnes n'ayant pas d'exposition professionnelle à cet hydrocarbure aromatique polycyclique. Après un important travail de développement et de vérifications techniques nous sommes parvenus à mesurer la concentration de ces adduits chez 20 volontaires témoins. Il apparaît clairement pour nous que si une exposition professionnelle au benzo(a)pyrène est significativement plus élevée que celle du bruit de fond environnemental, elle devrait conduire à une augmentation significative de la concentration des adduits que nous sommes techniquement capables de mesurer.

Annexe 3

**DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODOLOGIE ANALYTIQUE
POUR L'ANALYSE D'AMINES AROMATIQUES EN MILIEU BIOLOGIQUE
SUITE À UNE EXPOSITION AUX FUMÉES D'UN INCENDIE DE PNEU**

**par : Suzanne N. Dumont
et
Michel J. Bertrand
Département de Chimie
Université de Montréal**

INTRODUCTION

Le présent document vise à mettre au point une méthodologie analytique dans le but d'effectuer la mesure des adduits amine-hémoglobine dans le sang de travailleurs exposés aux fumées d'un incendie de pneu survenu à Saint-Amable. Ce rapport représente un bref aperçu des travaux effectués jusqu'à maintenant quant au dosage des adduits protéiques d'amines aromatiques en milieu biologique par des techniques chromatographiques. Les amines aromatiques dont il est question ici sont l'aniline, les isomères o-, m-, p-toluidine et 1-, 2-naphthylamine ainsi que le 4-aminobiphényle. Ces composés peuvent pénétrer dans le corps humain par les voies respiratoires, digestives ou cutanées et ceux-ci ont la capacité d'induire des tumeurs cancéreuses chez l'humain. Toutefois, pour manifester leur toxicité les amines aromatiques doivent subir une transformation métabolique. Le métabolite hydroxylé peut alors rejoindre la circulation systémique et sous cette forme son affinité pour les érythrocytes est particulièrement importante.

Il est donc proposé d'effectuer la mesure des adduits à l'hémoglobine pour l'évaluation de l'exposition des travailleurs potentiellement exposés aux amines aromatiques. La technique analytique utilisée consiste, dans un premier temps, à briser le lien covalent amine-hémoglobine puis à isoler les amines libres de la matrice biologique. Dans un second temps, les amines aromatiques extraites sont identifiées et quantifiées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La procédure utilisée sera discutée plus en détail.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Préparation des spécimens biologiques

Les échantillons sanguins sont centrifugés puis le plasma est prélevé et conservé à -20 °C dans un tube de polycarbonate. La fraction cellulaire est lavée trois fois avec une solution saline isotonique héparinée. Après la dernière centrifugation, la couche de cellules blanches est éliminée. Les érythrocytes sont lysés avec de l'eau et du CCl₄ et la solution d'hémoglobine est ensuite conservée à -20 °C dans des bouteilles de polypropylène. La première étape du dosage consiste en une hydrolyse acide douce des adduits libérant les amines aromatiques (adduits amines aromatiques-protéines). Les échantillons sont ensuite extraits puis analysés conjointement avec deux échantillons témoins: un blanc d'une solution d'hémoglobine et une solution d'hémoglobine fortifiée avec une quantité connue d'amines aromatiques.

Composés chimiques

Toutes les solutions ont été conservées dans du matériel de verre silanisé, au congélateur et à l'abri de la lumière. Le méthanol de grade HPLC provient de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), le dichlorométhane

et l'acétate d'éthyl de grade GC/MS proviennent de Baxter corporation. Le diphenylamine utilisé comme standard interne provient de J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, N.J.). Les amines aromatiques d'intérêt aniline, o-, m-, p-toluidine, 1-, 2-naphthylamine et 4-aminobiphényle proviennent toutes de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)

Instrumentations chromatographiques

Les analyses chromatographiques sont effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Perkin-Elmer Sigma 2B équipé d'un détecteur thermoionique azote-phosphore (NPD). L'injecteur et le détecteur sont maintenus à 280 °C et 300 °C respectivement. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur (2.2 mL/min.) et la colonne capillaire est de type SPB5, 30 m X 0.32mm de diamètre interne et d'épaisseur de film 0.25µm. La programmation de température utilisée est 110°C, 5 min/30°C min⁻¹/160°C, 4 min/30 °C min⁻¹/260°C. Les analyses de chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse sont effectuées avec un spectromètre de masse VG-TRIO 1 couplé à un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 5890. L'injecteur est maintenu à 280 °C alors que la température de la source et de l'interface sont de l'ordre de 250 °C et 240 °C respectivement. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur (1.9 mL/min.) et la programmation de température utilisée est 50°C/30°C min⁻¹/100°C, 5min./30°C min⁻¹/160°C, 4 min./30°C min⁻¹/260°C. Le spectromètre de masse est opéré en mode de balayage d'ions spécifiques avec un temps d'interscan de 80 msec. Les substances marquées à l'aide d'isotopes stables (¹³C, ²H) sont utilisés comme standards internes.

Isolement des amines aromatiques de la matrice biologique

La procédure d'extraction utilisée dans cette étude est décrite schématiquement à la Figure 1. Après isolement de l'hémoglobine et acidification, neuf échantillons de 30mL sont fortifiés avec 8 µL d'une solution stock 50 ng/mL de diphenylamine (standard interne). Les échantillons sont ensuite fortifiés avec des quantités variées d'une solution stock 50 ng/mL contenant les 7 amines aromatiques pour couvrir une étendue de concentration de 1 ppb à 100 ppb. Les échantillons sont agités pendant 15 secondes à l'aide d'un vortex. Le pH du milieu biologique est ensuite ajusté à 10. L'extraction-enrichissement des échantillons est effectuée à l'aide d'une cartouche extractante SepPak C₁₈. La cartouche extractante est conditionnée avec 2 mL de méthanol et 4 mL d'eau ultrapure (milli-Q) à pH 10. L'échantillon est ensuite élué à travers la cartouche. La cartouche adsorbante est alors lavée avec 4 mL d'eau ultrapure puis séchée par un jet d'azote. Les substances adsorbées sur la cartouche sont ensuite désorbées à l'aide de 2 mL de dichlorométhane ce qui permet de concentrer 15 fois les substances présentes dans l'échantillon original. L'échantillon recueilli est ensuite dérivé avec 100 µL d'anhydride trifluoroacétique, évaporé à sec et concentré à un volume final de 100 µL duquel 1 µL est analysé par GC/NPD et par GC/MS en mode de balayage d'ions spécifiques.

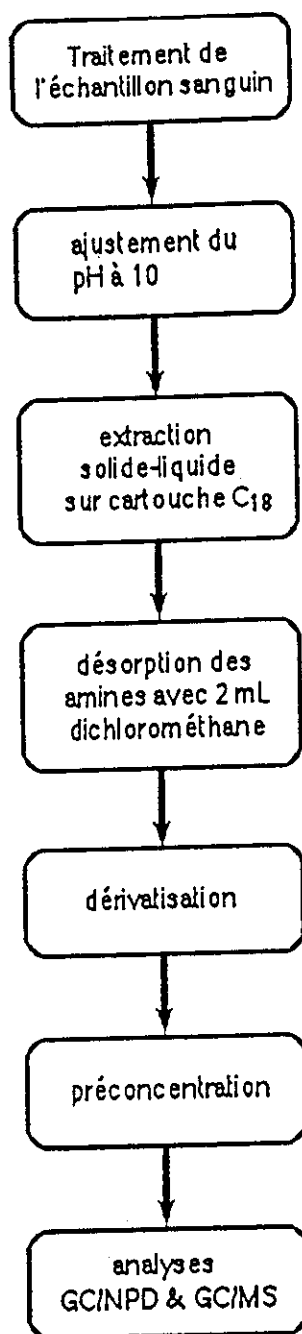


Figure 1. Schéma d'extraction

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La méthodologie analytique développée pour l'analyse d'amines aromatiques en milieu biologique a trait à l'utilisation d'adsorbants solides pour récupérer avec préconcentration les amines aromatiques d'intérêt. L'utilisation de cartouches adsorbantes offre l'avantage de pouvoir accumuler des substances en passant un grand volume d'échantillon à travers la cartouche et en désorbant avec un petit volume de solvant. Nous avons préféré cette approche à celle de l'extraction conventionnelle liquide-liquide puisque l'utilisation des cartouches extractantes permet de réduire considérablement la quantité de solvant nécessaire (quelques millilitres seulement sont nécessaires pour l'élution). De plus, la formation d'émulsion, souvent rencontrée lors de l'extraction liquide-liquide de matrice biologique, conduit à la perte d'analyte par occlusion à l'intérieur de l'émulsion et des recouvrements plus faibles s'ensuivent alors. Les cartouches extractantes permettent de réduire grandement et même d'éviter cette formation d'émulsion.

De façon à mettre en oeuvre le schéma d'extraction décrit ainsi que son optimisation (choix de solvants, de mode chromatographique..) un mélange synthétique aqueux des 7 amines aromatiques étudiés a été utilisé. Le Tableau 1 donne une liste des substances insérées dans le mélange synthétique.

Les résultats obtenus démontrent que les cartouches d'adsorbant de type C₁₈ sont très efficaces pour récupérer les amines aromatiques étudiées à partir de milieu aqueux. Le Tableau 2 présente les données de recouvrement des 7 amines aromatiques en milieu aqueux à l'aide des cartouches SepPak C₁₈. Dans ces expériences, des solutions aqueuses contenant une quantité de 100 ppb des 7 amines aromatiques ont été passées sur les cartouches de façon à vérifier la quantité de substance qui pouvait être adsorbée par la cartouche. Comme on peut le constater à la lecture du Tableau 2, les amines aromatiques sont adsorbées quantitativement pour un volume de 30 mL d'eau et les résultats ont montré un taux de recouvrement supérieur à 95% pour la plupart des amines et ceux-ci sont donc remarquablement satisfaisant. Les coefficients de variation sont de l'ordre de 1% à 8% selon le composé. De plus, des quantités de l'ordre de 1 ppb peuvent être détectées facilement et ce à partir d'une matrice aqueuse. Un exemple de chromatogramme d'un extrait aqueux en GC/NPD et GC/MS est donné aux Figures 2 et 3 respectivement.

La méthodologie développée en milieu aqueux a été étendue à une matrice plus complexe. Dans ces expériences, une quantité de 100 ppb des 7 amines aromatiques est ajoutée à la solution d'hémoglobine. La matrice biologique est passée sur la cartouche extractante de façon à vérifier les quantités d'amines aromatiques possiblement adsorbées par la cartouche. Les résultats obtenus figurant au Tableau 3 démontrent un taux de recouvrement supérieur à 95% pour la plupart des amines aromatiques et les coefficients de variation sont de l'ordre de 1% à 6 % selon le composé. Également, afin de vérifier les interférences possibles, un blanc d'un échantillon d'hémoglobine auquel seulement le standard interne a

LISTE DES COMPOSÉS D'INTÉRÊTS AINSI QUE LEUR STRUCTURE

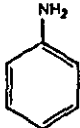
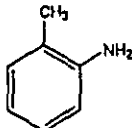
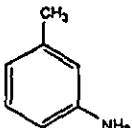
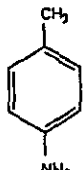
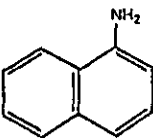
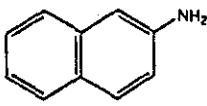
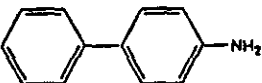
aniline	
o-toluidine	
m-toluidine	
p-toluidine	
1-naphthylamine	
2-naphthylamine	
4-aminobiphényl	

TABLEAU 2

ÉTUDE DE RECOUVREMENT ET REPRODUCTIBILITÉ DES EXTRACTIONS SOLIDE-LIQUIDE EN MILIEU AQUEUX POUR LES 7 AMINES AROMATIQUES ÉTUDIÉES (n=3)

Amines aromatiques	% Recouvrement	C.V. (%)
aniline	37.7	8
o-toluidine	96.9	5
m-toluidine	92.5	1
p-toluidine	98.0	2
1-naphthylamine	95.9	4
2-naphthylamine	98.7	3
4-aminobiphényle	98.5	4

TABLEAU 3

ÉTUDE DE RECOUVREMENT ET REPRODUCTIBILITÉ DES EXTRACTIONS SOLIDE-LIQUIDE À PARTIR D'UNE MATRICE D'HÉMOGLOBINE POUR LES 7 AMINES AROMATIQUES ÉTUDIÉES (n=3)

