



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale: - Ressources Procédés Produits Environnement

THESE

Présentée à l'INPL par

Abir CHAHIN

Pour obtenir le grade de:

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Bioindicateurs métaboliques de l'exposition des ruminants laitiers aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Domaines scientifiques : Biochimie, Métabolisme des xénobiotiques, Biologie animale

Le 28 juin 2010 devant la commission d'examen

Jury :

Rapporteurs: A. PARIS, Directeur de Recherches, INRA Paris
C. SIMOES, Directeur de Recherche, DSM

Examineurs: Y. GUIAVARC'H, Maître de conférences, co-directeur de thèse
G. RYCHEN, Professeur, co-directeur de thèse
A. GUCKERT, Professeur, INPL
A. TANKARI, Enseignant chercheur, université de Niamey

Table des matières :

1	CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
1.1	PRESENTATION GENERALE	14
1.1.1	<i>Les pollutions : définition et suivi</i>	<i>14</i>
1.1.2	<i>Pollution chimique et aspects légaux.....</i>	<i>15</i>
1.1.3	<i>Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : origines et réglementation</i>	<i>18</i>
1.1.4	<i>Les 16 HAP prioritaires définis par l'US EPA et leur propriétés physico-chimiques.....</i>	<i>19</i>
1.2	TOXICITE ET METABOLISME DES HAP	23
1.2.1	<i>Toxicité des HAP.....</i>	<i>23</i>
1.2.2	<i>La cytotoxicité directe</i>	<i>23</i>
1.2.3	<i>La cytotoxicité due aux métabolites</i>	<i>23</i>
1.3	METABOLISME DES HAP	24
1.3.1	<i>Les enzymes de phase I.....</i>	<i>26</i>
1.3.2	<i>Les systèmes enzymatiques de phase II.....</i>	<i>29</i>
1.3.3	<i>Métabolisme du Benzo[a]Pyrène</i>	<i>31</i>
1.4	EXPOSITION AUX HAP	32
1.4.1	<i>Exposition humaine aux HAP via l'alimentation.....</i>	<i>32</i>
1.4.2	<i>Exposition humaine aux HAP via l'ingestion de sol.....</i>	<i>34</i>
1.4.3	<i>Importances relatives des différents modes d'exposition chez l'homme.....</i>	<i>35</i>
1.4.4	<i>Transfert des HAP dans la chaîne alimentaire</i>	<i>36</i>
1.4.5	<i>L'exposition chez les animaux d'élevage</i>	<i>38</i>
1.4.6	<i>Exposition par l'ingestion de couvert végétal.....</i>	<i>38</i>
1.4.7	<i>Exposition par ingestion de sol</i>	<i>40</i>
1.4.8	<i>Comparaison avec l'homme.....</i>	<i>41</i>
1.5	CONTAMINATION DES ALIMENTS PAR LES HAP.....	42
1.5.1	<i>Vue générale.....</i>	<i>42</i>
1.5.2	<i>Pourquoi s'intéresser à l'exposition du ruminant laitier aux HAP et aux transferts de HAP vers le lait?.....</i>	<i>47</i>
1.6	EVALUER L'EXPOSITION DU RUMINANT LAITIER AUX HAP ET PLUS GENERALEMENT AUX AUTRES POP TELS QUE LES HAPH	49
1.6.1	<i>Par l'approche analytique globale ou « biological monitoring»</i>	<i>49</i>
1.6.2	<i>Par l'utilisation du concept de biomarqueurs d'exposition.....</i>	<i>50</i>
1.7	LES DIFFERENTES CLASSES DE BIOMARQUEURS.....	51
1.7.1	<i>Etude du tryptique « biomarqueur, animal, concentration en polluant(s) dans le milieu ».....</i>	<i>52</i>
1.7.2	<i>Les biomarqueurs utilisés pour identifier ou quantifier l'exposition aux HAP....</i>	<i>55</i>
1.7.3	<i>Le 1-Hydroxypyrene dans l'urine</i>	<i>55</i>
1.7.4	<i>Métabolisme du pyrène</i>	<i>57</i>
1.8	CONCLUSION.....	60
2	CHAPITRE II: EVALUATION DU 1-OH PYRENE COMME BIOINDICATEUR D'EXPOSITION DU RUMINANT LAITIER À DES DOSES MODÉRÉES À FORTES DE HAP EN MODE SUBCHRONIQUE (7 JOURS)	61
2.1	INTRODUCTION CHAPITRE II.....	62
2.2	ABSTRACT	
2.3	INTRODUCTION	
2.4	MATERIALS AND METHODS	

2.4.1	<i>Animals</i>	
2.4.2	<i>Experimental design</i>	
2.4.3	<i>1-OH pyrene extraction in milk</i>	
2.4.3	<i>1-OH pyrene extraction in urine</i>	
2.4.4	<i>HPLC analysis in milk</i>	
2.4.5	<i>HPLC analysis in urine</i>	
2.4.6	<i>quantification limits</i>	
2.5	RESULTS AND DISCUSSION	
2.5.1	<i>HPLC analysis, calibration curve, extraction yield, and quantification limits.</i>	
2.5.1	<i>1-OH pyrene in milk</i>	
2.5.3	<i>1-OH pyrene in urine</i>	
2.6	LITERATURE CITED	
3	CHAPITRE III: EVALUATION DU 1-OH PYRENE COMME BIOINDICATEUR D'EXPOSITION DU RUMINANT LAITIER A DE FAIBLES DOSES DE HAP EN MODE SUBCHRONIQUE (7 JOURS): RÉCONCILIATION AVEC LES DONNÉES OBTENUES AUX FORTES DOSES	71
3.1	INTRODUCTION CHAPITRE III.....	72
3.2	ABSTRACT	
3.3	INTRODUCTION	
3.4	MATERIALS AND METHODS	
3.4.1	<i>Animals</i>	
3.4.2	<i>Experimental design</i>	
3.4.3	<i>1-OH pyrene extraction in milk</i>	
3.4.4	<i>Metabolites extraction in urine</i>	
3.4.5	<i>HPLC analysis in milk</i>	
3.4.6	<i>HPLC analysis in urine</i>	
3.4.7	<i>quantification limits</i>	
3.5	RESULTS AND DISCUSSION	
3.5.1	<i>HPLC analysis, calibration curve, extraction yield, and quantification limits.</i>	
3.5.2	<i>1-OH pyrene in milk</i>	
3.5.3	<i>1-OH pyrene in urine</i>	
3.5.4	<i>1,2,3,4-OH phenanthrene and 3-OH benzo(a)pyrene in urine</i>	
3.5.5	<i>Literature based approach for an improved use of 1-OH pyrene as a bioindicator of oral exposure of goat to PAHs</i>	
3.6	CONCLUSION	
3.7	REFERENCES	
4	CHAPITRE IV: CINÉTIQUE D'EXCRÉTION DU 1-OH PYRÈNE ET D'INDUCTION DE L'ACTIVITÉ EROD LYMPHOCYTAIRE LORS D'UNE EXPOSITION ORALE SUBCHRONIQUE (40 JOURS) DU RUMINANT LAITIER AUX HAP	86
4.1	INTRODUCTION CHAPITRE IV	87
4.2	ABSTRACT.....	90
4.3	INTRODUCTION.....	91
4.4	MATERIALS AND METHODS	93
4.4.1	<i>Animals.....</i>	93
4.4.2	<i>Experimental design.....</i>	93
4.4.3	<i>Isolation of lymphocytes.....</i>	94
4.4.4	<i>Enzyme activity.....</i>	94
4.4.5	<i>1-OH pyrene extraction in milk.....</i>	95
4.4.6	<i>1-OH pyrene extraction in urine</i>	96

4.4.7	<i>HPLC analysis of 1-OH pyrene in milk</i>	96
4.4.8	<i>HPLC analysis of 1-OH pyrene in urine</i>	97
4.4.9	<i>Curve fitting and statistical analysis</i>	98
4.5	RESULTS AND DISCUSSION	98
4.5.1	<i>Quantification limits, detection limits, extraction yields and accuracy</i>	98
4.5.2	<i>Induction kinetic of EROD activity in goat peripheral blood lymphocytes</i>	99
4.5.3	<i>1-OH pyrene excretion in milk</i>	102
4.5.4	<i>1-OH pyrene excretion in urine</i>	103
4.6	CONCLUSION	103
4.7	REFERENCES	105
5	CHAPITRE V : CINETIQUE D'INDUCTION DE L'ACTIVITE EROD DANS LES LYMPHOCYTES DE SANG PERIPHERIQUE, LE FOIE ET LE CERVEAU DE RATS SOUMIS A UNE EXPOSITION ORALE SUBCHRONIQUE (28 JOURS) AUX HAP	115
5.1	INTRODUCTION CHAPITRE V	116
5.2	ABSTRACT	119
5.3	INTRODUCTION	120
5.4	MATERIALS AND METHODS	122
5.4.1	<i>Animals</i>	122
5.4.2	<i>Experimental design</i>	123
5.4.3	<i>Isolation of lymphocytes</i>	123
5.4.4	<i>Preparation of liver and brain microsomes</i>	124
5.4.5	<i>EROD activity</i>	124
5.4.6	<i>Statistical analysis</i>	125
5.5	RESULTS	125
5.5.1	<i>EROD activity in lymphocytes and liver of control rats</i>	125
5.5.2	<i>EROD activity in lymphocytes, liver and brain of rats exposed to PAH contaminated oil</i>	125
5.5.3	<i>Fitting of EROD activity induction kinetics in lymphocytes, liver and brain</i>	126
5.5.4	<i>Fitting of maximum EROD activities versus daily ingested PAHs doses</i>	127
5.5.5	<i>Correlation between EROD, CYP1A1 and CYP1B1 activity induction</i>	128
5.6	DISCUSSION	129
5.7	REFERENCES	132
6	DISCUSSION GÉNÉRALE	145
6.1	BIOINDICATION D'EXPOSITION ASPECIFIQUE CHEZ LA CHEVRE COMME MODELE DE RUMINANT LAITIER	149
6.1.1	<i>De quoi parle t'on ?</i>	149
6.1.2	<i>Originalité de notre approche</i>	149
6.1.3	<i>Analyse de 6 points clés en vue d'un usage de l'activité EROD lymphocytaire comme biomarqueur d'exposition orale aux HAP chez le ruminant laitier</i>	150
6.1.4	<i>L'activité EROD lymphocytaire peut-elle être utilisée comme biomarqueur d'exposition orale contrôlée aux HAP chez le ruminant laitier ?</i>	152
6.2	ETUDE MULTICOMPARTIMENTALE DE L'INDUCTION EROD CHEZ LE RAT EXPOSE ORALEMENT ET EN MODE SUBCHRONIQUE AUX HAP	153
6.2.1	<i>Bref rappel sur l'étude</i>	153
6.2.2	<i>Une induction EROD significative et modélisable dans les 3 compartiments : lymphocytes, foie, cerveau</i>	153
6.2.3	<i>Des relations « dose/réponse » riches d'enseignements</i>	154

6.2.4	<i>Une corrélation forte des activités EROD entre compartiments tout au long de l'expérience</i>	156
6.2.5	<i>Une distinction possible entre activités CYP1A1 et CYP1B1 cérébrales</i>	156
6.2.6	<i>Ce qu'il nous semble important de retenir concernant l'usage de l'activité EROD comme biomarqueur d'exposition aspécifique aux HAP et plus généralement aux POP ...</i>	157
6.3	BIOINDICATION D'EXPOSITION ORALE SPECIFIQUE CHEZ LA CHEVRE COMME MODELE DE RUMINANT LAITIER	158
6.4	TROIS EXPERIMENTATIONS ANIMALES DISTINCTES	159
6.5	LES PRINCIPAUX CONSTATS	160
6.5.1	<i>. Obtention de courbes dose-réponse linéaires (expérimentations 1 et 2)</i>	160
6.5.2	<i>Obtention de taux de transferts stables</i>	161
6.5.3	<i>Implications métaboliques et réconciliation avec nos résultats de mesure d'activité EROD chez la chèvre et chez le rat</i>	161
6.5.4	<i>Obtention d'un plateau d'excrétion de 1-OH pyrene vers l'urine et le lait</i>	163
6.5.5	<i>Biodisponibilité des HAP</i>	163
6.5.6	<i>Dans quelle mesure peut-on évaluer l'ingéré de HAP autres que le pyrène à partir de l'ingéré évalué en pyrène ?</i>	164
7	CONCLUSION GÉNÉRALE	166
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173

Liste des abréviations

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

ADN : Acide Desoxyribo Nucléique

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

B[a]P : Benzo[a]Pyrene

CEE : Communauté Economique Européenne

CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique

CYP : Cytochrome P450

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression de Fraudes

EROD : Ethoxyrésorufine -O- Deethylase

FAD : PolyChloroDibenzo-para-Dioxines

FMN : Flavine MonoNucléotide

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

VOC : Composés Organiques Volatils

HHP : Hydrocarbure Halogéné Polycyclique

IARC : Agence Internationale de Recherche contre le Cancer

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité.

INSERM : Institut National de la Santé et de la recherche Médicale

Kow : Coefficient de partage Octanol/Eau

NAS/NRC : National Academy of Sciences/National Research Council.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCB : PolyChloroBiphéniles

PCDD : PolyChloroDibenzo-para-Dioxines

PCDF : PolyChloroDibenzoFuranes

PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement

POP : Pollutions Organiques Persistants

TEF : Facteurs d'Equivalence Toxique

UNECE^o: Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe

USEPA : Agence de la Protection environnementale Américaine

VTR : Valeurs Toxicologiques de Références.

Bioindicateurs métaboliques de l'exposition des ruminants laitiers aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

Résumé :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants organiques persistants (POP) issus d'une combustion incomplète de matière organique, d'origine naturelle (incendies de forêt) et anthropique (chauffage au gaz, trafic routier, industrie...). La consommation par les animaux d'élevage de couverts végétaux et sols contaminés en HAP, couplée à une forte lipophilie de ces derniers, constitue un risque potentiel en terme de contamination des produits animaux (lait, viande, œufs...). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'exposition du ruminant laitier aux HAP au travers de l'utilisation de biomarqueurs métaboliques d'exposition orale aux HAP. Nous avons tout d'abord testé l'aptitude du 1-hydroxypyrene dans l'urine et/ou le lait à être utilisé comme biomarqueur métabolique spécifique d'exposition orale et subchronique (7 jours, 40 jours) de la chèvre au mélange : phénanthrene, pyrène, benzo(a)pyrene. Ceci en utilisant de l'huile comme vecteur de contamination sur la plage 0.04-50 mg/jour de chacun des 3 HAP. Les résultats démontrent entre autres que (i) le 1-hydroxypyrene est excrété de manière proportionnelle au niveau d'exposition sur toute la plage d'exposition testée dans le lait (taux de transfert stable de l'ordre de 1% dans le lait et 10% dans l'urine) ; (ii) qu'un plateau d'excrétion est obtenu au plus tard 10 jours après le début de l'exposition. La seconde partie de ce travail a permis de démontrer le potentiel de l'activité ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) dans les lymphocytes périphériques sanguins (LPS) à être utilisé comme un biomarqueur d'exposition orale aspécifique du ruminant laitier aux POP CYP450 inducteurs, dont certains HAP. Des cinétiques d'induction EROD lymphocytaire par exposition orale aux HAP ont ainsi pu être modélisées par un modèle de type logistique sur 40 jours d'exposition suivis de 10 jours post-exposition. Une ébauche de courbe dose-réponse de type Michaelis-Menten a par ailleurs pu être déterminée, autorisant plusieurs commentaires relatifs au métabolisme des HAP par le ruminant laitier. Une dernière étude cinétique, menée chez le rat en mode subchronique sur 32 jours, a finalement permis, entre autres, de mettre en évidence une bonne corrélation entre les activités EROD dans les lymphocytes sanguins périphériques, le foie et le tissu cérébral. L'ensemble des résultats obtenus démontre la pertinence de l'usage combiné de l'activité EROD lymphocytaire et du 1-OH pyrène dans le lait ou l'urine comme outils d'évaluation pratiques et accessibles du risque lié à l'ingestion de POP par les ruminants laitiers.

Mots clés : biomarqueur d'exposition, 1-hydroxypyrene, EROD, ruminant laitier, évaluation du risque

Bioindicators metabolic for exposition to ruminants of polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)

Abstract:

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are persistent organic pollutants (POP) produced during the incomplete burning of organic materials. Their production can be of natural origin (forest fire) or anthropic origin (gas heating, vehicular traffic, industry). The ingestion of PAH contaminated vegetal covers or soils by farm animals, coupled with the high lipophily of these PAH, therefore represents a potential hazard in terms of contamination of animal products (milk, meat, eggs...). In the present work, we focused on the evaluation of the dairy ruminant exposure to PAH through the use of metabolic biomarkers of exposure. At first we tested the potential of 1-hydroxypyrene excreted in urine or milk to be used as a metabolic and specific biomarker of subchronic (7 to 40 days) and oral exposure of the goat to a ternary mixture consisting of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene. Each PAH was solubilized in oil to reach contamination levels in the range 0.04-50 mg/day. Results demonstrate that (i) 1-hydroxypyrene excretion in milk and urine is proportional to the level of exposure all along the tested exposure range (stable transfer rates of 1-OH pyrene: about 1% in milk and 10 % in urine); (ii) excretion of 1-OH pyrene reached a plateau at the latest 10 days after the beginning of exposure. In the second part of this work, it was demonstrated that the ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity, when measured in peripheral blood lymphocytes (PBL), can be used as a convenient and non-specific biomarker of oral and chronic exposure of dairy ruminant to CYP 450 inducing POP, such as many PAH. Induction kinetic of EROD activity PBL could be fitted with a logistic-like model over 40 days of exposure followed by 10 days post-exposure. An approximate dose/response curve could be fitted using a Michaelis-Menten-like model, allowing for several comments about the metabolism of PAH in dairy ruminant. A final kinetic study, which was run on rats under subchronic conditions (32 days), next to other results, showed a good correlation between EROD activities in PBL, liver and brain. Achieved results demonstrate the relevance of the combined use of the EROD activity in PBL and of the 1-OH pyrene in milk or urine as convenient and cost-limited tools for risk assessment in terms of PAH and more generally POP ingestion by dairy ruminants.

Key words : *biomarker of exposition, 1-hydroxypyrene, EROD, Dairy ruminant,risque assessment.*

Chapitre I :
Etude bibliographique

Introduction générale

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), résultant d'une combustion incomplète de matière organique, constituent une part importante des polluants organiques persistants (POP) émis dans l'environnement. Les POP sont définis par le protocole d'Aarhus depuis 1998, sous l'égide de la Commission Economique des Nations Unies pour (CEE-NU), à partir des cinq caractéristiques suivantes : (i) ils présentent des caractéristiques toxiques; (ii) ils sont persistants; (iii) ils sont susceptibles de bioaccumulation; (iv) ils peuvent aisément être transportés dans l'atmosphère bien au-delà de leur lieu d'émission; (v) ils sont potentiellement nocifs pour la santé et l'environnement.

Les ruminants laitiers sont directement exposés aux HAP déposés sous forme particulaires sur les matrices environnementales telles que l'herbe pâturée et le sol ingéré involontairement. En zone rurale, nous le verrons, les ruminants laitiers peuvent ingérer des quantités relativement importantes de HAP via le fourrage et le sol. Ces quantités peuvent être nettement plus importantes lorsque les pâturages sont localisés à proximité directe de zones à forte activité anthropique, fixe (usines, villes) ou mobile (trafic automobile ou aérien).

L'étude du transfert de HAP, sous leur forme native ou métabolisée, vers les produits animaux et en particulier le lait, a fait l'objet de nombreux efforts fournis durant les sept dernières années au sein de l'équipe MRCA (Micropolluants et Résidus dans la Chaîne Alimentaire) de l'UR AFPA. Ceci principalement au travers d'études en mode d'exposition aiguë (Grova et al., 2005 ; Lapole et al. 2007) et dans une moindre mesure au travers d'études en mode d'exposition subchronique (Lutz et al., 2006).

Ces études ont permis d'initier une prise de conscience sur l'importance de ne pas focaliser uniquement les analyses sur les molécules natives de HAP, mais aussi sur leurs formes métabolisées, nettement majoritaires dans le lait par rapport à leur molécule mère, et potentiellement plus nocives.

Pour le toxicologiste environnemental et/ou alimentaire, une question d'importance est d'évaluer de manière aussi complète et précise que possible le niveau d'exposition de l'animal aux HAP ainsi que les transferts de HAP sous formes natives ou métabolisées vers les différents compartiments corporels.

La Figure 1 présente un essai de schématisation d'une approche analytique systématique et idéalisée, spécifique à chaque molécule native et à tous ses métabolites dans tous les compartiments corporels, pour l'évaluation du risque lié à l'ingestion de POP tels que

les HAP par l'animal. Les termes surlignés en bleu seront traités dans le présent travail de thèse qui privilégiera la voie orale d'exposition, dont il sera démontré en partie bibliographique, qu'elle constitue plus de 90% de l'exposition aux HAP.

Comme présenté dans les boxes 1, 2 et 3 de la Figure 1 on voit que de nombreux obstacles peuvent compliquer voire empêcher l'évaluation du risque lié à l'ingestion de POP. Ceci en termes de santé animale, de contamination des produits animaux mais aussi de contamination et santé de l'Homme consommant ces produits animaux en bout de chaîne alimentaire. La figure 2 liste ces obstacles et présente une approche alternative d'évaluation, basée sur l'utilisation de biomarqueurs métaboliques d'exposition aux POP, spécifiques ou non, et qui feront l'objet des différents volets expérimentaux de cette thèse.

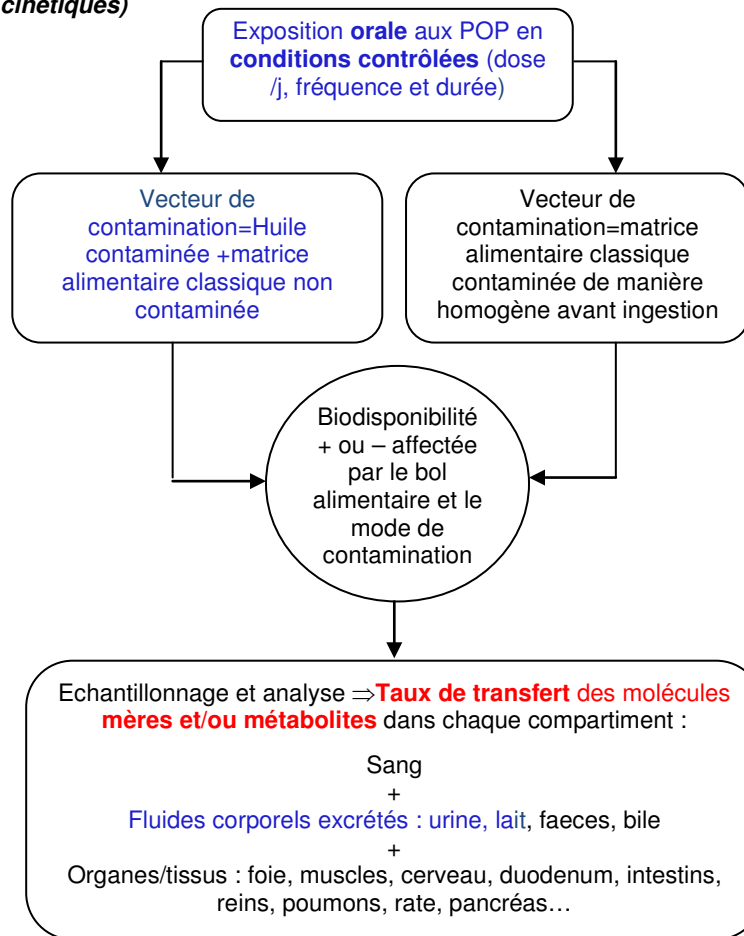
La présente thèse a pour objectif d'étudier la possibilité d'évaluer l'exposition du ruminant laitier aux HAP au travers d'une approche basée sur l'utilisation de biomarqueurs métaboliques d'exposition aux HAP. Comme le décrit l'organigramme structurel du présent manuscrit (Figure 3), nous ferons appel à deux types de biomarqueurs métaboliques différents :

- ↳ Un biomarqueur métabolique spécifique d'exposition aux HAP : le 1-OH pyrene.
- ↳ un biomarqueur métabolique aspécifique d'exposition aux HAP : l'activité Ethoxyresorufin-o-dééthylase (EROD).

L'approche expérimentale résumée en Figure 3 se composera de plusieurs études portant sur :

- l'excrétion de métabolites de HAP du lait et de l'urine et leur pertinence en tant que bioindicateurs de l'exposition des ruminants laitiers aux HAP.
- la pertinence de la mesure de l'activité EROD lymphocytaire et son utilisation comme biomarqueur aspécifique d'exposition aux HAP en mode d'exposition contrôlé, et à d'autres POP en mode d'exposition non contrôlé. Cette approche fera également l'objet d'un suivi cinétique de l'activité EROD dans le foie, le cerveau et les lymphocytes de rats soumis à des HAP, afin d'évaluer dans quelle mesure les activités observées au niveau lymphocytaire peuvent être corrélées aux activités cérébrales et surtout hépatiques.

Ces travaux ont tous été formalisés sous forme de publications scientifiques (publiées ou soumises) et sont rapportés en l'état dans cette thèse. Chacune d'entre elles est introduite de manière spécifique. Le lecteur retrouvera ainsi sans difficulté le fil conducteur et la démarche scientifique mise en œuvre.

Box 1 : Définition expérimentale des taux de transfert (aspects cinétiques)**Box 3 : Définition de Valeurs Toxicologiques de Référence**

Connaissances sur la toxicité in-vivo ou in-vitro de chaque POP natif ou métabolisé

NB : connaissances souvent limitées:

- essais in-vivo de plus en plus limités, pertinence des modèles vivants testés et interrogations sur leur transposition à d'autres modèles vivants (espèce, race, état physiologique, aspects stat.),
- essais in-vitro grandement dépendants de la lignée cellulaire testée.
- interactions possibles avec d'autres contaminants tels que les ETM...
- impact du mode d'exposition : aiguë ou répétée (subchronique ou chronique)
- études de la toxicité des métabolites trop rares (manque de métabolites accessibles commercialement)

Suggestion de valeurs repères à l'échelle communautaire ou mondiale :

Les VTR sont elles toujours fiables ?

pas de TEF pour les métabolites

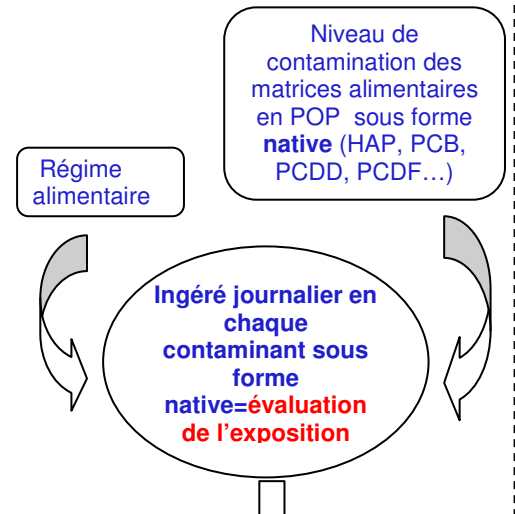
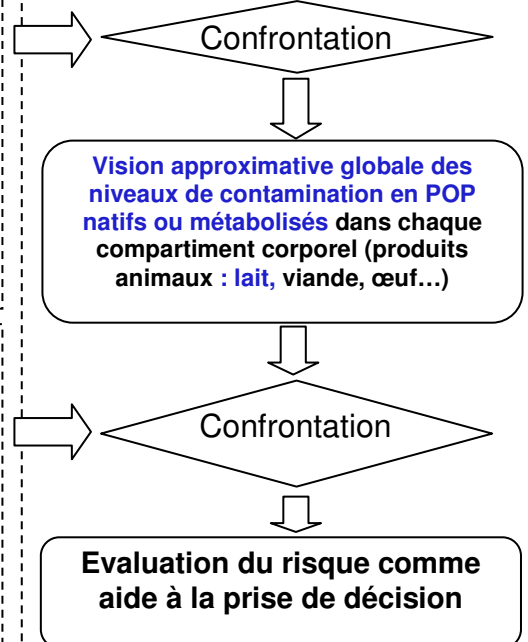
Box 2 : Evaluation de l'ingéré en POP**Box 4 : Evaluation du risque et prise de décision**

Figure 1. Essai de schématisation d'une approche analytique systématique et idéalisée, **spécifique à chaque molécule native et à tous ses métabolites dans tous les compartiments corporels**, pour l'évaluation du risque lié à l'ingestion de POP par l'animal. Les aspects notés en bleu seront traités dans le présent travail de thèse. Dans ce schéma, seule la voie d'exposition orale, largement prédominante, sera abordée.

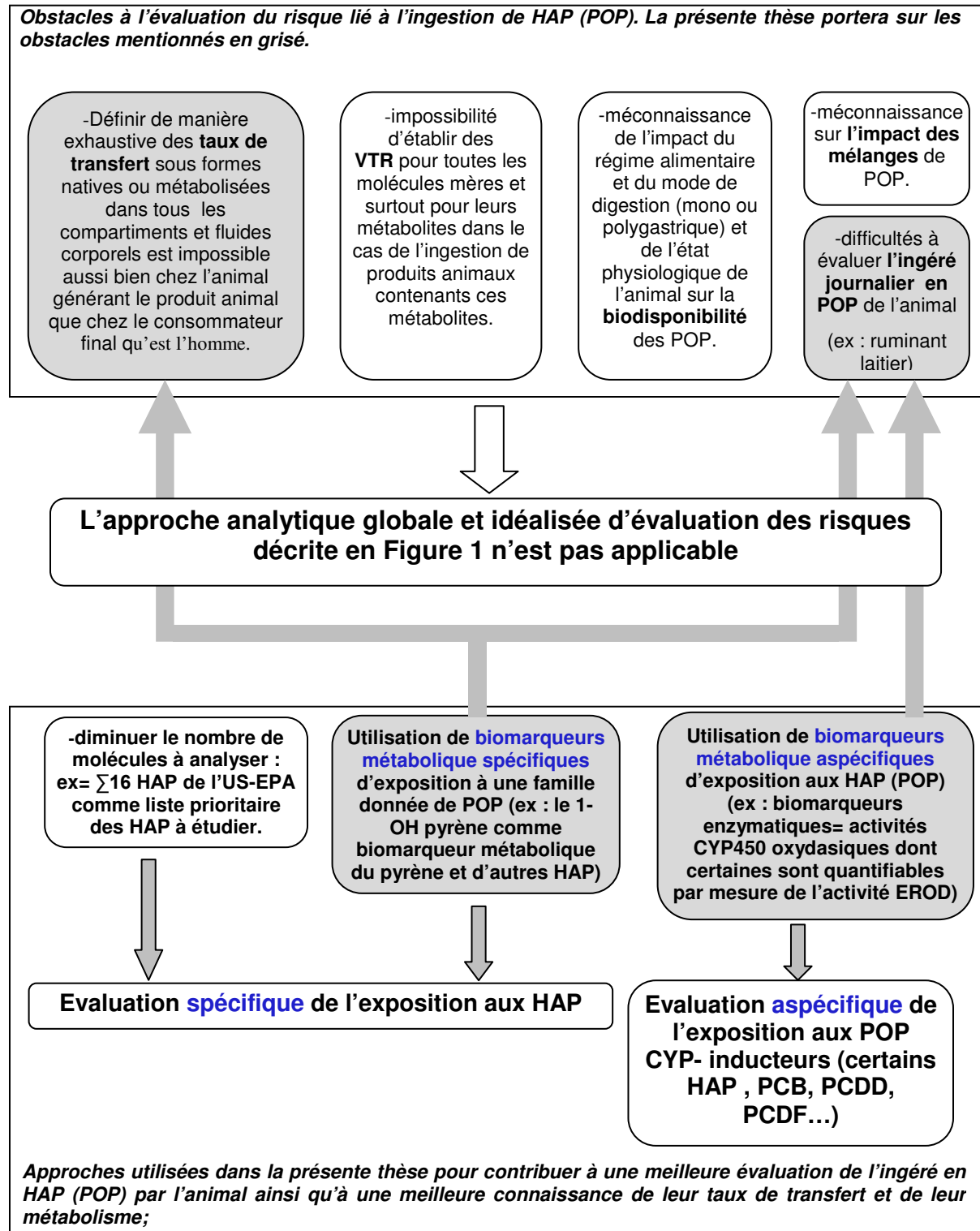


Figure 2. Obstacles à l'évaluation des risques par l'approche analytique globale et approche utilisées dans la présente thèse pour contribuer à une meilleure évaluation de l'ingéré en HAP (POP) par l'animal ainsi qu'à une meilleure connaissance de leur taux de transfert et de leur métabolisme.

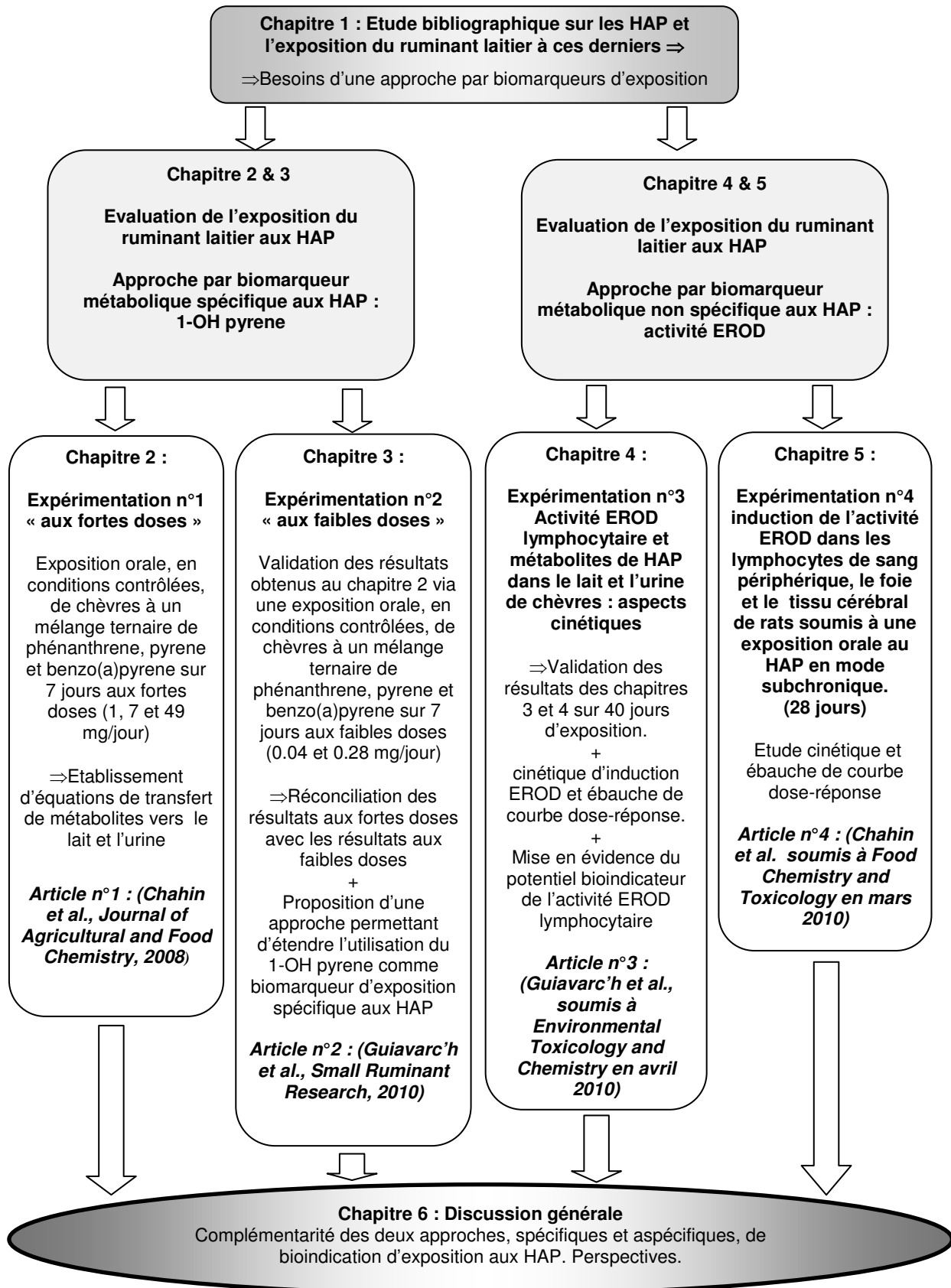


Figure 3. Organigramme structurel de la thèse formalisée sous forme de publications scientifiques rapportées en l'état dans ce manuscrit. Chaque publication, publiée ou en cours de revue, est introduite de manière spécifique. Le lecteur retrouvera ainsi sans difficulté le fil conducteur et la démarche scientifique mise en œuvre.

1.1 Présentation générale

1.1.1 Les pollutions : définition et suivi

Toute substance se trouvant en trop grande quantité, au mauvais endroit et au mauvais moment, peut-être considérée comme un polluant (Nilsson et Pitt, 1994; Pickering et Owen, 1994). Cette définition très limpide du terme « polluant » ne doit cependant pas masquer les difficultés inhérentes à la définition des « quantités critiques » des substances concernées dans l'environnement, que cela soit par des approches « in-vivo », « in-vitro » voire « in-silico ». Plus précisément, la pollution atmosphérique peut être définie comme « la présence de substances dans l'atmosphère, résultant des activités synthétiques ou des processus naturels, entraînant des effets nuisibles pour l'homme et pour l'environnement ». La pollution atmosphérique est un terme employé pour décrire tous les produits chimiques non désirés ou d'autres matériaux qui contaminent et dégradent la qualité de l'air que nous respirons.

Les polluants atmosphériques sont présents en dehors ou à l'intérieur des logements, et peuvent être naturels ou synthétiques. La pollution atmosphérique extérieure, parfois appelée pollution atmosphérique ambiante, est présente dans des zones urbaines et rurales. Cependant, des différences qualitatives et quantitatives significatives peuvent exister entre pollution ambiante rurale et pollution ambiante urbaine. Les polluants atmosphériques urbains typiques venant des activités de l'homme incluent les oxydes d'azote, le monoxyde de carbone, le dioxyde de soufre, les hydrocarbures et les particules en suspension. Tous ces polluants sont dits « polluants primaires » parce qu'ils sont émis directement dans l'atmosphère. Les sources communes de ces polluants primaires incluent les centrales électriques, l'industrie (dioxyde de soufre, PCB, dioxines), le chauffage domestique et les transports routiers (monoxyde de carbone, hydrocarbures aromatiques polycyclique, particules en suspension et oxyde d'azote).

Les polluants atmosphériques communs dans les logements incluent le monoxyde de carbone et le dioxyde d'azote provenant des radiateurs et des cuisinières à gaz défectueux, le monoxyde de carbone et le benzène provenant de la fumée de cigarette, et les composés organiques volatils (VOCs) provenant d'ameublement, de planchers en vinyle et de peintures synthétiques (Busquin, 2003).

Ces dernières années, une veille permanente des émissions polluantes s'est progressivement mise en place à l'échelle régionale, nationale, communautaire et mondiale,

au travers de la création de structures capables de générer des résultats analytiques et/ou de les compiler. Quelques exemples intéressants sont :

A l'échelle régionale : ATMO-Rhône-alpes (l'observatoire de l'air en Rhône-Alpes) ou AirPARIF (l'observatoire de la qualité de l'air en Région parisienne).

A l'échelle nationale : En France, le CITEPA (Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution de l'Air), l'INERIS (L'Institut National de L'Environnement Industriel et des Risques), l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité), l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), l'ADEME (Agence pour le Développement et la Maîtrise de l'Énergie). Aux Etats-Unis, l'US-EPA (United States Environmental Protection Agency), l'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry).

A l'échelle européenne : l'AEE (Agence Européenne pour l'Environnement), l'EFSA (European Food Safety Authority).

A l'échelle mondiale : l'OMS (Observatoire Mondial de la Santé), l'IARC (International Agency for Research on Cancer).

1.1.2 Pollution chimique et aspects légaux

La pollution chimique est engendrée par des rejets de produits chimiques d'origine industrielle, domestique et naturelle. Ces polluants chimiques peuvent être classés en deux catégories qui sont les micropolluants chimiques inorganiques (métaux lourds tels que le cadmium, le plomb, le mercure, l'arsenic...) et les micropolluants chimiques organiques (hydrocarbures, pesticides, détergents...). Ces derniers ont bénéficié (ou bénéficient encore) d'un véritable boom économique et industriel (chimie, agrochimie, cosmétique, textile, pharmacie, électro-ménager...). C'est dans cette catégorie de molécules qu'il faut distinguer les Polluants Organiques Persistants (POP). Ces molécules sont définies par le protocole d'Aarhus (tableau 1) depuis 1998 (Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe, UNECE) à partir de 5 caractéristiques.

Les POP sont des substances organiques qui :

- Présentent des caractéristiques toxiques ;
- Sont persistantes ;

- Sont susceptibles de bioaccumulation ;
- Peuvent aisément être transportées dans l'atmosphère au-delà des frontières sur de longues distances et se déposer loin du lieu d'émission ;
- Risquent d'avoir des effets nocifs importants sur la santé et l'environnement aussi bien à proximité qu'à une grande distance de leur source. Il est avéré que l'exposition chronique à ces polluants entraîne de nombreux risques sanitaires connus tels que des malformations, des cancers, des déficiences immunitaires, des perturbations endocriniennes induisant des problèmes de fertilité (Garban et al., 2002).

La Figure 4 représente la distribution sectorielle des émissions de polluants organiques ou non en France métropolitaine en 2007 (source CITEPA).

Parmi les très nombreuses familles de molécules répondant aux critères ci-dessus, et devant l'importance de l'enjeu de santé mondiale lié à ces molécules, des choix ont été effectués par les instances internationales accréditées. Le protocole d'Arrhus entré en vigueur en France en 2003 ainsi que la convention de Stockholm signée en mai 2001 dans le cadre du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) ont permis de déterminer les molécules prioritaires en terme d'étude de transferts environnementaux comme listé dans le tableau 1 (Rychen et al., 2005).

Tableau 1. Liste des POP établie dans le cadre du protocole d'Aarhus et de la convention de Stockholm (Rychen et al., 2005)

Produits de synthèse	
Pesticides	Produits industriels
Hexachlorobenzène Mirex Toxaphène DDT Lindane (HCH) Aldrine Chlordane Dieldrine Heptachlor Endrine	Hexabromobiphényl PCB (PolyChloroBiphényles)
Sous-produits involontaires des processus industriels et de combustion	
HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) PCDD (PolyChloroDibenzo-para-Dioxines) PCDF (PolyChloroDibenzoFuranes)	

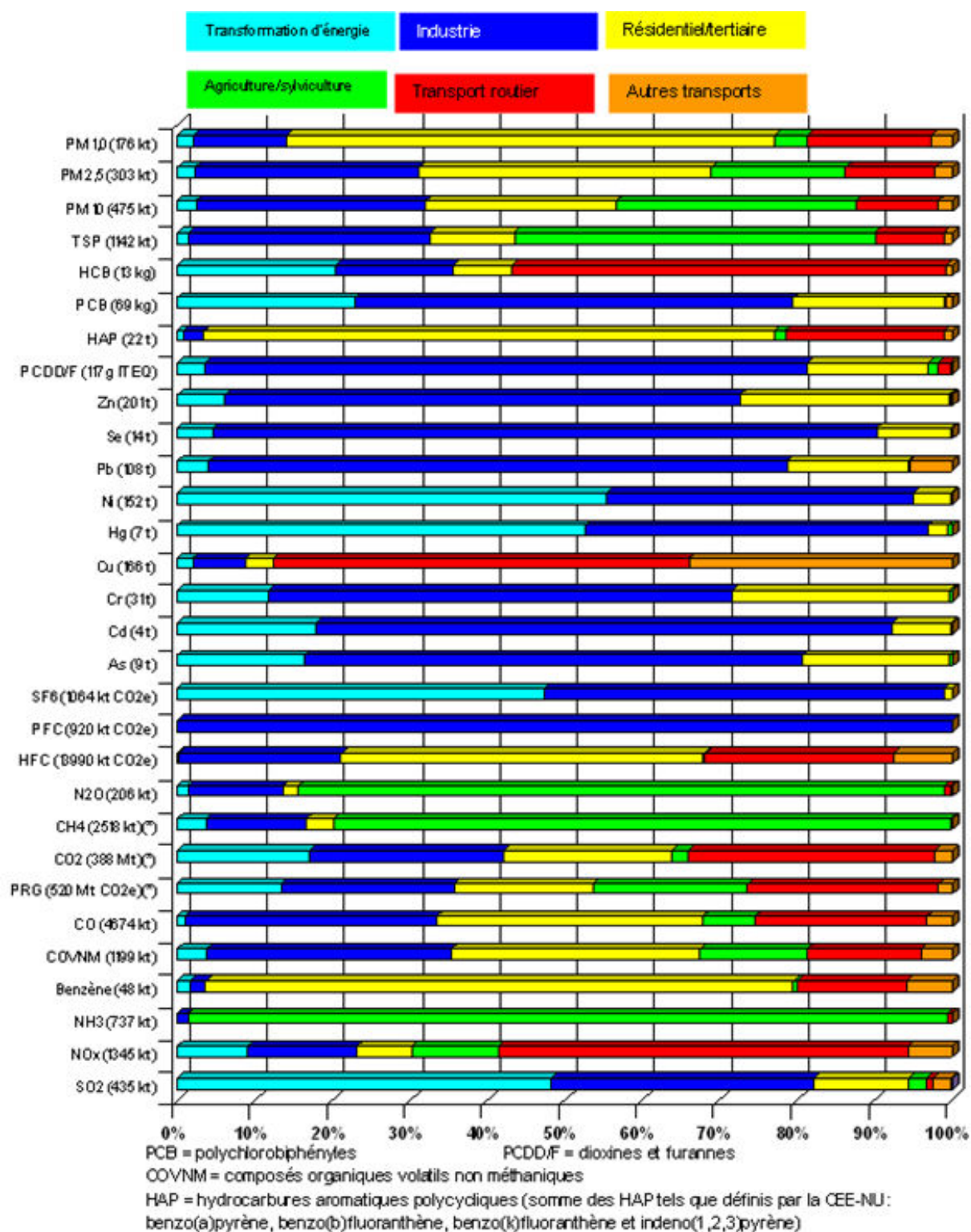


Figure 4 : Distribution sectorielle des émissions de polluants en France métropolitaine en 2007 (source CITEPA).

1.1.3 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : origines et réglementation

La Figure 5 représente la distribution sectorielle des émissions atmosphériques de 4 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) particulièrement toxiques en France jusqu'en 2008 (source CITEPA, 2008). Ces HAP sont le benzo(a)pyrene, le benzo(b) et le benzo(k)fluoranthène ainsi que l'indeno(1,2,3-cd)pyrène.

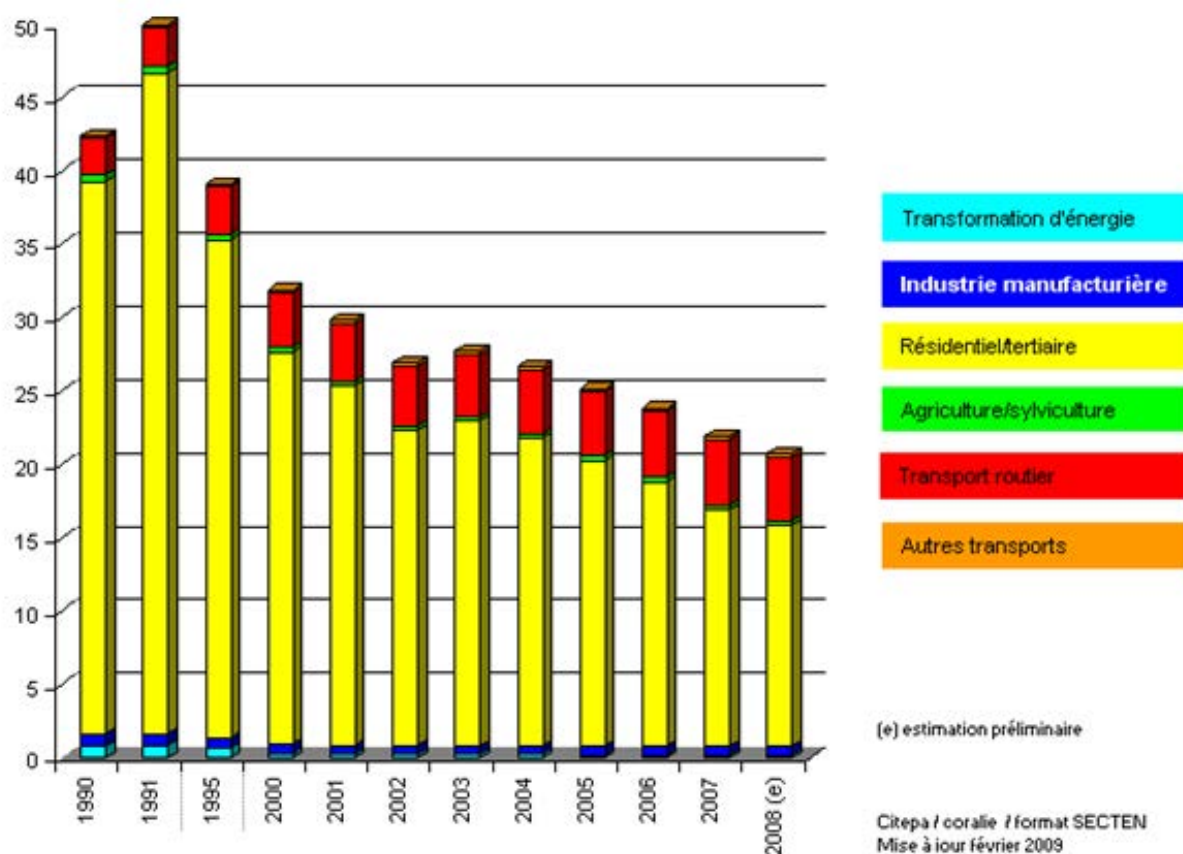


Figure 5. Distribution sectorielle des émissions atmosphériques de HAP en France jusqu'en 2008 (source CITEPA, 2009).

On peut voir ici que la production de ces 4 HAP, bien que dépassant encore les 20 tonnes par an en France métropolitaine, a diminué de moitié, de manière progressive, depuis 1991. Cette baisse est le fruit d'une amélioration des rendements des process de production d'énergie thermique ou mécanique à l'échelle industrielle et domestique. Le remplacement progressif des chauffe-eau conventionnels par des chauffe-eau à condensation en est un bel exemple. Dans l'absolu, et contrairement aux idées reçues, l'industrie manufacturière et énergétique émet beaucoup moins de HAP que le secteur résidentiel/tertiaire. Ce dernier totalise en effet environ 75% du total des émissions. Ceci est principalement dû au fait que les process industriels de production utilisés sont pour la majorité confinés. Le secteur des transports est

le seul dans lequel aucune baisse des émissions n'est observée. En 2007, les 5 premiers sous-secteurs de pollutions étaient :

- 1 - Résidentiel, 73 %
- 2 - Voitures particulières diesel catalysées, 9.0%
- 3 - Véhicules utilitaires diesel catalysés, 3.9 %
- 4 - Voitures particulières diesel non catalysées, 2.5 %
- 5 - Poids lourds diesel, 2.3 %

La Commission Européenne, en décembre 2006, a établi le règlement (CE) n° 1881/2006 fixant les teneurs maximales en certains POP dans les denrées alimentaires. Concernant les HAP, seul le benzo(a)pyrène, un HAP à 5 cycles particulièrement toxique, a pu être considéré pour l'établissement de teneurs maximales en HAP dans les denrées alimentaires, les données concernant les autres HAP étant jugées insuffisantes (EFSA, 2008), (Tableau 2).

1.1.4 Les 16 HAP prioritaires définis par l'US EPA et leur propriétés physico-chimiques

Seize molécules prioritaires appartenant à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été identifiées par l'US EPA sur la base de leurs propriétés et de leur toxicité au sens large (effets systémiques + effets cancérigènes). Ces molécules sont présentées en Figure 6. Ce nombre peut sembler insignifiant au regard du millier de molécules de HAP susceptibles d'être rencontrées par l'homme (ASTDR, 1997). Mais ces choix restrictifs sont nécessaires à la cohérence des actions de recherches menées dans le monde pour faire face à la problématique « pollution-santé » à l'échelle mondiale. Les différences entre les 16 HAP prioritaires proviennent du nombre de cycles (2 à 6) ainsi que de leur arrangement spatial (Sims et Overcash, 1983). La nature biochimique de ces micropolluants influe beaucoup sur leur comportement dans l'environnement et la chaîne alimentaire (volatilité, lipophilicité, biodisponibilité, aptitude à être métabolisés après absorption...). De nombreuses études ont montré l'aptitude des HAP les plus lipophiles à se concentrer au niveau des tissus gras, ce qui favorise leur insertion dans la chaîne trophique avec des phénomènes de bioaccumulation et de biomagnification. (Adamo et al., 1997).

Tableau 2. Teneurs maximales en benzo(a)pyrene dans diverses denrées alimentaires (EC regulation n° 1881, 2006).

Denrées alimentaires	Teneurs maximales µg/kg de poids à l'état (frais)
Huiles et graisses (à l'exclusion du beurre de cacao) destinées à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2,0
Viandes fumées et produits de viandes fumées	5,0
Chair de poissons fumés et produits de la pêche fumés, à l'exclusion des mollusques bivalves.	5,0
Chair de poissons	2,0
Crustacés et céphalopodes non fumés,	5,0
Mollusques bivalves	10,0
Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	1,0
Préparations pour nourrissons, y compris le lait pour nourrissons	1,0
Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons	1,0

Leurs propriétés physiques varient selon leur masse et leur structure. Celles-ci dépendent en effet du nombre d'atomes de carbone centraux et de la topologie des systèmes (enchaînement des atomes). Les HAP angulaires (fluoranthène) sont ainsi plus stables que ceux présentant un arrangement linéaire (anthracène). D'une façon générale, lorsque le poids moléculaire des HAP augmente, leur solubilité dans l'eau et leur volatilité diminuent. Inversement, la solubilité dans les corps gras ainsi que les points de fusion et d'ébullition augmentent avec le poids des molécules (Palayer, 1997).

Ainsi, en raison de leur très faible solubilité dans l'eau, les HAP sont solubles dans les lipides et ils ont tendance à s'associer aux fines particules en suspension (0,3 à 3 µm) qui peuvent avoir un temps de séjour très long dans l'atmosphère (ATSDR, 1990).

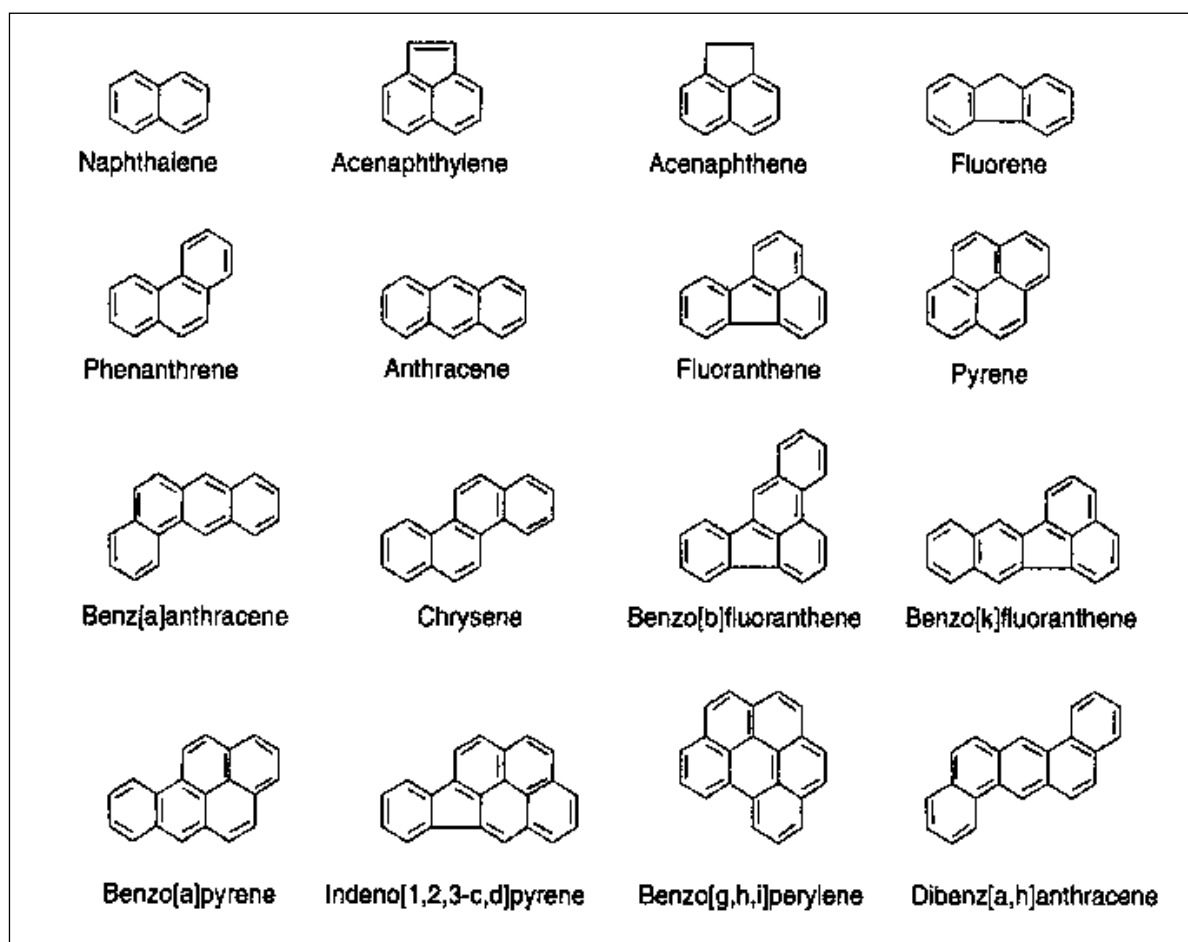


Figure 6. Structure chimique de 16 HAP jugés à risques par l'U.S.E.P.A. (Amir et al., 2005).

Les HAP se subdivisent en deux groupes:

- Les HAP légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g/mol (HAP à moins de quatre cycles),
- Les HAP lourds (au moins quatre cycles) entre 178 et 300 g/mol (Edwards, 1983).

La pression de vapeur sert à estimer la tendance d'un produit à se volatiliser et donc à passer en phase gazeuse à partir d'une phase aqueuse. A partir de 10^{-5} kPa, les composés sont considérés comme volatils, sachant que la pression de vapeur est comprise entre $2,8 \cdot 10^{-12}$ et 12 Pa (Mackay et al., 1991) et est fortement liée au nombre de cycles de la molécule. Leurs points d'ébullition sont élevés, entre 150 et 525°C (Palayer, 1997).

La lipophilicité d'une molécule est souvent estimée par la valeur de son $\log K_{ow}$. Ce coefficient de répartition entre la phase lipophile (octanol) et la phase hydrophile (eau) (octanol/eau) est connu pour la plupart des entités chimiques et il est couramment utilisé pour

prédire leur absorption. Il décrit l'aptitude de la molécule à se répartir dans une phase lipophile, l'octanol, considéré comme ayant une lipophilicité comparable à celle de la membrane cellulaire (Artursson et al., 1996).

Les HAP présentent des coefficients de partition octanol/eau ($\log K_{ow}$) variant de 3,4 pour le naphthalène à 7,1 pour le benzo (g,h,i) pérylène (tableau 2) (Barrwman et al., 1989; De Maagd et al., 1998; Jones et de Voogt, 1999). Ce qui signifie que le benzo (g,h,i) pérylène est beaucoup plus hydrophobe que le naphthalène. Leur lipophilie permet leur stockage dans les tissus gras des organismes où le métabolisme est lent, d'où une accumulation progressive dans la chaîne alimentaire (Fisher, 1995).

En ce qui concerne les aspects santé, des HAP comme le benzo [a] anthracène et le benzo [a] pyrène (4 et 5 cycles respectivement) ont par exemple été classés comme très toxiques et cancérigènes, alors que seulement l'anthracène et le phénanthrène ont été identifiés comme des molécules modérément toxiques.

Tableau 3. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP de la liste US-EPA (Mackay et al., 1992; Grova, 2003).

Composés	Nombre de cycle	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L à 25°C)	Log K_{ow}	Pression de vapeur (Pa)
Naphtalène	2	128,20	31	3,37	36,8
Acénaphtène	3	154,20	3,8	3,92	1,52
Acénaphtylène	3	152,20	16,1	4,06	4,14
Fluorène	3	166,20	1,9	4,18	0,715
Phénanthrène	3	178,20	1,1	4,50	0,113
Anthracène	3	178,20	0,045	4,45	0,0078
Fluoranthène	4	202,30	0,26	5,20	$8,72 \cdot 10^{-3}$
Pyrène	4	202,30	0,123	4,88	0,0119
Benzo (a)anthracène	4	228,30	0,011	5,70	$6,06 \cdot 10^{-4}$
Chrysène	4	228,20	0,002	5,61	$8,4 \cdot 10^{-7}$
Benzo(e) pyrène	5	252,30	0,004	7,40	ND
Benzo (b) Fluoranthène	5	252,30	0,0015	6,50	$6,7 \cdot 10^{-5}$
Benzo (k) Fluoranthène	5	252,30	0,0008	6,80	$4,12 \cdot 10^{-6}$
Benzo (a)pyrène	5	252,30	0,0038	6,31	$2,13 \cdot 10^{-5}$
Dibenzo (a, h) anthracène	5	278,40	0.0006	6,50	$9,16 \cdot 10^{-8}$
Benzo (g, h, i) pérylène	6	276,30	0,00026	7,20	$2,25 \cdot 10^{-5}$
Indeno (1, 2, 3-c, d) pyrène	6	276,30	0,0005	ND	$1,3 \cdot 10^{-8}$

ND: non disponible

Log K_{ow} : coefficient de partage octanol-eau

1.2 Toxicité et métabolisme des HAP

1.2.1 Toxicité des HAP

La toxicité des HAP, ainsi que celle de leurs produits de dégradation et de métabolisme a été démontrée sur de nombreux êtres vivants (Beaune et Lorient, 2000). Elle est mesurée en Toxic Equivalent Factor (TEF), avec pour molécule de référence (TEF égal à 1) le benzo[a]pyrène, considéré comme la molécule la plus toxique. Ce facteur d'équivalence toxique a été créé en comparant la courbe représentant la relation dose-effet d'un congénère à celle de la molécule de référence, ici le benzo[a]pyrène.

1.2.2 La cytotoxicité directe

Dans ce cas, les composés à faible poids moléculaire (naphtalène à phénanthrène) peuvent être directement cytotoxiques. Cette toxicité joue sur deux plans : la relative hydrophilie de ces HAP leur permettra d'interagir avec les protéines membranaires causant ainsi des dommages à ce niveau ; le second plan met en jeu l'hydrophobie des HAP qui interagiront cette fois au niveau des enzymes mitochondriales de la respiration. Cette toxicité est donc liée à la structure de ces HAP (Schirmer et al., 1998).

1.2.3 La cytotoxicité due aux métabolites

La seconde voie concerne l'ensemble des composés et se manifeste par la voie des métabolites. En effet, les HAP sont métabolisés chez les organismes vivants par des réactions de Phase I, via des système enzymatiques cytochromes P450 dépendants (Van Der Oost et al., 2003). Les métabolites produits au cours de ces réactions sont considérés à ce jour comme de puissants cancérigènes, particulièrement leur forme époxyde (Xue and Warshawsky, 2005). Cette forme se caractérise par un oxygène ponté sur une liaison carbone-carbone, l'ensemble étant aussi nommé oxacyclopropane (figure 7).

La génotoxicité de cette forme époxyde vient du fait qu'elle se lie avec la molécule d'ADN induisant des modifications structurales telles que des substitutions, délétions... (Yang et al., 1999).

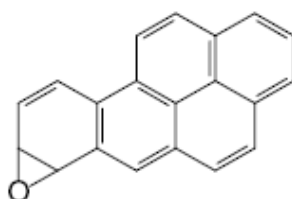


Figure 7. Forme époxyde du B[a]P

Un autre aspect relatif à la génotoxicité des HAP mérite d'être signalé ici. La présence de ces composés dans l'environnement pose le problème de l'évaluation de l'exposition des individus et des risques encourus. Le problème est difficile, parce que, selon les voies d'administrations utilisées (voie orale, inhalation, cutanée), le pouvoir cancérigène est plus ou moins élevé. L'expérimentation chez l'animal montre que ces caractéristiques sont très variables d'une espèce à l'autre (Muller et al., 1997).

Chez l'homme, les HAP deviennent toxiques après oxydation enzymatique, provoquant la formation de métabolites électrophiles solubles. Ces métabolites peuvent alors former des adduits sur les acides nucléiques ainsi que sur les protéines, amenant à un dérèglement du processus de division cellulaire et à la formation de tumeurs (Szeliga et Dipple, 1998). Le benzo(a)pyrène (BaP) est certainement le plus connu et le plus étudié des HAP quant à sa cancérogénicité. Certains de ses dérivés seraient impliqués dans le développement de cancers du poumon chez l'homme par la formation d'adduits avec l'ADN, notamment au niveau du gène p53 (Denissenko et al., 1996). Des études font état d'une plus grande mutagénicité de mélanges de HAP lorsque la proportion en BaP est plus importante (Randerath et al., 1999).