Amines aromatiques	% Recouvrement	C.V. (%)
aniline	29.1	3
o-toluidine	94.4	1
m-toluidine	99.6	6
p-toluidine	100.0	5
1-naphthylamine	89.4	5
2-naphthylamine	100.6	5
4-aminobiphényle	99.8	6

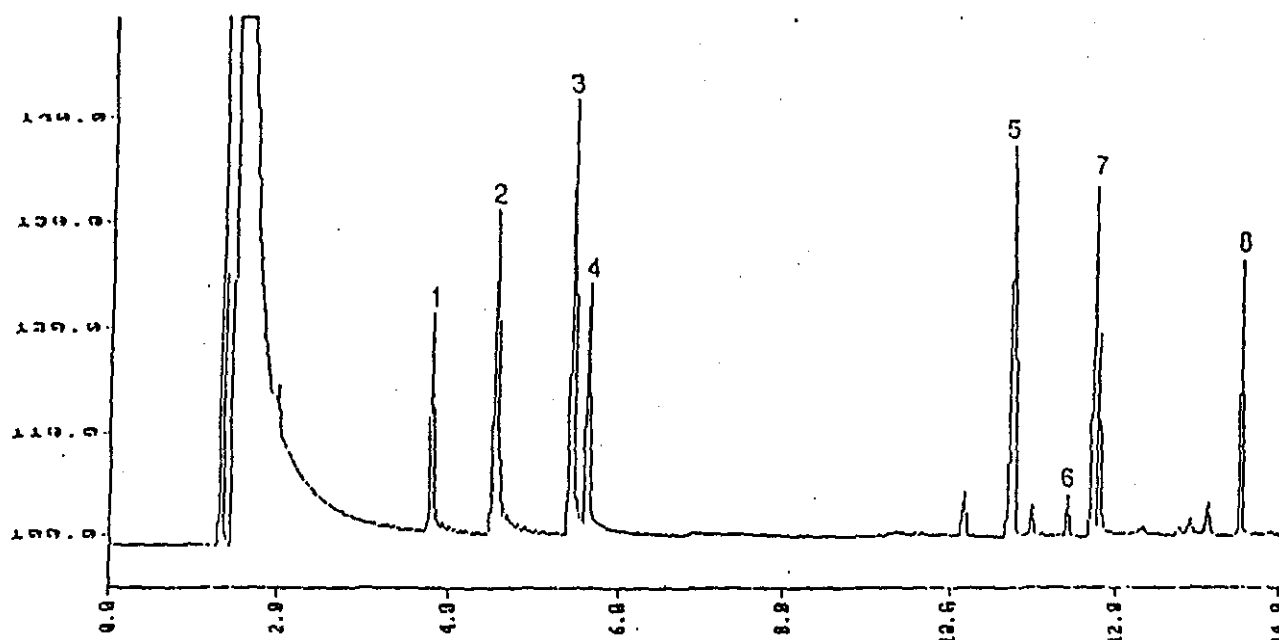


Figure 2. Représentation d'un chromatogramme GC/NPD d'un extrait de 7 amines aromatiques à partir d'une matrice aqueuse fortifiée (100ppb). Les numéros correspondent à : 1) aniline, 2) o-toluidine, 3) m-toluidine, 4) p-toluidine, 5) 1-naphthylamine, 6) diphenylamine (standard interne), 7) 2-naphthylamine, 8) 4-aminobiphényle.

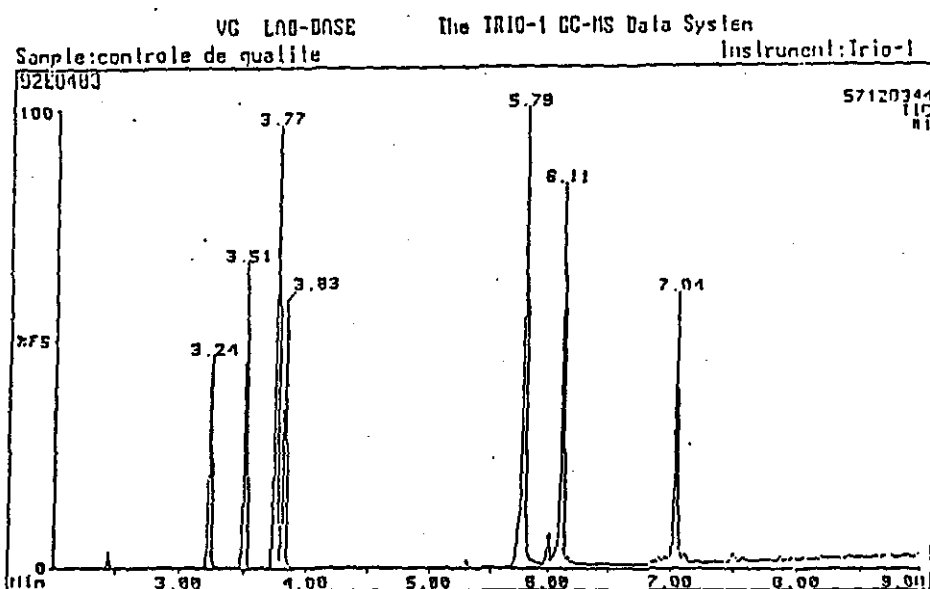


Figure 3. Représentation d'un chromatogramme GC/MS/SIM d'un extrait de 7 amines aromatiques à partir d'une matrice aqueuse fortifiée (100ppb). Les temps de rétention correspondent à : 3.24 min.= aniline (m/z 189), 3.51 min.= o-toluidine (m/z 203), 3.77 min.= m-toluidine (m/z 203), 3.83 min.= p-toluidine (m/z 203), 5.79min.= 1-naphthylamine (m/z 239), 6.02min.= diphenylamine (standard interne) (m/z 265). 6.11 min.=

été ajouté, a subi le même procédé d'extraction. Les résultats montrent qu'aucune interférence n'est observée aux temps de rétention des 7 amines aromatiques étudiées comme le démontre la Figure 4. Des exemples de chromatogrammes en GC/NPD et GC/MS d'un extrait à partir d'une solution d'hémoglobine fortifiée avec 100 ppb d'amines aromatiques sont représentés aux Figures 5 et 6. Les résultats obtenus quant aux recouvrements des diverses amines aromatiques, tant en milieu aqueux qu'en milieu biologique, démontrent le potentiel de cette approche pour extraire et concentrer les amines aromatiques dans ce type d'échantillon.

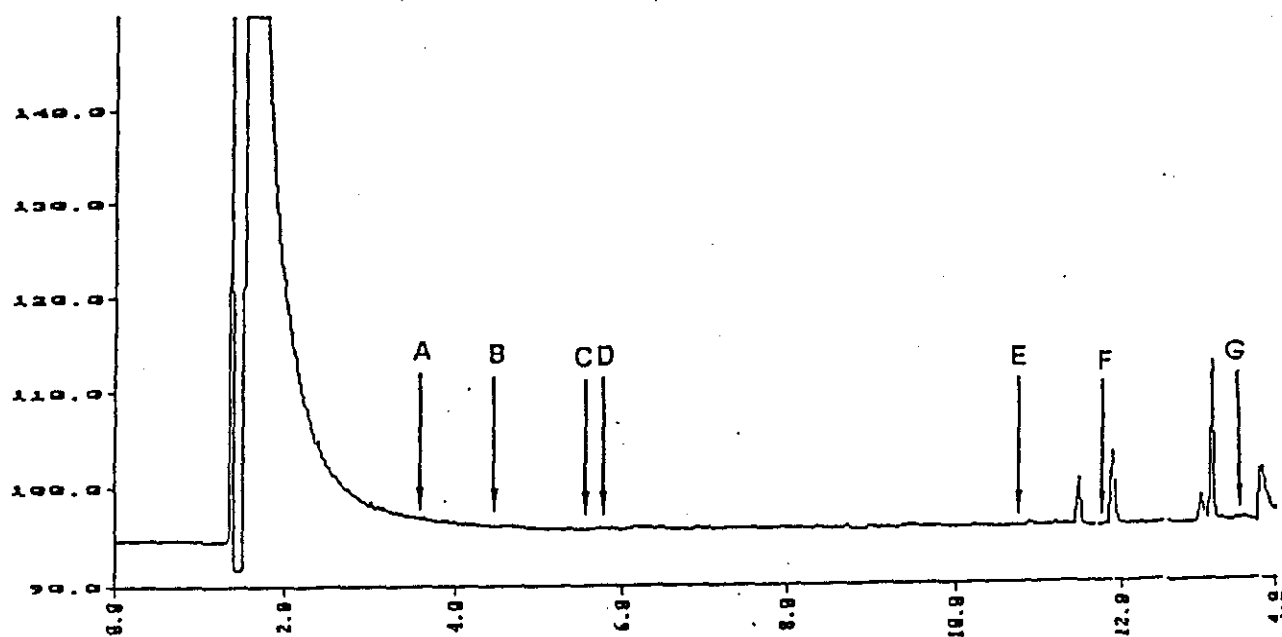


Figure 4. Représentation d'un chromatogramme GC/NPD d'un blanc d'une solution d'hémoglobine. Les lettres correspondent à l'emplacement des 7 amines aromatiques : A= aniline B= o-toluidine, C= m-toluidine, D= p-toluidine, E= 1-naphthylamine, F= 2-naphthylamine, G= 4-aminobiphényle.

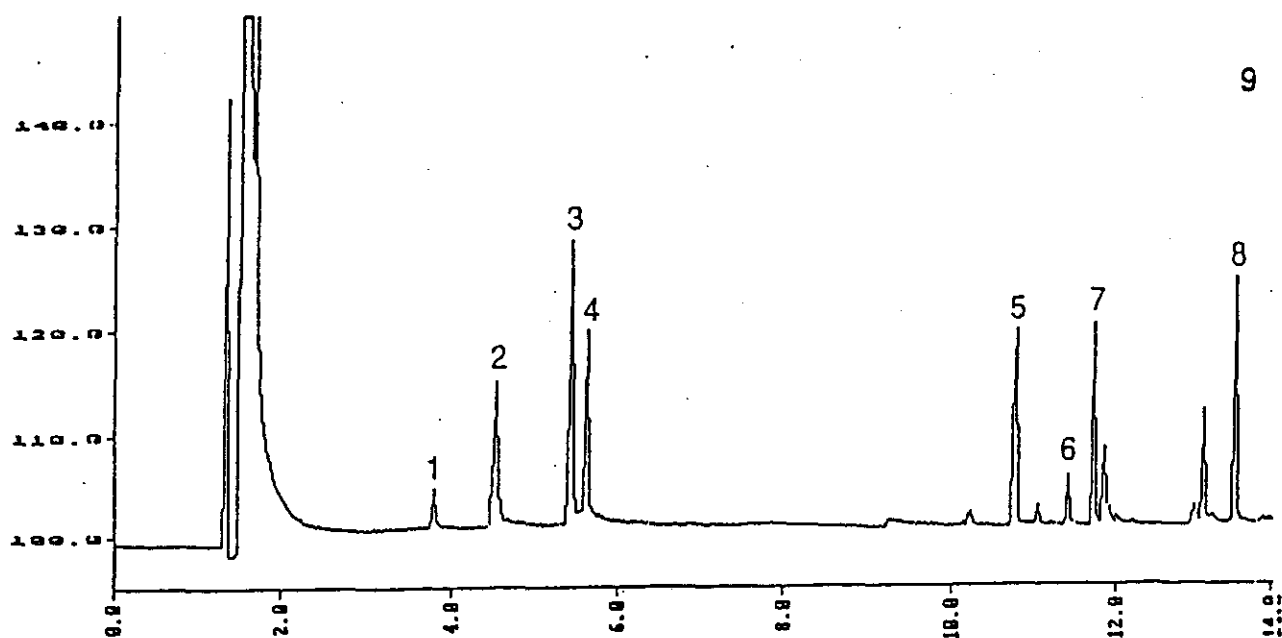


Figure 5. Représentation d'un chromatogramme GC/NPD d'un extrait de 7 amines aromatiques à partir d'une solution d'hémoglobine fortifiée (100ppb). Les numéros correspondent à : 1) aniline, 2) o-toluidine, 3) m-toluidine, 4) p-toluidine, 5) 1-naphthylamine, 6) diphenylamine (standard Interne), 7) 2-naphthylamine, 8) 4-aminobiphényle.