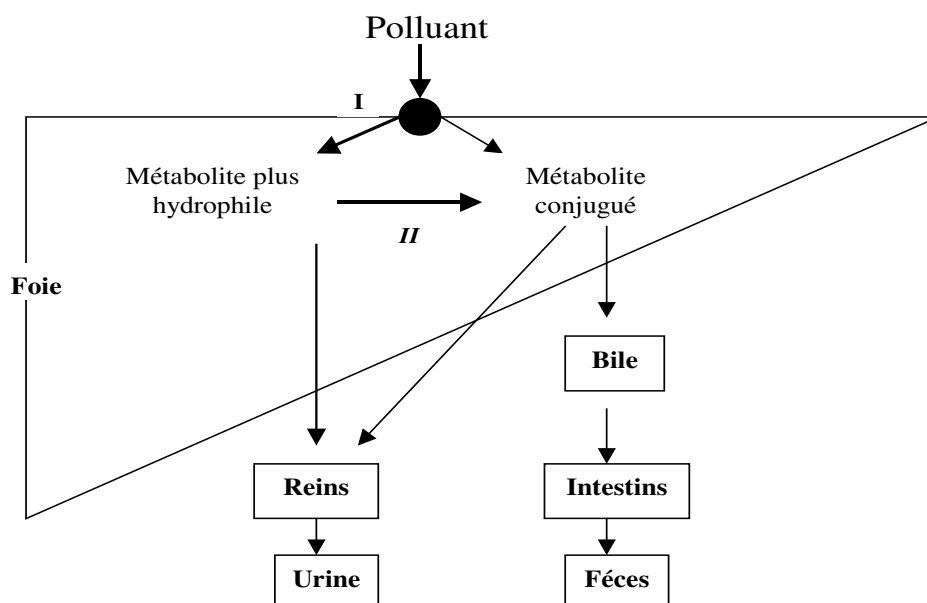
1.3 Métabolisme des HAP

Généralement hydrophobes, ces molécules ont tendance à s'accumuler naturellement dans les phases lipidiques des membranes cellulaires. Elles entraîneraient ainsi une mort inéluctable des organismes si ceux-ci ne s'étaient dotés, au cours de l'évolution, de systèmes enzymatiques permettant leur élimination.

Après leur absorption, les polluants organiques se distribuent au sein de différents tissus et organes. Le plus souvent, ils sont pris en charge par des systèmes enzymatiques hépatiques ou extrahépatiques spécifiques du métabolisme oxydatif des substances liposolubles endogènes (acides gras, stéroïdes, vitamines) (Narbonne, 1991; Buet, 2002). Dans les autres cas, ils sont stockés dans les structures de réserves lipidiques tissulaires (tissu adipeux) ou cellulaires. Les transformations métaboliques ont lieu principalement dans le foie, mais aussi dans le duodénum, les poumons, le rein et la peau (Roos et al., 2002). Le tableau 4 présente les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques chez l'homme.

Tableau 4. Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (Guengerich 1996).

Oxygénases et Oxydases	Hydrolases
Cytochrome P450	Estérases
Flavo-mono-oxygénases	Amidases
Peroxydases	Epoxides hydrolases
Monoamines oxydases	γ -Glutamyl transpeptidases
Alcool déshydrogénases	Dipeptidases
Aldéhyde déshydrogénases	Cystéine conjuguée β -lyase
Aldo-kéto réductases	
Xanthine déshydrogénases	
Aldéhyde oxydases	Enzymes de conjugaison
Quinone réductases	Glutathion S-transférases
	Sulfotransférases
Enzymes piègeuses de radicaux libres	Acétyltransférases
Superoxide dismutases	UDP-glucuronyltransférases
Catalases	Méthyltransférases
Glutathion peroxydases	Conjugaison de la glycine

**Figure 8.** Les différentes étapes du métabolisme hépatique

Les réactions du métabolisme des xénobiotiques peuvent être divisées en deux ensembles : les réactions de phase I ou phase de fonctionnalisation et les réactions de phase II ou phase de conjugaison. La figure 8 résume les différentes étapes du métabolisme hépatique.

1.3.1 Les enzymes de phase I

La majorité des réactions de phase I ou de phase de fonctionnalisation permettent, par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, d'introduire dans la molécule cible un groupement polaire hydroxyl (OH), carboxyl (COOH) ou amino (NH₂).

Ces enzymes sont catalysées par les isoenzymes du cytochrome P450. Le rôle principal des isoenzymes est de catalyser une réaction de monooxygénation afin de rendre les substrats plus hydrophiles en y introduisant un groupement polaire grâce à l'oxygène atmosphérique (e.g. oxydation aromatique ou aliphatique) ou en dégageant une fonction pour augmenter la polarité (e.g. désacétylation, déhalogénéation) (Guengerich 1992a, 1992b, Beaume 1993). À la suite du processus métabolique de phase I, certains substrats peuvent être conjugués avec des composés endogènes et subir ainsi une réaction de phase II.

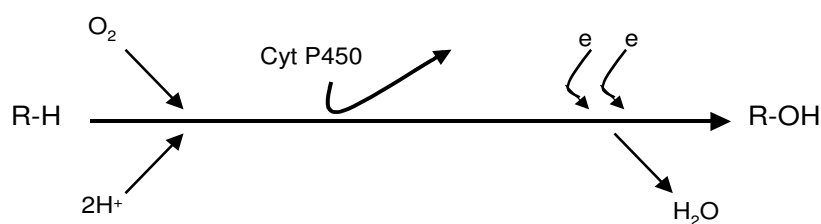
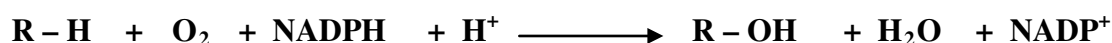
Les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP), appelés aussi oxydases à fonctions multiples (MFO), sont des complexes multi-enzymatiques localisés essentiellement dans le réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales et dont le site actif est orienté du côté du cytoplasme (Anandatheerthavarada et al., 1997). Elles sont retrouvées essentiellement au niveau hépatique, mais également en quantité non négligeable dans les reins (zone corticale), les poumons, l'intestin, la peau, le cerveau, la vessie, les glandes surrénales.... (De Waziers et al., 1991 ; Trédaniel et al., 1995; Hukkanen, 2000). Leur expression peut être constitutive ou inductible. Le profil d'expression des isoenzymes de CYP varie entre les espèces, d'un individu à l'autre, sous l'effet de facteurs environnementaux et/ou génétiques (Hietanen et al., 1997). Il existe aussi une distribution différente des cytochromes P450 entre les organes pour une même espèce (Mugford & Kedderis, 1998).

Généralement, les métabolites présentent un profil d'activité pharmacologique inférieur à celui de la molécule mère. Ceci est dû à l'accroissement de l'hydroslubilité ; par apparition de groupements polaires, l'aptitude de la substance à pénétrer dans les cellules est diminuée et l'élimination rendue plus aisée. Ces dérivés plus hydrosolubles provenant des phases I ou II sont plus facilement éliminés par le rein ou par la bile (Hermann et al., 1983). Certains conjugués excrétés dans la bile peuvent subir une hydrolyse via β -glucuronidase dans la lumière intestinale. Le substrat séparé de son conjugué est alors disponible pour être de nouveau réabsorbé et métabolisé, initiant ainsi un cycle entérohépatique (Barrwman et al., 1989).

L'oxydation des substrats est quantitativement la plus importante réaction de phase I et elle est principalement catalysée par la famille des cytochromes P450. Les cytochromes représentent le système enzymatique oxydatif le plus puissant *in vivo* (Park et al. 1995). Ils sont impliqués dans le métabolisme oxydatif des stéroïdes, des acides gras, des prostaglandines, des leucotriènes et des xénobiotiques. Ce système enzymatique est répandu dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes et dans quelques cellules procaryotes (Nebert et al., 1989; Nebert et Nelson, 1991). En se basant sur la séquence des acides aminés, le dénominateur commun des isoenzymes du cytochromes P450 semble remonter à plus d'un milliard d'années (Gonzalez et al., 1986; Nebert et al., 1989; Gonzalez, 1990).

L'ensemble du cytochrome P450 comprend une hémoprotéine hydrophobe, sauf chez les bactéries (P450 hydrosoluble), et un système de support qui fournit les électrons donnés par le NADPH via la flavoprotéine NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase ou le cytochrome b₅, selon le cas. Les phospholipides ne sont pas essentiels à l'activité catalytique des isoenzymes du cytochrome P450, mais elles pourraient contribuer à son efficacité *in vitro* (Mannering 1972).

Le transport des électrons depuis leur source NADPH jusqu'au cytochrome P450 est ainsi assuré par un intermédiaire unique : la NADPH-cytochrome P450 réductase.



Cette flavoprotéine contient deux types de flavines : la FMN (Flavine MonoNucléotide) et FAD (Flavine Adénine Dinucléotide). Elle interagit avec n'importe quel cytochrome P450.

Une autre voie de transfert des électrons peut également intervenir par l'intermédiaire de la chaîne de transport impliquée dans la désaturation des acides gras, où les électrons du NADH transitent par la NADH-cytochrome B5 réductases. Le cytochrome B5 peut fournir le

deuxième électron au cytochrome P450, suivant la nature de ce dernier et du substrat hydroxylé. La flavine mononucléotide (FMN) est un coenzyme transporteur d'hydrogène. Ce coenzyme est fabriqué dans nos cellules à partir de la riboflavine ou Vit B2.

La Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) est aussi un coenzyme transporteur d'hydrogène. Ce coenzyme est fabriqué dans nos cellules à partir de la riboflavine ou Vit B2 et de l'ATP.

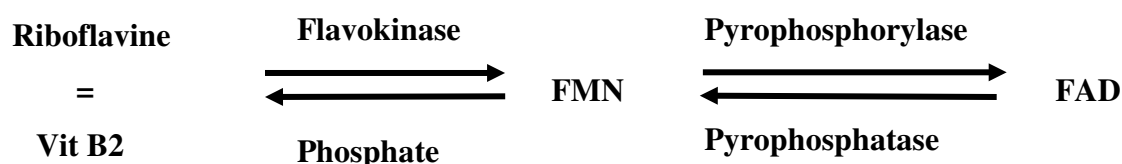
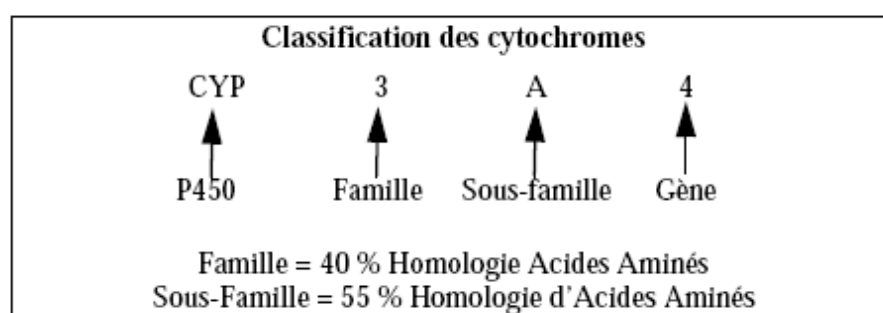


Figure 9. Réaction de la flavine mononucléotide

Les isoenzymes du cytochrome P450 présentent certaines caractéristiques cliniquement importantes. Premièrement et selon la famille de cytochromes, elles ont peu de spécificité vis-à-vis de leurs substrats par comparaison aux relations spécifiques entre un ligand et son récepteur. Deuxièmement, ces enzymes microsomiales possèdent un grand potentiel d'interactions, plus particulièrement au niveau de l'induction et de l'inhibition de leur activité métabolique. Troisièmement, il existe une grande variabilité intra et inter espèces quant à l'expression et l'activité des cytochromes dans les divers tissus de l'organisme (Foster et al., 1986; Gonzalez, 1992; Murray, 1992; Beaune, 1993).



Il existe au moins 30 familles différentes de cytochromes P450, dont 12 communes à tous les mammifères (Nebert et al., 1989, 1991 ; Coon et al., 1992; Slaughter et Edwards, 1995). Chez ces derniers, les cytochromes P450 peuvent être divisés en deux classes selon la localisation intracellulaire du système enzymatique, i.e. mitochondriale et microsomiale. La première classe mitochondriale contient deux familles de cytochromes localisées dans le cortex surrénalien et impliquées uniquement dans la synthèse des stéroïdes (Nebert et al.,

1989; Gonzalez, 1992; Guengerich, 1992a, 1992b; Gonzalez et Lee, 1996). La grande majorité des isoenzymes du cytochrome P450 appartient à la deuxième classe, soit des enzymes membranaires. Il semble que ces enzymes ont une structure globulaire et qu'elles soient fortement ancrées dans la couche lipidique du réticulum endoplasmique (Gonzalez, 1990). Cette configuration leur permet d'avoir accès autant aux substrats lipophiles qu'aux composés hydrophiles (Park et al., 1995).

Les différentes familles des cytochromes P450 peuvent être subdivisées en deux classes majeures, celles qui interviennent dans la synthèse de substances endogènes telles que les stéroïdes, les acides biliaires, les leucotriènes ou les prostaglandines, et celles qui interviennent dans le métabolisme des molécules exogènes (les xénobiotiques) (Lu et al., 1998; Smith et al., 1998).

Les cytochromes P450 métabolisant les xénobiotiques comprennent quatre familles chez les mammifères: CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 (Beaune 1993; Krishna et Klotz 1994; Park et al. 1995).

Tableau 5. Principales réactions de phase I (Inserm, 2001)

Réactions	Enzymes	Substrats
Oxydation	Oxydases	Aldéhydes, amines, hydrazines
Hydroxylation, époxydation, N- et S- oxydation Déshydrogénation	Mono-oxygénases à Cyt P450 FAD déshydrogénases	HAP, arylamines, arylamides Amines, hydrazines, thiols, sulfites Alcools, aldéhydes, dihydrodiols
Réduction	Réductases	Carbonyl, quinones, nitro, azo, N-oxydes, sulfoxydes
Hydrolyse	Estérases, amidases, imidases, Epoxyde hydrolase	Procaïne, acétylcholine Oxydes d'arène, oxydes éthyléniques
Décarboxylation	Décarboxylases	Lévo-dopa
Déméthylation	Mono-oxygénases à cyt P450	Benzphétamine

1.3.2 Les systèmes enzymatiques de phase II

Les réactions de phase II ou phase de conjugaison, catalysées principalement par les transférases, se définissent par la conjugaison du médicament ou de son métabolite avec un substrat endogène (Buet, 2002). Lors de la biotransformation des xénobiotiques, ces réactions de conjugaison ou de synthèse impliquent l'acide glucuronique, le glutathion, les ions sulfate et acétate, le groupement méthyl et la glycine.

La glucuronidation est quantitativement la plus importante réaction de phase II et elle se réalise, à l'échelle cellulaire, au niveau du réticulum endoplasmique (Kitchin, 1984; Koster et al., 1985; Jansen et al., 1992). La glucuronidation a lieu principalement dans le foie, mais sa présence est détectée dans d'autres tissus tels que les reins, la muqueuse intestinale, les poumons et l'estomac, en ordre décroissant d'activité enzymatique (Back et Rogers, 1987; Pacifici et al., 1988a, 1989; Peters et al., 1989a, 1989b, 1989c).

Au niveau du tractus gastro-intestinal, les glucuronides peuvent être formés tout au long de l'intestin mais les plus fortes activités apparaissent dans la région du pylore et du duodénum (Peters et al., 1989a, 1989b, 1989c). Au niveau du côlon, la voie des glucuronyltransférases est la plus dominante des réactions de phase II (Pacifici et al., 1989). Les phénols, les alcools et les acides carboxyliques représentent les substrats les plus fréquemment conjugués par ces transférases.

Les groupements conjugués de liaison de type glucuronique, sulfate ou glutathion augmentent le poids moléculaire et la solubilité des métabolites de HAP. La modification de cette structure peut diminuer directement l'activité du composé (en modifiant le groupe potentiellement réactif, par exemple la formation de triols ou de tétroles à partir des diolépoxydes) ou indirectement en augmentant la probabilité de son taux d'élimination (par l'introduction d'un groupe conjugué à un phénol ou un époxyde). Les variations de réactions rencontrées au sein d'un tissu pourraient s'expliquer par les enzymes spécifiques retrouvées dans celui-ci, les teneurs en HAP dans le tissu et la disponibilité des autres composants comme les sulfates ou le glutathion (Bories, 1993).

La conjugaison de l'ion sulfate avec les substrats endogènes ou exogènes est catalysée par les sulfotransférases cytosoliques, elle constitue une voie métabolique importante des HAP. La majorité des substrats éligibles à la sulfatation sont cependant métabolisés par glucuronidation (Jansen et al., 1992). Plusieurs conditions déterminent le choix entre la sulfatation et la glucuronidation comme voie de biotransformation. Ces conditions peuvent être la saturation des voies de sulfatation, l'affinité des enzymes pour le substrat, l'accès à l'enzyme et la disponibilité des enzymes de conjugaison. En général, les sulfotransférases sont des enzymes ayant une haute affinité et une faible capacité, à l'opposé des glucuronyltransférases (Back et Rogers, 1987).

Tableau 6. Principales réactions de phase II (Inserm, 2001)

Réactions	Enzymes	Substrats
Glucuroconjugaison	UDP-glucuronosyl transférases	Hydroxylamines, arylamines
Sulfoconjugaison	Sulfotransférases	Stéroïdes, phénols, amines, hydroxylamines
Acétylation	N-acétyltransférases	Arylamines, hydrazines
Conjugaison avec des acides aminés	N-acyltransférases	Acides carboxyliques aromatiques et aliphatiques
Mercaptoconjugaison	Glutathion S-transférases	Epoxydes d'HAP, arylamines
Méthylation	Méthyltransférases	Amines, catécholamines, imidazoles, thiols
Transsulfuration	Thioltransférases	Echange disulfure

UDP: uridine-diphosphatase

1.3.3 Métabolisme du Benzo[a]Pyrène

Le métabolisme du Benzo(a)Pyrène (BaP), HAP le plus toxique de la liste de l'US EPA (TEF=1), est assez bien connu sur le plan qualitatif. Il est transformé en une vingtaine de métabolites oxydés et un grand nombre de composés conjugués. L'oxydation initiale est réalisée par une monooxygénase de type cytochrome P450, enzyme présente dans tous les tissus des mammifères (Brookes, 1977).

Une époxyde hydrolase transforme alors le produit en dihydrodiols, oxydés à leur tour en dihydrodiol-époxydes par un cytochrome P450. Ce sont ces dérivés du BaP qui se fixent de façon covalente à l'ADN ou aux acides aminés de protéines, formant ainsi des adduits lesquels sont à l'origine de cancers (figure 10) (INSERM, 2001). Ce métabolisme met en jeu des intermédiaires radicalaires, dont la toxicité pour l'organisme pourrait être supérieure à celle des HAP, d'où l'importance de quantifier également les métabolites (Szeliga et Dipple, 1998; Xue and Warshawsky, 2005).

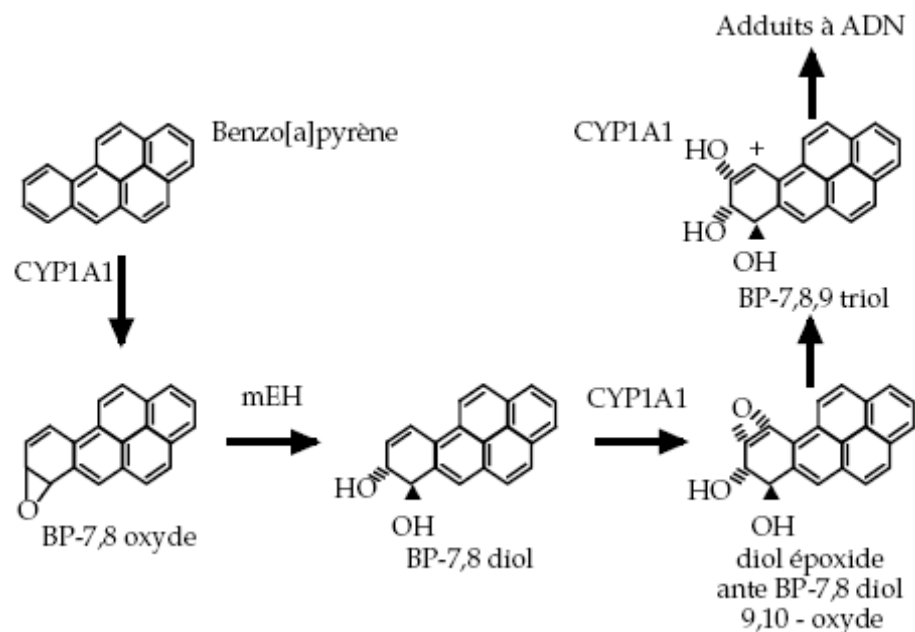


Figure 10. Métabolisme du benzo(a)pyrène dans des cellules de mammifères (INSERM, 2001).

1.4 Exposition aux HAP

1.4.1 Exposition humaine aux HAP via l'alimentation

La Figure 11, issue du travail de synthèse effectué par Laurent et al., 2005, synthétise le devenir des HAP émis dans l'atmosphère en terme de transfert sur les couverts végétaux, dans l'eau et le sol, et en terme de transfert dans la chaîne alimentaire jusqu'à l'homme (sol et végétaux vers l'animal, et animal vers l'homme).

Les diverses sources d'exposition humaine sont par ordre décroissant d'importance, l'alimentation, la pollution intérieure (tabagisme actif et passif entre autres) et extérieure (respiration, transferts cutanés). L'importance de l'exposition au HAP par voie alimentaire dépend de la nature des aliments eux-mêmes (sucres, céréales, poissons, viandes, huiles...), mais également des procédés alimentaires auxquels ils ont été soumis avant ingestion (fumaison, cuisson, grillade) (Kazerouni et al., 2001; Phillips, 1999; Varlet et al., 2007).

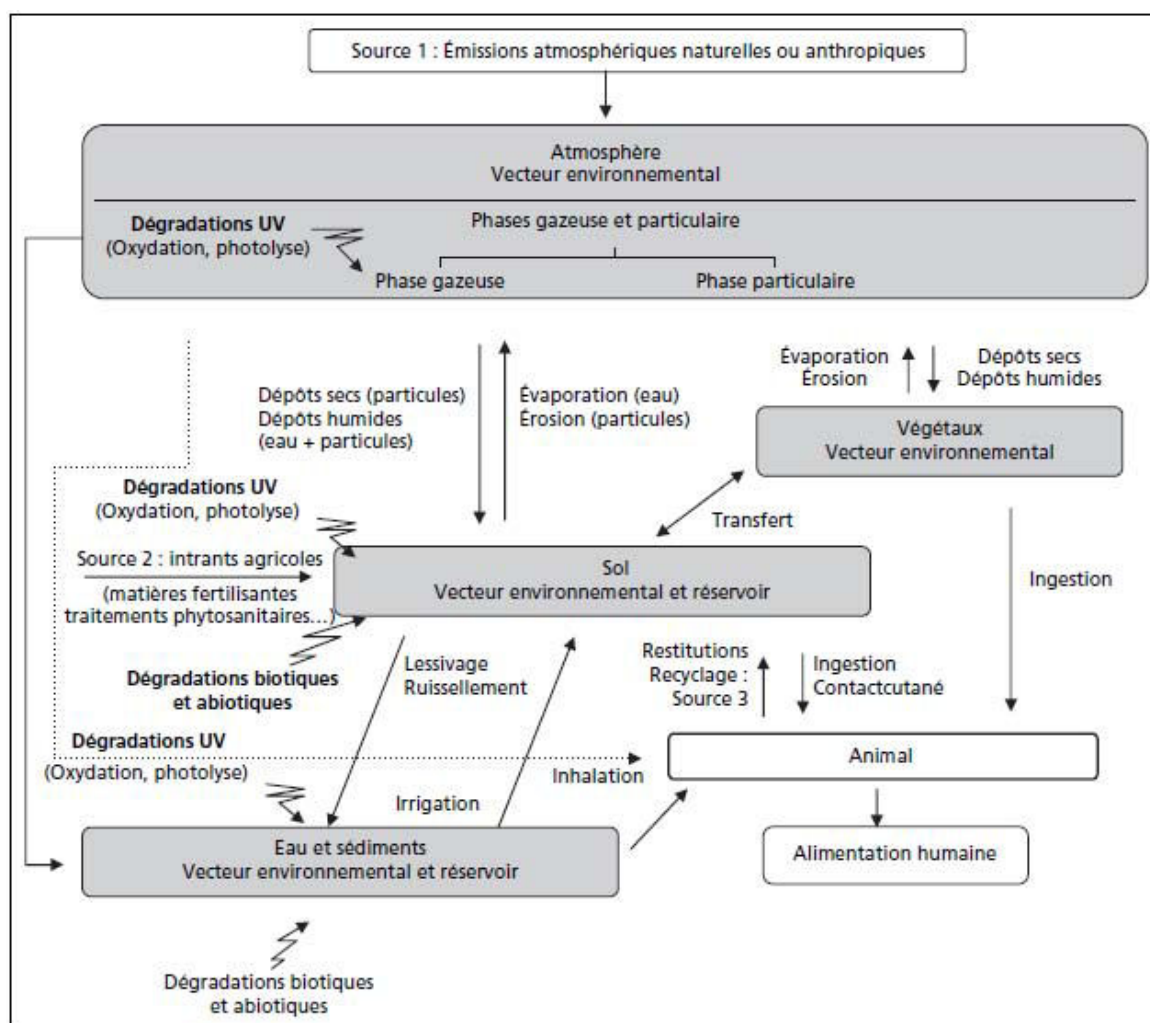


Figure 11. Devenir des HAP émis dans l'atmosphère.

Si de nombreuses études ont été et sont heureusement encore consacrées à la détermination de niveaux de contamination dans les matrices alimentaires (Fontcuberta et al., 2006; Janoszka et al., 2004; Philipps, 1998; de Vos et al., 1990), les études cherchant à évaluer les quantités de HAP ingérées quotidiennement par l'être humain sont plus rares. Falco et al. (2003) ont par exemple évalué l'ingestion moyenne des 16 HAP prioritaires via l'alimentation à 8,4 $\mu\text{g}/\text{jour}$ chez l'homme adulte en Catalogne. Lodovici et al., (1995) ont évalué cette ingestion à 3 $\mu\text{g}/\text{jour}$ et par adulte en Italie, dont 1,4 $\mu\text{g}/\text{jour}$ de HAP avérés cancérigènes. Une étude assez complète menée par de Vos et al., (1989) a permis d'estimer une ingestion quotidienne des 16 HAP prioritaires entre 5 et 17 $\mu\text{g}/\text{jour}/\text{personne}$ en Hollande, dont à peu près 50% de HAP avérés cancérigènes. Les sources principales de HAP identifiées par ces auteurs étaient le sucre et les produits sucrés, les céréales, les huiles, les graisses et les noix. En extrayant les valeurs basses et hautes de ces résultats respectivement issus du sud et

du nord de l'Europe, la plage de 3-17 $\mu\text{g}/\text{jour}/\text{adulte}$ pour les 16 HAP prioritaires peut donc être considérée comme une plage repère.

1.4.2 Exposition humaine aux HAP via l'ingestion de sol

Récemment, les forts niveaux de contamination parfois observés dans des sols ont généré des interrogations sérieuses concernant la contribution de ces derniers à l'ingestion quotidienne de polluants par les jeunes enfants jouant en plein air. Certains sols contaminés en zones industrielles peuvent contenir jusqu'à 3,8 g de HAP par kg et il est arrivé de retrouver jusqu'à 67 mg de HAP par kg de sol dans des carrés de jardin en Allemagne (Roos et al., 2004). Des valeurs très nettement moindres mais malgré tout non négligeables ont été trouvées par Fiala et al. (2001) dans des jardins d'enfants tchèques en « zone polluée » (152 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sol) ou « non-polluée » (88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sol). Or, l'ingestion de sol par l'enfant jouant en plein air a été évaluée à 80 mg/jour par Paustenbach (1989). Une étude beaucoup plus récente de Van Wijnen (2008) menée sur 162 enfants sur un terrain de camping a permis d'évaluer cette ingestion entre 30 et 200 mg/jour/enfant ce qui est en accord avec les données de Paustenbach (1989). Par conséquent, si on prend comme référentiels « défavorables et raisonnable » un jardin d'enfant en zone polluée à 152 μg HAP/kg de sol d'une part, et une ingestion quotidienne de 200 mg de sol/jour/enfant d'autre part, cela revient à dire que l'enfant ingère environ 0.03 μg de HAP par jour via le sol. Ce chiffre, comparé aux 3-17 $\mu\text{g}/\text{jour}/\text{adulte}$ (soit 0,3 - 1.7 $\mu\text{g}/\text{jour}/\text{enfant}$ en considérant une consommation alimentaire 10 fois moindre pour un enfant) représente 1.8 à 10 % seulement de la quantité de HAP ingérée via l'alimentation de l'enfant. Autrement dit, chez le jeune enfant, la part de HAP ingérée via le sol, même sur un site considéré comme pollué, demeure négligeable par rapport à la part de HAP ingérée via l'alimentation. Cependant, en considérant une pollution extrême à 67 mg de HAP/kg de sol de jardin (Roos et al., 2004) ainsi qu'une ingestion de 200 mg de terre par jour (cas défavorable), l'enfant ingèrerait alors 13,4 μg de HAP via le sol par jour, soit 8 à 45 fois plus que la quantité de HAP ingérée journalièrement via son alimentation. Cet exemple montre combien, dans de rares situations, le sol peut tout de même présenter un risque toxicologique pour l'enfant.

Du point de vue agronomique, nous verrons plus loin que les animaux en pâture peuvent ingérer des quantités de sols nettement supérieures à celles ingérées par l'enfant et nous évaluerons l'importance de la contamination par ingestion de sol par rapport à l'importance de la contamination par ingestion de fourrage.

La Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) a saisi, en janvier 2000, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments afin d'évaluer les risques présentés par les HAP dans diverses denrées alimentaires et déterminer les niveaux de concentration au-delà desquels risquent de se poser des problèmes de santé.

1.4.3 Importances relatives des différents modes d'exposition chez l'homme

Le mode d'exposition est un élément clé dans les événements qui mènent à la concentration de micropolluants dans l'organisme. Les HAP peuvent être absorbés par le tractus respiratoire ou gastro-intestinal ou pénétrer à travers la peau.

Après l'application de benzo[a]pyrène sur la peau de souris, il a été observé l'apparition de tumeurs cutanées (Cavalier et al., 1988; Shibik et porta, 1957; Albert et al., 1991). L'injection intrapéritonéale de benzo[a]pyrène à des souris a augmenté le nombre de cas de tumeurs du foie et du poumon (IARC, 1998).

La plupart des travaux visant à déterminer leur importance relative sont fondés sur les quantités de benzo[a]pyrène absorbé par inhalation et par ingestion (Waldman et al., 1991). Ils définissent une prédominance de la contamination par la voie alimentaire. Menzie et al. (1992) ont étudié l'ensemble des 16 HAP de la liste US-EPA et ont confirmé cette tendance. En effet, l'alimentation semble être la source majeure de contamination en HAP et représente selon eux 96,2% de la dose journalière absorbée par un individu non fumeur, soit 3 à 17 $\mu\text{g}/\text{jour}$. L'exposition par inhalation, par ingestion d'eau et de sol ne représenterait que 1,6%, 0,2% et 1,9% respectivement (mais, comme précisé plus haut, le pourcentage lié à l'ingestion de sol peut augmenter chez le jeune enfant). Les ingestions d'eau et de sol apparaissent comme des sources mineures de ces composés. L'ingestion accidentelle de sol est évidemment négligeable pour l'homme (50 ng/jour) mais peut devenir une source importante de contamination pour les animaux en pâture (Tableau 7). Dolora et al. (1995), ont démontré chez l'homme la prépondérance de la voie alimentaire (3 $\mu\text{g}/\text{jour}$) par rapport à la voie respiratoire (0.370 $\mu\text{g}/\text{jour}$). Enfin, une campagne de mesures réalisées durant les années 90 dans plusieurs pays européens a confirmé l'importance de la voie alimentaire (>90%) dans la prise journalière en HAP comparativement à l'ingestion d'eau (<1%) et à l'inhalation d'air (<1%) (Scientific Committee on Food, 2002) (Tableau 7).

Tableau 7. Estimation moyenne de la prise journalière en HAP par différentes voies de contamination pour un adulte non fumeur.

Menzie et al. (1992)					Scientific Committee on food (2002)			
Valeurs moyennes			Valeurs maximales		Valeurs moyennes		Valeurs maximales	
Sources de HAP	Prise (µg/jour)	%	Prise (µg/jour)	%	Prise (µg/jour)	%	Prise (µg/jour)	%
Alimentation	3	96,2	12	79	2,235	79	12,86	93,30
Air	0,05	1,6	2,70	18	0,842	26,40	0,842	6,1
Eau	0,006	0,2	0,124	1	0,023	0,72	0,0802	0,58
Sol	0,06	1,9	0,4	2	/	/	/	/
Total	3,12	100	15,22	100	3,19	100	13,78	100

Des situations particulières telles qu'une exposition active (Shields et al., 1996; Chetiyankornkul et al., 2006) ou passive (Lash et Aschengrau, 1999) à la fumée de cigarette, ainsi qu'un environnement professionnel anormalement pollué sur certains sites de production sont également considérées avec attention par les autorités de surveillance. Les environnements professionnels concernés peuvent par exemple être des fours à coke (Yilmazer et al., 2006; Vanrooij et al., 1993), des usines d'Aluminium (Vu-Duc et al., 1996), des usines pétrochimiques (Booggard et al., 1994), des atmosphères confinées soumises à des rejets moteurs, en particulier les particules diesel (Petry et al., 1996; Lafontaine et al., 2000).

1.4.4 Transfert des HAP dans la chaîne alimentaire

Le comportement des HAP dans la chaîne alimentaire joue un rôle majeur dans l'étude de l'exposition de l'homme et des animaux à ces contaminants (Grova et al., 2003). Les HAP se caractérisent par une bioaccumulation dans les chaînes alimentaires. Ces molécules font l'objet de processus de bioconcentration et de bioamplification, aboutissant à des taux parfois élevés au niveau terminal (Farrington, 1989; Fisher, 1995). Ce phénomène de bioamplification dépend de deux caractéristiques physico-chimiques des HAP (INSERM, 2000):

- Leur stabilité chimique et métabolique, qui explique à la fois leur faible dégradation dans le milieu, et leur accumulation dans les organismes vivants au cours du temps.

- Leur lipophilie, car elle entraîne un passage facilité des HAP, par diffusion passive à travers les membranes biologiques des êtres vivants, entre le milieu et les organismes qui y vivent (par transfert cutané par exemple) mais aussi lors d'ingestion d'un aliment végétal ou animal, à travers la muqueuse digestive.

A ce transfert de micropolluants au travers des membranes biologiques, correspond une biodisponibilité élevée, propre à ces contaminants dits « bioaccumulatifs ». Soulignons que, pour ces deux paramètres (stabilité et lipophilie), le nombre de cycles benzéniques et leur position jouent un rôle important ; les comportements des divers congénères dans les chaînes alimentaires peuvent donc être relativement différents (INSERM, 2000).

Dans les organismes aquatiques, un facteur de bio-accumulation de 2657 a été estimé par McCarthy et Jimenez (1985) sur *Lepomis macrochirus* (perche soleil), en se basant sur le rapport des constantes d'absorption et d'élimination de **la substance** dans l'organisme. Cet ordre de grandeur a été confirmé en 1989 par Johnsen qui a trouvé la valeur de 2310 sur *Salmo salar* (saumon atlantique), bien qu'il n'ait suivi **que la molécule** marquée au C14.

Dans les organismes terrestres y compris les végétaux, diverses expériences ont montré que le B(a)P présent dans l'environnement pouvait être fixé par les plantes à la fois via leurs racines (sol) et leurs feuilles (air). Le passage des racines vers les parties superficielles des plantes dans le cas d'un sol pollué, et/ou des parties superficielles vers les racines si l'atmosphère est polluée, a également été démontré sur certaines plantes (Edwards, 1983; fritz, 1983).

Malgré les expérimentations menées sur la bio-accumulation du B(a)P dans les végétaux, aucun facteur de bio-concentration ne peut être proposé.

Les animaux d'élevage se positionnent dans des chaînes alimentaires relativement courtes, mais fournissent des produits largement consommés par l'homme, d'où leur importance sur le plan de la surveillance des taux de bioaccumulation des micropolluants organiques et de la compréhension des modalités de transfert (INSERM, 2000). La chaîne alimentaire qui inclut les ruminants laitiers est certainement très importante à considérer car le lait et les produits laitiers occupent une place majeure et croissante dans la consommation (350 kg équivalent lait/habitant/an en France, notamment chez les jeunes (Agrete Primeur, 2008) ; ce sont par ailleurs des produits riches en lipides, dans lesquels les micropolluants s'accumulent facilement. Globalement, l'organisme peut être comparé à un filtre éliminant parfois une fraction importante de ces composés lipophiles, sous forme métabolisée ou non, vers une voie d'excrétion (lait, urine, bile), ou les concentrant dans ses tissus (McLachlan, 1995).

1.4.5 L'exposition chez les animaux d'élevage

L'exposition orale, considérée comme fortement majoritaire chez l'homme, sera la seule considérée dans cette section. Elle correspond à l'ingestion directe de polluants contenus sur les végétaux (ADEME, 1997) et l'ingestion involontaire de sol contaminé en HAP. Les calculs seront effectués en prenant comme référentiel une vache laitière de 600 kg.

1.4.6 Exposition par l'ingestion de couvert végétal

Le tableau 8 liste, sur la base d'un ingéré en couvert végétal de l'ordre de 15 kg de matière sèche par jour et par vache laitière (600 kg), les quantités de HAP ingérées par jour et par animal dans des zones diversement exposées. Sans considérer le cas exceptionnel mentionné par Bakker et al. (2000), il apparaît qu'une vache laitière peut ingérer jusqu'à environ 2.5 µg de HAP par kg et par jour en zone rurale peu exposée et jusqu'à environ 25 µg de HAP par kg et par jour en zone semi-rurale fortement exposée. Si on prend comme élément de comparaison les 17 µg max. de HAP ingérés par jour par un homme adulte, non fumeur, de corpulence moyenne (environ 70 kg), soit 0.25 µg/jour/kg de poids corporel, on perçoit alors mieux combien le ruminant laitier est significativement plus exposé aux HAP via son alimentation, même en zone rurale peu exposée, par rapport à l'homme.

Sur le plant qualitatif, Kipopoulou et al. (1999) ont évalué les teneurs en HAP de différentes espèces de végétaux d'une grande zone industrielle au nord de la Grèce. Les composés légers (naphtalène, fluorène, phénanthrène et pyrène) sont prépondérants dans les feuilles et les racines des végétaux avec des teneurs comprises entre 25 et 294 µg/kg de matière sèche. Les composés lourds associés aux particules atmosphériques, déposés de façon superficielle sur les végétaux sont facilement lessivés par les pluies (Edwards, 1983) et s'accumulent moins, contrairement aux composés légers qui s'adsorbent sur la cuticule. Par conséquent, les HAP de poids moléculaires élevés apparaissent moins dans les profils de contamination en HAP des végétaux. Un état des lieux qualitatif et quantitatif plus précis sera présenté au chapitre 3.

Les teneurs en HAP dans les plantes dépendent de la distance par rapport à la source d'émission et des conditions météorologiques (Kipopoulou et al., 1999; Crépineau et al., 2003). L'étude de Grova et al., (2000) sur l'évaluation des teneurs en HAP de l'herbe et du lait de fermes situées en zones rurales et urbaines a par exemple révélé une contamination plus importante des pâtures localisées à proximité de sources multiples (aciérie, autoroute et

voie de chemin de fer) comparativement à celles situées en zone rurale (83.1 µg/kg matière sèche, 51.8µg/kg matière sèche, respectivement).

Tableau 8. Evaluations des ingérés journaliers en HAP par une vache laitière de 600 kg ingérant 15 kg de couvert végétal (matière sèche) par jour. Les concentrations trouvées sur les divers couverts végétaux ont été utilisées pour le calcul.

Auteurs	Zone géographique	mg HAP/jour/animal via l'ingestion de couvert végétal	µg HAP/jour/kg via l'ingestion de couvert végétal
Crepineau et al., 2004; Grova et al., 2000	Zone rurale peu exposée	max ≈ 1.5 mg/jour/vache	2.5
Grova et al., 2000; Muller et al., 2001; Smith et al., 2001; Crepineau et al., 2001	Zone semi-rurale modérément exposée	≈ 3 mg/jour/vache	5
Crepineau et al., 2004; Smith et al. 2001 Ciganek et al., 2002	Zone semi-rurale fortement exposée au trafic routier ou aérien et/ou aux rejets industriels	≈ 10 à 15 mg/jour/vache	17-25
Bakker et al. 2000	Cas exceptionnel d'un près à proximité directe d'une raffinerie en Belgique	≈ 30 mg/jour/vache	50

L'étude de Crépineau-Ducoulombier et Rychen (2003) sur l'évaluation de la contamination en HAP des parcelles agricoles situées à proximité d'une autoroute et d'un aéroport a révélé un niveau de contamination en HAP plus important pour le site de l'autoroute (188 µg/kg matière sèche) que pour celui de l'aéroport (69 µg/kg matière sèche). Les dosages en HAP effectués sur les cultures de *Lolium perenne* exposées durant 30 et 75 jours de part et d'autre d'une autoroute et d'une route nationale ont révélé des concentrations s'étalant dans la plage 18 µg/kg - 414 µg/kg de matière sèche, sans différences significatives entre 30 et 75 jours. Par ailleurs, les plus fortes concentrations ont été observées à proximité de la route nationale révélant ainsi l'importance de la nature des véhicules circulants (proportion de camions) et de leur vitesse moyenne (Crépineau et al., 2004). L'ingestion de fourrage apparaît donc comme une voie de contamination importante voire potentiellement très importante du ruminant laitier.

1.4.7 Exposition par ingestion de sol

Le lessivage des HAP déposés à la surface du couvert végétal représente une source importante de contamination des sols. A cela s'ajoute la contamination directe du sol par dépôt atmosphérique ou épandage, celui-ci devenant alors une source de contamination non négligeable pour l'animal en pâture. L'ingestion journalière de sol par des vaches laitières en pâturage peut atteindre jusqu'à 1,5 kg par jour selon la saison, la zone climatique, la nature du sol, la taille du troupeau et bien sûr la densité et la nature du couvert végétal (Healy et al., 1968; Hinton et al., 1995; Mayland et al., 1975). En zones rurales, des teneurs en HAP oscillant de 0,06 à 0,32 mg/kg de sol sec ont été observées aux Etats-Unis (Wilcke et Amelung, 2000; Wong et al., 2004), en Angleterre (Wild et Jones, 1995), en Espagne (Nadal et al., 2004) ou encore au Brésil (Wilcke et al., 1999). Certains sols de pâture ont par ailleurs été contrôlés à 0,4 mg HAP/kg de sol sec (Howsam et al., 1999) en Angleterre. En zone urbaine, des teneurs allant jusqu'à 4,24 mg/kg de sol sec ont été observées en Angleterre (Wild et Jones, 1995). En zone industrielle pétrochimique, gazière ou métallurgique, les teneurs en HAP peuvent dépasser le g/kg de sol sec et même atteindre exceptionnellement jusqu'à 7 g/kg de sol sec (Wilcke et al., 1996; Juhasz, 1998).

Le tableau 9 liste les contaminations de sols en HAP dans différents pays, par différents auteurs, sur des sites ruraux et sur des sites urbains. Entre ces extrêmes, de nombreux cas peuvent exister. Sur la base d'un ingéré de 1.5 kg de sol maximum par jour, on peut ainsi évaluer l'ingéré journalier d'une vache laitière via le sol comme étant compris entre 0.45 et 4.5 mg par jour.

En guise de valeur repère, si on considère (i) un sol contaminé à 300 µg de HAP par kg (valeur réaliste pour une pâture faiblement exposée), (ii) une ingestion moyenne par animal et par jour de 500 g de sol (cas moins extrême que celui retenu dans le tableau 9), (iii) une ingestion moyenne par animal et par jour de 1.5 mg de HAP via le couvert végétal (cas tout à fait réaliste dans une pâture faiblement exposée), alors cela revient à dire que l'animal ingère quotidiennement 0,15 mg de HAP via le sol contre 1.5 mg via le fourrage (soit 9 % de la dose totale de HAP ingérés). On voit ici que même en zone faiblement exposée, le sol peut donc représenter une source de contamination relative qui, bien que faible, demeure non négligeable chez l'animal d'élevage en pâture.

1.4.8 Comparaison avec l'homme

Toujours en guise de repère, il nous semble important de comparer les ingérés en HAP par jour et par kg de poids corporel chez la vache laitière en pâture et chez l'homme. Un homme adulte, nous l'avons vu, peu ingérer de 3 à 17 μg de HAP par jour en moyenne soit 0.04 à 0.24 μg de HAP/kg/jour. Une vache laitière, sur la base de 15 kg de fourrage par jour (base sèche) et 500 g de sol par jour, en zone rurale faiblement exposée, ingèrera environ 1650 μg de HAP par jour soit environ 2.75 μg de HAP/kg/jour (base 600 kg en poids corporel). Cela signifie que même en zone faiblement exposée, la vache laitière ingère environ 11 à 70 fois plus de HAP par kg de poids corporel et par jour, par rapport à l'homme. Ces ordres de grandeurs permettent de mieux appréhender la problématique de l'exposition des ruminants laitiers aux HAP.

Il faut enfin noter que d'autres ruminants laitiers, tels que le mouton ou la chèvre, broutent les couverts végétaux encore plus au ras du sol que ne le fait la vache laitière, ce qui tend probablement à augmenter la part du sol dans l'exposition orale de ces derniers aux HAP (INSERM, 2001). De même, l'ingestion de sol par des volailles élevées en plein air et se nourrissant partiellement de pédofaune, et aussi de sol, devrait donc être considérée avec attention.

Tableau 9 : Comparaisons des niveaux de contamination en HAP de sols, en zones rurales peu exposées et zones urbaines fortement exposées (Σ des 12 ou 14 HAP les plus lourds de la liste de l'US EPA, ou somme des 16 HAP de la liste).

Sols en zone rurales faiblement exposées				Sols en zone urbaine fortement exposées			
Auteurs	Pays	μg HAP/kg de sol	HAP analysés	Auteurs	Pays	μg HAP/kg de sol	HAP analysés
Trapido et al., 1999	Estonie	232	Σ 12	Motelay-Massei et al., 2004	France	2780	Σ 14
Wilcke et Amelung, 2000	USA	142	Σ 16	Wild et Jones, 1995	U.K.	4500	Σ 12
Malawska et al., 2001	Pologne	384	Σ 14	Trapido et al., 1999	Estonie	2200	Σ 12
Nam et al., 2003	Corée	158	Σ 16	Tang et al., 2005	Chine	3917	Σ 16
Chen et al., 2005	Chine	200	Σ 14	Wong et al., 2004	Canada	1750	Σ 12
Agarwal et al., 2008	Inde	830	Σ 16	Agarwal et al., 2008	Inde	3880	Σ 16
Moyenne		\approx 300		Moyenne		\approx 3000	
mg HAP ingérés / jour ¹		0.45		mg HAP ingérés / jour ¹		4.5	

¹: pour 1.5 kg de sol ingéré par jour (cas extrême).

1.5 Contamination des aliments par les HAP

1.5.1 Vue générale

On l'a vu, les HAP peuvent être ingérés en quantités importantes par le ruminant laitier. Leur transfert vers le lait ou la viande, sous forme métabolisée ou non, est susceptible de représenter un risque pour l'être humain incluant ces produits dans son régime alimentaire. L'EFSA (2008) s'est penchée de manière très aboutie sur la question de la contamination des produits alimentaires par les HAP sous leurs formes natives.

Dans le tableau 10, on peut voir une comparaison des 16 HAP et de leurs TEF considérés comme prioritaires sur le plan environnemental par l'US-EPA avec les 16 HAP considérés comme prioritaires sur le plan alimentaire par l'EFSA. Cette liste « EFSA » est la même que celle du Scientific Committee on Food (SCF) de la Commission Européenne, à laquelle le benzo(b)fluorène a été rajouté. Ces deux listes possèdent 8 HAP en commun, possédant tous au moins 4 cycles, donc particulièrement lipophiles, et ayant pour la majorité

des TEF relativement élevés à élevés. C'est sur cette liste de 8 HAP commune aux deux listes que l'EFSA concentré, entre autre, son attention pour établir un état des lieux sur les niveaux de contamination en HAP de diverses catégories d'aliments, dont les produits laitiers et les viandes (EFSA report, 2008, answer to question n° EFSA-Q-2007-136). Les 8 HAP de la liste EFSA n'appartenant pas à la liste EPA sont pour leur part principalement issus des processus de transformation subits par les aliments (fumaison, grillade, séchage, fritures).

Tableau 10. Comparaison des 16 HAP prioritaires de l'US EPA avec les 16 HAP prioritaires de l'EFSA

HAP-EPA	TEF	HAP-EPA/EFSA	TEF	HAP-EFSA	TEF
Naphtalene	0.001	Benzo(a)anthracene	0.1	Benzo©fluorene	-
Acenaphtylene	0.001	Benzo(a)pyrene	1	5-Methylchrysene	-
Acenaphtene	0.001	Benzo(b)fluoranthene	0.1	Dibenzo(a,i)pyrene	10
Fluorene	0.001	Benzo(k)fluoranthene	0.1	Dibenzo(a,h)pyrene	10
Phenanthrene	0.001	Benzo(ghi)perylene	0.01	Dibenzo(a,i)pyrene	10
Pyrene	0.001	Chrysene	0.01	Dibenzo(a,e)pyrene	1
Fluoranthene	0.001	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.1	Benzo(j)fluoranthene	0.1
Anthracene	0.01	Dibenzo(a,h)anthracene	1	Cyclopent(cd)pyrene)	0.1

Le tableau 11, qui détaille les niveaux de contamination observés pour chacun des 8 HAP communs aux deux listes EPA et EFSA, révèle ainsi que les aliments les plus contaminés en HAP sont par ordre décroissant (en considérant la somme de ces 8 HAP) :

-café/cacao/thé	37.4 µg/kg	(n=63)
-poissons et produits de la mer	13.8µg/kg	(n=1031)
-poissons frais	1.06 µg/kg	(n=66)
-poissons soumis à process	14.6 µg/kg	(n=757)
-mollusques bivalves	15.58 µg/kg	(n=200)
-graisses et huiles	9.8µg/kg	(n=1140)
-céréales	3.09 µg/kg	(n=25)
-fruits (séchés ou non)	3.09 µg/kg	(n=134)
-chocolat	2.76 µg/kg	(n=148)
-viandes	2.1 µg/kg	(n=777)

-grillées	3.48 µg/kg	(n=53)
-fumées	1.7 µg/kg	(n=562)
-barbecue	7.95 µg/kg	(n=39)
-autres viandes	0.79 µg/kg	(n=123)
-légumes et noix	1.95 µg/kg	(n=80)
-produits laitiers*	0.71 µg/kg	(n=17)

* Données EFSA.

Au regard de ces données très synthétiques, il apparaît que les produits animaux que sont les produits laitiers et la viande non grillée/fumée sont relativement peu contaminés par rapports aux autres denrées alimentaires. Les produits subissant des opérations de séchage et /ou torréfaction comme le thé, le café ou le cacao sont particulièrement contaminés. Les graisses et les huiles végétales ou animales qui sont des matrices de stockage idéales pour les HAP à partir de 4 cycles, montrent logiquement un niveau de contamination assez important. Le poisson à l'état frais est peu contaminé. Mais son niveau de contamination peut-être multiplié par environ 15 après son exposition à des procédés de conservation tels que la fumaison. Les mollusques bivalves, même à l'état cru, atteignent des niveaux de contaminations identiques à ceux du poisson conservé.

Enfin, le tableau 12 présente une évaluation des ingérés journaliers en HAP dans divers pays européens, en se basant uniquement sur les aliments pour lesquels les données sont disponibles et en considérant le BaP seul ou bien la somme de 2, 4 ou 8 HAP (EFSA, 2008). Ces données sur 8 HAP de l'EPA sont en accord avec l'évaluation mentionnée plus haut, à savoir 3 à 17 µg de HAP (Σ 16 HAP de l'EPA) ingérés par jour et par adulte.

Tableau 11. Limites basses (LB) et hautes (UB) pour la concentration moyenne en µg/kg de 8 HAP identifiés dans des mélanges de goudron de houille et leurs proportions respectives au-delà de la limite de détection (LOD) correspondante : analyse dans 4065 produits alimentaires différents (EFSA report, July 2008, answer to question n° EFSA-Q-2007-136)

	BaP			BaA			BbFA			BkFA			BghiP			CHR			DibahA			IP			
	N	LB	UB	>LOD	LB	UB	>LOD	LB	UB	>LOD	LB	UB	>LOD	LB	UB	>LOD	LB	UB	>LOD	LB	UB	>LOD	LB	UB	>LOD
Cereals	25	0.20	0.40	40%	0.41	0.53	56%	0.26	0.33	52%	0.07	0.14	44%	0.63	0.69	56%	0.30	0.36	56%	0.10	0.19	4%	0.01	0.40	8%
Processed	9	0.03	0.26	44%	0.15	0.32	67%	0.13	0.18	67%	0.02	0.09	56%	0.03	0.10	44%	0.20	0.25	67%	0.00	0.08	0%	0.02	0.26	22%
Unprocessed	16	0.30	0.47	36%	0.56	0.73	50%	0.34	0.41	44%	0.10	0.17	38%	0.97	1.02	63%	0.35	0.42	50%	0.15	0.25	6%	0.00	0.49	0%
Chocolate	148	0.30	0.32	83%	0.35	0.38	60%	0.39	0.44	76%	0.15	0.17	74%	0.43	0.45	68%	0.57	0.62	83%	0.00	0.05	1%	0.18	0.33	30%
Fats and oil	1140	0.97	1.00	56%	1.23	1.28	52%	1.26	1.37	57%	0.52	0.57	52%	0.75	0.83	41%	3.59	3.69	66%	0.12	0.20	19%	0.68	0.86	27%
Cocoa butter	128	1.99	1.99	96%	2.92	2.93	89%	3.37	3.37	97%	1.80	1.81	91%	1.94	1.96	84%	3.78	3.78	87%	0.24	0.28	49%	2.55	2.74	64%
Other	899	0.65	0.89	52%	0.74	0.80	45%	0.75	0.89	52%	0.30	0.36	46%	0.43	0.53	36%	2.14	2.28	65%	0.07	0.16	13%	0.38	0.59	22%
Pomace oil	113	2.38	2.39	44%	3.24	3.24	62%	2.91	2.92	50%	1.05	1.06	50%	1.91	1.96	30%	14.97	14.99	52%	0.36	0.38	37%	0.93	0.96	26%
Vegetables and nuts	80	0.16	0.26	26%	0.14	0.23	26%	0.21	0.27	36%	0.08	0.16	26%	0.11	0.27	21%	0.31	0.38	30%	0.00	0.15	1%	0.11	0.23	20%
Dried	40	0.03	0.15	13%	0.02	0.11	10%	0.07	0.15	20%	0.02	0.14	10%	0.00	0.24	5%	0.07	0.15	13%	0.00	0.23	0%	0.01	0.14	8%
Other	40	0.29	0.38	40%	0.25	0.35	48%	0.34	0.38	53%	0.14	0.18	48%	0.22	0.29	39%	0.55	0.61	48%	0.00	0.08	3%	0.20	0.32	33%
Fruit	134	0.13	0.17	36%	0.91	0.95	56%	0.27	0.32	57%	0.07	0.11	44%	0.07	0.12	39%	1.19	1.23	66%	0.00	0.08	1%	0.03	0.11	17%
Dried	133	0.13	0.17	36%	0.92	0.95	56%	0.28	0.32	57%	0.07	0.11	44%	0.07	0.12	39%	1.20	1.23	67%	0.00	0.08	2%	0.03	0.11	17%
Processed	1	0.00	0.05	0%	0.00	0.05	0%	0.00	0.05	0%	0.00	0.05	0%	0.00	0.10	0%	0.00	0.05	0%	0.00	0.05	0%	0.00	0.05	0%
Coffee, tea and cocoa	63	5.02	5.12	57%	5.21	5.25	60%	5.86	5.93	59%	2.58	2.64	57%	4.39	4.45	59%	9.55	9.61	60%	0.19	0.29	24%	3.97	4.07	56%
Cocoa powder	3	0.02	0.35	33%	1.19	1.36	67%	0.04	0.15	33%	0.01	0.11	33%	1.69	1.74	67%	0.08	0.18	33%	0.00	0.11	0%	0.00	0.34	0%
Coffee powder	28	2.33	2.46	21%	3.09	3.22	25%	2.57	2.69	25%	1.20	1.32	21%	1.98	2.09	25%	3.76	3.87	29%	0.04	0.19	4%	1.96	2.10	21%
Dried tea	30	8.37	8.38	97%	7.90	7.91	93%	9.91	9.91	97%	4.30	4.30	97%	7.20	7.21	93%	16.48	16.49	93%	0.36	0.42	47%	6.51	6.51	97%
Other	2	0.00	0.50	0%	0.42	0.87	50%	0.00	0.16	0%	0.00	0.15	0%	0.00	0.15	0%	0.80	0.88	50%	0.00	0.15	0%	0.00	0.50	0%
Alcoholic beverages	30	0.00	0.01	3%	0.00	0.01	7%	0.00	0.01	3%	0.00	0.01	3%	0.00	0.03	0%	0.01	0.02	30%	0.00	0.03	0%	0.00	0.04	0%
Meat	777	0.29	0.32	41%	0.39	0.43	40%	0.20	0.23	32%	0.14	0.16	40%	0.15	0.21	21%	0.47	0.49	61%	0.03	0.09	4%	0.10	0.17	12%
Barbecued meat	39	1.92	1.92	100%	0.70	0.72	36%	1.86	1.87	77%	0.56	0.57	74%	0.71	0.73	44%	0.72	0.74	36%	0.51	0.53	41%	0.86	0.87	64%
Grilled meat	53	0.61	0.63	57%	0.56	0.57	66%	0.32	0.33	62%	0.15	0.17	32%	0.49	0.53	36%	0.79	0.79	66%	0.01	0.07	4%	0.35	0.39	36%
Other	123	0.05	0.10	27%	0.06	0.11	37%	0.04	0.10	46%	0.02	0.06	34%	0.03	0.10	17%	0.10	0.15	56%	0.00	0.06	1%	0.02	0.11	5%
Smoked meat	562	0.20	0.23	39%	0.42	0.47	37%	0.10	0.14	23%	0.13	0.15	39%	0.11	0.16	19%	0.50	0.52	63%	0.01	0.07	2%	0.04	0.12	7%
Fish and seafood	1031	1.26	1.30	51%	3.96	4.01	54%	1.77	1.84	54%	0.69	0.75	45%	0.57	0.64	38%	4.24	4.31	62%	0.17	0.25	19%	0.58	0.71	32%
Cephalopods	5	0.00	0.10	0%	0.00	0.09	0%	0.00	0.09	20%	0.00	0.09	0%	0.00	0.09	20%	0.01	0.10	20%	0.00	0.09	0%	0.00	0.09	0%
Fresh fish	69	0.02	0.11	7%	0.01	0.11	10%	0.02	0.13	14%	0.01	0.11	13%	0.01	0.12	1%	0.03	0.13	23%	0.00	0.11	0%	0.01	0.24	1%
Preserved fish	421	2.21	2.26	46%	8.42	8.47	46%	2.30	2.39	50%	0.69	0.77	40%	0.56	0.68	27%	7.97	8.05	56%	0.24	0.35	11%	0.76	0.95	23%
Smoked fish	336	0.29	0.34	40%	0.56	0.61	52%	0.30	0.39	46%	0.13	0.18	33%	0.16	0.22	30%	0.75	0.84	63%	0.03	0.09	6%	0.14	0.26	19%
All bivalve molluscs	200	1.34	1.35	66%	1.75	1.77	66%	3.75	3.77	90%	1.89	1.90	90%	1.42	1.44	89%	3.81	3.82	86%	0.32	0.37	64%	1.15	1.16	86%
Fresh bivalve molluscs	187	1.34	1.36	87%	1.75	1.77	86%	3.81	3.82	88%	1.92	1.93	88%	1.43	1.45	88%	3.78	3.80	86%	0.33	0.37	64%	1.16	1.17	86%
Smoked bivalve molluscs	13	1.28	1.28	100%	1.77	1.77	92%	2.99	2.99	100%	1.41	1.41	100%	1.24	1.24	100%	4.15	4.16	92%	0.25	0.28	54%	1.00	1.01	92%
Dairy	61	0.08	0.13	43%	0.06	0.12	23%	0.04	0.10	26%	0.04	0.08	38%	0.01	0.09	13%	0.10	0.14	39%	0.00	0.08	0%	0.00	0.11	3%
Other dairy	29	0.03	0.12	10%	0.05	0.14	14%	0.04	0.12	21%	0.01	0.09	10%	0.00	0.11	0%	0.05	0.13	26%	0.00	0.11	0%	0.00	0.16	0%
Smoked cheese	32	0.13	0.14	72%	0.07	0.10	31%	0.06	0.07	31%	0.06	0.07	66%	0.03	0.07	25%	0.14	0.15	50%	0.00	0.05	0%	0.01	0.06	6%
Miscellaneous	576	1.45	1.48	39%	2.77	2.80	55%	2.84	2.88	58%	0.89	0.91	42%	1.16	1.20	50%	5.12	5.13	74%	0.25	0.29	10%	0.91	0.96	28%
Food supplements	263	2.78	2.82	46%	5.31	5.34	64%	5.61	5.63	64%	1.73	1.76	53%	2.29	2.32	59%	10.03	10.05	74%	0.49	0.54	19%	1.80	1.85	36%
Other	13	0.27	0.46	62%	0.22	0.42	38%	0.40	0.46	62%	0.17	0.23	46%	0.21	0.28	54%	0.42	0.48	54%	0.00	0.10	8%	0.16	0.38	31%
Spices	10	3.50	3.51	60%	8.21	8.24	70%	3.54	3.55	80%	1.89	1.91	60%	1.50	1.53	60%	7.94	7.98	30%	0.39	0.42	10%	1.23	1.27	50%
Infant food	270	0.02	0.05	27%	0.03	0.05	46%	0.04	0.05	50%	0.01	0.03	29%	0.02	0.05	41%	0.09	0.10	77%	0.00	0.03	0%	0.01	0.05	16%
Total	4065																								

N: Number of samples

Tableau 12. Concentrations en BaP ou sommes de HAP dans diverses denrées alimentaires ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Country	Average exposure Whole population				High exposure Sum of P97.5 for cereals and seafood + average exposure for whole population			
	BaP	PAH2	PAH4	PAH8	BaP	PAH2	PAH4	PAH8
Belgium	232	637	1158	1732	393	1101	2108	3138
Bulgaria	209	560	1020	1526	385	1053	2027	3018
Czech Republic	239	654	1196	1777	426	1207	2328	3449
Denmark	223	617	1135	1690	299	818	1545	2300
Finland	185	535	978	1422	231	623	1155	1693
France	245	655	1220	1814	380	1021	1966	2921
Germany	255	681	1258	1888	422	1194	2311	3439
Hungary	231	647	1168	1716	314	877	1636	2410
Iceland	205	558	1039	1522	694	2232	4486	6568
Ireland	238	646	1188	1793	370	1049	2013	3009
Italy	255	719	1332	1962	487	1502	2943	4322
Netherlands	239	658	1197	1785	535	1687	3318	4886
Norway	252	765	1449	2136	461	1470	2900	4262
Slovakia	244	626	1158	1727	709	1905	3769	5601
Sweden	230	621	1168	1719	364	1003	1949	2876
United Kingdom	188	499	936	1415	315	854	1661	2489
Median EU	235	641	1168	1729	389	1077	2068	3078

EU: European Union

PAH2=BaP+Chrys

PAH4=BaP+Chrys+BaA+BbFA

PAH8=BaP+Chrys+BaA+BbFA+BkFA+BghiP+DBahA+IP (ces 8 HAP sont communs à la liste EFSA et la liste US-EPA).

On l'a vu, les produits laitiers et donc le lait, sont faiblement contaminés en molécules natives de HAP, comparativement à de nombreux autres aliments. De plus, il a été observé que les HAP les plus toxiques, qui possèdent au minimum 4 cycles, étaient peu retrouvés dans le lait sous leur forme native dans le lait de ruminant laitier (Grova et al., 2002 ; Lapole et al., 2007).

Dès lors, pourquoi vouloir s'intéresser à l'exposition du ruminant laitier aux HAP et aux transferts de HAP vers le lait issu de cette exposition?

1.5.2 Pourquoi s'intéresser à l'exposition du ruminant laitier aux HAP et aux transferts de HAP vers le lait?

A cette question toute simple nous pouvons apporter 4 éléments de réponse :

↳ **Manque de données scientifiques.** Tout d'abord, trop peu de données existent sur le transfert de HAP sous forme native vers le lait de ruminant laitier. De plus, ces données ne concernent pas les mêmes jeux de HAP, ce qui complique ou empêche des comparaisons fiables entre les études. Par exemple Grova et al. (2002) ont identifié des concentrations en HAP comprises entre 0.86 et 1.32 µg/kg de lait en considérant 8 HAP prioritaires de la liste de l'US-EPA (naphtalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorene, anthracène, fluoranthène, pyréne et benzo(a)anthracène). Kishikawa et al. (2003) ont trouvé 2 µg/kg de lait en considérant les 12 HAP les plus lourds de la liste de l'US-EPA (du phénanthrène au benzo(g,h,i)perylène).