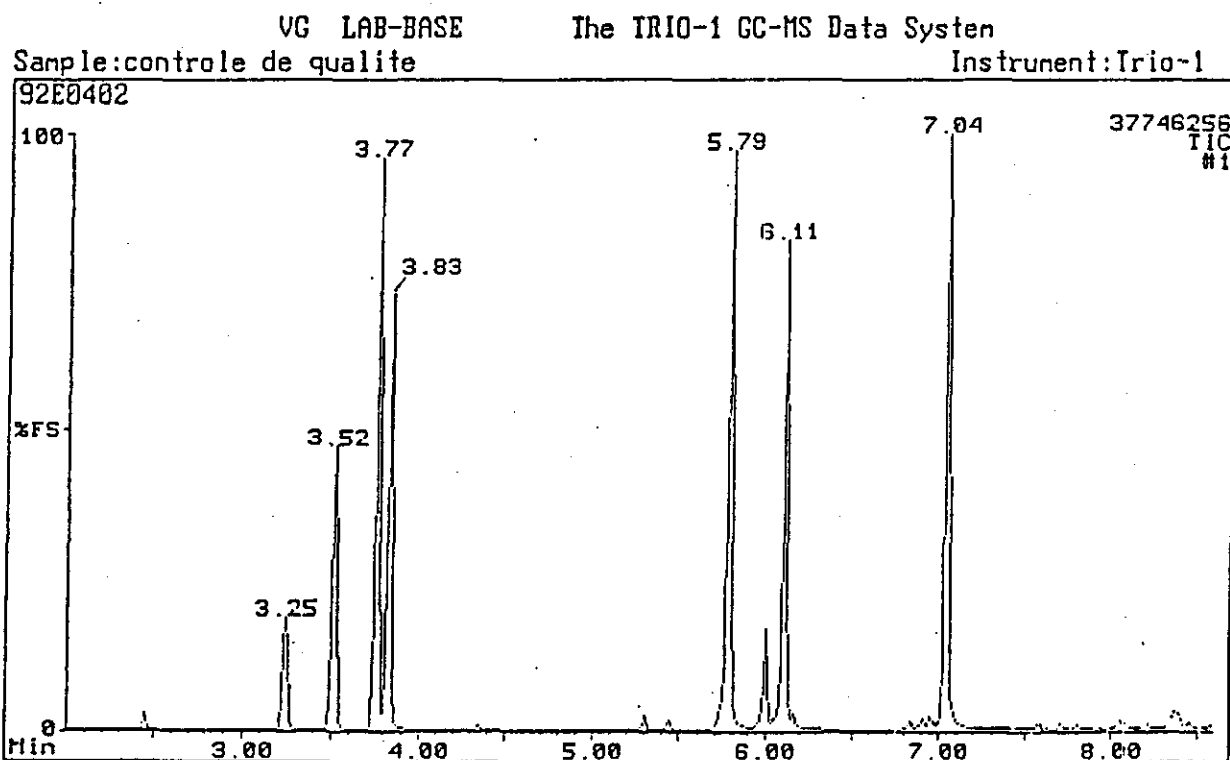


Figure 6. Représentation d'un chromatogramme GC/MS/SIM d'un extrait de 7 amines aromatiques à partir d'une solution d'hémoglobine fortifiée (100ppb). Les temps de rétention correspondent à : 3.25 min.= aniline (m/z 189), 3.52 min.= o-toluidine (m/z 203), 3.77 min.= m-toluidine (m/z 203), 3.83 min.= p-toluidine (m/z 203), 5.79min.= 1-naphthylamine (m/z 239), 6.02min.= diphenylamine (standard Interne) (m/z 265), 6.11 min.= 2-naphthylamine (m/z239), 7.04 min.= 4-aminobiphényle (m/z 265).

Dans le contexte de la présente étude, la dérivation des composés par l'anhydride trifluoroacétique montré à la Figure 7 offrent plusieurs avantages. Dans un premier temps, l'ajout d'un groupe COCF_3 sur la fonction aminée (NH_2) permet la séparation des isomères o-, m-, p-toluidine ainsi que le 1-, 2-naphthylamine lesquels coéluent lorsque non dérivés. Dans un second temps, la dérivation des amines permet des gains en volatilité et stabilité thermique par rapport à l'amine initiale et permet aussi d'obtenir des pics symétriques et bien séparés. La réaction de dérivation est quantitative et complète en quelques minutes à la température de la pièce.

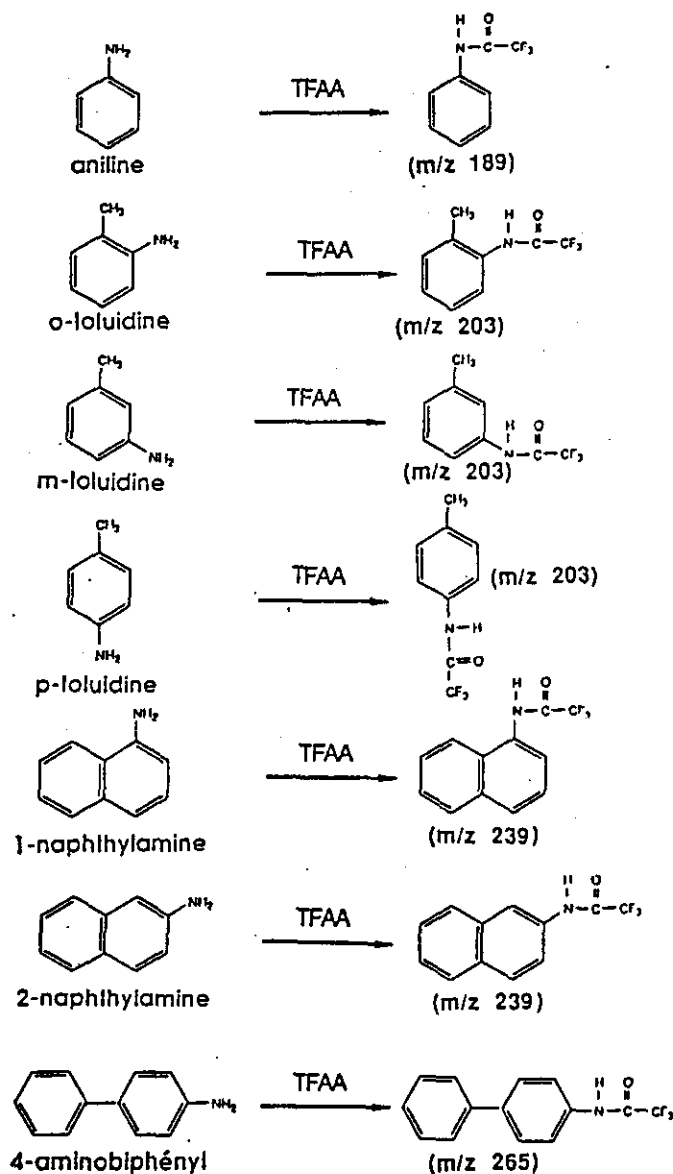


Figure 7. Dérivation des composés d'intérêts par l'anhydride trifluoroacétique.

Au cours de cette étude, les échantillons sont analysés par GC/NPD et également par GC/MS. Pour les analyses GC/MS, le spectromètre de masse est opéré en mode de balayage d'ions spécifiques. Les intensités des ions à m/z 189, 203, 239 et 265 ont été utilisés pour quantifier l'aniline, les isomères *o*-, *m*-, *p*-toluidine, 1-, 2-naphthylamine, le 4-aminobiphényle ainsi que le diphenylamine utilisé comme standard interne. L'analyse de ces composés par couplage de la chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse (GC/MS) donne des spectres qui sont hautement spécifiques. En effet, ils possèdent des ions moléculaires intenses, des masses impaires et des ions fragments (M-69), (M-97) et (M-112), démontré au Tableau 4 qui sont peu communs et caractéristiques des produits de dérivation et par le fait même très utiles lors de l'identification absolue de ces composés ou lors de leur analyses par balayage d'ions spécifiques (SIM/MS). Les spectres de masses des amines aromatiques dérivées sont présentés en annexe.

TABLEAU 4

PRINCIPAUX IONS OBTENUS EN IMPACT ÉLECTRONIQUE (EI) POUR LES AMINES AROMATIQUES DÉRIVÉES (TFAA)

COMPOSÉS	M+	M-69	M-97	M-112	AUTRES
aniline	189(50)	120 (63)	92 (100)	77 (74)	69, 65
<i>o</i> -toluidine	203(68)	134(100)	106(44)	91(66)	77, 69, 65
<i>m</i> -toluidine	203(100)	134(45)	106(34)	91(87)	77, 69, 65
<i>p</i> -toluidine	203(100)	134(33)	106(57)	91(34)	77, 69, 65
1-naphthylamine	239(100)	170(25)	142(26)	127(15)	115, 69
2-naphthylamine	239(100)	170(13)	142(16)	127(13)	115, 69
4-aminobiphényle	265(100)	196(13)	168(36)	---	115, 69

* les Intensités relatives (%) sont données entre parenthèses

Mentionnons également une étape importante dans la préparation des échantillons soit la silanisation du matériel de verre. Effectivement, lors de l'analyse de trace, les pertes causées par l'adsorption de l'analyte sur la surface de verre, peuvent devenir significatives. Les amines étant particulièrement susceptibles de s'adsorber sur la surface de verre, il s'avère donc important de désactiver les sites actifs présents. Le

traitement utilisé pour désactiver ou silaniser le verre consiste en l'élimination des groupements polaires (Si-OH) présents à la surface du verre, et ce, en liant chimiquement une couche de silicone ce qui a pour effet de dériver le verre.

Les courbes de calibration obtenues pour les diverses amines aromatiques montrent que la réponse du détecteur est linéaire sur plusieurs ordres de grandeur autant en GC/NPD qu'en GC/MS. Des limites de détection se situant aux environs de 1 à 10 pg en GC/NPD et de 20-50 fg en GC/MS en mode de balayage d'ions spécifiques peuvent être obtenues. La Figure 8 présente des exemples de courbe de calibration pour les 7 amines aromatiques en GC/NPD.

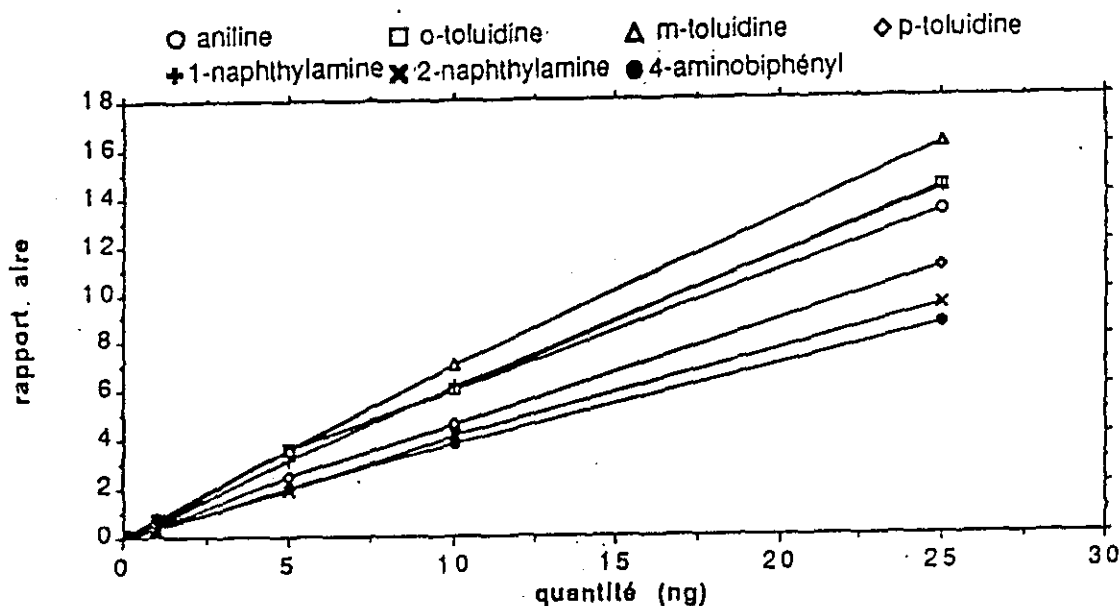


Figure 8. Linéarité de la réponse du détecteur NPD en fonction de la concentration d'amines aromatiques (courbes de calibration).

Au niveau de la conservation des échantillons il est important que la validité de la procédure utilisée soit vérifiée. En effet, les échantillons ne sont généralement pas analysés immédiatement après leur cueillette ainsi il devient important de les conserver dans des conditions où il n'y aura pas d'altération de la composition des composés d'intérêts. De façon à contrôler le contenu et s'assurer de leur intégrité, des échantillons de solution d'hémoglobine auxquels une quantité connue d'amines aromatiques a été ajoutée, ont été conservés durant plusieurs jours à -20 °C. La Figure 9 démontre que les échantillons demeurent stables sur plusieurs intervalles de temps lorsque ceux-ci sont congelés à -20 °C.

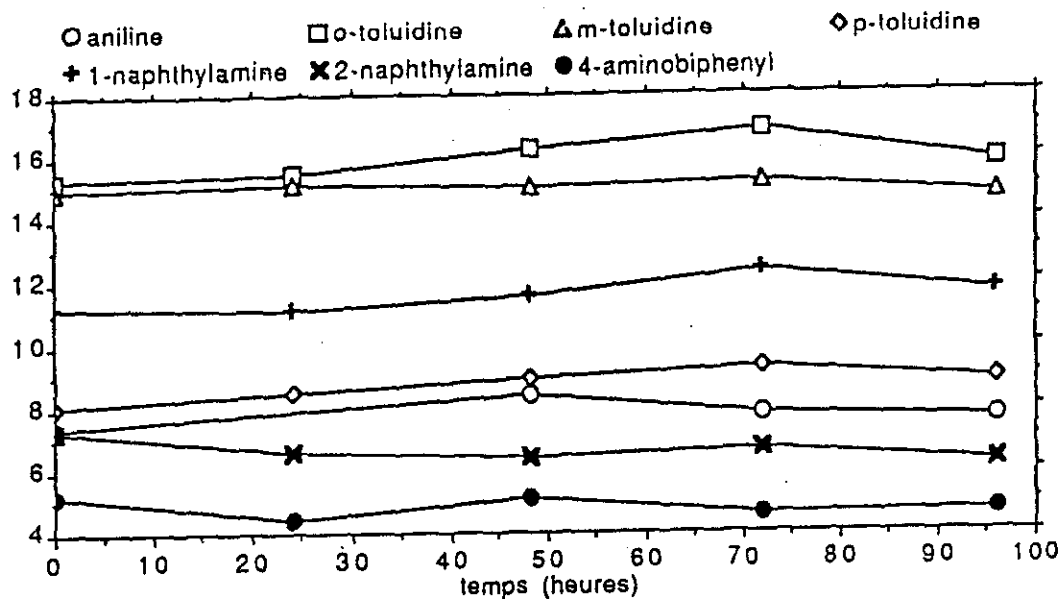


Figure 9. Stabilité dans le temps des amines aromatiques étudiées.

CONCLUSION

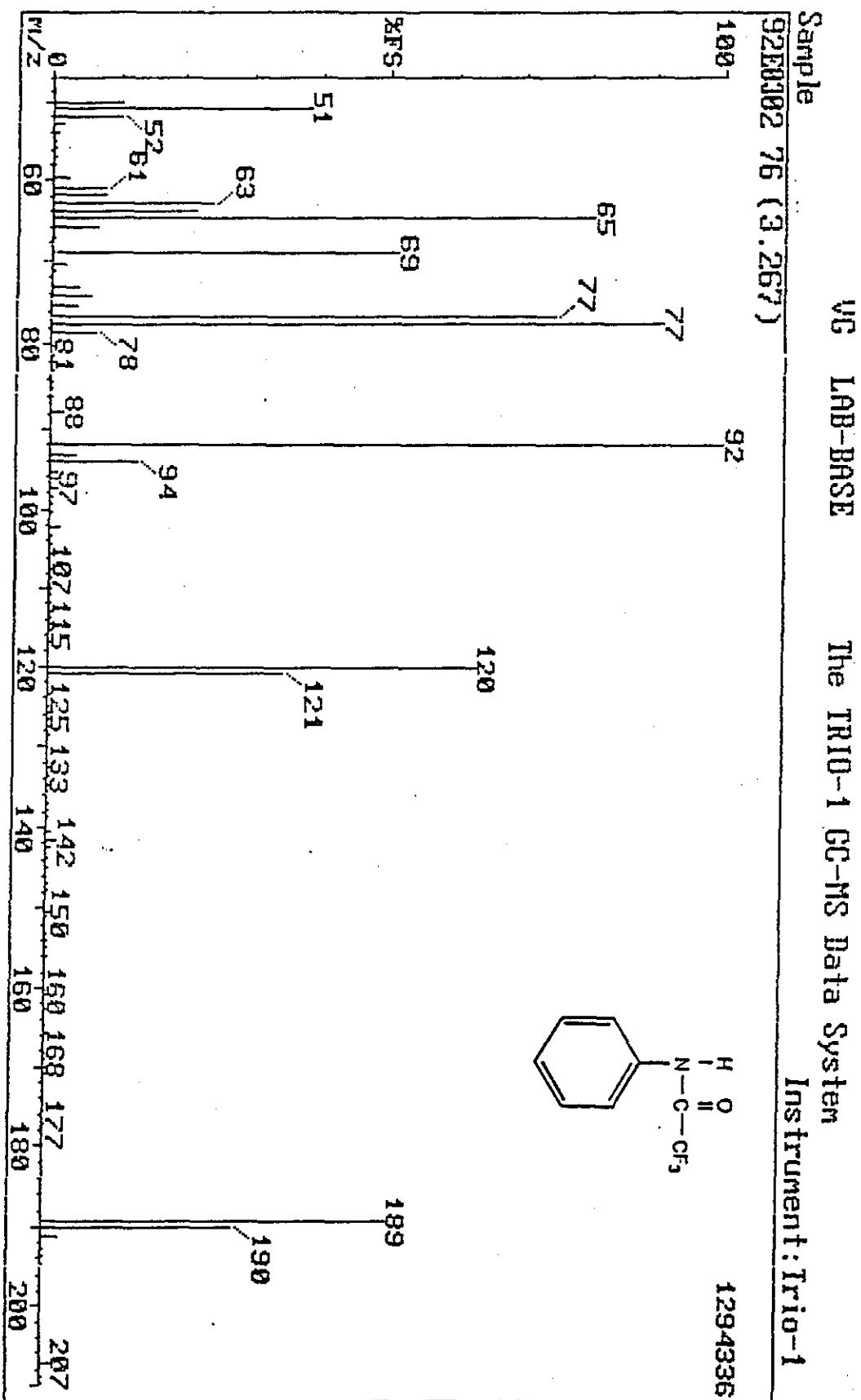
À la lumière des résultats préliminaires obtenus le développement et l'optimisation des différentes étapes de la procédure d'isolement des amines aromatiques d'intérêt semblent bien enclenchés. Les résultats présentés sur l'utilisation de cartouche d'adsorbant solide pour récupérer et concentrer les composés d'intérêt à partir d'une matrice aqueuse ou d'hémoglobine s'avèrent très prometteur.

Sur le plan de la récupération des composés à partir des cartouches d'adsorbants solides, il est relativement facile de récupérer en grande partie les amines aromatiques adsorbées en utilisant un solvant d'élution approprié. Cette procédure à la fois simple et rapide permet également d'effectuer une préconcentration de l'échantillon du fait que les volumes d'élution sont de beaucoup inférieurs aux volumes à partir desquels les substances sont adsorbées. De plus, l'étape de dérivation permet une seconde préconcentration de l'échantillon puisque l'échantillon est évaporé à sec et le volume final refait avec un microvolume de solvant.

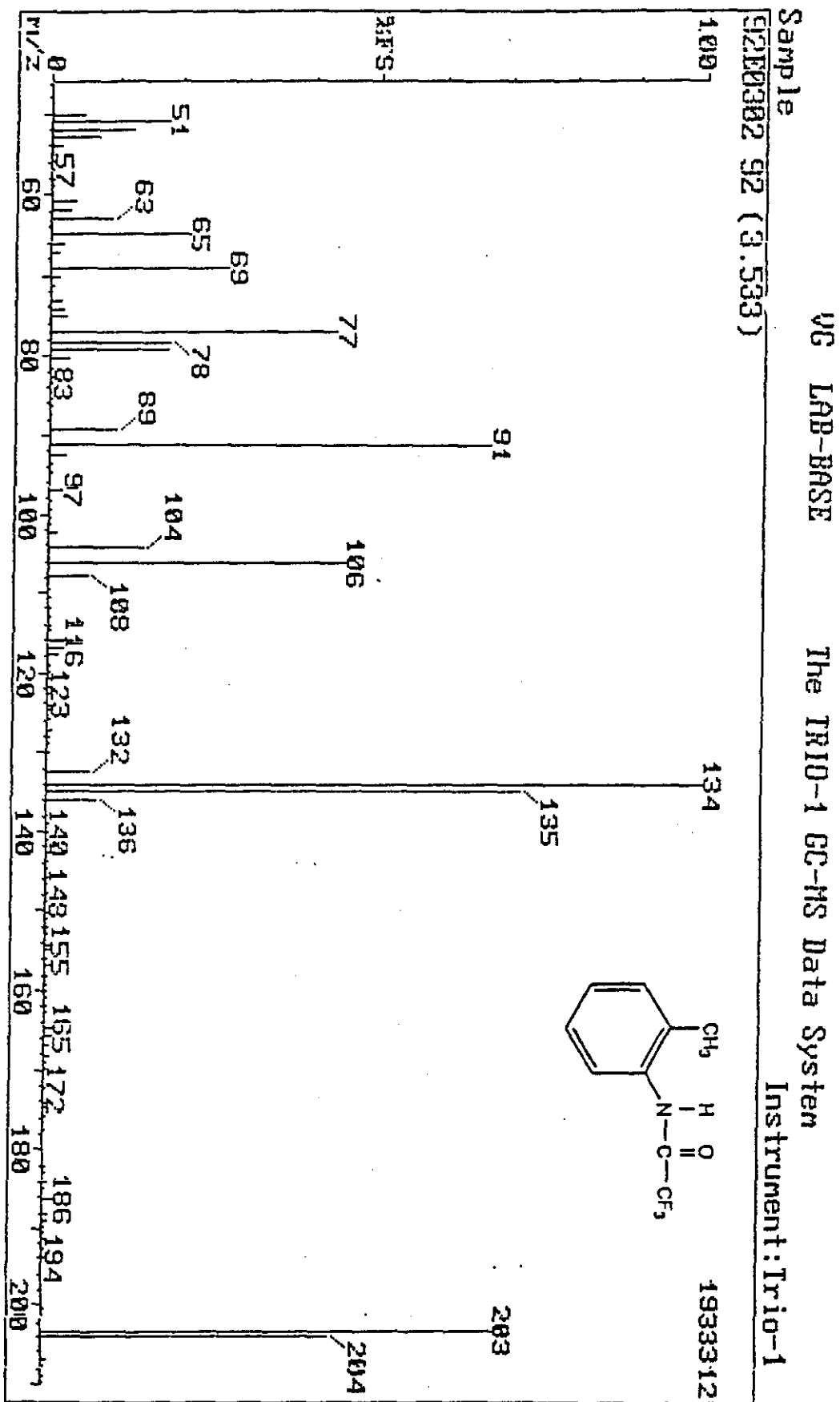
Sur le plan de la quantification et de l'identification des diverses amines aromatiques, le système chromatographique GC/MS est un outil analytique puissant qui nous permet de détecter et d'identifier des quantités de composés de l'ordre du femtogramme. A ce niveau, afin de procéder à la mesure des amines aromatiques à partir d'échantillon réel, des isotopes stables de chacune des amines aromatiques seront intégrés à la procédure d'isolement initiale. De plus, des expériences pourront éventuellement être menées chez l'animal afin de compléter l'étude en cours.