↳ **Plus de métabolites que de molécules mères dans le lait et une plus grande toxicité des métabolites.** Il a été démontré que l'excrétion de HAP sous formes métabolisées vers le lait pouvait être nettement supérieure à l'excrétion de ces mêmes HAP sous forme native. Lapole et al. (2007) ont ainsi mis en évidence, via une exposition orale aiguë de chèvres à du pyrène, que ce dernier était environ 70 fois moins excrété vers le lait que le 1-hydroxypyrene. Grova et al. (2005) ont observé que la somme des quantités de 1, 2, 3, 4 ou 9-hydroxyphénanthrène et de 9,10-dihydroxyphénanthrène retrouvées dans le lait correspondait à environ 95% du phénanthrène ingéré. Or, comme vu plus haut, il est avéré que la métabolisation des HAP peut conduire à des formes dérivées plus toxiques/cancérogènes que les molécules natives correspondantes, en particulier les formes diol-époxydes. Ceci démontre clairement que le suivi de la contamination du lait par les HAP devrait se faire sous forme native ET métabolisée.

↳ **Transferts potentiellement importants vers le lait humain.** Le transfert de HAP sous forme métabolisée ou non vers le lait humain a également été mis en évidence par del Bubba et al., en 2005. Ces derniers ont démontré que la somme des 11 HAP suivants : naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthène et benzo(k)fluoranthene pouvait atteindre 6.95 µg/kg de lait maternel, lors d'une première lactation, chez une femme non fumeuse exposée à un environnement pollué. Un enfant de moins de 6 mois ingérant environ 750 mL de ce lait par jour ingèrerait ainsi autant voire plus de HAP par jour qu'un adulte de 70 kg, si on garde une exposition journalière aux 16 HAP de l'US EPA comme référence.

Par ailleurs, Kim et al. ont observé en 2008 que le lait maternel pouvait correspondre à 81.4 % de la dose journalière de HAP chez l'enfant ce qui est compatible avec les résultats obtenus par del Bubba. Enfin, Zanieri et al. (2007), en se penchant sur le lait de femmes italiennes fumeuses et primipares, ont mis en évidence que ce dernier pouvait être contaminé à hauteur de 145 µg de HAP/kg (16 HAP de l'US-EPA) avec un TEQ de 11 µg de BaP/kg de lait environ, ce qui est extrêmement élevé, surtout si l'on tient compte du fait que les quantités de métabolites, comme vu plus haut, sont beaucoup plus importantes que celles des molécules mères dans le lait. L'impact de l'ingestion d'un lait aussi contaminé chez le jeune nourrisson sur son développement neuro-comportemental et physiologique est absolument inconnu.

↳ **La consommation de lait est particulièrement importante en Europe.** Exprimée en équivalent kg de lait par habitant et par an, cette consommation est de l'ordre de 309 kg/habitant/an en Europe et 371 kg/habitant/an en France (source AGRESTE Primeur, 2008). Le tableau 13 représente la répartition des kg équivalent lait consommés, en 2006, 2007 et 2008, par habitant en Suisse (source TSM Fiduciaire, 2009). Ces données montrent l'importance du lait et des produits laitiers dans notre alimentation puisque, par exemple en France, nous consommons en moyenne plus de 1 kg d'équivalent lait par habitant et par jour.

Tableau 13. Répartition des kg équivalent lait consommés, en 2006, 2007 et 2008, par habitant en Suisse (source TSM Fiduciaire, 2009).

Produits	2006 (kg/habitant)	2007 (kg/habitant)	2008 (kg/habitant)
Lait de consommation	79.0	77.7	75.6
Boissons lactées	8.5	8.5	10.1
Yogourt	17.9	18.1	18.4
Beurre	5.6	5.7	5.8
Crème de consommation	8.2	8.4	8.5
Fromage et fromage fondu	20.0	20.8	21.2
Consommation totale en EL*	392.0	404.0	394.0

*EL : Equivalent Lait

La conjonction des 4 points évoqués ci-dessus justifie pleinement que l'on s'intéresse à l'exposition du ruminant laitier aux HAP dans un souci de sécurisation des produits laitiers et d'information des collectivités, ce questionnement pouvant être étendu aux autres POP que sont les HAPH (hydrocarbures aromatique polycyclique halogénés tels que les PCB et les PCDD et PCDF).

Mais comment procéder pour évaluer cette exposition ?

1.6 Evaluer l'exposition du ruminant laitier aux HAP et plus généralement aux autres POP tels que les HAPH

L'évaluation de l'exposition du ruminant laitier, comme de tout autre animal, aux HAP et HAPH peut en théorie s'effectuer via deux approches différentes :

1.6.1 Par l'approche analytique globale ou « *biological monitoring* »

Cette dernière consiste en l'évaluation de l'exposition à une molécule polluante via la mesure de cette molécule elle-même, ou de ses métabolites, dans l'air exhalé, l'urine, le sang et tous les autres compartiments corporels de l'animal exposé. Il est évident qu'une telle approche systématique peut rapidement devenir extrêmement coûteuse financièrement mais également coûteuse en temps et en énergie, surtout si l'on souhaite étudier une exposition à un groupe de molécules et à leurs métabolites respectifs et non plus à une seule molécule et à ses métabolites respectifs. Et même s'il était entrepris de l'appliquer, l'analyste se heurterait à (i) une

connaissance partielle des différentes formes métaboliques existantes ; (ii) à l'absence de disponibilité commerciale de certains standards analytiques nécessaires au dosage des métabolites ; (iii) à la problématique de l'extraction souvent délicate des molécules mères et de leurs métabolites à partir de matrices biologiques complexes (ex : lait, sang, urine, muscle, foie, intestins....) ; (iv) à la nécessité de disposer de standards internes appropriés (par exemple deutérés), et donc absent de la matrice biologique étudiée. Or ces standards sont encore trop souvent inaccessibles commercialement, que cela soit pour les métabolites de HAP ou d'autres POP.

De même, vouloir établir de manière analytique un profil d'exposition journalière de l'animal aux molécules natives de HAP et HAPH via une étude sur son alimentation peut se révéler très coûteux. Et d'un point de vue pratique, même si cela était possible, l'utilité d'une telle approche systématique serait limitée car il faudrait pouvoir relier les niveaux de contamination obtenus à des contaminations en molécules natives et métabolisées dans le produit animal (lait dans cette étude) via la définition préalable de taux de transfert nécessitant des expérimentations animales lourdes. Et ces taux de transfert sont eux-mêmes susceptibles d'être affectés (i) d'une espèce de ruminant laitier à l'autre (vache, chèvre, brebis) ; (ii) par la biodisponibilité probablement variable des POP ingérés en fonction de la matrice contaminée ; (iii) par l'état physiologique des animaux, et bien sûr (iv) par le niveau d'aptitude de l'organisme à métaboliser le « cocktail de POP » auquel il est confronté via son alimentation (phénomènes de compétition/saturation éventuels).

Tous ces éléments pouvant potentiellement interagir, on conçoit alors plus concrètement le challenge que constitue la volonté de fournir aux toxicologistes environnementaux et alimentaires des données d'exposition des ruminants laitiers aux POP et des données de transferts de ces POP vers les produits animaux, sous forme métabolisée ou non. (Levin,1995)

1.6.2 Par l'utilisation du concept de biomarqueurs d'exposition

Le concept de biomarqueur d'exposition, nous allons le voir, a pour but de contourner les limitations inhérentes à l'approche analytique globale décrite ci-dessus. Afin de bien comprendre ce qu'est un biomarqueur d'exposition, il nous semble important de le définir en même temps que deux autres types de biomarqueurs que sont les biomarqueurs d'effets et les biomarqueurs de prédisposition. Nous focaliserons ensuite notre attention sur un biomarqueur spécifique d'exposition aux HAP : le 1-hydroxypyrene.

1.7 Les différentes classes de biomarqueurs

Les biomarqueurs sont largement définis comme des indicateurs de signalisation d'événements dans des systèmes ou des échantillons biologiques. Ils ont été classés en trois catégories : des marqueurs d'exposition, les marqueurs d'effet, et les marqueurs de prédisposition (NAS / NRC, 1989) qu'il convient de bien distinguer:

Le biomarqueur d'exposition, très important en toxicologie environnementale, est une substance xénobiotique ou un de ses métabolites, ou bien le produit d'une interaction entre un xénobiotique et une molécule ou cellule cible, quantifiée dans un compartiment donné d'un organisme (NAS/NRC 1989). Le meilleur biomarqueur d'exposition est généralement la substance elle-même, ou bien un métabolite spécifique de cette substance dans un fluide interne (sang, lymph, bile) ou excrété (urine). Cependant, plusieurs facteurs peuvent complexifier les interprétations liées aux mesures de biomarqueur. La charge corporelle en une substance donnée peut, par exemple, être le fruit de plusieurs sources d'exposition (air, eau, aliments solides et même terre) et de plusieurs voies d'exposition (alimentaire, respiratoire, cutanée). La substance mesurée peut-être le métabolite d'un autre xénobiotique (par exemple, de hautes teneurs en phénol urinaire peuvent être la résultante de la métabolisation de plusieurs composés aromatiques différents). De plus, avant même la quantification de la substance d'intérêt, cette dernière (ainsi que ses métabolites) peut avoir plus ou moins disparu en fonction de sa demi-vie et des conditions environnementales (durée et voie d'exposition).

Le biomarqueur d'effet est défini comme toute altération biochimique, physiologique ou autre au sein d'un organisme qui, en fonction de son intensité, peut être reconnue comme indiquant un handicap ou une maladie potentielle ou établie (NAS/NRC 1989). Cette définition inclut: (i) des signaux cellulaires ou biochimiques liés à des dysfonctionnements tissulaires (augmentation d'une activité enzymatique hépatique par exemple), (ii) les signes de dysfonctionnement physiologique tels qu'une augmentation de pression sanguine ou une décroissance de la capacité pulmonaire. Ces marqueurs sont souvent non substances-spécifiques. Par ailleurs, ils n'ont pas forcément un caractère négatif immédiat, mais peuvent indiquer des problèmes de santé potentiels (adduits ADN).

Le biomarqueur de prédisposition est un indicateur de limitation innée ou acquise d'un organisme dans son aptitude à répondre à une exposition à un xénobiotique donné. Cela

peut être un marqueur génétique (ex. gène de prédisposition au diabète) ou bien une pathologie préexistante qui résulte en une augmentation de la dose absorbée, de la dose biologiquement active, ou de la réponse des tissus cibles.

D'autres définitions plus ou moins génériques, mais néanmoins intéressantes, de biomarqueurs d'exposition ont été proposées par d'autres auteurs.

Selon van Gestel et van Brummelen (1996), un biomarqueur d'exposition se définit comme " toute réponse biologique à un produit environnemental constatée à un niveau inférieur à celui de l'individu. Cette réponse doit être mesurée dans un organisme ou dans ses produits et indiquer un changement par rapport à l'état normal. Cette réponse ne peut être détectée chez un organisme sain". Un biomarqueur représente donc une signature biologique de l'impact ou de la présence du xénobiotique dans l'organisme, et non la mise en évidence directe de celui-ci. Les biomarqueurs peuvent donc être des changements moléculaires, biochimiques, physiologiques histologiques et morphologiques spécifiques dans des populations d'animaux et de plantes, observés après une exposition à un polluant.

Une définition plus récente présente enfin le biomarqueur d'exposition comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic et al., 1997).

Ces deux dernières définitions, nous le verrons plus loin, permettent de considérer l'activité EROD comme un biomarqueur d'exposition aspécifique à diverses familles de xénobiotiques,

1.7.1 Etude du tryptique « biomarqueur, animal, concentration en polluant(s) dans le milieu »

L'objectif principal de la présente étude étant d'évaluer plus rapidement et simplement le niveau d'exposition globale spécifique aux HAP (mais également le niveau d'exposition aspécifique à diverses familles de polluants incluant les HAP, les PCDD et PCDF, les PCB...) du ruminant laitier, c'est donc sur le concept de biomarqueur d'exposition que nous focaliserons notre attention. Ceci implique de définir précisément ce que nous entendons par « exposition globale » en considérant le trinôme « biomarqueur, concentration du polluant dans le milieu, individu » sur lequel Gestel et Brummelen (1996) insistent afin d'utiliser correctement le concept de biomarqueur d'exposition (Figure 12).

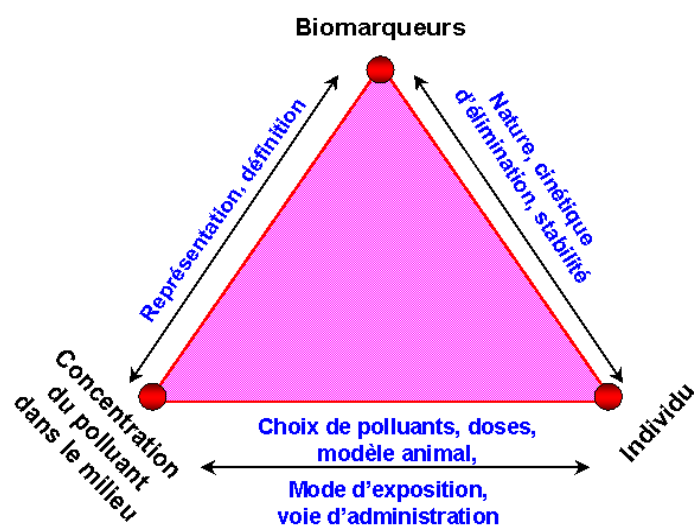


Figure 12. Relations entre les biomarqueurs d'exposition, l'individu et la concentration du polluant dans le milieu (van Gestel et van Brummelen, 1996)

↳ Relation entre concentration du polluant dans le milieu et l'individu ou l'animal : du point de vue expérimental, cette dernière implique divers questionnements relatifs à :

- (i) la pertinence du choix des polluants considérés par l'étude : les données bibliographiques collectées montrent clairement l'intérêt du choix des HAP (POP, origines, quantités, métabolisation, caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques).
- (ii) L'intérêt du modèle animal choisi (ruminant laitier) : ce dernier est réel car des transferts de HAP sous forme native ou métabolisée ont été mis en évidence dans le lait et trop peu de données existent à ce jour concernant les coefficients de transfert dans les matrices lait et urine.
- (iii) La pertinence des doses de HAP utilisées : pour mettre en évidence de manière nette une relation entre biomarqueur et HAP, des expositions supérieures à celles observées en général pourront être utilisées. Mais, afin de valider la fiabilité du biomarqueur il faudra aussi utiliser des niveaux d'exposition réalistes en utilisant de faibles doses.

- (iv) La pertinence du mode d'exposition (aigüe, chronique) : le mode chronique est certainement le plus approprié dans le cadre d'une évaluation globale et continue.
- (v) La pertinence de la voie d'administration (alimentaire orale ou intra-péritonéale, respiratoire) : l'alimentation par voie orale est bien sûr la plus pertinente, au regard des données bibliographiques collectées.

↳ Relation entre biomarqueur et individu : cette relation implique une réflexion sur :

- (i) La nature du biomarqueur quantifié: il a été dit précédemment que la molécule polluante elle-même ou un de ses métabolites représentait le meilleur biomarqueur. Comme nous le verrons plus loin, l'utilisation du 1-OH pyrène, métabolite hydroxylé majeur du pyrène, comme biomarqueur d'exposition, représente un choix « à priori » intéressant.
- (ii) La cinétique d'élimination (sous forme métabolisée ou native) du biomarqueur et sa compartimentation : en effet, il faut que le biomarqueur soit quantifiable au sein d'un compartiment (sang, urine, lait, organe) qui représente le meilleur compromis en termes d'échantillonnage et de facilité d'extraction ultérieure.
- (iii) Si le biomarqueur retenu est un métabolite d'un des HAP dont on souhaite évaluer les concentrations environnementales, il faut absolument s'assurer qu'à de forts niveaux d'exposition aux HAP, sa biosynthèse ne sera pas affectée par une compétition inter-HAP pour l'accès aux systèmes enzymatiques à CYP450. Si c'était le cas, le potentiel bio-indicateur du métabolite en question deviendrait alors totalement nul, car sa teneur ne serait plus représentative de sa propre molécule mère, et encore moins des molécules natives voisines.
- (iv) La stabilité du biomarqueur dans sa matrice durant le stockage à froid avant extraction et dosage.

↳ Relation entre biomarqueur et concentration du polluant dans l'environnement : cette relation implique une réflexion sur :

- (i) La représentativité du biomarqueur par rapport à la ou aux molécules dont il est sensé définir le niveau d'exposition. Ceci est particulièrement important dans la présente étude, dans la mesure où l'un de nos objectifs majeurs est d'évaluer

un niveau d'exposition globale aux HAP à partir du dosage d'un seul biomarqueur dans une matrice qui soit la plus appropriée possible.

- (ii) La définition de l'expression « exposition globale aux HAP ». Nous entendons par cette expression, une exposition indépendante de la ou des sources de HAP ainsi que de la ou des voies d'exposition aux HAP. Que le biomarqueur choisi soit une des molécules de HAP elle-même ou un de ses métabolites, sa teneur dans la matrice d'étude (sang, lait, urine...) doit pouvoir être reliée de manière concrète à celle des autres molécules de HAP d'intérêt, à savoir, dans notre cas, les HAP appartenant à la liste des 16 HAP de l'US-EPA.

1.7.2 Les biomarqueurs utilisés pour identifier ou quantifier l'exposition aux HAP

L'absorption de HAP dans l'organisme est en général évaluée (qualitativement ou pseudo-quantitativement) par la détection de différents types de marqueurs biologiques tels que les métabolites de HAP, les HAP-adduits de protéines et les HAP-adduits à l'ADN (Ferreire et al., 1994). L'un d'eux, le 1-hydroxypyrene (1-OH pyrene) apparaît comme étant un marqueur d'exposition aux HAP (Jongeneelen et al., 1985; Buchet et al., 1992; Boogard et Van Sittert, 1994; Bouchard et al, 1998; Lafontaine et al., 2000; Carbannelle et Buchet, 2002).

1.7.3 Le 1-Hydroxypyrene dans l'urine

Un métabolite spécifique du pyrene, le 1-hydroxypyrene, a été proposé comme biomarqueur de l'exposition aux HAP (Jongeneelen et al., 1985). Le pyrene, un HAP à 4 cycles cancérigène au caractère toxique modéré, à la cancérogénicité constatée et à l'aptitude cancérigène non confirmée chez l'humain, se retrouve en effet en quantités relativement élevées dans les mélanges de HAP environnementaux (Jongeneelen et al., 1985; Buchet et al., 1992). De nombreux rapports de différentes sources ont confirmé le potentiel intéressant de la méthode, sans toutefois dépasser le stade semi-quantitatif (Jongeneelen et al., 1992 ; Pan et al., 1998 ; Wu et al., 1998). En d'autres termes, ces auteurs ont simplement mis en évidence une évolution en 1-OH pyrene urinaire lorsque l'individu ou l'animal considéré par l'étude était exposé à des environnements à priori plus pollués que d'autres. Mais, aucune équation permettant de relier la concentration en 1-OH pyrene urinaire à un niveau d'exposition aux HAP n'a été proposée dans ces études.

Récemment, le 1-OH pyrene glucuronidé a également été proposé comme un indicateur de l'exposition, puisque la majorité du 1-OH pyrene est glucuroconjuguée (Giessing et al, 2003 ; Strickland et al., 1994).

Ces dernières années, et malgré un manque d'approche réellement quantitative, l'utilisation du 1-OH pyrène comme biomarqueur de l'exposition aux HAP dans les urines animales (Bouchard et al, 1998, 2002 chez le rat) ou humaines s'est généralisée. En effet le 1-OH pyrène apparaît comme un bon indicateur biologique du niveau d'exposition au pyrène (Raszyk et al., 1999 ; Bouchard et Viau, 1998 ; Buratti et al., 2000 ; Hollender et al., 2000 ; Cho et al., 2000 ; Jongeneelen, 2001 ; Jacob et Seidel, 2002). Etant donnée que le pyrène est ubiquitaire dans de nombreux biotopes, son utilisation comme bioindicateur pour l'ensemble des HAP a été suggérée (Jongeneelen, 2001), et l'étude de Ciganek et al. en 2002 confirme son intérêt.

De nombreuses études ont par ailleurs montré que le 1-OH pyrène pouvait être employé comme métabolites indiquant la présence de HAP dans l'environnement professionnel, (Gimmer et al., 1993 ; Jongeneelen et al., 1985 ; Becher et Bjorseth, 1983 ; Jacob et Seidel, 2002; Ciganek et al., 2002). Il a ainsi été utilisé comme biomarqueur d'exposition potentiel aux HAP chez les ouvriers dans une usine fabricant des cibles pour le tir (Lafontaine et al., 2000), dans l'industrie pétrochimique (Boogard et Van Sittert, 1994), dans une usine fabricant des anodes de charbon (Perty et al., 1996), à proximité de fours à coke (Van Rooij et Bodelier-Bade, 1993) et également sur des sites de production d'aluminium (Vu-Duc et Lafontaine, 1996).

Dans l'étude menée en Thaïlande par Chetianukornkul et al. (2006), dix métabolites de HAP possédant 2 à 4 cycles ont été quantifiés dans l'urine. Ceci a permis de mettre en évidence des différences d'exposition globale importantes entre individus exposés en milieu rural et individus exposés en milieu urbain, avec, une fois n'est pas coutume, une concentration en métabolites significativement plus élevée en zone rurale par rapport à la zone urbaine. Ce résultat original a été attribué au fait que dans la campagne thaïlandaise, la population n'a pas ou peu accès au gaz et à l'électricité et prépare donc sa nourriture au feu de bois. Les cultures sur brûlis sont également importantes dans le pays.

Li et al. (2000) ont également constaté que la concentration urinaire de 1-OH pyrène est fortement corrélée avec le nombre de cigarettes fumées. Chez certains gros fumeurs par exemple, les concentrations de 1-OH pyrène urinaire, peut être 30 fois plus élevées que dans l'urine des non-fumeurs.

On estime que le tabagisme et l'alimentation sont les plus importantes sources d'ingestion des HAP (IARC, 1983). L'inhalation de l'air en milieu urbain peut être une autre source. En 1994, Vanrooij et al. ont étudié les sources de la variation inter-individuelle de 1-OH pyrène urinaire. Ils ont conclu que le tabagisme et l'alimentation sont les principaux

facteurs contribuant à la variation. Aux Etats-Unis, Huang et al., (2006) ont analysé le 1-OH pyrene dans 2312 échantillons d'urine démontrant son aptitude à être utilisé à large échelle pour évaluer l'exposition de la population aux HAP.

1.7.4 Métabolisme du pyrène

Le pyrène est métabolisé en intermédiaire 1-hydroxypyrène pour former le 1-hydroxypyrène-glucuronide, qui est excrétée (Jongeneelen, 1987). Le 1,2-dihdropyrène a été signalé comme étant présent dans l'urine humaine comme un métabolite mineur (Grimmer et al., 1993). Le métabolisme du pyrène, vu par Lange et al. (1994) s'amorce par une oxydation au niveau des liaisons 1-2 et 4-5, avec le 1-OH pyrène comme métabolite principal (Figure 13). Celui-ci a été détecté dans l'urine de porc suite à une ingestion unique de pyrène (Keiming et al., 1983). Boyland et Sims (1964) ont mis en évidence les formes conjuguées du 1-OH pyrène à l'acide sulfurique ou l'acide glucoronique, le 1,6 et le 1,8-dihdropyrène et le trans-4,5-dihydro-pyrène dans l'urine de rat et de lapin suite à une injection intrapéritonéale de pyrène. Plusieurs de ces métabolites ainsi que deux dérivés trihydroxylés ont été identifiés dans des microsomes de rat isolés, suite à l'incubation de pyrène (Sims, 1970, Jacob et al., 1982).

Le tableau 14 représente une synthèse des études dans lesquelles des métabolites de HAP ont été étudiés comme bioindicateurs potentiels d'exposition aux HAP. La forme 1-OH pyrène est systématiquement utilisée. Ces études sont soit uniquement qualitatives soit pseudo-quantitatives au sens où aucune d'entre elles ne fournit d'équation de transfert claire de type « dose/réponse » utilisables pour évaluer un niveau d'exposition aux HAP.

Dans la présente étude nous utiliserons un mélange de trois HAP : phénanthrène (3 cycles), pyrène (4 cycles), benzo(a)pyrène (5 cycles). Le métabolisme du phénanthrène est présenté en annexe. Le métabolisme du benzo(a)pyrène a été évoqué plus haut.

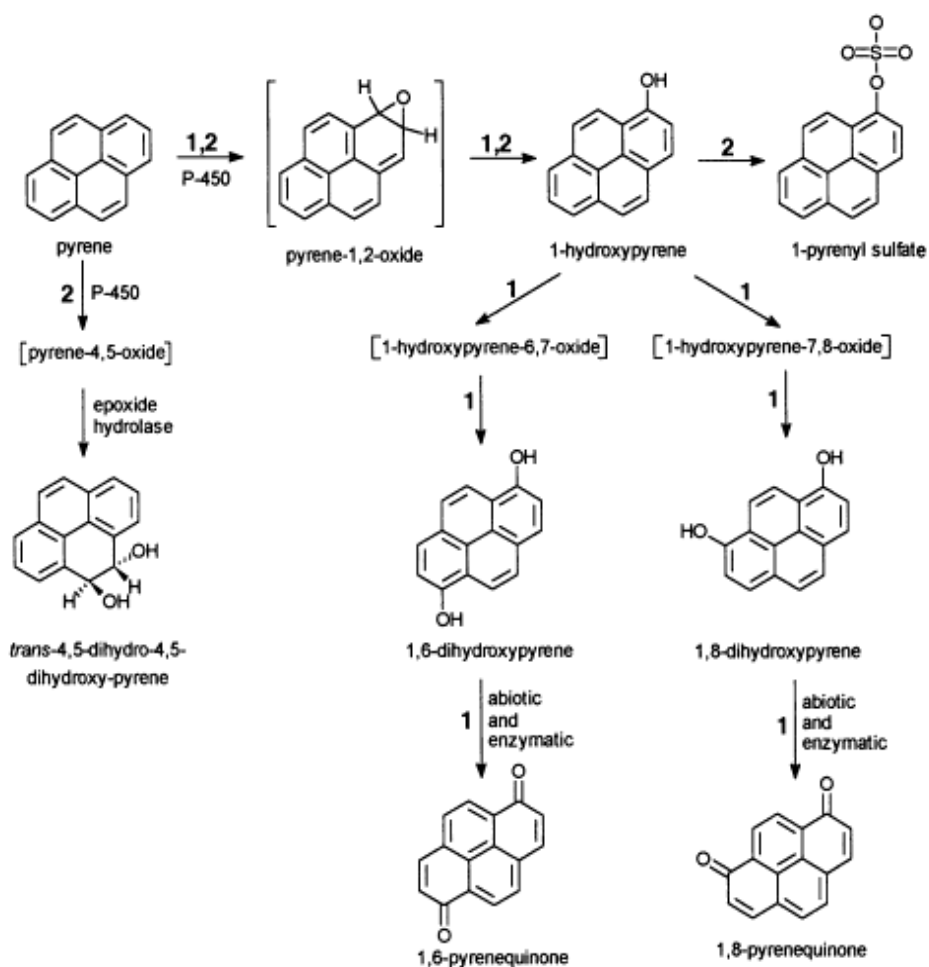


Figure 13. Métabolisme du pyrène (Lange et al., 1994)

Tableau 14. Etudes ayant utilisé des métabolites de HAP comme bioindicateurs d'exposition qualitatifs ou pseudo-quantitatifs aux HAP chez différentes espèces et dans différents compartiments.

Bioindicateur d'exposition	Compartiment étudié	Espèce	Qualitatif / pseudo-quantitatif -/+	Référence
OH Naphtalène, OH Fluorène, OH Phenanthrène, OH Fluoranthène, OH Pyrène	Urine	Homme	-	Chetianukornkul et al., 2006
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Yilmazer et al., 2006
1-OH Pyrène, 3OH Phenanthrène	Urine	Homme	-	Huang et al., 2006
1-OH Pyrène	Urine	Enfants	-	Hansen et al., 2005
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Jacob et Seidel, 2004
Naphtols, Phenanthrols, 1-OH pyrène	Urine	Rat	+	Elovaara et al., 2003
1-OH Pyrène	Foie, pancrès	isopodes	+	Stroomberg et al., 2002
3-OH B(a)P	Plasma, foie, urine, fecés	rat	+	Ramesh et al., 2001
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Lafontaine et al., 2000
1-OH Pyrène	Urine	Enfants	-	Vyskocil et al., 2000
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Bouchard et Viau, 1999
1-OH Pyrène	Urine, Bile	Rat	+	Bouchard et Viau, 1998
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Brzeznicki et al., 1997
1-OH Pyr, 3-OH B(a)P	Sang, Fèces, Urine	Rat	+	Van Schooten et al., 1997
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Lafontaine et vu-Duc, 1996
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Vu-Duc et al., 1996
1-OH Pyrène	Urine	Homme	-	Booggard et al., 1994

1.8 Conclusion

Ce chapitre bibliographique a abordé successivement, la production, les propriétés physico-chimiques, la toxicité, et le métabolisme des HAP. L'exposition de l'homme et des animaux d'élevage, en particulier des ruminants laitiers, aux HAP a ensuite été discutée et a montré que (i) la voie orale constituait environ 90% de l'exposition aux HAP; (ii) chez un ruminant laitier telle que la vache laitière, l'ingestion de fourrage et, dans une moindre mesure de sol contaminés, pouvait conduire à des niveaux de contamination journaliers (en $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$) très nettement supérieurs à ce qui est rencontré chez l'humain et (iii) les taux de transfert de HAP vers le lait sous formes métabolisées étaient bien plus élevés que les taux de transfert des molécules natives correspondantes, ces dernières représentant une source d'exposition mineure en terme de consommation humaine de lait et produits laitiers (EFSA, 2008). Indépendamment des aspects « transfert mère-jeune », la méconnaissance de la toxicité liée aux métabolites, associée à une forte consommation de lait et produits laitiers (environ 400 kg équivalent lait/habitant/an en France et en Suisse), pose en revanche la question de l'évaluation de l'exposition du ruminant laitier aux HAP comme outil d'évaluation du risque. Nous avons vu qu'une approche exhaustive de cette exposition, prenant en compte les molécules natives comme les métabolites de HAP, était impossible pour des raisons techniques, matérielles et éthiques. La notion de bioindicateur d'exposition aux HAP a finalement été abordée en tant qu'alternative partielle, pratique et préalable à toute analyse plus exhaustive de l'exposition aux HAP en terme qualitatif et quantitatif. C'est sur cette notion de bioindicateur d'exposition que le présent travail de thèse a porté.

Les chapitres suivants sont consacrés à l'étude de deux bioindicateurs métaboliques potentiels de l'exposition du ruminant laitier aux HAP:

↳ Le 1-OH pyrène en tant que bioindicateur spécifique de l'exposition au pyrène et plus généralement aux autres HAP.

↳ L'activité éthoxyresorufin-o-deethylase (EROD) dans les lymphocytes de sang périphérique (PBL) en tant que bioindicateur d'exposition aspécifique aux HAP. Cette activité étant inducible par tout POP CYP450 1A1 et 1B1 inducteur.

Chapitre II :
Evaluation du 1-OH pyrène comme bioindicateur d'exposition du ruminant laitier à des doses modérées à fortes de HAP en mode subchronique (7 jours)

Chahin, A., Guiavarc'h, Y.P., Dziurla, M.A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2008. 1-Hydroxypyrene in milk and urine as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of ruminants. J. Agric. Food Chem. 56, 1780-1786.

2.1 Introduction chapitre II

Le 1-hydroxypyrene (1-OH pyrène) urinaire, nous l'avons vu dans le précédent chapitre, est d'ores et déjà considéré comme un biomarqueur de l'exposition de l'homme et des animaux au pyrène et plus largement aux autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). En revanche, peu de choses sont connues sur la pertinence de son utilisation comme indicateur lorsqu'il est dosé dans une autre matrice plus accessible, telle que le lait. Par ailleurs, aucune équation de transfert de 1-OH pyrène vers l'urine ou le lait n'a encore été proposée comme outil d'évaluation de l'exposition aux HAP, les études préalables se limitant à des approches qualitatives ou semi-quantitatives.