ANNEXES

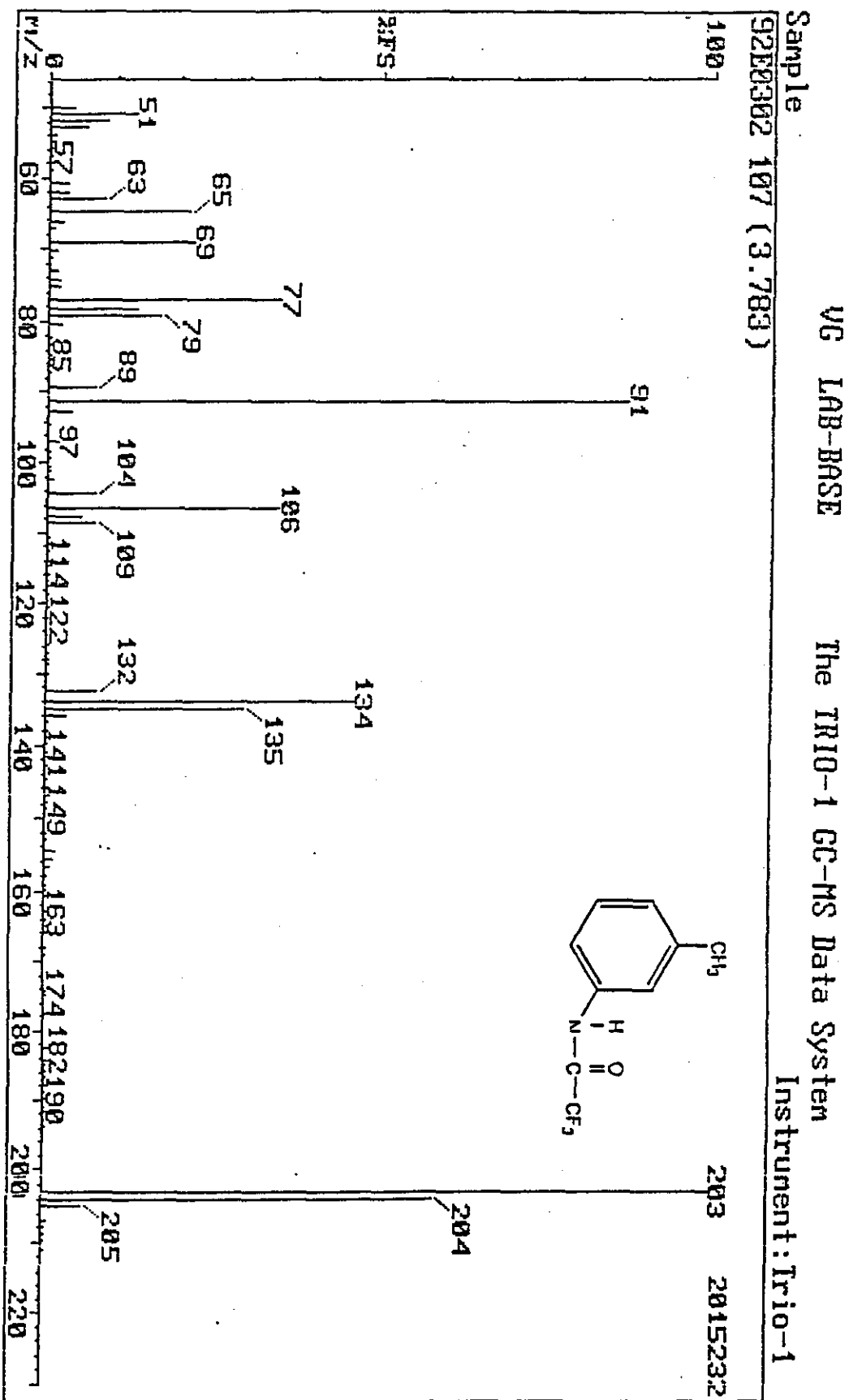
SPECTRE 1. Spectre de masse en impact électronique de l'aniline dérivé par l'anhydride trifluoroacétique.



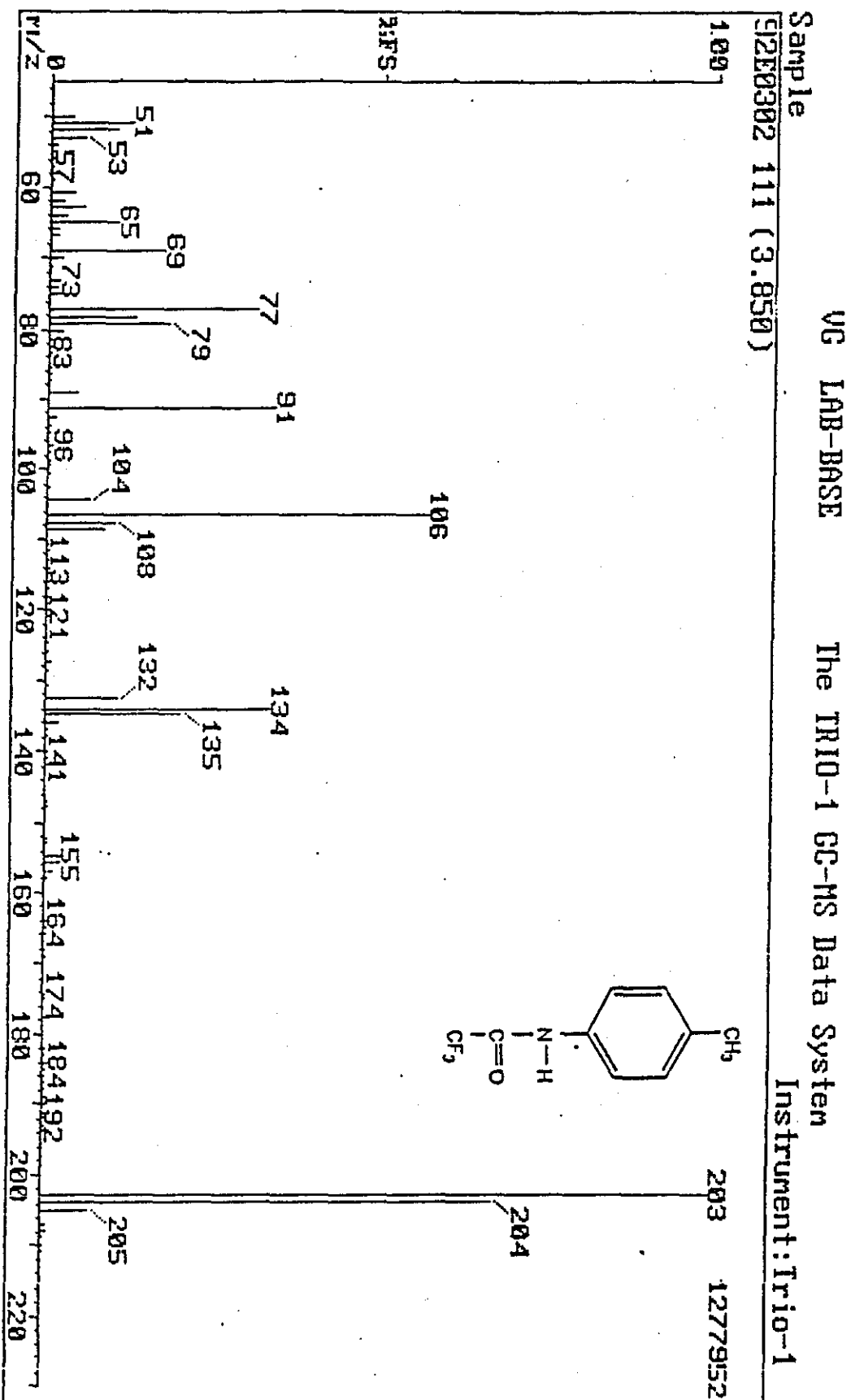
SPECTRE 2. Spectre de masse en impact électronique de l'o-toluidine dérivé par l'anhydride trifluoroacétique.



SPECTRE 3. Spectre de masse en impact électronique du m-toluidine dérivé par l'anhydride trifluoroacétique.



SPECTRE 4. Spectre de masse en impact électronique du p-toluidine dérivé par l'anhydride trifluoroacétique.



SPECTRE 5. Spectre de masse en impact électronique du 1-naphthylamine dérivé par l'anhydride trifluoroacétique.

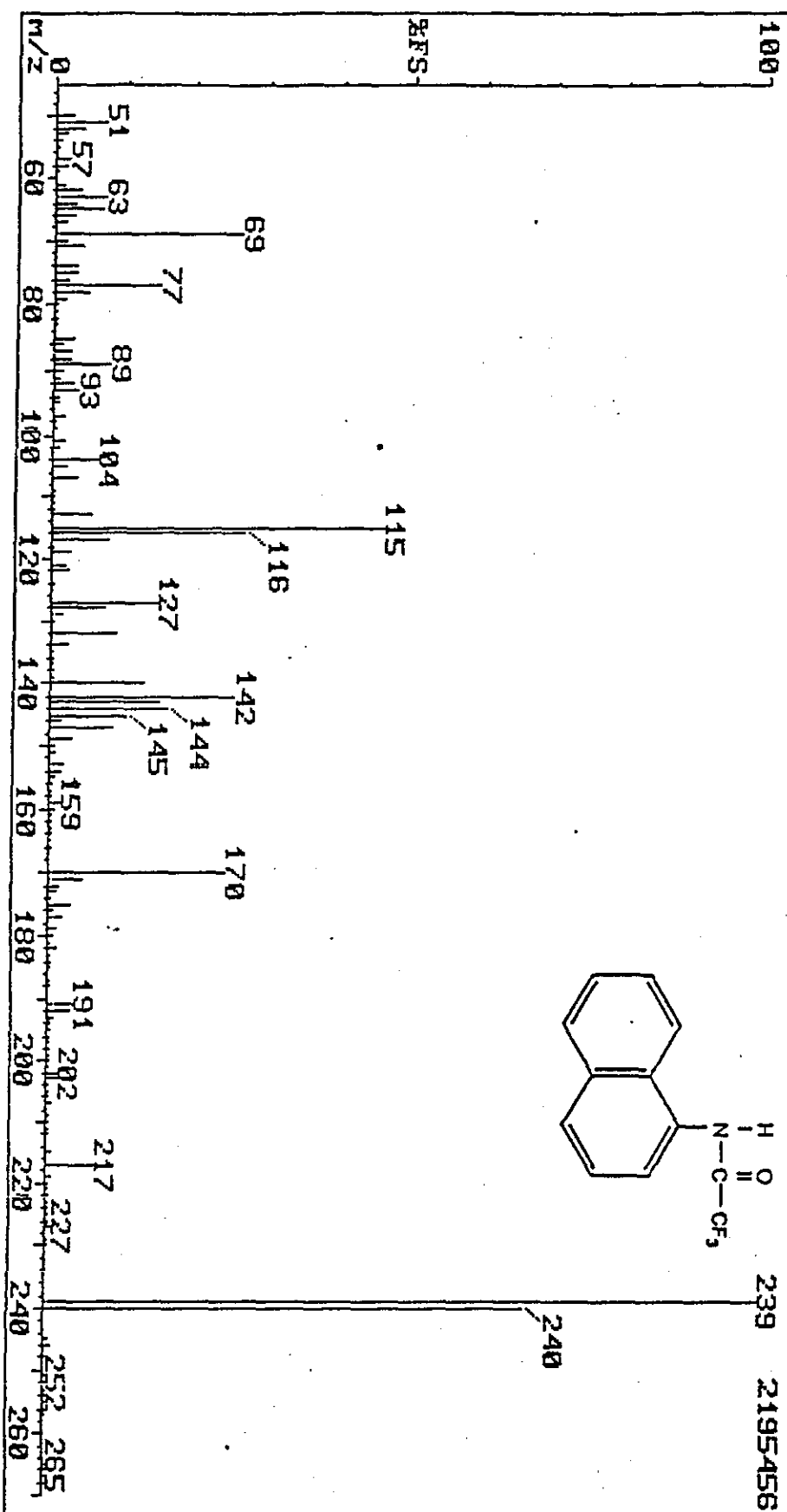
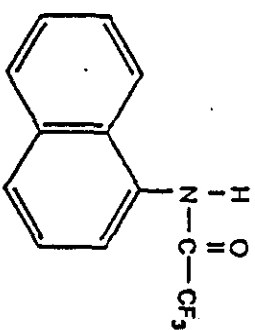
Sample

UG LAB-BASE

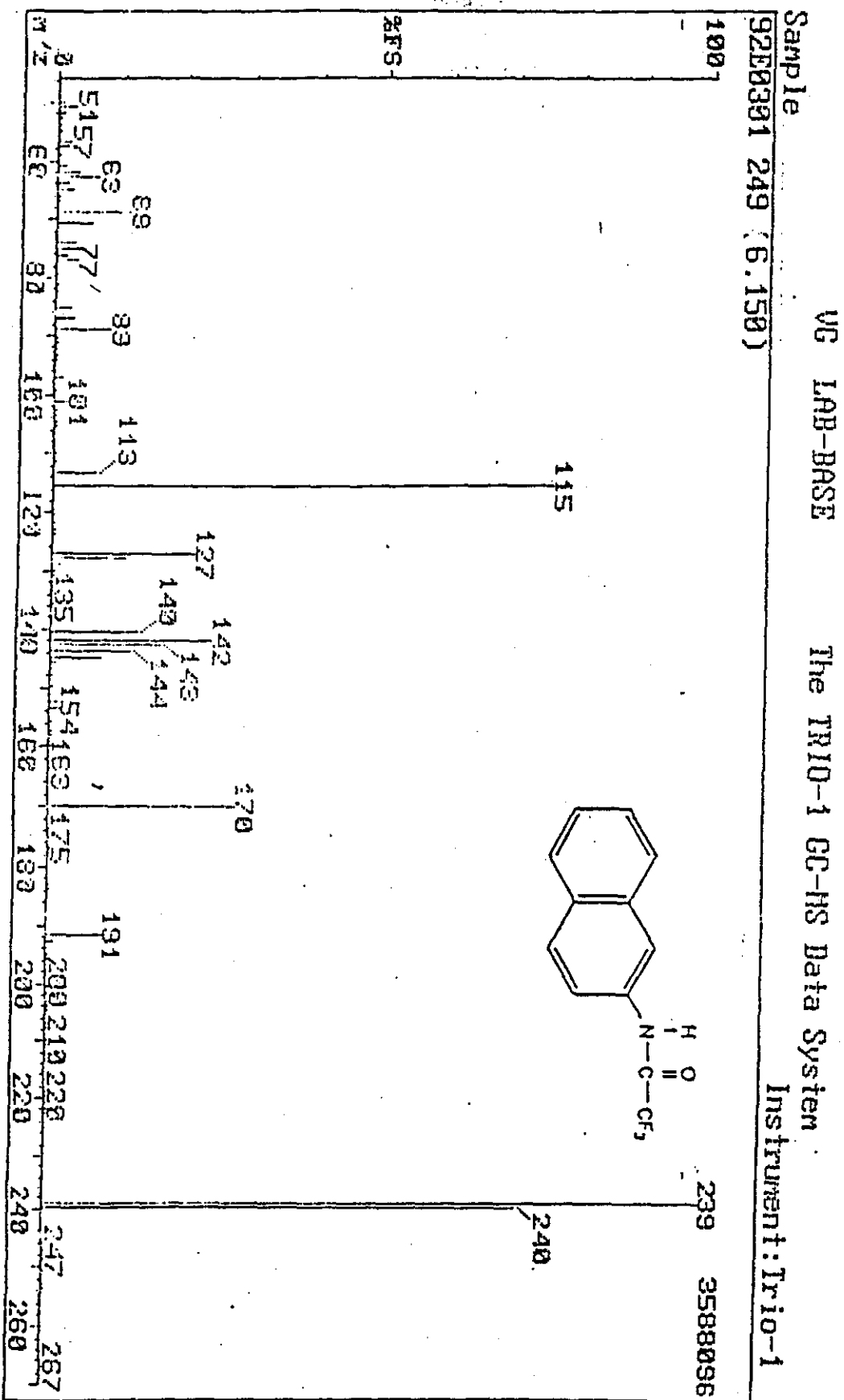
The TRIO-1 GC-MS Data System

Instrument: Trio-1

92E0302'229 (5.818) REFINE



SPECTRE 6. Spectre de masse en impact électronique du 2-naphthylamine dérivé par l'anhydride trifluoroacétique.



SPECTRE 7. Spectre de masse en impact électronique du 4-aminobiphényl dérivé par l'anhydride trifluoroacétique.

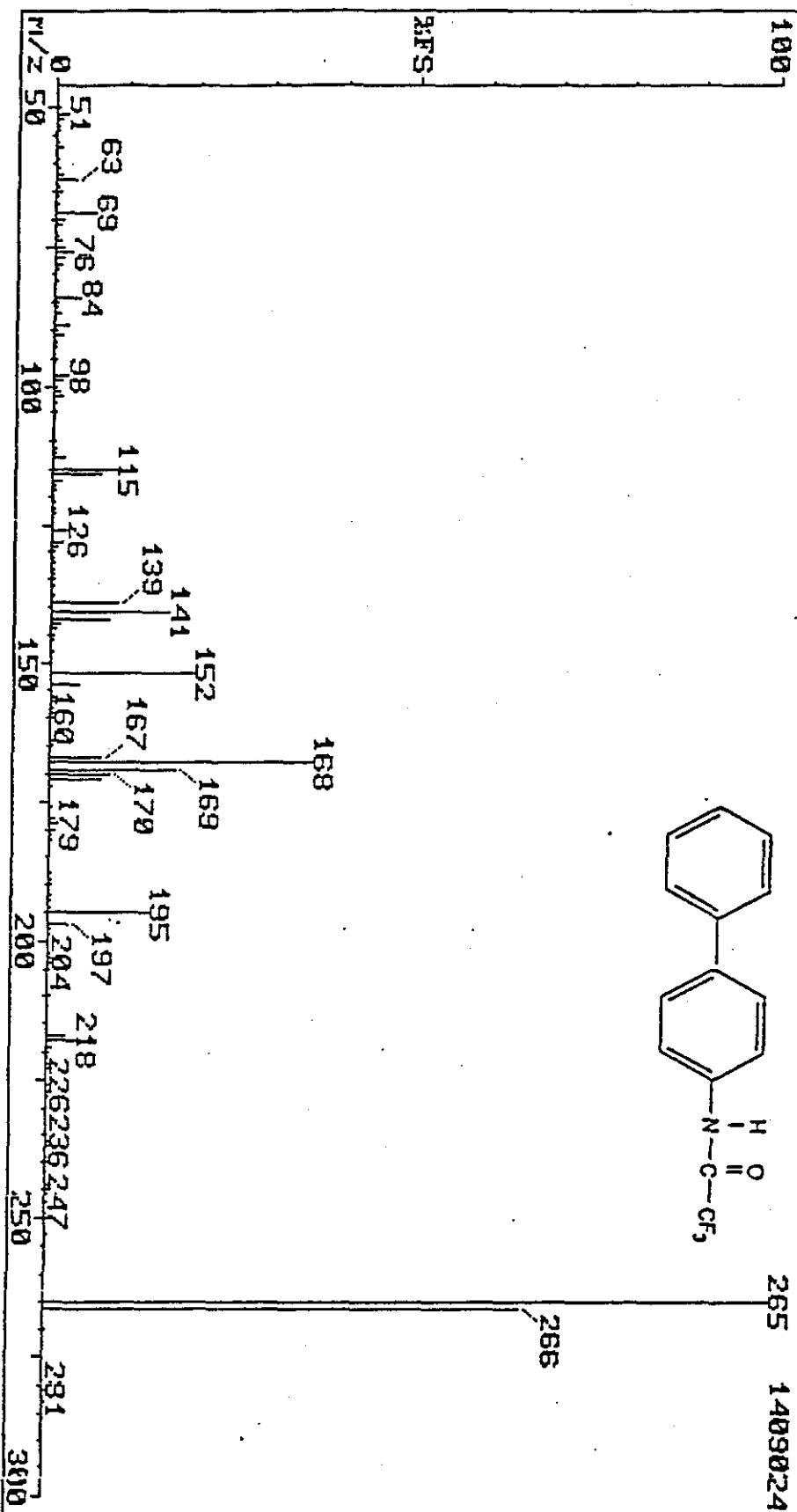
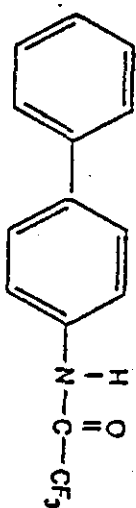
Sample

VC LAB-BASE

The TRIO-1 GC-MS Data System

Instrument: Trio-1

92E0302'304 (7.068)



Annexe 4

**DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODOLOGIE ANALYTIQUE POUR L'ANALYSE
D'AMINES AROMATIQUES EN MILIEU BIOLOGIQUE SUITE À UNE EXPOSITION
AUX FUMÉES D'UN INCENDIE DE PNEUS**

APPLICATION À DES ÉCHANTILLONS RÉELS

**Par : Suzanne N. Dumont et
Michel J. Bertrand**

**Département de Chimie
Université de Montréal**

1. INTRODUCTION

Cette étude fût entreprise afin de mettre au point une méthodologie analytique dans le but d'effectuer la mesure des adduits amine-hémoglobine dans le sang de travailleurs exposés aux fumées d'un incendie de pneus survenu à St-Amable. L'évaluation de l'exposition aiguë ou sub-aiguë à des amines aromatiques est difficile sinon impossible à réaliser à partir de mesures environnementales. Une approche en surveillance biologique par la mesure des amines aromatiques adduites à des composés protéiques paraît donc la meilleure façon de mesurer cette exposition. L'objectif de cette étude consiste à isoler, identifier et quantifier les amines aromatiques 2-naphthylamine et 4-aminobiphényle libres et adduites à l'hémoglobine, dans le sang de travailleurs exposés à des amines aromatiques suite à une exposition aux fumées d'un incendie de pneus.

L'étude entreprise est de type comparative, c'est-à-dire que les résultats obtenus pour les travailleurs exposés aux amines aromatiques sont comparés à des individus non exposés à ce type de composés. La population étudiée est composée de deux groupes bien distincts : un groupe exposé et un groupe témoin non exposé. Le groupe exposé constitue les individus qui ont été en présence d'une source de contamination en amines aromatiques lors de l'incendie de pneus. Ces individus ont été invités à se soumettre à un premier prélèvement sanguin quelques jours après l'exposition ainsi qu'à un second prélèvement plusieurs mois après l'exposition.

Le groupe témoin, ou non exposé, est recruté auprès de travailleurs de l'industrie manufacturière dans le secteur Charles Lemoyne. Les témoins ont également été appelés à se soumettre à un prélèvement sanguin. Ceux-ci sont appariés aux individus exposés de façon spécifique c'est-à-dire selon leur âge ainsi qu'en fonction de leur habitudes tabagiques (fumeurs ou non fumeurs). Également, un paramètre important à considérer est leur exposition potentielle en milieu de travail

ou ailleurs aux contaminants visés dans cette étude. Le groupe témoin choisi doit donc être exempt de toute source d'exposition au cours de ses fonctions quotidiennes.

La technique analytique utilisée afin d'évaluer la mesure des amines aromatiques dans le sang des travailleurs exposés et des témoins non exposés, consiste dans un premier temps, à briser le lien covalent amine-hémoglobine puis à isoler les amines libres de la matrice biologique. Dans un second temps, les amines aromatiques extraites sont identifiées et quantifiées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Composés chimiques

Les amines aromatiques étudiées soit la 2-naphthylamine et le 4-aminobiphényle proviennent de Aldrich Chemicals (Milwaukee WI). La diphenylamine utilisée comme standard interne provient de J.T.Baker Chemical Co. (Phillipsburg N.J.) et les standards internes deutérés tels que la 2-naphthylamine-D7 et le 4-aminobiphényle-D9 proviennent tout deux de MSD Isotopes (Montréal, Canada). Tous les composés ont été utilisés tels que reçus, sans purification supplémentaire. Les solvants organiques utilisés sont le méthanol de grade HPLC provenant de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI). Le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'hexane et l'acétonitrile de grade GC-MS ont été obtenus de la compagnie Baxter corporation (Mississauga, Ontario). L'acétone spectrograde provient de A & C (Toronto). Le diclorodiméthylsilane utilisé pour la silanisation du matériel de verre ainsi que l'hydroxyde de sodium proviennent de Aldrich Chemicals (Milwaukee WI). L'eau distillée, déionisée employée dans la préparation des échantillons provient d'un système de purification d'eau de modèle Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2 Préparation et conservation des spécimens biologiques

La préparation et la conservation des échantillons sanguins des travailleurs exposés et des témoins non exposés a été effectué par le Groupe de Recherche Du Dr. Claude Viau du Département de Médecine du Travail de l'Université de Montréal.

2.2.1 Isolement de l'hémoglobine

Les échantillons sanguins sont centrifugés puis le plasma est prélevé et conservé à -20 °C dans un tube de polycarbonate. La fraction cellulaire est lavée trois fois avec une solution saline isotonique héparinée. Après la dernière centrifugation, la couche de cellules blanches est éliminée. Les érythrocytes sont lysés avec de l'eau et du CCl_4 et la solution d'hémoglobine est ensuite conservée à -20 °C dans des bouteilles de polypropylène. La teneur en hémoglobine de chaque échantillon est mesurée selon une adaptation de la méthode de Kingsley.

2.2.2 Hydrolyse des adduits protéiques

Les échantillons de solutions d'hémoglobine sont dilués environ 4 fois avec de l'eau ultra pure (millipore) et 10 μL de HCl concentré / mL de solution sont ajoutés. La solution d'hémoglobine acidifiée est chauffée à 80°C durant 2 heures. Également, afin de s'assurer du bon fonctionnement de la méthode d'extraction, chaque analyse est accompagné d'un échantillon témoin positif c'est-à-dire auquel une quantité connue d'amines aromatiques est ajoutée. Ces échantillons témoins positifs sont préparés à partir de solutions d'hémoglobine préalablement hydrolysées et 8 μL d'une solution stock 50 ng/mL de 2-naphthylamine et 4-aminobiphényle sont ajoutés.