Ce n'est qu'en 2005 que Grova et al. ont pour la première fois mis en évidence, au travers d'une administration orale et unique de phénanthrène chez la chèvre, le transfert d'hydroxymétabolites de HAP, et plus précisément de phénanthrène, vers le lait, en quantité plus faibles que dans l'urine. Les mêmes auteurs avaient auparavant démontré, en 2002, que la lipophilicité des HAP sous forme native n'était pas forcément corrélée à leur taux de transfert vers le lait. En 2006, ils démontrèrent, cette fois-ci au travers d'une exposition orale en mode subchronique (28 jours) à un cocktail de 9 HAP allant du fluorène jusqu'au benzo(g,h,i)perylene, que des hydroxymétabolites de fluorène et de pyrène pouvaient aussi passer dans le lait comme dans l'urine avec des taux de transfert nettement plus élevés dans l'urine que dans le lait. A l'inverse ils observèrent une absence complète des 3 HAP les plus lourds sous leur forme native dans le lait : benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, permettant ainsi d'hypothétiser une absorption très limitée et /ou un transfert vers le lait très limité de ces derniers en raison de leur taille (cinq cycles). En 2007, via une administration orale unique de 100 mg de phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène par la chèvre, Lapole et al. observèrent des pics de concentration plasmatique en ces 3 molécules natives durant les 2 premières heures post-ingestion, suivi d'un retour au niveau basal à environ 16 heures post-ingestion. Ils observèrent également la présence des 3 HAP dans le lait comme dans l'urine, avec des taux de transfert à 24 heures post-ingestion inférieurs à 0.003% sous formes natives et de l'ordre de 1%, 0.1% et 0.001% respectivement pour les 1-OH pyrène, 3-OH phénanthrène et 3-OH benzo(a)pyrène dans le lait.

A ce jour nous savons donc que :

-les taux de transfert de HAP sous forme native sont faibles dans l'urine et très faible dans le lait.

-les molécules natives de HAP à 5 cycles ou plus, bien que retrouvées au niveau sanguin, ne passent pratiquement pas dans le lait.

-Le transfert de HAP sous forme hydroxylée, conjuguée ou non, vers le lait et l'urine, est nettement supérieur au transfert sous forme native. Lapole et al. (2007) ont ainsi observé 70 fois plus de 1-OH pyrène que de pyrène dans le lait (après déconjugaison par glucuronidases et sulfatases).

Le but du présent chapitre était d'acquérir plus d'informations sur le transfert de 1-OH pyrène dans le lait et l'urine au travers d'une exposition orale et multidoses au pyrène en mode subchronique. L'objectif de cette première expérimentation animale était cette fois-ci de tester s'il est envisageable ou non de proposer des équations de transfert de 1-OH pyrène vers le lait ou l'urine et donc d'utiliser ces équations comme outils d'évaluation quantitative de l'ingéré journalier en pyrène par l'animal.

Pour ce faire nous avons soumis 4 chèvres en lactation à l'ingestion d'un mélange de 3 HAP dissous dans de l'huile. Les HAP étudiés ont été les suivants : le phénanthrène, HAP à 3 cycles (TEF=0.001) le plus répandu dans l'environnement et en particulier sur les couverts végétaux (Wagrowski et al., 1997 ; Smith et al., 2001 ; Crépineau et al., 2004 ; Gocht et al., 2007), le pyrène, HAP à 4 cycles (TEF=0.001) systématiquement présent dans les mélanges de HAP environnementaux (Levin, 1995 ; Jongeneelen, 2001), et enfin le benzo(a) pyrène, HAP à 5 cycles (TEF=1) considéré comme référence en termes de toxicité selon US-EPA et l'EFSA.

Lors de cette première expérimentation animale nous avons volontairement décidé d'exposer les chèvres à des doses de HAP supérieures à ce qui peut être observé en zone rurale moyennement exposée afin d'être certains d'obtenir des réponses facilement quantifiables.

Les chèvres ont ainsi été journalièrement exposées à l'ingestion de 1 mg/j, 7 mg/j et 49 mg/j de chaque HAP durant 1 semaine pour chaque dose avec dosage de 1-OH pyrène dans l'urine et le lait à la fin de chaque semaine d'exposition. Cet essai, que nous qualifierons d'essai « aux fortes doses » a fait l'objet d'un article dans *Journal of Agricultural & Food Chemistry* dans lequel seuls les résultats relatifs au 1-OH pyrène, notre bioindicateur potentiel, sont présentés. Les résultats relatifs aux métabolites de phénanthrene et benzo(a)pyrene seront présentés dans le chapitre 3.

1-Hydroxypyrene in Milk and Urine as a Bioindicator of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure of Ruminants

ABIR CHAHIN, YANN P. GUIAVARC'H,* MARIE-ANTOINETTE DZIURLA,
HERVÉ TOUSSAINT, CYRIL FEIDT, AND GUIDO RYCHEN

Research Unit on Animal and Functionality of Animal Products (UR AFPA), Nancy University—Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), ENSAIA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Urinary 1-hydroxypyrene (1-OH-pyrene) is now largely considered to be a valuable biomarker of exposure of man and animals to pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). However, from a practical and agronomic standpoint, the question remains whether such biomarking capability still holds when 1-OH-pyrene is analyzed in milk produced by ruminants. To assess this hypothesis, four goats were daily submitted to three different amounts of pyrene oral ingestion, together with phenanthrene and benzo(a)pyrene (1, 7, and 49 mg/day during 1 week each). An HPLC–fluorometric analysis of 1-OH-pyrene in milk revealed a perfect correlation between pyrene doses and 1-OH-pyrene detected in milk, thus fully confirming the biomarking capability of 1-OH-pyrene and providing information on its transfer coefficient toward milk. Transfer equations such as the ones found in the present study could be used as a valuable and practical risk assessment tool in (i) the accurate monitoring of exposure of ruminants to pyrene and (ii) the evaluation of occupational and environmental exposure of ruminants to PAH mixtures.

KEYWORDS: Polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene; biomarker of exposure; ruminant; milk

INTRODUCTION

Among environmental and health issues, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their metabolites are the subject of numerous studies in terms of production (1), spatial deposition (2–4), and impact on health (5, 6), as well as transfers in native or metabolized forms (7, 8). A significant environmental persistence of PAHs in crop soils amended with sewage sludges was also observed over a 25-year record, which also clearly demonstrated the environmental persistence of PAHs (9). PAHs belong to the group of persistent organic pollutants (POPs), which, according to the Protocol on Persistent Organic Pollutants signed on June 24, 1998, in Denmark (10), fulfill the five following points: (i) they possess toxic characteristics; (ii) they are persistent; (iii) they can bioaccumulate; (iv) they are prone to long-range transboundary atmospheric transport and deposition; and (v) they are likely to cause significant adverse human health or environmental effects near to and distant from their source. PAHs are a group of over 100 different chemicals that are formed during the incomplete burning of coal, oil, and gas, garbage, or other organic substances such as tobacco or charbroiled meat. PAHs are usually found as a mixture containing two or more of these compounds, such as soot.

Considering their toxicity and presence in our environment, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has identified 16 unsubstituted PAHs as priority pollutants, these being approximately 80% of the PAHs found in the United States. Besides quantitative considerations, the physical–chemical properties and danger of PAHs is highly related to their number of cycles (2–6 cycles for the 16 priority pollutants). Considered as hydrophobic molecules, their log K_{ow} ranges from 3.4 with naphthalene to 6.5 with benzo(g,h,i)perylene (11), which means that benzo(g,h,i)perylene is a 1000-fold more hydrophobic molecule than naphthalene. With regard to health aspects, PAHs such as benzo[a]anthracene and benzo(a)pyrene (respectively, 4 and 5 cycles) have, for instance, been classified as highly toxic, confirmed to be carcinogenic, and observed mutagenic components, whereas phenanthrene and anthracene have been identified as “only” moderately toxic and observed as mutagenic compounds (12).

Next to the intensive studies of native PAHs focusing on their production, atmospheric transport, deposition, transfer, stability, or toxicity, PAH metabolites have also been considered with an increased interest over the past decade. Indeed, PAHs are absorbed inside the body through the skin but can also be absorbed through the lung and the gastrointestinal tract before being metabolized inside the liver. There, they are converted into monohydroxylated PAHs and may be subsequently conjugated with glucuronides and sulfates before being almost fully

* Author to whom correspondence should be addressed [telephone +33 (0)383595888; fax +33 (0)383595889; e-mail yann.guiavarch@ensaia.inpl-nancy.fr.

eliminated in urine or bile. Most studies attempt to answer the following questions: What is the rate of PAH conversion into metabolites? What is the fraction of PAHs converted into metabolites and in which form? Are they simply hydroxylated or also glucuronconjugated or sulfoconjugated and, if so, in which proportions depending of the metabolites? What is their toxicity at the cellular, organic, and body scale? Can they reflect the level of global exposure to PAHs of human beings and animals (food, respiration, absorption through the skin). That is, could they be used as relevant exposure bioindicators of a global exposure to PAHs? The latter question has recently been investigated by several authors who analyzed metabolite concentrations in animal or human urine and fish bile mainly. With regard to human exposure, Huang et al. (13) analyzed 1-hydroxypyrene (1-OH-pyrene) in 2312 urine samples and used results to establish the first U.S. reference range of OHPAH as biomarkers to assess human exposure. But 1-OH-pyrene was also demonstrated to be a potential biomarker of exposure to PAHs of workers in an artificial shooting target factory (14), in the petrochemical industry (15), in a carbon anode plant (16), in a coke oven (17), and also in an aluminum production plant (18). Multimetabolite monitoring in the urine of smokers and nonsmokers was also performed by Chetiyankornkul et al. (19), who recently developed an excellent analytical method for the analysis of up to 10 different metabolites in a single HPLC-fluorometric run. In this last valuable study, 10 metabolites from 2 cycles up to 4 cycles were accurately quantified, thus allowing the multimetabolite-based evaluation of global exposure to PAHs, instead of a single-metabolite (1-OH-pyrene) based evaluation.

With regard to animal exposure, the urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous or oral administration of PAHs in rat was seriously investigated (20–24). 1-OH-pyrene was also, for instance, successfully analyzed in fish bile as a bioindicator of PAH exposure of *Solea solea* fish after the Erika oil spill (25). Ferrari et al. (26) analyzed 1-OH-pyrene in bovine urine samples and observed a significant increase of concentrations when bovines were living close to a highway.

At the moment, there is a real lack of information on the possibility of using the analysis of PAH metabolites inside ruminant milk to evaluate their global level of exposure to PAHs. Milk samples would, however, be much more convenient to collect than urine samples for subsequent PAH metabolites analysis. Grova et al. (27) were the first to detect PAH metabolites in the milk of lactating goats, thus demonstrating that the detection of native molecules in milk is not representative of the real contamination of this biological matrix. As mentioned by the latter authors, in terms of food safety, knowledge of PAH metabolite levels in food is of real interest since these metabolites appear to be more reactive than their parent compounds in terms of mutagenesis and carcinogenesis (28, 29) or endocrine disruption (30, 31).

The purpose of the present study was therefore to evaluate the potential of 1-OH-pyrene in milk and urine to be used as a relevant bioindicator of PAH exposure of lactating goats submitted to three different levels of PAH chronic oral uptake of phenanthrene, the most often found PAH under metabolite form in milk (27), pyrene, the usual indicator of environmental PAH contamination according to ref 32, and benzo(a)pyrene, the reference PAH in terms of toxicity according to the EPA.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Four alpine goats (50 ± 5 kg; second and third lactations, second month postpartum) from the herd of the “Domaine Experimental

de la Bouzule” (Champenois, France) were used for this experiment as a model of the lactating ruminant. They received a 7 day adaptation period within individual boxes at an average day temperature of 22 °C and under natural light conditions. The animals were mechanically milked twice a day, providing an average milk production of 2000 ± 200 mL during the 7 days before the experiment was run. The goats were fed with meadow hay, water, and mineral salt ad libitum and received 850 g of granulated mix consisting of dehydrated maize, alfalfa, wheat, sunflower grains, sugar beet, colza and soybean cattle cakes mixed with palm oil, sugar beet molasses, and other organic additives and specific salts. This diet met the nutritional requirements of goats and has already been proven to be sufficient to maintain milk production at about 3 L/day over three milkings (33). Measurements of the milk production were performed each day as well as renewal of the litters.

Experimental Design. The experimental design involved the oral and daily intake of three different amounts of PAHs (1, 7, and 49 mg), each level being applied during a 7 day period. The animal protocol was in accordance with the general directive 86/609/EEC on animal care used in the European Community (34). After 1 week of adaptation period, and just after the morning milking, each animal received 2 mL of cremophor oil (Fluka) containing 1 mg of pyrene, 1 mg of phenanthrene, and 1 mg of benzo(a)pyrene (0.02 mg/kg of body weight) for 7 consecutive days. The 7 mg dose was applied for 7 successive days and the 49 mg dose for a further 7 successive days. PAHs were directly administrated into the mouth of the animal with a syringe. The latter was then flushed once with another 2 mL of cremophor oil, and the contaminated oil was given to the animals. It was previously demonstrated that this amount of ingested oil did not affect the rumen activity (35). Urine samples and milk samples (the last two milkings) from the 24 h before each increase of dose (every 7 days) were collected and stored at –20 °C.

1-OH-pyrene Extraction in Milk. Due to the complex composition of milk, which contains approximately 49, 39, and 33 g/L of lactose, fat, and proteins, respectively, the extraction of 1-OH-pyrene required both liquid/liquid and liquid/solid separation processes. Extractions were performed in triplicate for pyrene, phenanthrene, and benzo(a)pyrene metabolites but, for technical and priority reasons, only 1-OH-pyrene was dosed as described below. The procedure used was the one designed in our laboratory by Grova et al. (27). Ten milliliter milk samples were collected in 50 mL Falcon tubes (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany), adjusted at pH 5.2 with glacial acetic acid (Eastman, Kingsport, TN), and complemented with 50 µL of β-glucuronidase and sulfatase solutions, respectively. β-Glucuronidase type H-2 from *Helix pomatia* was provided in crude solution by Sigma-Aldrich (Poole, U.K.) with a volume activity of 99000 units/mL, where 1 unit is the amount of glucuronidase that can liberate 1 µg of phenolphthalein from phenolphthalein glucuronide at 37 °C and pH 5 in 30 min. Sulfatase type H-2 from *H. pomatia* was provided in crude solution by Sigma-Aldrich (Poole, U.K.) with a volume activity of 2000 units/mL, where 1 unit is the amount of sulfatase that can hydrolyze 1 µmol of *p*-nitrocatechol sulfate per hour at pH 5 and at 37 °C. Milk samples were then incubated at 37 °C during 16 h to convert glucuronide and sulfate conjugates of 1-OH-pyrene into 1-OH-pyrene. Internal standard 6-OH-chrysene was then added to the samples, which were subsequently mixed in 20 mL of cyclohexane (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) and 20 mL of ethyl acetate (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France) before being thoroughly shaken with a horizontal Agitast shaker (CAT, Staufen, Germany) at a maximum speed of 700 shakings per minute during 30 min at ambient temperature. After centrifugation (15 min at 1000g) in a Jouan CR4I centrifuge (Chateau Gontier, France), the supernatant was evaporated with a Buchi RE121 rotovapor (Flawil, Switzerland) under automated vacuum control. Residual volume was recovered with 6 mL of cyclohexane and applied onto an Envi-Chrom P SPE column (Supelco, Bellefonte, PA) previously conditioned with 5 mL of ultrapure water, 5 mL of methanol (Prolabo, Leuven, Belgium), and 5 mL of cyclohexane. After elution of interfering compounds with 2 × 3 mL of cyclohexane, pyrene and 1-OH-pyrene were coeluted with 12 mL of cyclohexane/ethyl acetate (50:50, v/v). The samples were totally evaporated to dryness at 40 °C using a nitrogen flow and a multichannel evaporator (Liebisch, Bielefeld, Germany). The dry

residue was then dissolved in 2 mL of cyclohexane and 2 mL of methanol–water (80/20; v/v), vortexed for at least 10 s, and centrifuged at 1500g and ambient temperature during 5 min; the two phases were then separated with a Pasteur pipet. This step, which was repeated once, allowed the separation of pyrene and fatty acids (cyclohexane fraction) from 1-OH-pyrene and 6-OH-chrysene metabolites (methanol/water fraction). The methanol/water fraction was collected and totally evaporated to dryness at 40 °C under nitrogen flow before being redissolved in 4 mL of ethyl acetate/water solution (50:50, v/v) and then centrifuged at 1500g and ambient temperature during 5 min. Forty microliters of 1000 ng/mL chrysene-*d*₁₂ as an external standard (Cluzeau Synthe Labo, Paris, France) was then added to the supernatant. Extracts were finally evaporated to dryness and redissolved into 250 μL of acetonitrile before HPLC–fluorometry analysis.

1-OH-pyrene Extraction in Urine. Samples were treated using the method described by Wang et al. (36). A 5 mL urine sample was transferred to a 50 mL flask (Greiner bio-one). The pH of the solution was adjusted to 5.0 with 1 M HCl, and then 5 mL of 0.5 M acetate buffer (pH 5.0) was added and complemented with 50 μL of β-glucuronidase and sulfatase solutions, respectively, before incubation at 37 °C during 16 h. Internal standard 6-OH-chrysene was then added to the samples. After hydrolysis, samples were centrifuged at 1500g for 3 min in a Jouan CR41 centrifuge, and supernatant was used for solid phase extraction. C₁₈ cartridges were pretreated with 5 mL of methanol and 5 mL of ultrapure water. The hydrolyzed urine sample was then loaded onto the cartridge at a flow rate lower than 1 mL/min. The column was washed with 10 mL of water and 10 mL of methanol/water (30:70, v/v) to remove the matrix interferences. The purity of methanol was 99.8%. 1-OH-pyrene and internal standard were eluted with 4 mL of methanol. The eluate was totally evaporated to dryness at 40 °C using a gentle flow of nitrogen and multichannel evaporator (Liebisch, Bielefeld, Germany). The dry residue was then dissolved in 1 mL of methanol and vortexed for at least 10 s. The solution was filtered through a 0.2 μm filter, and 40 μL of external standard chrysene-*d*₁₂ (Cluzeau Synthe Labo, Paris, France) was finally added before storage at –20 °C and subsequent HPLC–fluorometry analysis. Before injection, the extracts must be diluted at 50:50 (v/v) with a 10 mM acetate buffer solution at pH 4.

HPLC Analysis in Milk. The HPLC system consisted of an autosampler 717+ programmed for 100 μL of volume injection, a gradient controller 600 with column temperature control, and a 2475 multiwavelength fluorescence detector (all from Waters, Milford, MA). 1-OH-pyrene, internal standard 6-OH-chrysene, and external standard chrysene-*d*₁₂ were separated on a reverse phase C₁₈ column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, Grace-Vydac, Hesperia, CA) with a guard column (C₁₈, 20 × 4 mm i.d., 5 μm, Grace-Vydac). Based on a method recently designed in our laboratory, HPLC conditions were as follows: eluent A, 4 mg/L ascorbic acid solution (daily prepared and stored in brown glass bottle); eluent B, methanol; gradient program at constant temperature (35 °C) and flow rate (0.8 mL/min), 0–21 min (eluent B composition, 65%), 21–22 min (B, 65–100%), 22–37 min (B, 100%), 37–38 min (B, 100–65%); detection wavelength program (excitation/emission in nm), 0–21 min (346/400) for 1-OH-pyrene and 6-OH-chrysene, 22–53 min (270–378) for chrysene-*d*₁₂. After the end of the washing step (38 min), the initial mobile phase conditions were kept from 15 to 53 min before the next sample was injected.

HPLC Analysis in Urine. The analysis was carried out using a method different from the one used with milk. On the basis of the recent study of Chetianoukornkul et al. (10), we recently developed a method for the simultaneous analysis of 1-, 2-, 3-, and 4-OH-phenanthrene, 1-OH-pyrene, and 3-OH-benzo(*a*)pyrene. In the present paper only quantitative results about 1-OH-pyrene will be introduced for comparison with results found in milk. The autosampler, gradient controller, and fluorescence detector were similar to the ones used for analysis in milk. 1-OH-pyrene (and other metabolites), internal standard 6-OH-chrysene, and external standard chrysene-*d*₁₂ were separated on a Discovery reverse phase amide C₁₆ column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, Supelco) with a guard column (C₁₆, 20 × 4 mm i.d., 5 μm, Supelco). HPLC conditions were as follows: eluent A, acetonitrile (purity of 99.8%); eluent B, 10 mM acetate buffer at pH 4 (daily prepared and stored in brown glass bottle); gradient program at constant

temperature (40 °C) and flow rate (1 mL/min), 0–25 min (eluent A composition, 45%), 25–50 min (A, 45–65%), 50–60 min (A, 65%), 60–63 min (A, 65–90%), 63–68 min (A, 90%), 68–71 min (A, 90–45%), 71–86 min (A, 45%); detection wavelength program (excitation/emission in nm), 0–35 min (256–370) for 1-, 2-, 3-, and 4-OH-phenanthrene, 35–46.5 min (240–387) for 1-OH-pyrene, 46.5–56 min (270–378) for internal standard 6-OH-chrysene and external standard chrysene-*d*₁₂, over 56 min (375–435) for 3-OH-benzo(*a*)pyrene. Injection volume was 100 μL. After the end of the washing step (71 min), the initial mobile phase conditions were kept from 15 to 86 min before the next sample was injected.

Quantification Limits. Briefly, the calculation of the QL value for 1-OH-pyrene was based on the former calculation of a response factor *R* by taking the slope of the standard curve obtained with five different standard solutions of 1-OH-pyrene at, respectively, 10, 20, 30, 40, and 50 ng/mL. *R* was taken as the inverse of the slope of the standard curve peak height versus amount of 1-OH-pyrene injected. For instance, in the HPLC method used with urine, these amounts were, respectively, 1, 2, 3, 4, and 5 ng because the injection volume was 100 μL. After definition of the *h*_{av} and *h*_{max} on both sides of the 1-OH-pyrene peak, we could calculate two different QL values for 1-OH-pyrene: QL₁ = 10*R* × *h*_{av} = 0.017 ng and QL₂ = 10*R* × *h*_{max} = 0.043 ng. Choosing the method based on *h*_{max} logically provided the highest QL value. Taking the average of these two QL values, we obtained an estimated QL of 0.03 ng for 1-OH-pyrene, which was largely sufficient given the amounts of pyrene used in our experimental design.

RESULTS AND DISCUSSION

HPLC Analysis, Calibration Curve, Extraction Yield, and Quantification Limits. Panels **a** and **b** of Figure 1, respectively, show typical milk and urine extract chromatograms. Our six-point standard curve in milk showed an excellent linearity (*R*² = 0.99) in the range of 0–400 ng of 1-OH-pyrene/g of milk, which was investigated. Our five-point standard curve in urine also showed a good linearity (*R*² = 0.99) in the range of 0–1000 ng of 1-OH-pyrene/g of urine. In addition, on the basis of the use of our external and internal standards, we obtained an average extraction yield of 35.1 ± 10.2% within the range 23.9–53.9% for 1-OH-pyrene in milk, which is acceptable given the complexity of the milk composition (caseins, fat compounds, lactose, etc.). On the basis of a specific low-concentration standard curve with five points in the range of 0–0.1 ng/g and a *R*² of 0.99, we found a noise concentration of 0.12 ng of 1-OH-pyrene/g of milk.

1-OH-pyrene in Milk. Figure 2 presents the correlation between the doses of pyrene ingested and the pyrene concentration in the milk volume produced 24 h after the last ingestion of each dose (two milking volumes). To take into account the variations in milk volumes produced for each dose (1, 7, and 49 mg/day), Figure 3 presents the correlation between the doses of pyrene ingested and the 1-OH-pyrene mass amount found in the milk volume produced 24 h after the last ingestion of a pyrene dose (two milking volumes). Table 1 provides details on percent transfer of pyrene under 1-OH-pyrene form in the milk for each of the three doses tested as well as goat to goat variations in 1-OH-pyrene concentration in milk and milk volumes. From these data several interesting points deserve to be discussed. Of course, not surprisingly, we observe an increase of 1-OH-pyrene concentration in milk when ingested doses increase. However, when considering the average transfer coefficients, we can see that the latter are not significantly different whatever the pyrene daily doses used (1.10 ± 0.55, 1.26 ± 0.57, and 1.23 ± 0.57% for 1, 7, and 49 mg/day, respectively). Therefore, it is obvious that transfer coefficients, even with large differences between ingested doses of pyrene, are not at all affected by these differences. However, the key

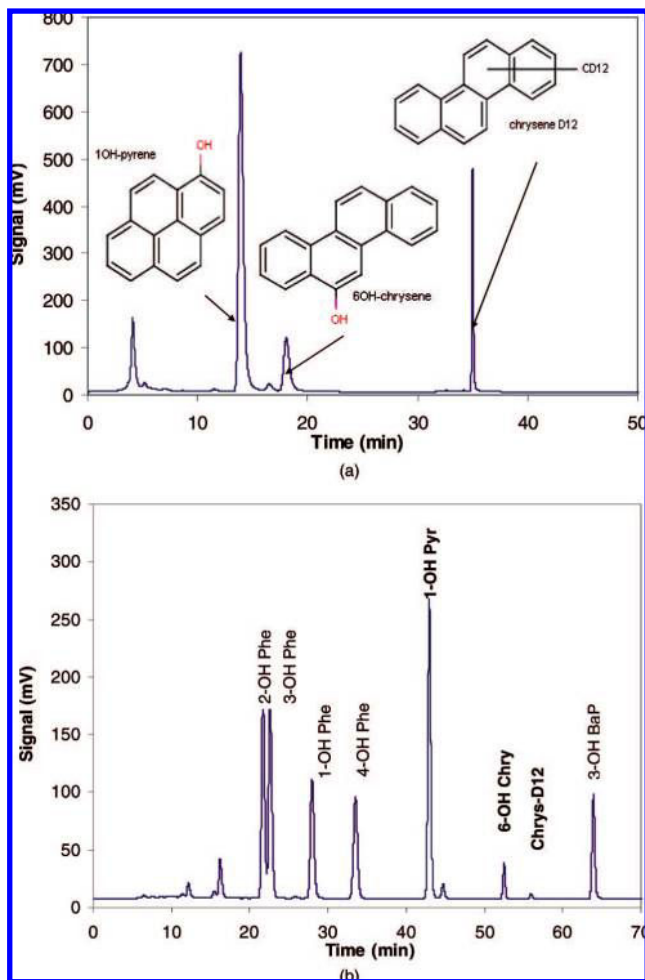


Figure 1. HPLC–fluorometry chromatograms of milk extracted from milk at 50 ng of 1-OH-pyrene/g of milk (a) and urine extracted from urine at 1000 ng of 1-OH-pyrene/g of urine (b).

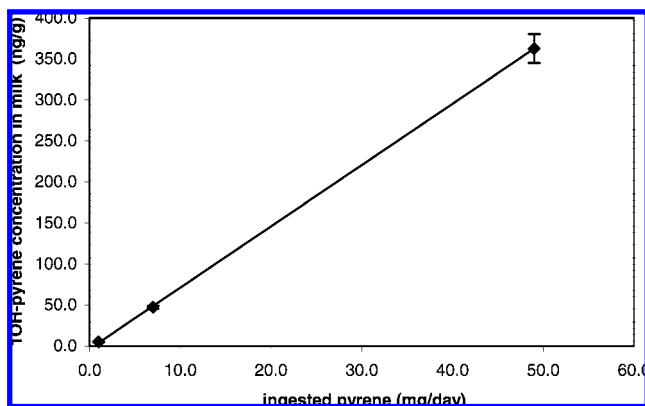


Figure 2. Average 1-OH-pyrene concentrations (ng/g) and their associated standard deviation in milk produced 24 h after the last ingestion of a 7 day period at 1 mg of pyrene/day followed by a 7 day period at 7 mg of pyrene/day and finally a 7 day period at 49 mg of pyrene/day (concentration = $7.47 \times$ ingested dose $- 3.59$, $R^2 = 0.99$). Averages are based on the milking of four goats.

point in the present study is that the correlations between doses and concentration as well as mass amounts of 1-OH-pyrene in the milk are excellent as can be seen from R^2 values. Logically, the correlation is better when the mass amount of 1-OH-pyrene is considered instead of the concentration of 1-OH-pyrene. However, the latter difference in correlation is extremely low because we did not observe significant variations in goat to goat

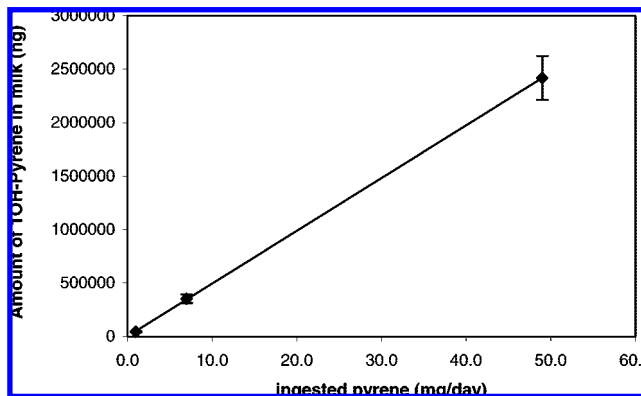


Figure 3. Average 1-OH-pyrene amounts (ng) and their associated standard deviation found in milk produced 24 h after the last ingestion of a 7 day period at 1 mg of pyrene/day followed by a 7 day period at 7 mg of pyrene/day and finally a 7 day period at 49 mg of pyrene/day (amount = $49345 \times$ ingested dose + 1170.7, $R^2 = 1$). Averages are based on the milking of four goats.

and dose to dose milking volumes (**Table 1**). Consequently, in a herd of goats (and probably other ruminants), it can be concluded that the monitoring of 1-OH-pyrene in milk, when used together with one or another of the two transfer equations that we experimentally generated (in urine or milk), should properly reflect the level of chronic exposure of goats to pyrene and other PAHs. However, it is obvious, here, that the transfer equation of pyrene under the 1-OH-pyrene form into milk or urine should be designed with and for much lower daily intakes of pyrene in order to increase the accuracy in the evaluation of exposure to pyrene and other daily ingested PAHs. For instance, if we enter the “natural” 1-OH-pyrene concentration in milk (0.12 ng/g) into our transfer equation from **Figure 2**, we will find a negative value that is, of course, not providing any information on the “natural” and, however truly existing, daily dietary intake of pyrene by the goat. Along with the good correlations that were observed, it should also be stressed here that, in terms of sampling, the analysis of 1-OH-pyrene in milk is much easier to perform than in urine. Naturally, the question of whether metabolism of pyrene into 1-OH-pyrene can be affected when pyrene is ingested together with other PAHs, such as phenanthrene and benzo(a)pyrene, should be discussed. Indeed, according to Bouchard et al. (20) various individual PAHs are likely to be biotransformed via the same cytochrome P450 oxidase system, thus generating potential competition for accessing to the metabolism pathway (hydroxylation, glucuronide, and sulfate conjugates synthesis). On the basis of binary and ternary mixtures of PAHs intravenously administered to Sprague–Dawley rats, they demonstrated that sufficiently high doses of benzo(a)pyrene could generate a significant increase of 1-OH-pyrene metabolism resulting in higher urinary concentrations. Such an observation, which precluded the use of 1-OH-pyrene as a relevant bioindicator of exposure to PAHs, was, however, true for only benzo(a)pyrene doses that were not in accordance with realistic levels of exposure. In the present study, it is clear that even the high amounts of ingested phenanthrene and benzo(a)pyrene did not affect at all the metabolism of pyrene into 1-OH-pyrene because we observed a perfect linearity between the amounts of ingested pyrene and 1-OH-pyrene concentration in the milk. This observation confirms that analysis of 1-OH-pyrene in milk is a performing, practical, and robust way to evaluate the level of exposure of goats (and likely other ruminants) to PAHs.

Table 1. 1-Hydroxypyrene Concentrations in Milk and Percent Recovery of Ingested Pyrene under the 1-Hydroxypyrene Form with Their Associated Standard Deviations

sample		av 1-OH-pyrene ^a		av/dose ^b		% recovery		av transfer (%)
dose/day pyrene (mg)	goat	[(ng/g)/goat]	variation (%)		variation (%)	milk ^c (g)	in milk ^d	
1	1	5.5 ± 0.4	6.8	5.2 ± 0.1	2.9	1696	0.93	1.10 ± 0.55
	2	2.7 ± 0.4	15.2			1703	0.46	
	3	7.6 ± 0.2	2.7			2364	1.79	
	4	4.9 ± 0.2	3.4			2484	1.22	
7	1	65.0 ± 4.5	6.9	47.2 ± 1.9	4.0	1523	1.41	1.26 ± 0.57
	2	36.1 ± 2.1	5.8			1873	0.97	
	3	68.2 ± 5.0	7.3			2042	1.99	
	4	19.6 ± 2.9	14.9			2460	0.69	
49	1	568.0 ± 59.4	10.5	362.7 ± 17.8	4.9	1200	1.39	1.23 ± 0.42
	2	228.2 ± 3.8	1.7			1521	0.71	
	3	418.5 ± 32.4	7.7			1988	1.70	
	4	235.9 ± 43.5	18.5			2363	1.14	

^a Average based on three extractions on the same milk sample. ^b Standard deviation derived from rules in error propagation in arithmetic calculations. ^c Milk produced during the 24 h (three last milkings) before the increase of dose. ^d Percent recovery (or transfer coefficient) into milk of ingested pyrene under the 1-OH-pyrene form 24 h after the last ingestion of a dose calculated as [milk (in g) × average 1-OH-pyrene concentration in milk (in ng/g)] × 100/daily intake (converted in ng).