À la suite de l'acidification des échantillons, le standard interne diphénylamine et les standards internes deutérés tels que la 2-naphthylamine-D7 et le 4-aminobiphényl-D9 (50ng/mL) sont

ajoutés. Les échantillons sont ensuite agités à l'aide d'un vortex, puis extraites selon le protocole décrit ci-dessous.

2.3 Mesure d'amines aromatiques en milieu sanguin

2.3.1 Processus d'isolement et de dosage des amines aromatiques

L'extraction solide-liquide est effectuée à l'aide d'un système d'extraction sous vide provenant de Waters Co. (Milford, Massachussetts) pouvant accueillir jusqu'à 16 cartouches extractantes ou mini colonnes chromatographiques. Les colonnes extractantes proviennent de Millipore Inc. et sont vendues en paquet de dix cartouches. Après ouverture de l'enveloppe, les cartouches extractantes non-utilisées sont conservées au dessiccateur afin de prévenir toutes contaminations ou détériorations de la phase stationnaire.

2.3.2. Utilisation des cartouches extractantes

L'extraction-enrichissement des échantillons est effectuée à l'aide de cartouches extractantes de type C18. La cartouche demande une certaine préparation avant son utilisation et doit être préparée adéquatement avant de recevoir l'échantillon aqueux.

La première étape consiste à conditionner la cartouche extractante. L'étape de conditionnement se divise en deux parties : (i) La cartouche est d'abord mouillée avec un solvant organique par exemple le méthanol, ce qui permet d'ouvrir les chaînes d'hydrocarbure et ainsi augmenter la surface de contact disponible pour l'interaction avec l'analyte et également permet d'éliminer les résidus provenant du matériel de remplissage. (ii) La cartouche est ensuite lavée avec de l'eau de grade supérieure, ce qui permet d'éliminer l'excès de méthanol et de préparer la surface à recevoir

l'échantillon. Cette étape de conditionnement doit être similaire en terme de polarité, force ionique et pH à l'échantillon qui sera extrait. Dans ce cas-ci, le pH de l'eau est ajusté à 10 unités similairement aux conditions de l'échantillon.

L'échantillon à analyser, dont le pH est ajusté à 10 unités (solution hydroxyde de sodium concentrée), est agité brièvement à l'aide d'un vortex et filtré avant d'être transféré dans une seringue de verre de 30 mL préalablement silanisée et ayant une extrémité inférieure pouvant se raccorder à l'embout de la cartouche extractante. L'échantillon est par la suite élué au travers de la cartouche. Le débit de passage de l'échantillon à travers la cartouche extractante est fixé à 5 mL/min.

Afin d'éliminer les impuretés qui sont demeurées adsorbées sur la cartouche, le lavage de celle-ci permet d'éliminer les composés endogènes de la matrice qui peuvent interférer avec les composés d'intérêt lors de l'analyse chromatographique. Le lavage de la cartouche est donc effectué avec de l'eau millipore préalablement ajusté à pH 10. La cartouche extractante est ensuite séchée par injection d'un jet d'azote. Enfin, lorsque la cartouche est sèche, les substances adsorbées sur la cartouche sont désorbées avec 2 mL de dichlorométhane.

Chaque échantillon est ensuite dérivé avec 100 μ L d'anhydride trifluoroacétique. La solution est agitée brièvement à l'aide d'un vortex et ensuite reposée 5 minutes. Après dérivation des composés, l'excès de réactif est éliminé par évaporation. Le système d'évaporation utilisé est composé de seringue, de tube de plastique de marque Tygon et d'un gaz inerte de grade ultra pur, l'azote. Ce système permet l'évaporation de plusieurs échantillons à la fois et la variation du débit d'azote permet un contrôle de la vitesse d'évaporation. Les échantillons dérivés sont donc évaporés à sec sous un jet d'azote puis le volume final est refait avec 25 ou 50 μ L d'acétate d'éthyle.

Dans chaque cas, le rapport des aires des amines aromatiques sur celui de la référence soit la diphénylamine ou 4-aminobiphényle-D9 et 2-naphthylamine-D7, est calculé. L'identification et la confirmation de la présence des composés est effectué par GC-MS en mode de balayage d'ions spécifiques.

3. INSTRUMENTATION : Chromatographie et spectrométrie de masse

Les analyses en spectrométrie de masse sont effectuées avec un appareil de type quadrupolaire VG-TRIO-1 (VG, Angleterre) équipé d'un système de pompage différentiel. Le spectromètre de masse est couplé à un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard, modèle 5890. La colonne chromatographique utilisée est une colonne chromatographique capillaire de 30 mètres de longueur et de diamètre interne de 0.32mm (Supelco). La phase stationnaire de type SPB-5 est composée de 5% de diphényl, 94% de diméthyl et 1% de vinyl polysiloxane. L'épaisseur du film de phase stationnaire est de 0.25 μm .

Une source à impact électronique (EI) est installée dans la chambre à ionisation du spectromètre de masse. Les lentilles, la cage ainsi que le repoussoir d'électrons de la source doivent être soyeusement entretenus afin de ne pas gêner la sensibilité de l'appareil. Les dépôts de carbone qui s'accumulent à la suite de plusieurs injections doivent être nettoyés régulièrement.

Le système d'acquisition et de traitement de données LAB-BASE est utilisé pour la manipulation des données. L'acquisition des données en mode de balayage entre les masses 50 et 500 est effectuée en 0.5 seconde. En mode de monitoring d'ions spécifiques (SIM) le spectromètre de masse est opéré avec un temps d'interscan de 80 millisecondes par canal d'acquisition suivie d'un temps de repos de 20 millisecondes. Le choix des masses balayées pour ce mode d'acquisition est décrit au Tableau I. Le Tableau II présente les conditions auxquelles le système analytique est opéré.

Tableau I. Choix des ions pour l'analyse des amines
aromatiques en GC-MS en mode de monitoring
d'ions spécifiques.

Composés	Ions choisis	
2-naphthylamine	239	170
4-aminobiphényle	265	168
2-naphthylamine-d7	246	----
4-aminobiphényle-d9	274	----
diphénylamine	265	----

Tableau II. Conditions d'opération du spectromètre de masse et du système chromatographique pour les analyses en milieu biologique.

Paramètres	Conditions d'opération
Courant d'émission :	250 eV
Courant d'électron :	70 eV
Repoussoir :	0 à 1 Volt
Température de l'interface :	240°C
Température de la source :	250°C
Température de l'injecteur :	280°C
Débit du gaz vecteur :	1.9 mL/min
Programmation de température :	50°C/30°Cmin ⁻¹ /100°C, 5min/30°Cmin ⁻¹ /160°C, 4min/30°Cmin ⁻¹ /260°C

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les échantillons sanguins ont été analysés selon les conditions expérimentales décrites dans les sections précédentes. L'ajout d'une étape d'hydrolyse permet de briser le lien covalent amine-hémoglobine et ainsi libérer les amines aromatiques. L'hydrolyse des adduits peut se faire par acidification ou basification du milieu organique et celle-ci doit être douce afin d'éviter le clivage des liens peptidiques.

Les amines étant maintenant libres en solution d'hémoglobine, il est alors possible de les isoler selon le protocole expérimental d'extraction solide-liquide à l'aide de cartouche extractante C18. Les échantillons provenant des travailleurs ont été analysés conjointement avec deux échantillons témoins, accompagnés d'un échantillon fortifié d'une quantité connue des amines aromatiques 2-naphtylamine et 4-aminobiphényle. Les extraits obtenus ont été dérivés par l'anhydride trifluoroacétique puis analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'ajout d'isotopes stables pour deux composés spécifiques, soit le 4-aminobiphényle et la 2-naphtylamine, est intégré à la procédure d'isolement initiale. Les analyses en GC-MS sont effectuées en mode de balayage d'ions spécifiques selon les ions sélectionnés à partir des spectres de masse de chaque composé en impact électronique.

La mise au point de cette méthodologie a permis de mesurer les quantités d'amines aromatiques présentes sous forme libre et adduite à l'hémoglobine chez des individus exposés aux amines aromatiques. L'analyse des échantillons d'hémoglobine des travailleurs a conduit à l'identification et à la quantification des amines aromatiques ciblés. Les résultats sont présentés aux Tableaux III et IV. Les résultats sont rapportés en termes de picogrammes d'amines aromatiques par gramme d'hémoglobine.

Tableau III. Concentration de 2-naphthylamine retrouvée chez les individus exposés et non exposés, exprimée en pg/g Hb.

# Échantillon	Travailleur temps 0	Travailleur après 7 mois	Témoin 1	Témoin 2
001	78.2	20.3	ND (H021)	30.2 (H058)
002	161.3	74.2	30.3 (H048)	15.5 (H049)
003	ND	12.1	71.5 (H007)	ND (H098)
004	66.8	ND	ND (H085)	31.7 (H094)
005	96.9	14.3	ND (H084)	18.4 (H096)
006	ND	7.2	2.6 (H041)	25.8 (H071)
007	ND	14.6	18.7 (H060)	ND (H089)
008	31.4	62.3	32.1 (H068)	ND (H081)
009	153.1	42.1	ND (H014)	27.8 (H027)
010	ND	53.6	34.1 (H018)	75.2 (H045)
011	168.5	2.4	14.4 (H004)	29.4 (H051)
012	41.4	11.3	n/d (H026)	n/d (H056)
013	ND	22.1	n/d (H016)	n/d (H059)
014	61.9	58.3	11.9 (H042)	23.3 (H065)
015	500.1	ND	ND (H031)	71.7 (H069)
016	154.4	39.2	41.5 (H009)	2.6 (H046)
017	248.7	64.8	ND (H034)	4.3 (H075)
018	496.2	33.0	65.1 (H030)	31.7 (H033)
019	273.5	12.7	1.8 (H025)	93.2 (H067)
* 020	110.3	13.9	25.9 (C020)	49.0 (D020)
021	73.4	n/d	57.7 (H012)	10.6 (H020)

() = numéro d'identification des témoins non exposés

ND = aucun pic détecté

n/d = échantillon non disponible

(suite)

(Suite Tableau III)

022	237.5	9.2	12.7	(H078)	40.5	(H090)
023	109.2	23.4	31.0	(C023)	13.4	(D023)
024	73.7	18.0	18.1	(C024)	10.0	(D024)
025	12.6	25.3	34.1	(H019)	87.2	(H054)
026	ND	2.6	8.1	(H013)	64.4	(H015)
027	63.5	58.5	3.4	(H010)	ND	(H052)
028	60.3	24.5	30.1	(C028)	32.4	(D028)
029	ND	24.7	15.6	(H001)	ND	(H077)
030	ND	13.2	21.3	(H053)	23.3	(H074)
031	ND	4.2	30.3	(H057)	52.7	(H097)
032	68.7	ND	9.5	(C032)	10.1	(D032)
033	14.7	23.8	13.2	(H023)	ND	(H100)
034	45.4	10.1	28.7	(H017)	10.6	(H095)
035	54.4	ND	43.7	(H003)	50.8	(H028)
036	123.3	52.4	29.2	(H076)	58.0	(H083)
037	151.4	31.7	25.9	(H087)	22.1	(H092)
038	200.3	29.4	57.7	(H029)	0.5	(H039)
039	98.1	ND	32.0	(H011)	1.4	(H062)
040	22.4	21.7	36.2	(H050)	4.4	(H066)
041	73.7	8.3	31.7	(H005)	27.6	(H008)
042	67.9	12.8	40.2	(H055)	ND	(H088)
043	n/d	35.6	n/d	(H037)	n/d	(H086)
044	n/d	11.6	n/d	(H073)	n/d	(H091)

() = numéro d'identification des témoins non exposés
 ND = aucun pic détecté
 n/d = échantillon non disponible

Tableau IV. Concentration de 4-aminobiphényle retrouvée chez les individus exposés et non exposés, exprimée en pg/g Hb.

# Échantillon	Travailleur temps 0	Travailleur après 7 mois	Témoin 1	Témoin 2
001	42.1	24.5	74.5 (H021)	51.7 (H058)
002	ND	11.3	ND (H048)	56.4 (H049)
003	66.2	53.7	ND (H007)	12.1 (H098)
004	175.9	14.6	49.4 (H085)	91.2 (H094)
005	ND	2.4	73.2 (H084)	62.0 (H096)
006	ND	ND	45.8 (H041)	20.6 (H071)
007	211.6	107.1	73.8 (H060)	ND (H089)
008	151.5	49.6	14.4 (H068)	8.7 (H081)
009	198.9	ND	ND (H014)	42.1 (H027)
010	173.3	ND	8.7 (H018)	ND (H045)
011	241.6	97.5	61.7 (H004)	98.5 (H051)
012	121.6	62.1	n/d (H026)	n/d (H056)
013	63.6	75.7	n/d (H016)	90.6 (H059)
014	ND	21.8	21.3 (H042)	47.4 (H065)
015	159.2	12.3	49.1 (H031)	36.5 (H069)
016	ND	42.2	62.2 (H009)	60.8 (H046)
017	381.0	43.7	ND (H034)	13.4 (H075)
018	484.9	63.4	73.6 (H030)	98.8 (H033)
019	112.7	0.6	28.5 (H025)	27.6 (H067)
020	561.8	16.2	53.7 (C020)	99.8 (D020)
021	131.5	n/d	48.4 (H012)	59.3 (H020)

() = numéro d'identification des témoins non exposés
 ND = aucun pic détecté
 n/d = échantillon non disponible

(suite)

(Suite Tableau IV)

022	117.7	32.6	8.2	(H078)	24.0	(H090)
023	172.3	95.5	61.7	(C023)	48.9	(D023)
024	173.2	133.3	91.3	(C024)	83.9	(D024)
025	96.5	57.6	14.0	(H019)	ND	(H054)
026	981.1	143.1	98.7	(H013)	ND	(H015)
027	57.9	ND	21.4	(H010)	ND	(H052)
028	397.6	140.6	51.4	(C028)	59.3	(D028)
029	53.6	73.4	41.3	(H001)	ND	(H077)
030	ND	ND	60.9	(H053)	88.3	(H074)
031	76.0	69.6	23.4	(H057)	12.7	(H097)
032	184.2	62.2	41.7	(C032)	49.5	(D032)
033	100.1	87.3	121.6	(H023)	70.7	(H100)
034	479.3	139.6	54.1	(H017)	93.1	(H095)
035	352.5	87.2	98.8	(H003)	ND	(H028)
036	160.9	4.7	102.4	(H076)	54.0	(H083)
037	ND	60.3	41.7	(H087)	93.1	(H092)
038	417.8	81.4	81.4	(H029)	57.3	(H039)
039	66,7	69.0	98.1	(H011)	59.3	(H062)
040	172.3	78.4	53.2	(H050)	83.7	(H066)
041	384.0	ND	48.9	(H005)	57.8	(H008)
042	235.7	ND	49.8	(H055)	59.3	(H088)
043	n/d	100.8	n/d	(H037)	n/d	(H086)
044	n/d	54.2	n/d	(H073)	n/d	(H091)

() = numéro d'identification des témoins non exposés
 ND = aucun pic détecté
 n/d = échantillon non disponible

Les résultats des échantillons sanguins prélevés quelques jours après l'exposition (temps 0) démontrent des quantités de 2-naphthylamine et de 4-aminobiphényle nettement supérieures chez la plupart de ces individus, comparativement aux individus non exposés (témoin 1 et 2) et ce, indépendamment de l'amine aromatique étudiée. Un exemple de chromatogramme en GC-MS d'un échantillon sanguin d'un individu exposé aux fumées de l'incendie de pneu est présenté à la Figure 1.

Par ailleurs, 7 mois après l'exposition occupationnelle, la mesure des amines aromatiques ciblées permet de constater que les concentrations des individus exposés atteignent des niveaux similaires aux individus du groupes témoins. En effet, il est possible d'expliquer cette élimination du fait que l'hémoglobine possède le même temps de vie que le globule rouge soit de 120 jours. À la mort du globule rouge, l'amine aromatique est également éliminé.

Chez les individus non exposés, la présence d'amines aromatiques en milieu sanguins peut s'expliquer par d'autres sources de contamination non connues. Cependant, plusieurs hypothèses sont émises quant à la provenance possible de ces composés chez des individus non exposés directement à des sources connues de ces contaminants. Parmi celles-ci, on note une contamination possible au niveau de l'alimentation tel que la viande fumée, connue pour sa libération d'un nombre important d'amines aromatiques hétérocycliques¹ ainsi qu'au niveau du poisson fumé². Également, la présence de 4-aminobiphényle a été noté dans trois colorants utilisés dans l'industrie alimentaire et également au niveau pharmaceutique et cosmétique^{3,4}.

Les travaux de Bryant² ont démontré la présence de plusieurs amines aromatiques dans le sang de fumeurs toutefois présentes en quantités moindre chez des non-fumeurs. Également, des études ont démontré que la fumée de cigarette passive contenait également plusieurs amines aromatiques

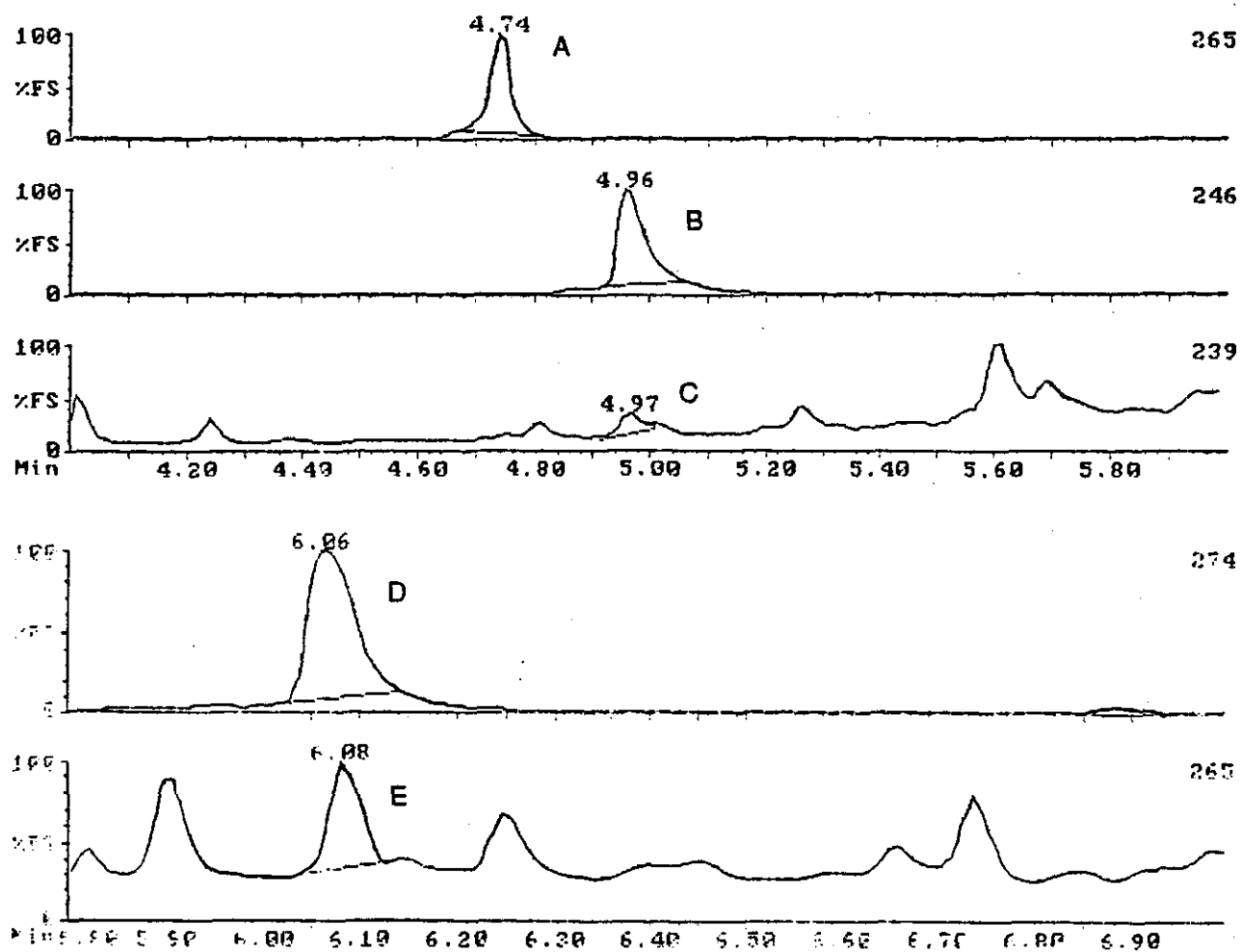


Figure 1. Chromatogramme en GC-MS d'un extrait de solution d'hémoglobine d'un individu exposé aux fumées de l'incendie de pneus de St-Amable.
 A) diphenylamine (m/z 265), B) 2-naphthylamine-D7, C) 2-naphthylamine (m/z 239),
 (m/z 246), D) 4-aminobiphényle-D9 (m/z 274) et E) 4-aminobiphényle (m/z 265).

en concentrations substantielles⁵. Enfin, une dernière possibilité pouvant expliquer la présence d'amines aromatiques chez des individus témoins pourrait être la pollution environnementale^{2,6,7}.

Par ailleurs, les variations observées des valeurs entre les individus peuvent refléter plusieurs facteurs. Ces variations peuvent être causées par des expositions différentes dans la vie de tous les jours, mais également par une différence d'activation métabolique entre les individus, différences au niveau du transport des amines aromatiques vers les érythrocytes et également au niveau de la vitesse de liaison des composés à l'hémoglobine.

Dans chaque cas, on dénote clairement une diminution importante en amines aromatiques 7 mois après l'exposition, pour atteindre des seuils similaires aux individus non exposés.

5. CONCLUSION

L'analyse des adduits à l'hémoglobine en tant qu'outil de surveillance à l'exposition aux amines aromatiques, a été proposée par plusieurs chercheurs^{8,9,10,11}. Les résultats présentés au cours de cette étude démontrent que la relation entre l'exposition et le niveau d'adduits à l'hémoglobine observé pour le 4-aminobiphényle et le 2-naphthylamine chez l'humain peut être facilement mesurable de façon rapide et efficace. De plus l'utilisation de cartouches extractantes permet d'atteindre des pourcentages de récupération totale pour la plupart des amines aromatiques dans laquelle ces composés sont présents initialement.

L'étude comparative entreprise a permis de confirmer la présence de quantités significativement plus élevées d'amines aromatiques chez les individus exposés à ces composés en milieu de travail. L'analyse des données révèle que les quantités de 2-naphthylamine et de 4-aminobiphényle présentes dans le sang des individus est environ deux à dix fois plus importante que chez les individus témoins. En moyenne, les quantités mesurés pour les individus exposés sont de l'ordre de 230 pg/g Hb pour le 4-aminobiphényle, 150 pg/g Hb pour le 2-naphthylamine.

Par ailleurs, plusieurs mois après l'exposition, on observe qu'une portion des amines aromatiques est éliminée et que les niveaux atteignent maintenant des seuils comparables aux quantités observées chez les individus non exposés. Cependant, la présence d'une certaine quantité de 2-naphthylamine et de 4-aminobiphényle suggère qu'il existe d'autres sources d'exposition environnementale, ce qui suppose un niveau minimale détectable pour tous les individus.

Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence que la mise au point d'un programme de surveillance biologique pour les travailleurs potentiellement exposés à des amines aromatiques cancérigènes pourrait éventuellement permettre un dépistage beaucoup plus juste des quantités présentes en milieu de travail mais surtout des quantités absorbées. Les résultats obtenus

démontrent que la méthodologie utilisée permet la détermination des adduits amine-hémoglobine et peut donc être utile pour l'évaluation de l'exposition de la population aux amines aromatiques.

RÉFÉRENCES

1. Sugimura T.A., A view of a cancer researcher on the environmental mutagens. Dans T. Sugimura et al. (eds.). Environmental mutagens and carcinogens. N.Y. Alan R. Liss (1982).
2. Bryant M.S., Skipper P.L., Tannenbaum S.R., MacIure M., Cancer Research, 47 (1987) 602-608.
3. Tse C.S., N. Engl. J. Med., 306 (1982) 681-682.
4. Tartrazine : a yellow hazard, Drug and therapeutics bulletin. 18 (1980) 53-55.
5. Pieraccini G., Luceri F., Moneti G., Rapid communications in mass spectrometry, 6 (1992) 406-409.
6. Wei E.T., Shu H.P., Am.J. Public Health, 73 (1983) 1085-1088.
7. Gibson T.L., Mutat. Res., 122 (1983) 115-121.
8. Neumann G., Arch. Toxicol., 56 (1984) 1-6.
9. Skipper P.L., Tannenbaum S.R., Carcinogenesis, 11:4 (1990) 507-518.
10. Birner G. Albrecht W., Neumann H.G., Arch. Toxicol., 64 (1990) 97-102.
11. Albrecht W., Neumann H.G., Arch. Toxicol. 57 (1985) 1-5.