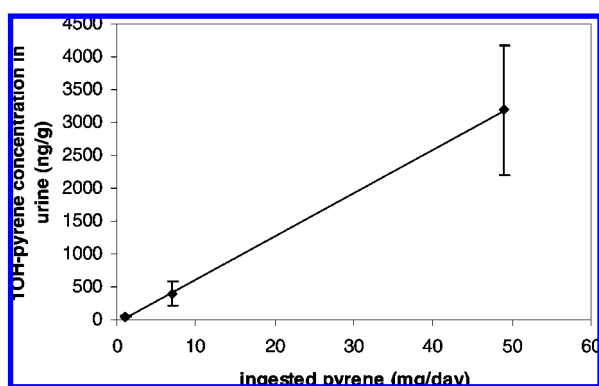


Figure 4. Average 1-OH-pyrene concentrations (ng/g) and their associated standard deviation in urine produced 24 h after the last ingestion of a 7 day period at 1 mg of pyrene/day followed by a 7 day period at 7 mg of pyrene/day and finally a 7 day period at 49 mg of pyrene/day (concentration = $65.684 \times$ ingested dose $- 36.395$, $R^2 = 0.99$). Averages are based on the milking of four goats.

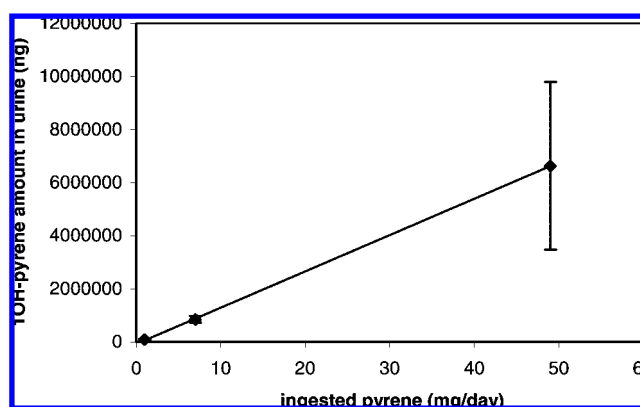


Figure 5. Average 1-OH-pyrene amounts (ng) and their associated standard deviation found in urine produced 24 h after the last ingestion of a 7 day period at 1 mg of pyrene/day followed by a 7 day period at 7 mg of pyrene/day and finally a 7 day period at 49 mg of pyrene/day (amount = $136752 \times$ ingested dose $- 76264$, $R^2 = 1$). Averages are based on the milking of four goats.

1-OH-pyrene in Urine. Figure 4 presents the correlation between the doses of pyrene ingested and the pyrene concentration in the urine volume produced 24 h after the last ingestion of a pyrene dose. To take into account the variations in urine volumes produced for each dose (1, 7, and 49 mg/day), Figure 5 presents the correlation between the doses of pyrene ingested and the 1-OH-pyrene mass amount found in the urine volume produced 24 h after the last ingestion of a pyrene dose. Table 2 provides details on percent transfer of pyrene under 1-OH-pyrene form in the urine for each of the three doses tested as well as goat to goat variations in 1-OH-pyrene concentration in urine and urine volumes. First of all, the excellent linearity observed in Figures 4 and 5 clearly demonstrates the potential of 1-OH-pyrene to be used as a good bioindicator of exposure of goat, and probably other ruminants, to pyrene. Another important observation is that the percent transfer of ingested pyrene toward urine under the 1-OH-pyrene form was found to be about 10-fold higher than the one observed in milk, which is in accordance with the fact that urine is a major elimination pathway for xenobiotics. However, when the percent transfers of pyrene under the 1-OH-form into milk and urine are summed, not more than 15% transfer is found

into these two compartments. Given the fact that it was recently shown that, even 24 h after a 100 mg pyrene ingestion by goats, the transfer of pyrene under native form was $<0.01\%$ into milk and $<0.05\%$ into urine (7), it can reasonably be assumed that feces is by far the main elimination pathway for pyrene (nonabsorbed or absorbed and eliminated via the bile) and its metabolites, such as 1-OH-pyrene. It can also be reasonably assumed that other metabolites of pyrene, different from 1-OH-pyrene, represent a major source of pyrene metabolites as compared to 1-OH-pyrene. Whereas the first assumption is actually generally recognized in the literature, the second assumption can be supported by the recent studies of Ruzgys et al. (37, 38). These authors recently showed that about 27% of pyrene intravenously injected into Sprague–Dawley rats was metabolized under the pyrene-1,6-dione and pyrene-1,8-dione forms against about 1% only under the 1-OH-pyrene form (analysis in urine over a 48 h sampling period). Finally, as observed with milk, no significant differences in percent transfer of pyrene as 1-OH-pyrene into urine were observed when ingested doses increased from 1 to 7 to 49 mg/day. We do not observe any plateau curve (which would reflect a

Table 2. 1-Hydroxypyrene Concentrations in Urine and Percent Recovery of Ingested Pyrene under the 1-Hydroxypyrene Form with Their Associated Standard Deviations

sample	dose/day		av 1-OH-pyrene [(ng/g)/goat]	av/dose	variation (%)	urine ^a (g)	% recovery in urine ^b	av transfer (%)
	pyrene (mg)	goat						
1	1	1	32.2	47.9 ± 11.4	23.8	3407	10.9	8.9 ± 2.6
		2	51.8					
		3	59.1					
		4	48.7					
7	1	1	245.8	402.7 ± 185.48	46.1	2910	10.2	12.1 ± 1.8
		2	572.6					
		3	552.5					
		4	237.5					
49	1	1	2365.0	3184.8 ± 982.9	30.9	4690	22.6	13.5 ± 6.4
		2	3776.8					
		3	4260.4					
		4	2336.9					

^a Urine produced during the 24 h before the increase of dose. ^b Percent recovery (or transfer coefficient) into urine of ingested pyrene under the 1-OH-pyrene form 24 h after the last ingestion of a dose calculated as [urine (in g) × average 1-OH-pyrene concentration in urine (in ng/g)] × 100/daily intake (converted in ng).

saturation in metabolism capabilities of goats) or exponential type curves (which would reflect a progressive increase of adaptation in metabolism capabilities of goats). As seen with milk, we simply observe a linear relationship between ingested dose and 1-OH-pyrene amounts found in urine. From a metabolic standpoint, it remains difficult to know whether this linear relationship (observed in milk and urine) reflects or not a preexisting sufficient metabolic machinery or an induced metabolic machinery. Further investigations on cytochrome P450 oxidase induction might provide a definitive answer to such a question.

From a general standpoint, it is now more than 20 years that urinary 1-OH-pyrene has been suggested to be a good indicator of exposure to pyrene and other PAHs because it is always present in PAH mixtures and is a ubiquitous PAH (39–41). Jongeneelen notes that the conclusion of the first international workshop on 1-OH-pyrene in 1993 was that urinary 1-OH-pyrene is a solid biological exposure indicator of PAH (41). Actually, whereas 700 papers reporting on the urinary concentrations of 1-OH-pyrene in workers' urines have been published (42), fewer than 50 papers related to PAHs in milk can be found in the literature (personal search on SCOPUS database, 2007), of which only 4 are aimed toward PAH metabolites in milk (7, 27, 33, 43). The evidence that PAH metabolites can be transferred to milk has only been recently demonstrated (27). From an agronomic and food safety standpoint, this lack of information on metabolites in milk and more precisely in ruminant milk is somewhat surprising because milk is a highly consumed animal product, in a natural or processed form (concentrate, cheese, yogurt, powder, etc.) and may, in our opinion, represent an issue in terms of "mother to child" transfer of lipophilic persistent organic pollutants such as PAH and their metabolites.

In this context, the present work clearly demonstrates that 1-OH-pyrene in milk could be used as a reliable and convenient agronomic bioindicator of exposure to pyrene and should therefore be considered with a clear interest as a bioindicator of global exposure of ruminants to PAHs. It is therefore our expectation that transfer equations such as the one identified in this study will be used as a valuable and practical risk assessment tool for (i) the accurate monitoring of global exposure of ruminants to pyrene and (ii) the evaluation of occupational and environmental exposure of ruminants to PAH mixtures. A similar approach based on more realistic daily ingested PAHs

doses will be necessary to achieve a more reliable level of bioindication accuracy at low exposure levels.

LITERATURE CITED

- Rhead, M.; Hardy, S. The sources of polycyclic aromatic compounds in diesel engine emissions. *Fuel* **2003**, *82*, 385–393.
- Ravindra, K.; Bencs, L.; Wauters, E.; de Hoog, J.; Deutsch, F.; Roekens, E.; Bleux, N.; Berghmans, P.; Van Grieken, R. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmos. Environ.* **2006**, *40*, 771–785.
- Chan, C.; Yao, X. Air pollution in mega cities in China. *Atmos. Environ.* **2008**, *42*, 1–42.
- Crépineau, C.; Rychen, G.; Feidt, C.; Le Roux, Y.; Lichtfouse, E.; Laurent, F. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4841–4845.
- Pandey, K.; Pant, A.; Das, M. In vitro cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon residues arising through repeated fish fried oil in human hepatoma Hep G2 cell line. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 308–316.
- Allan, L.; Schlezinger, J.; Shansab, M.; Sherr, D. CYP1A1 in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced B lymphocyte growth suppression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 227–235.
- Lapole, D.; Rychen, G.; Grova, N.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C. Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants. *Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2624–2629.
- Grova, N.; Feidt, C.; Laurent, C.; Rychen, G. [¹⁴C] Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [¹⁴C]polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 1025–1031.
- Lichtfouse, E.; Sappin-Didier, V.; Denaix, L.; Caria, G.; Metzger, L.; Amellal-Nassr, N.; Schmidt, J. A 25-year record of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils amended with sewage sludges. *Environ. Chem. Lett.* **2005**, *3*, 140–144.
- The 1998 Aarhus Protocol to the 1979 Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution on Persistent Organic Pollutants (POPs). *Rev. Eur. Community Int. Environ. Law* **1999**, *8*, 224–230.
- De Maagd, P.; ten Hulsher, D.; van den Heuvel, H.; Opperhuizen, A.; Sijm, D. Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 251–257.

- (12) International Agency for Research on Cancer. *Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Evaluation*; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; IARC: Lyon, France, 1998; p 32.
- (13) Huang, W.; Caudill, P.; Grainger, J.; Needham, L.; Patterson, D. Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: a study based on U.S. reference range values. *Toxicol. Lett.* **2006**, *163*, 10–19.
- (14) Lafontaine, M.; Payan, J. P.; Delsaut, P.; Morele, Y. Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in an artificial shooting factory: assessment of 1-hydroxypyrene urinary excretion as a biological indicator of exposure. *Ann. Occup. Hyg.* **2000**, *44*, 89–100.
- (15) Booggard, P. J.; Van Sittert, N. J. Measurement of exposure to PAH in petrochemical industries by determination of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup. Environ. Med.* **1994**, *51*, 250–258.
- (16) Petry, T.; Schmid, P.; Schlatter, C. Airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. *Ann. Occup. Hyg.* **1996**, *40*, 345–357.
- (17) Vanrooij, J. G. M.; Bodelier-Bade, M. M.; Jongeneelen, F. J. Estimation of the individual dermal and respiratory uptake of PAH of 12 coke oven workers. *Occup. Environ. Med.* **1993**, *50*, 623–632.
- (18) Vu-Duc, T.; Lafontaine, M. 1-Hydroxypyrene in human urines as biomarker of exposure to PAH in work related processes in an aluminum production plant. *Polycyclic Aromat. Compd.* **1996**, *11*, 1–9.
- (19) Chetianukornkul, T.; Toriba, A.; Kameda, T.; Tang, N. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 712–718.
- (20) Bouchard, M.; Krishnan, K.; Viau, C. Urinary excretion kinetics of 1-OH pyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Toxicokinetic* **1998**, *72*, 475–482.
- (21) Bouchard, M.; Viau, C. Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *139*, 301–309.
- (22) Bouchard, M.; Viau, C. Urinary and biliary excretion kinetics of 1-OH pyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology* **1998**, *127*, 69–84.
- (23) Bouchard, M.; Krishnan, K.; Viau, C. Kinetics of tissue distribution and elimination of pyrene and 1-hydroxypyrene following intravenous administration of [¹⁴C]pyrene in rats. *Toxicol. Sci.* **1998**, *46*, 11–20.
- (24) Viau, C.; Diakité, A.; Ruzgytė, A.; Tuchweber, B.; Blais, C.; Bouchard, M.; Vyskocil, A. Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary aromatic hydrocarbon under normal conditions. *J. Chromatog., B* **2002**, *778*, 165–177.
- (25) Budzinski, H.; Mazeas, O.; Tronczynski, J.; Désauney, Y.; Bocquéné, G.; Claireaux, G. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: application to the “Erika” oil spill. *Aquat. Living Resour.* **2004**, *17*, 329–334.
- (26) Ferrari, St.; Mandel, F.; Berset, J. D. Quantitative determination of 1-hydroxypyrene in bovine urine samples using high performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection. *Chemosphere* **2001**, *47*, 173–182.
- (27) Grova, N.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C.; Andre, F.; Rychen, G. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at traces levels using gas chromatography–mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **2005**, *29*, 175–181.
- (28) Denison, M.; Whitlock, J. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18175–18178.
- (29) Uno, S.; Dalton, T.; Derkenne, S.; Curran, C.; Miller, M.; Shertzer, H.; Nebert, D. Oral exposure to benzo(a)pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 1225–1237.
- (30) Fertuck, K.; Matthews, J.; Zacharewski, T. Hydroxylated benzo(a)pyrene metabolites are responsible for in-vitro estrogen receptor-mediated gene expression induced by benzo(a)pyrene but do not elicit uterotropic effects in vivo. *Toxicol. Sci.* **2001**, *59*, 231–240.
- (31) Van Lipzig, M.; Vermeulen, N.; Gusinu, R.; Legler, J.; Heinz, F.; Seidel, A.; Meerman, J. Formation of estrogenic metabolites of benzo(a)pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. *Environ. Toxicol. Phar.* **2005**, *19*, 41–55.
- (32) Jacob, J.; Seidel, A. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J. Chromatogr., B* **2002**, *778*, 31–47.
- (33) Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C. Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat’s milk contamination. *Agron. Sustainable Dev.* **2006**, *26*, 195–199.
- (34) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* **1986**, *358*, 0001–0028.
- (35) Murphy, J.; Morgan, D. Effect of inclusion of protected and performance of lactating dairy cows. *Anim. Prod.* **1983**, *37*, 203–210.
- (36) Wang, Y.; Zhang, W.; Dong, Y.; Fan, R.; Sheng, G.; Fu, J. Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 804–809.
- (37) Ruzgytė, A.; Bouchard, M.; Viau, C. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal and human urine. *J. Anal. Toxicol.* **2005**, *29*, 533–538.
- (38) Ruzgytė, A.; Bouchard, M.; Viau, C. Comparison of the urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione and 1-hydroxypyrene in rats intravenously exposed to pyrene. *Biomarkers* **2006**, *11*, 417–427.
- (39) Levin, J. O. First international workshop on 1-hydroxypyrene as biomarker for PAH exposure in man: summary and conclusions. *Sci. Total Environ.* **1995**, *163*, 165–168.
- (40) Holian, A. Air toxics: biomarkers in environmental applications: overviews and summary recommendations. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 851–855.
- (41) Jongeneelen, F. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci. Total Environ.* **1997**, *199*, 141–149.
- (42) Jongeneelen, F. Benchmark guidelines for urinary 1-hydroxypyrene as bioamarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.* **2001**, *45*, 3–13.
- (43) Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S. Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parents compounds and their monohydroxylated metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 263–268.

Received for review September 16, 2007. Revised manuscript received January 7, 2008. Accepted January 9, 2008.

JF072757G

Chapitre III :

Evaluation du 1-OH pyrène comme bioindicateur d'exposition du ruminant laitier à de faibles doses de HAP en mode subchronique (7 jours) : réconciliation avec les données obtenues aux fortes doses

Guiavarc'h, Y.P., Chahin, A., Dziurla, M.A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2010. Evaluation of small dairy ruminant exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons : A biomarker approach. J. Small Rum. Res. In press.

3.1 Introduction chapitre III

Dans le chapitre précédent, il a été démontré que :

↳ l'excrétion de 1-OH pyrène vers le lait et l'urine pouvait être corrélée de manière linéaire à la quantité de pyrène ingérée par les chèvres. Des équations de transfert ont ainsi pu être proposées comme outil d'évaluation du pyrène ingéré.

↳ la machinerie métabolique de la chèvre est suffisante pour faire face à la métabolisation de quantités de pyrène nettement supérieures aux niveaux d'exposition les plus sévères pouvant être rencontrés (pour rappel, 1 mg/jour de la somme des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA correspond déjà à un maximum pour une chèvre de 50 kg). On aurait donc pu « craindre » l'obtention d'une non linéarité, voire d'un plateau, sur notre courbe dose-réponse (1-OH pyrène vs pyrène) en exposant nos chèvres à un total de 147 mg de HAP/jour du mélange équiproportionnel « pyrène+benzo(a)pyrène+phenanthrene ». Cela n'a pas été le cas. Pourtant, comme évoqué précédemment, ces 3 HAP sont oxydés en formes métabolisées hydroxylées par l'intermédiaire de la CYP450 1A1 oxydase et dans une moindre mesure par les CYP450 1B1 et 1A2 oxydases. La compétition pour l'accès à ces oxydases, du moins dans le stricte cadre d'une analyse après 7 jours d'exposition à chacune des doses testées, n'est donc pas un facteur limitant au métabolisme de nos 3 HAP, même à des concentrations bien plus élevées que la normale.

Cette non limitation du métabolisme du pyrène en 1-OH pyrène est en fait probablement due au fait que le pyrène, et surtout le benzo(a)pyrène, sont connus comme étant de puissants inducteurs de la CYP450 1A1 oxydase, et dans une moindre mesure des CYP450 1B1 et 1A2 oxydases, via leur fixation sur le récepteur AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Cet aspect sera traité dans le chapitre 4 dans lequel nous évaluerons dans quelle mesure le métabolisme de nos 3 HAP est dû à un potentiel CYP450 oxydasique préexistant ou bien à un potentiel CYP450 oxydasique induit.

↳ Utiliser le lait comme matrice pour le dosage du 1-OH pyrène en tant que bioindicateur d'exposition du ruminant laitier aux HAP serait donc à priori pertinent et permettrait de profiter de la plus grande facilité de collecte du lait par rapport à l'urine.

L'objectif de ce troisième chapitre est:

↳ De confirmer, si possible, la capacité du 1-OH pyrène dosé dans l'urine et le lait à être utilisé comme un biomarqueur quantitatif d'exposition aux HAP lorsque les niveaux d'exposition sont beaucoup plus bas et réalistes. Cette seconde expérimentation animale à donc mis en jeu des doses de HAP bien plus faibles et représentant davantage les conditions d'expositions réelles des animaux (0,28 et 0,04 mg / jour / chèvre de chacun des HAP du mélange ternaire suivant : phénanthrène, pyrène, benzo[a]pyrène.

↳ De réconcilier les données obtenues dans l'expérimentation « aux faibles doses » avec l'expérimentation « aux fortes doses » de ce chapitre en vérifiant si des équations de transfert différentes doivent être utilisées selon que les niveaux d'exposition sont forts ou faibles.

↳ D'évaluer les variations inter-individu en terme d'excrétion de 1-OH pyrène dans le lait et l'urine.

↳ D'évaluer les niveaux d'excrétion de plusieurs hydroxymétabolites de phénanthrène et benzo(a)pyrène dans l'urine, et, si possible, de proposer des équations de transfert pour ces métabolites.

↳ De proposer, sur la base d'une synthèse bibliographique, une approche permettant d'étendre le potentiel bioindicateur de l'ingéré en pyrène à un potentiel bioindicateur de l'ingéré en 12 autres HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA, régulièrement retrouvés sur les couverts végétaux pouvant être pâturés par des ruminants laitiers.

Ce chapitre fait l'objet d'une publication dans la revue *Small Ruminant Research* (Guiavarc'h et al., 2010) dont les résultats sont présentés en l'état.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Small Ruminant Research

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



Evaluation of small dairy ruminant exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A biomarker approach

Yann P. Guiavarc'h*, Abir Chahin, Marie-Antoinette Dziurla, Hervé Toussaint, Cyril Feidt, Guido Rychen

Research Unit on Animal and Functionality of Animal Products (UR AFPA), Nancy University-Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2009
Accepted 24 February 2010
Available online xxx

Keywords:

Polycyclic aromatic hydrocarbons
Goat
1-OH-pyrene
Biomarker of exposure
Milk
Urine

ABSTRACT

Despite its interest, little is known about the potential of 1-hydroxypyrene to be used as biomarker of exposure of dairy ruminants (goat, sheep and cow) to pyrene or other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and, to date, no clear approach has been proposed to evaluate and use this biomarking potential for evaluating exposure to pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons also prone to contaminate the vegetal cover ingested by these dairy ruminants. In the present study, three Alpin goats were daily submitted to two different levels (0.04 and 0.28 mg/day) of pyrene oral ingestion, together with phenanthrene and benzo(a)pyrene, during 1 week each. Extraction and HPLC-fluorimetry analysis results on 1-hydroxypyrene in milk and urine as well as on 1, 2, 3 and 4-OH-phenanthrene and 3-OH benzo(a)pyrene in urine were fruitfully combined with few recently published results on 1-hydroxypyrene excretion achieved in a former and similar experiment performed on a set of four goats with doses 1, 7 and 49 mg/day/goat. Statistical analysis demonstrated the biomarking potential of 1-hydroxypyrene to be used for evaluation of oral exposure to pyrene under low and large levels of exposure and transfer (linear) equations were proposed. Finally, a literature based approach, combined with the achieved experimental transfer rates, was proposed for evaluating the amounts of 12 additional polycyclic aromatic hydrocarbons into the fodder, thus extending the potential of 1-hydroxypyrene in urine and/or milk to be used as a biomarker of oral exposure to PAHs. Keeping in mind that milk is much easier to sample as compared to urine, such approach may be used as a first step for evaluation of oral exposure of goat and likely other dairy ruminants to polycyclic aromatic hydrocarbons prior to any exhaustive, time and cost consuming analytical investigation.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental contaminants generated by the incomplete combustion of organic materials such as coal, wood, oil, gas and garbage. They belong to the group of per-

sistent organic pollutants (POPs), which, according to the protocol on POPs established in 1998 in Denmark, is characterized with toxic, persistent, bio accumulative properties as well as long-range transboundary atmospheric transport and deposition with negative effects on environmental and human health. Animal and human exposures to these contaminants occur via skin, respiration, and oral pathways, the latter counting for about 90% of the exposure. Considering the 16 US-EPA (United States Environmental Protection Agency) priority PAHs, it was for instance shown that the daily dietary intake of adult men was in

* Corresponding author. Tel.: +33 383595888; fax: +33 383595889.
E-mail address: yann.guiavarch@ensaia.inpl-nancy.fr
(Y.P. Guiavarc'h).

the range 3–17 $\mu\text{g}/\text{day}$, whose about 50% was carcinogenic (Dennis et al., 1982; De Vos et al., 1989; Lodovici et al., 1995; Falco et al., 2003). To date, no studies specifically focused on oral exposure of small dairy ruminants to PAHs but results achieved with grazing dairy cows may be used as an interesting basis for reflection. Considering experimental data from numerous articles (Healy and Ludwig, 1968; Hinton et al., 1995; Trapido, 1995; Wilcke, 2000; Smith et al., 2001a,b; Crépineau-Ducoulombier and Rychen, 2003; Nam et al., 2003; Pereira Netto et al., 2004; Motelay-Massei et al., 2004; Wong et al., 2004; Tang et al., 2005; Lutz et al., 2006; Yin et al., 2008; Agarwal et al., 2008), Guiavarc'h et al. (2008) evaluated that grazing dairy cows may therefore easily ingest about 11 mg PAH per day in semi-rural areas considering both the contamination of soil and the contamination of the fodder. This observation is in line with Ciganek et al. (2002) who found a daily intake of about 15 mg PAH/day in cattle from semi-rural Czech farms exposed to industrial activities. Based on these observations, it is reasonable to hypothesize that a 50 kg goat grazing in a contaminated pasture or fed with PAHs contaminated fodder may ingest from about 0.2 mg PAHs/day in slightly contaminated area up to about 1.25 mg PAHs/day in polluted semi-rural areas. Once ingested, PAH are partially absorbed through the gastrointestinal tract before being metabolised into the liver. There, they can be hydroxylated by CYP450-oxydases (1A1 and 1B1 mainly) and are subsequently conjugated with glucuronides and sulfates before to be almost fully eliminated in urine or bile. In an agronomic standpoint, and keeping in mind that PAHs are lipophilic contaminants susceptible to contaminate milk and therefore dairy products, a question of importance is therefore to evaluate the level of exposure of dairy ruminants to PAHs. As a preliminary study before any further cost and time consuming exhaustive analytical investigations on each of the 16 US-EPA priority PAHs susceptible to be ingested via the diet, it was proposed to use the urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of oral exposure to pyrene (a four rings PAH) and other PAHs (Jongeneelen et al., 1985, 1990; Jongeneelen, 2001; Booggard and Van Sittert, 1994; World Health Organization, 1996; Bouchard and Viau, 1998; Chahin et al., 2008; Levin, 1995). Indeed, pyrene presents several key characteristics: (i) it shows a relatively high abundance in PAH mixtures where it is always present (Jongeneelen et al., 1985; Jongeneelen, 2001; Buchet et al., 1992), (ii) it undergoes a quite simple metabolism to 1-hydroxypyrene as a major metabolite, which is subsequently transformed into 1-hydroxypyrene-glucuronide before to be excreted into urine (Jongeneelen et al., 1987; Grimmer et al., 1993) and (iii) data found in numerous studies show quite good positive correlations between pyrene concentrations and other 3, 4, 5 and 6 rings PAHs concentrations in the air (Park et al., 2002; Sharma et al., 2007; Bozlaker et al., 2008) and in soils (Yin et al., 2008). To date, only few studies attempted to evaluate transfer of PAHs and/or their metabolites in ruminant milk and/or urine (Grova et al., 2002; Lapole et al., 2007; Chahin et al., 2008). But these authors clearly demonstrated (i) that PAHs were only slightly transferred toward milk in a native form (less than 0.01% for phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene) and (ii) that metabolized forms of

these PAHs were excreted into milk and urine in much larger amount. For instance, Grova et al. (2005) demonstrated that 1, 2, 3, 4 or 9-hydroxyphenanthrene as well as 9,10-dihydroxyphenanthrene were counting for about 95% of the phenanthrene excreted into milk and Lapole et al. (2007) observed that 1-hydroxypyrene excretion in milk was about 70 folds higher as compared to pyrene one.

In the present study, two sets of three alpin goats were orally exposed to 0.28 and 0.04 mg/day/goat of a mix consisting of phenanthrene (3 ring PAH), pyrene (4 rings PAH) and benzo(a)pyrene (5 rings PAH) in order to simulate levels of exposure such as the one found in slightly contaminated rural pastures. Transfer rates of pyrene toward urine and milk under the 1-OH-pyrene form were combined with some transfer rates that we observed in a previous experiment using much higher doses such as 1, 7 and 50 mg/day (Chahin et al., 2008). Based on this comparison, our first objective was to check whether the linear relationship observed by Chahin et al. (2008) between daily ingested doses and levels of 1-OH-pyrene excreted in urine and milk still holds when using much lower and more realistic levels of exposure to PAHs, which would demonstrate the biomarking potential of 1-OH-pyrene under low to moderate realistic levels of exposure to PAHs. If so, the second objective of the present paper was to propose transfer equations that could be used as practical tool for evaluation of global oral exposure of small dairy ruminants such as goat, and possibly other dairy ruminants, to PAHs. Finally, next to additional and detailed transfer data of phenanthrene and benzo(a)pyrene metabolites into urine, a literature based approach is proposed for an improved use of 1-OH-pyrene as a bioindicator of exposure of goats to pyrene but also to other US-EPA PAHs. We feel the need to specify, here, that the present article combines about 80% of new experimental data together with only about 20% of already published data in Chahin et al. (2008). This combination was necessary for statistical analysis.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Alpine goats (50 ± 5 kg) from the herd of the "Domaine Experimental de la Bouzule" (Champenoux, France) were used for this experiment as a model of the lactating ruminant. As detailed in Chahin et al. (2008), a set of four goats was previously used to investigate PAH metabolites transfer subsequent to exposures to 1, 7 and 49 mg PAH/day. In the present study, another set of three goats was used to investigate PAHs metabolites transfer subsequent to exposures to 0.28 and 0.04 mg PAH/day. Goats received a 7 days adaptation period within individual boxes at an average day temperature of 22°C and under natural light conditions. The animals were mechanically milked twice a day providing an average milk production of 2000 ± 200 mL during the seven days before the experiment was run. The goats were fed with meadow hay, water and mineral salt *ad libitum* and received 850 g of granulated mix consisting of dehydrated maize, alfalfa, wheat, sunflower grains, sugar beat, colza and soya beans cattle cakes mixed with palm oil, sugar beat molasses and other organic additives and specific salts. This diet met the nutritional requirements of goats and has already been proven to be efficient to maintain the milk production at about 3 L/day over three milkings (Grova et al., 2006). Measurements of the milk production were performed each day as well as renewal of the litters. Full cleaning of each animal box were performed every 7 days.

2.2. Experimental design

The experimental design consisted in the oral and daily intake of two different amounts of PAHs (0.04 and 0.28 mg/day/goat), each level being applied during a seven days period. The animal protocol was in accordance with the general directive 86/609/EEC on animal care used in European Community (1986). After 1 week of adaptation period, and just after the morning milking, each animal received 2 mL of Cremophor oil (Fluka, city, Germany) containing 0.04 mg of pyrene, 0.04 mg of phenanthrene and 0.04 mg of benzo(a)pyrene (0.0008 mg/kg body weight) for 7 consecutive days. The dose 0.28 mg (0.0056 mg/kg body weight) was then applied for 7 successive days. PAHs were directly administered into the mouth of the animal with a syringe. The latter was then flushed once with 2 other mL of cremophor oil and the contaminated oil was given to the animals. It was previously demonstrated that this amount of ingested oil did not affect the rumen activity (Murphy and Morgan, 1983). Urine samples and milk samples (2 last milkings) from the 24 h before each 7-day periods were collected and stored at -20°C .

2.3. 1-OH-pyrene extraction in milk

Extraction of 1-OH-pyrene from milk was performed according to the procedure designed in our laboratory by Grova et al. (2005) and previously described in Chahin et al. (2008). Extractions were performed in duplicate for pyrene, phenanthrene and benzo(a)pyrene hydroxymetabolites but, for technical and priority reasons, only 1-OH-pyrene was quantified in milk as described below. In brief, 10 mL milk samples were collected in 50 mL Falcon tubes (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany), adjusted at pH 5.2 with glacial acetic acid (Eastman, Kingsport, Tennessee, USA) and complemented with 50 μL of β -glucuronidase and sulfatase solutions respectively. β -glucuronidase type H-2 from *Helix pomatia* was provided in crude solution by Sigma-Aldrich (Poole, United Kingdom) with a volume activity of 99,000 unit/mL, where one Unit is the amount of glucuronidase that can liberate 1 μg of phenolphthalein from phenolphthalein glucuronide at 37°C and pH 5, in 30 min. Sulfatase type H-2 from *H. pomatia* was provided in crude solution by Sigma-Aldrich (Poole, United Kingdom) with a volume activity of 2000 unit/mL, where one Unit is the amount of sulfatase that can hydrolyse 1 μmole of p-nitrocatechol sulfate per hour at pH 5 and at 37°C . Milk samples were then incubated at 37°C during 16 h in order to convert glucuronide and sulfate conjugates of 1-OH-pyrene into 1-OH-pyrene. Internal standard 6-OH chrysene was then added to the samples, which were subsequently mixed in 20 mL cyclohexane (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) and 20 mL ethyl acetate (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France) before to be thoroughly shaken with an horizontal Agitest shaker (CAT, Staufen, Germany) at a maximum speed of 700 shakings per min during 30 min at ambient temperature. After centrifugation (15 min at $1000 \times g$) in a Jouan CR41 centrifuge (Chateau Gontier, France), the supernatant was evaporated with a Buchi RE121 rotovapor (Flawil, Switzerland) under automated vacuum control. Residual volume was recovered with 6 mL of cyclohexane and applied onto an Envi-Chrom P SPE column (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) previously conditioned with 5 mL of ultra-pure water, 5 mL of methanol (Prolabo, Leuven, Belgium) and 5 mL of cyclohexane. After elution of interfering compounds with 2-folds 3 mL cyclohexane, pyrene and 1-OH-pyrene were co-eluted with 12 mL cyclohexane/ethyl acetate (50:50, v/v). The samples were totally evaporated to dryness at 40°C using a nitrogen flow and a multi-channels evaporator (Liebisch, Bielefeld, Germany). The dry residue was then dissolved in 2 mL cyclohexane and 2 mL methanol–water (80/20; v/v), vortexed at least 10 s, and centrifuged at $1500 \times g$ and ambient temperature during 5 min, the two phases were then separated with a Pasteur pipette. This step, which was repeated once, allowed the separation of pyrene and fatty acids (cyclohexane fraction) from 1-OH-pyrene and 6-OH chrysene metabolites (methanol/water fraction). Methanol/water fraction was collected, and totally evaporated to dryness at 40°C under nitrogen flow before to be redissolved in 4 mL ethyl acetate–water solution (50/50, v/v) and then centrifuged at $1500 \times g$ and ambient temperature during 5 min. 40 μL of 1000 ng/mL Chrysene-d12 as an external standard (Cluzeau Synthe Labo, Paris, France) was then added to the supernatant. Extracts were finally evaporated to dryness and redissolved into 250 μL acetonitrile before HPLC–fluorimetry analysis.

2.4. Metabolites extraction in urine

In addition to 1-OH-pyrene and 3-OH Benzo(a)pyrene, 1-OH-phenanthrene, 2-OH-phenanthrene, 3-OH-phenanthrene and 4-OH-phenanthrene were also extracted. Samples were treated using the method described by Wang et al. (2005). 5 mL urine sample was transferred to a 50 mL flask (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany). The pH of the solution was adjusted to 5.0 with 1 M HCl, and then 5 mL of 0.5 M acetate buffer (pH 5.0) was added and complemented with 50 μL of β -glucuronidase and sulfatase solutions, respectively, before incubation at 37°C during 16 h. Internal standard 6-OH chrysene was then added to the samples. After hydrolysis, samples were centrifuged at $1500 \times g$ for 3 min in a Jouan CR41 centrifuge (Chateau Gontier, France), and supernatant was used for solid phase extraction. C_{18} cartridges were pretreated with 5 mL of methanol and 5 mL of ultra-pure water. The hydrolyzed urine sample was then loaded onto the cartridge at a flow rate lower than 1 mL min^{-1} . The column was washed with 10 mL water and 10 mL of methanol–water (30/70, v/v) to remove the matrix interferences. Purity of methanol was 99.8%. PAHs metabolites and internal standard were eluted with 4 mL of methanol. The eluate was totally evaporated to dryness at 40°C using a gentle flow of nitrogen and multi-channels evaporator (Liebisch, Bielefeld, Germany). The dry residue was then dissolved in 1 mL of methanol and vortexed at least 10 s. The solution was filtered through 0.2 μm filter, and 40 μL of external standard Chrysene-d12 (Cluzeau Synthe Labo, Paris, France) was finally added before storage at -20°C and subsequent HPLC–fluorimetry analysis. Before injection, the extracts must be diluted at 50/50 (v/v) with a 10 mM acetate buffer solution at pH 4.

2.5. HPLC analysis in milk

The HPLC system consisted of an autosampler 717+ programmed for 100 μL of volume injection, a gradient controller 600 with column temperature control and a 2475 multi-wavelength fluorescence detector (all from Waters, Milford, Massachusetts, USA). 1-OH-pyrene, internal standard 6-OH chrysene, and external standard Chrysene-d12 were separated on a reverse phase C_{18} column (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μm , Grace-Vydac, Hesperia, CA, USA) with a guard column (C_{18} , 20 mm \times 4 mm I.D., 5 μm , Grace-Vydac). Based on a method recently designed in our Laboratory, HPLC conditions were as follows: eluent A, 4 mg/L ascorbic acid solution (daily prepared and stored in brown glass bottle); eluent B, methanol; gradient program at constant temperature (35°C) and flow rate (0.8 mL/min), 0–21 min (eluent B composition, 65%), 21–22 min (B, 65–100%), 22–37 min (B, 100%), 37–38 min (B, 100–65%); detection wavelength program (excitation/emission in nm), 0–21 min (346/400) for 1-OH-pyrene and 6-OH chrysene, 22–53 min (270–378) for chrysene-d12. After the end of the washing step (38 min), the initial mobile phase conditions were kept during 15 min up to 53 min before the next sample was injected.

2.6. HPLC analysis in urine

Analysis was carried out using a method developed by Chahin et al. (2008) and derived from the method of Chetiyankornkul et al. (2006) for the simultaneous analysis of 1, 2, 3 and 4-OH-phenanthrene, 1-OH-pyrene and 3-OH benzo(a)pyrene. In this paper, urinary concentrations of phenanthrene and benzo(a)pyrene hydroxymetabolites not shown in Chahin et al. (2008) will be introduced together with urinary concentrations found in the present study, where much lower levels of exposure were used. In brief, the method can be described as follows. Autosampler, gradient controller and fluorescence detector were similar to the ones used for analysis in milk. 1-OH-pyrene (and other metabolites), internal standard 6-OH chrysene, and external standard Chrysene-d12 were separated on a Discovery reverse phase amide C_{16} column (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μm , Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a guard column (C_{16} , 20 mm \times 4 mm I.D., 5 μm , Supelco). HPLC conditions were as follows: eluent A, acetonitrile (purity of 99.8%); eluent B, 10 mM acetate buffer at pH 4 (daily prepared and stored in brown glass bottle); gradient program at constant temperature (40°C) and flow rate (1 mL/min), 0–25 min (eluent A composition, 45%), 25–50 min (A, 45–65%), 50–60 min (A, 65%), 60–63 min (A, 65–90%), 63–68 min (A, 90%), 68–71 min (A, 90–45%), 71–86 min (A, 45%); detection wavelength program (excitation/emission in nm), 0–35 min (256–370) for 1, 2, 3 and 4-OH-phenanthrene, 35–46.5 min

Table 1

1-OH-pyrene concentrations, transfer rate and average transfer rates in milk with their associated standard deviations.

Sample	Average 1-OH-pyrene ^a (ng/g)/goat ^a		Variation (%)	Average /dose	Variation (%)	Milk ^b (g)	Transfer rate in milk ^c (%)	Average transfer rate (%)
	Dose/day pyrene (mg)	Goat						
0.04	1	0.33 ± 0.02	6.1	0.28 ± 0.05	7.1	1667	1.38	1.41 ± 0.09
	2	0.28 ± 0.03	10.7			2158	1.51	
	3	0.24 ± 0.03	12.5			2247	1.34	
0.28	1	0.12 ± 0.01	8.3	0.23 ± 0.11	8.69	1589	0.48	0.13 ± 0.06
	2	0.34 ± 0.06	17.6			1159	0.99	
	3	0.23 ± 0.04	17.4			2197	1.26	
1	1	5.5 ± 0.4	6.8	5.2 ± 2.0	2.9	1696	0.93	1.10 ± 0.55
	2	2.7 ± 0.4	15.2			1703	0.46	
	3	7.6 ± 0.2	2.7			2364	1.79	
	4	4.9 ± 0.2	3.4			2484	1.22	
7	1	65.0 ± 4.5	6.9	47.2 ± 23.4	4.0	1523	1.41	1.26 ± 0.57
	2	36.1 ± 2.1	5.8			1873	0.97	
	3	68.2 ± 5.0	7.3			2042	1.99	
	4	19.6 ± 2.9	14.9			2460	0.69	
49	1	568.0 ± 59.4	10.5	362.7 ± 162.7	4.9	1200	1.39	1.23 ± 0.42
	2	228.2 ± 3.8	1.7			1521	0.71	
	3	418.5 ± 32.4	7.7			1988	1.70	
	4	235.9 ± 43.5	18.5			2363	1.14	

^a Average based on three extractions on the same milk sample for doses 1, 7 and 49 mg/day and on two extractions on the same milk sample for doses 0.04 and 0.28 mg/day.

^b Milk produced during the 24 h (two last milkings) before the increase of dose.

^c Transfer rate (%) into milk of ingested pyrene under the 1-OH-pyrene form 24 h after the last ingestion of a dose calculated as (milk (in g) × average 1-OH-pyrene concentration in milk (in ng/g)) × 100/daily intake (converted in ng).

(240–387) for 1-OH-pyrene, 46.5–56 min (270–378) for internal standard 6-OH chrysene and external standard chrysene-*d*12, over 56 min (375–435) for 3-OH Benzo(a)pyrene. Injection volume was 100 µL. After the end of the washing step (71 min), the initial mobile phase conditions were kept during 15 min up to 86 min before the next sample was injected.

2.7. Quantification limits

After definition of the $h_{average}$ and of the h_{max} on both sides of the hydroxymetabolites peaks we could calculate two different quantification limits $QL_1 = 10 \times R \times h_{average}$ and $QL_2 = 10 \times R \times h_{max}$ (amounts of extract to be injected in the 100 µL injection volume). Choosing the method based on h_{max} logically provided the highest QL-value. Taking the average of these two QL-values we obtained estimated quantification limit values and detection limit values in the range 1.5–18.75 ng/kg and 0.5–5.75 ng/kg, respectively, depending on hydroxymetabolites.

2.8. Statistical analysis

SAS 9.1.3 (SAS Insitute, Cary, NC, USA) was used to perform data analysis. The linear relation between levels of exposures and metabolites excreted into milk or urine was tested with SAS Proc Reg to generate Pearson correlations matrix, ANOVA and parameter estimates. SAS Proc Univariate was subsequently used to analyse the normality of residuals via a Shapiro-Wilk test. Slopes comparisons were performed on two different, high and low, experimental domains (0.04–49 and 0.04–7 mg/day) for 1-OH-pyrene concentrations and amounts in milk and urine. To do so we confronted the statistic value t described in equation 1 to the student table for alpha risk=0.05 and freedom degree $n_1 + n_2 - 4$ with n_1 and n_2 representing the number of points used in each experimental domain. In Eq. (1), a_1 and a_2 represent the slopes issue from the two regressions and s_{a_1} and s_{a_2} are the respective standard deviations on these slopes:

$$t = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s_{a_1}^2 + s_{a_2}^2}} \quad (1)$$

Finally, in order to check the possible interaction of goats together with metabolites amounts excreted in milk and urine, a SAS PROC GLM

was applied on a data set in which goats were considered as an uncontrolled factor with values being 1, 2, 3 or 4. This analysis was performed on data points issue from the 4 goats exposed to 1, 7 and 49 mg/day.

3. Results and discussion

3.1. HPLC analysis, calibration curve, extraction yield and quantification limits

Our 10 points standard curve in milk showed an excellent linearity ($R^2=0.99$) in the range 0–5 ng 1-OH-pyrene/g milk. Spiked milks at 0–0.025–0.05–0.075–0.1–0.2–0.5–1–2 and 5 ng/mL were used for this standard curve. Our eight points standard curves in urine also showed a good linearity ($R^2=0.99$ in the range 0–50 ng 1-OH-pyrene/g urine and in the range 0–5 ng/g urine for the other metabolites. Spiked urines at 0–1–2.5–5–7.5–10–20–50 ng/mL were used for 1-OH-pyrene and spiked urines at 0–0.1–0.25–0.5–0.75–1–2–5 ng/mL were used for the other metabolites. In addition, based on the use of our external and internal standards we obtained an average extraction yield of about 35% within the range 23.9–53.9% for 1-OH-pyrene in milk, which is acceptable given the complexity of the milk composition (caseins, fat compounds, lactose, etc.) and the extremely small quantities to be extracted.

3.2. 1-OH-pyrene in milk

Table 1 provides details on transfer of pyrene under 1-OH-pyrene form in the milk for each of the five doses

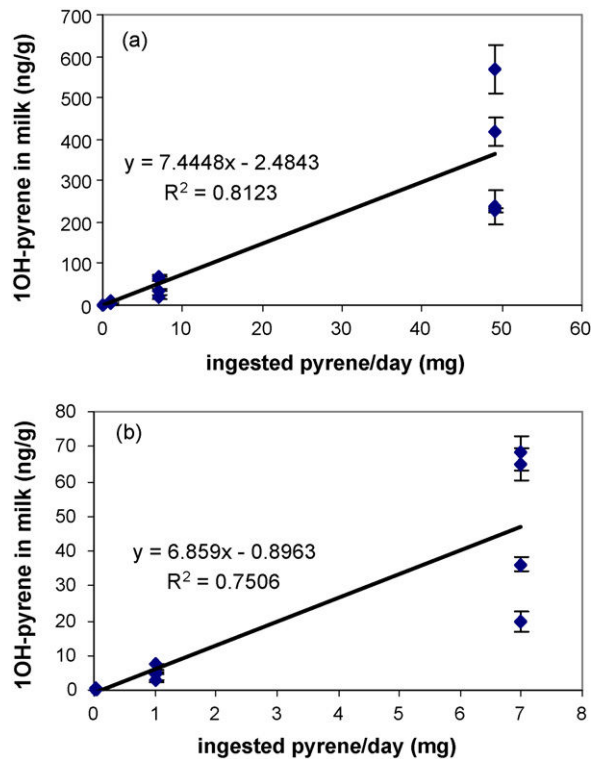


Fig. 1. Average 1-OH-pyrene concentrations (ng/g) and their associated standard deviation in milk produced 24 h after last ingestion of doses in the range 0.04–49 mg/day (a) and in the range 0.04–7 mg/day (b).

tested as well as goat to goat variations in 1-OH-pyrene concentration in milk and milk volumes. Data corresponding to this specific study (daily oral ingestions of 0.04 and 0.28 mg/goat/day) are combined together with data from Chahin et al. (2008), in which daily oral ingestions of 1, 7 and 49 mg/goat/day were tested. Fig. 1a presents the correlation between the doses of pyrene ingested (0.04–49 mg/day) and the pyrene concentration in the milk volume produced 24 h after the last ingestion of each dose (two milking volumes). Fig. 1b focuses on the range 0.04–7 mg/day. In order to take into account the variations in milk volumes produced for each dose, Fig. 2a presents the correlation between the doses of pyrene ingested and the 1-OH-pyrene mass amount found in the milk volume produced 24 h after the last ingestion of a pyrene dose (two milking volumes). Fig. 2b focuses on the range 0.04–7 mg/day. An increase of excreted 1-OH-pyrene (concentration or amount) is observed when daily ingested dose increase. Despite the very large experimental domain tested (the highest dose of 49 mg/day being 1225 folds higher as compared to the lowest dose of 0.04 mg/day), we do not observe any plateau in excretion of 1-OH-pyrene into the milk. As listed in Table 5, which lists regression outputs and analysis of normality of residuals for each metabolite analysed in the present study, the amounts of 1-OH-pyrene found in milk can be linearly linked to daily ingested doses, considering both 0.04–49 mg/day (p ANOVA < 0.0001 and $R^2 = 0.88$) and 0.04–7 mg/day (p

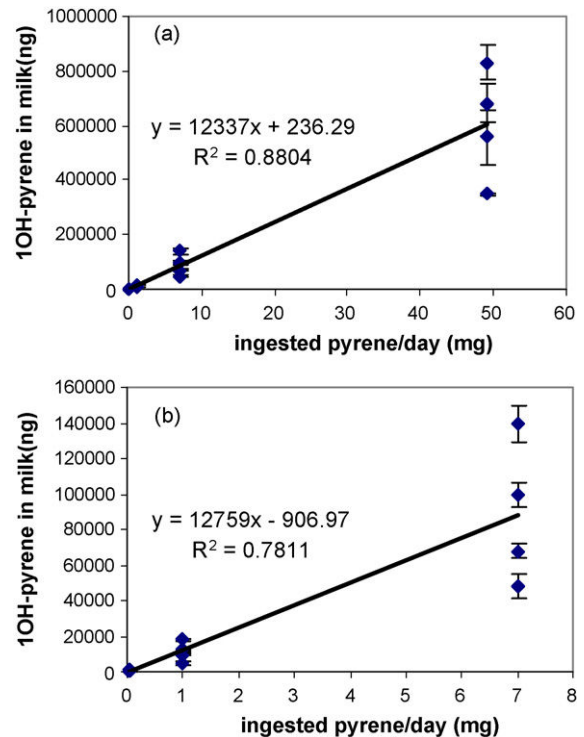


Fig. 2. Average 1-OH-pyrene amounts (ng) and their associated standard deviation found in milk produced 24 h after last ingestion of doses in the range 0.04–49 mg/day (a) and in the range 0.04–7 mg/day (b).

ANOVA < 0.0003 and $R^2 = 0.78$) as experimental domains. Corresponding slopes were not found to be significantly different. In both cases, a two-tailed t test showed that intercept was not significantly different from 0. For each of these two regression domains, Shapiro–Wilk tests showed that residuals could be considered as normally distributed, thus demonstrating that the fitting was appropriate. However, as can be seen in Fig. 3, when considering separately each goat, 1-OH-pyrene excretion versus ingested pyrene doses can be linearly fitted and significant differences between slopes can be observed, which shows an

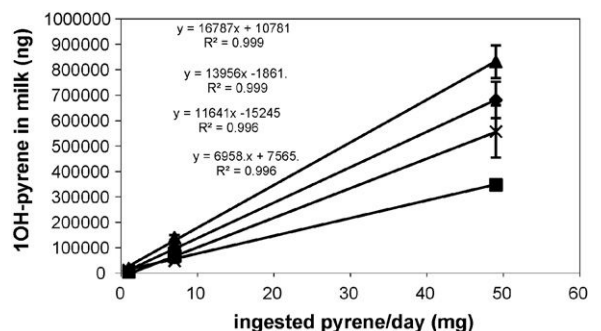


Fig. 3. Average 1-OH-pyrene amounts (ng) and their associated standard deviation found in milk produced 24 h after last ingestion of doses in the range 0.04–49 mg/day for each goat: (■) goat 1, (×) goat 2, (◆) goat 3 and (▲) goat 4.

Table 2

1-OH-pyrene concentrations, transfer rates and average transfer rates in urine with their associated standard deviations.

Sample	Average 1-OH-pyrene (ng/g)/goat		Average /dose	Variation (%)	Urine ^a (g)	Transfer rate in urine ^b (%)	Average transfer rate (%)
Dose/day pyrene (mg)	Goat						
0.04	1	1.2	2.0 ± 0.7	35	1932	5.6	10.7 ± 4.5
	2	2.4			2143	12.9	
	3	2.6			2153	13.7	
0.28	1	Blood in urine	8.2 ± 6.8	83	754	ND	6.2 ± 6.8
	2	3.4			1181	1.4	
	3	13.0			2362	11.0	
1	1	32.2	47.9 ± 11.4	24	3407	10.9	8.9 ± 2.6
	2	51.8			986.3	5.1	
	3	59.1			1715	10.1	
	4	48.7			1929	9.4	
7	1	245.8	402.7 ± 185.48	46	2910	10.2	12.1 ± 1.8
	2	572.6			1499	12.3	
	3	552.5			1759	13.9	
	4 ^c	237.5			871	3.0	
49	1	2365.0	3184.8 ± 982.9	31	4690	22.6	13.5 ± 6.4
	2	3776.8			1020	7.9	
	3	4260.4			1520	13.2	
	4	2336.9			2180	10.4	

^a Urine produced during the 24 h before the increase of dose.

^b Transfer rate (%) into urine of ingested pyrene under the 1-OH-pyrene form 24 h after the last ingestion of a dose calculated as (urine (in g) × average 1-OH-pyrene concentration in urine (in ng/g)) × 100/daily intake (converted in ng).

^c Data not used for the calculation of the average transfer rate in urine.

interaction of goats with the ingested doses. Such interaction, that is the non-equality of slopes depending on goats, was clearly established based on a SAS PROC GLM applied on a data set in which goats were considered as an uncontrolled factor with values 1, 2, 3 or 4. These differences reflect an heterogeneity in terms of absorption of pyrene through the gastrointestinal tract and/or in terms of pyrene metabolism between animals. Because slopes are significantly different, we should not be allowed to perform a single linear regression on the whole data set (every goats and doses) as was performed in Figs. 1 and 2. But this way to proceed remains a reasonable way to generate an “average equation” that can be used at the level of a herd of goats in order to evaluate a daily ingested dose of pyrene (and therefore other PAHs) based on amounts of 1-OH-pyrene analysed in milk. The question to know whether it is preferable or not to keep the intercept into the equation deserves to be discussed. Indeed, although these intercepts are not significantly different from 0, applying equations with their intercept may contribute to (i) underestimation of the pyrene (PAHs) daily ingestion if this intercept is positive or (ii) overestimation of the pyrene (PAHs) daily ingestion in case this intercept is negative. This is mainly due to the limited number of goats used in our experiments combined to their heterogeneity in terms of pyrene absorption and/or metabolism. For these reasons, and because intercepts are not significantly different from 0, we suggest to use equations listed in Table 5 without their intercept. Another interesting point is that average transfer rates are not significantly affected by very large differences in daily doses of ingested pyrene (1.41 ± 0.55 ,

$1.10 \pm 0.55\%$, $1.26 \pm 0.57\%$ and $1.23 \pm 0.57\%$ for 0.04, 1, 7 and 49 mg/day, respectively). This may be explained by a pre-existing and/or induced metabolic machinery (CYP450 1A1 and 1B1 mainly) inside the liver or intestinal epithelium. It should be pointed out, here, that pyrene conversion into 1-OH-pyrene is not affected by the simultaneous ingestion of similar amounts of phenanthrene and benzo(a)pyrene included in the tested PAH ternary mixture. It is difficult to know in which extent the conversion of pyrene into 1-OH-pyrene takes benefit of a metabolic machinery that is preexisting, specifically induced by itself, or takes benefit of an induction mediated by the two other PAHs, especially benzo(a)pyrene, which is generally recognized as a powerful CYP450 inducer. Pyrene was indeed also already shown to induce CYP450 production (Zapata-Perez et al., 2002). Despite these interrogations, the present observations confirm that analysis of 1-OH-pyrene in milk, an easy to sample matrix, should be considered with interest for a rapid evaluation of the level of exposure of goats (an likely other ruminants) to PAHs.

3.3. 1-OH-pyrene in urine

Table 2 lists the 1-OH-pyrene concentrations and amounts found in urine as well as corresponding transfer coefficients. As illustrated in Figs. 4 and 5, these concentrations and amounts can be linearly related to the daily dose of ingested pyrene in the range 0.04–49 mg/day as well as in the range 0.04–7 mg/day. According to Table 5, which lists regression data, the amounts of 1-OH-pyrene found in urine can be linearly linked to daily

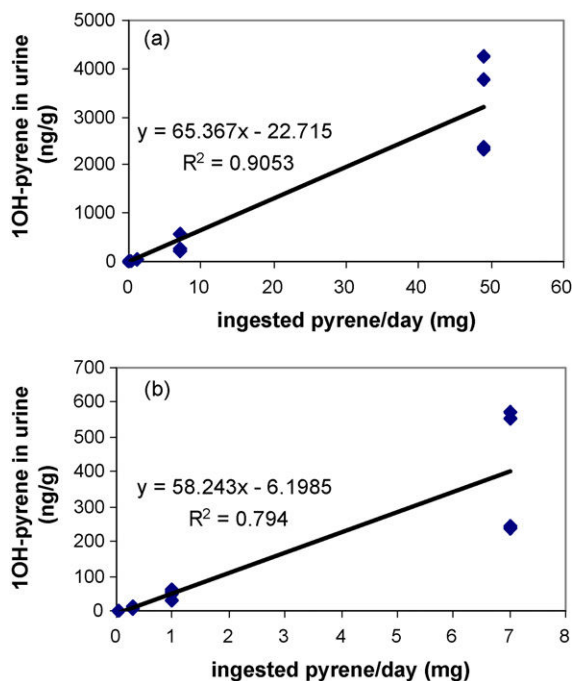


Fig. 4. Average 1-OH-pyrene concentrations (ng/g) and their associated standard deviation in urine produced 24 h after last ingestion of doses in the range 0.04–49 mg/day (a) and in the range 0.04–7 mg/day (b).

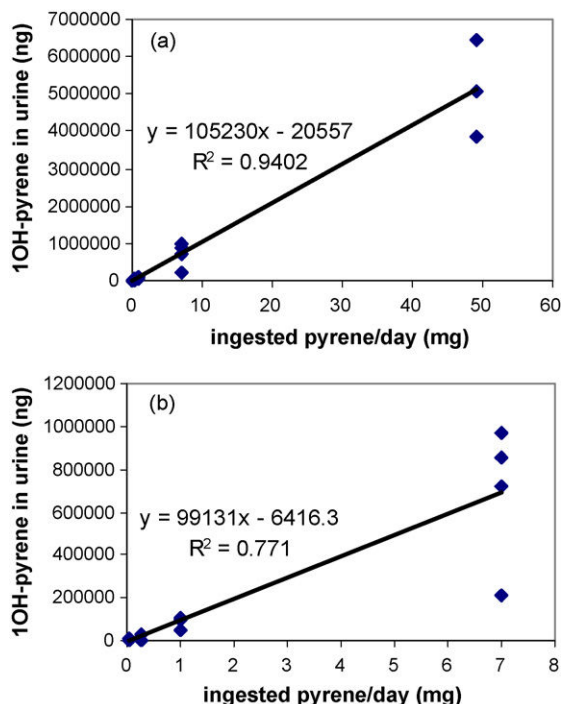


Fig. 5. Average 1-OH-pyrene amounts (ng) and their associated standard deviation found in urine produced 24 h after last ingestion of doses in the range 0.04–49 mg/day (a) and in the range 0.04–7 mg/day (b).

ingested pyrene doses, considering both 0.04–49 mg/day (p ANOVA < 0.0001 and $R^2 = 0.94$) and 0.04–7 mg/day (p ANOVA < 0.0001 and $R^2 = 0.77$) as experimental domains. In both cases, a two-tailed t test showed that intercept was not significantly different from 0. For each of these two regression domains, Shapiro-Wilk tests showed that residuals could be considered as normally distributed, thus demonstrating that the fitting was appropriate. Slopes obtained with regressions on 1-OH-pyrene data in the range 0.04–49 mg/day and 0.04–7 mg/day did not significantly differ, considering both concentrations and amounts. As already observed in Chahin et al. (2008), transfer rates of pyrene toward urine under the 1-OH-pyrene form was about 10-folds higher (about 10%) as compared to transfer rate toward milk (about 1%) and were not significantly affected by large changes in levels of exposure to pyrene, probably for the same reasons as the one discussed above. When summing the % transfers of pyrene under the 1-OH-form into milk and urine, not more than about 15% transfer is found toward these two compartments. Given the fact that it was recently put in evidence that, even 24 h after a 100 mg pyrene ingestion by goats, the transfer of pyrene under native form was less than 0.01% into milk and less than 0.05% into urine (Lapole et al., 2007), it can reasonably be assumed that feces is by far the main elimination pathway for pyrene (non-absorbed or absorbed and eliminated via the bile) and its metabolites, such as 1-OH-pyrene. It can also be reasonably assumed that other metabolites of pyrene, different from 1-OH-pyrene, represent a major source of pyrene metabolites as compared to 1-OH-pyrene. While the first assumption is actually generally recognized in literature, the second assumption could be supported by the recent studies of Ruzgyte et al. (2005, 2006). These authors recently showed that about 27% of intravenously injected pyrene into Sprague–Dawley rats was metabolized under the pyrene-1,6-dione and pyrene-1,8-dione forms against about 1% only under the 1-OH-pyrene form (analysis in urine over a 48 h sampling period). Further investigations on Cytochrome P450-oxidases induction might provide explanations about this question.

3.4. 1, 2, 3, 4-OH phenanthrene and 3-OH benzo(a)pyrene in urine

As depicted in Table 3, transfer rates of hydroxymetabolites of phenanthrene toward urine were found to be about 1–3% only without significant differences observed between 1, 2, 3 or 4-OH-phenanthrene. The sum of these four hydroxymetabolites of phenanthrene counted for about 10% of the amount of ingested phenanthrene. As listed in Table 4, transfer coefficient of 3-OH benzo(a)pyrene toward urine was about 0.01% only, which is in accordance with former results obtained by Grova et al. (2006). These results are in accordance with the high hydrophobicity of benzo(a)pyrene, which is a five rings PAH. 3-OH benzo(a)pyrene was not quantifiable into urine for daily dose 0.04 and 0.28 mg/day. As observed with 1-OH-pyrene, large changes in ingested doses did not

Table 3
1, 2, 3 and 4-OH-phenanthrene concentrations in urine and their average transfer rates of with their associated standard deviations.

Dose/day phenanthrene (mg)	Metabolite	Average concentration (n = 3 or 4) in urine (ng/g) ^a	Variation (%)	Average transfer rate (%)
0.04	1-OH-Phe	1.04 ± 0.10	10	5.56 ± 6.58
	2-OH-Phe	0.44 ± 0.47	106	2.38 ± 2.69
	3-OH-Phe	0.27 ± 0.28	104	1.19 ± 1.52
	4-OH-Phe	0.18 ± 0.01	11	0.62 ± 0.21
0.28	1-OH-Phe	4.55 ± 0.59	13	4.17 ± 4.90
	2-OH-Phe	2.97 ± 2.15	72	1.67 ± 0.32
	3-OH-Phe	(0.05 ± 0.00 ^b)	0	(0.02 ± 0.00 ^b)
	4-OH-Phe	ND	ND	ND
1	1-OH-Phe	28.27 ± 6.70	24	5.3 ± 1.91
	2-OH-Phe	20.33 ± 3.57	18	3.83 ± 1.28
	3-OH-Phe	29.93 ± 2.75	9	6.04 ± 3.36
	4-OH-Phe	(44.30 ± 0.057 ^b)	0	(8.86 ± 4.38 ^b)
7	1-OH-Phe	31.06 ± 3.53	11	0.79 ± 0.40
	2-OH-Phe	44.31 ± 15.52	35	1.09 ± 0.48
	3-OH-Phe	76.29 ± 22.17	29	1.84 ± 0.74
	4-OH-Phe	45.79 ± 1.28	3	1.15 ± 0.53
49	1-OH-Phe	111.05 ± 18.93	17	0.52 ± 0.04
	2-OH-Phe	235.92 ± 126.36	54	0.95 ± 0.49
	3-OH-Phe	451.05 ± 254.77	56	1.88 ± 1.15
	4-OH-Phe	68.60 ± 7.78	11	0.31 ± 0.17
Metabolite	Overall Average Transfer in % ^b		Variation (%)	
1-OH-Phe	3.26 ± 1.69		52	
2-OH-Phe	1.98 ± 0.61		31	
3-OH-Phe	2.73 ± 0.97		36 ^b	
4-OH-Phe	2.08 ± 0.20		10	
Sum	10.5 ± 2.05			

ND: not determined due to analytic failure.

^a n = 3 for doses 0.04 and 0.28 mg/day and n = 4 for doses 1, 7, 49 mg/day.

^b Outliers not considered in overall average transfer rate calculation.

Table 4
3-OH benzo(a)pyrene concentrations in urine and % recovery of ingested benzo(a)pyrene under the 3-OH benzo(a)pyrene form with their associated standard deviations.

Sample	Average 3-OH benzo(a) pyrene (ng/g)/goat	Average /dose	Variation (%)	Urine ^a (g)	Transfer rate in urine ^b (%)	Average transfer rate (%)
Dose/day benzo(a) pyrene (mg)	Goat					
0.04	1	ND		1932		
	2	ND	ND	2143	ND	ND
	3	ND		2153		
0.28	1	Blood in urine		754		
	2	ND	ND	1181	ND	ND
	3	ND		2362		
1	1	0.056		3407	0.019	
	2	0.102	0.085 ± 0.045	986.3	0.010	0.015 ± 0.008
	3	0.141		1715	0.024	
	4	0.043		1929	0.008	
7	1	0.181		2910	0.008	
	2	0.971	0.357 ± 0.416	1499	0.021	0.008 ± 0.009
	3	0.052		1759	0.001	
	4	0.223		871	0.003	
49	1	1.504		4690	0.014	
	2	3.306	2.856 ± 1.589	1020	0.006	0.011 ± 0.004
	3	4.910		1520	0.015	
	4	1.705		2180	0.008	

^a Urine produced during the 24 h before the increase of dose.

^b % Recovery (or transfer coefficient) into urine of ingested benzo(a) pyrene under the 3-OH benzo(a)pyrene form 24 h after the last ingestion of a dose calculated as (urine¹ (in g) × average 3-OH benzo(a)pyrene concentration in urine (in ng/g)) × 100/daily intake (converted in ng).

Table 5

Summarized regression analysis data over the experimental domain (0.04–49 mg/day) for analyzed amounts of PAH metabolites (in ng) in milk or urine as a function of daily intakes expressed in mg with each data point corresponding to a goat.

Metabolites	Matrix	Dose range (mg/day)	Pearson cor.	ANOVA Pr.	R ²	Slope	Intercept (ng)	Shapiro-Wilk Pr. on residuals
1-OH-Pyr	Milk	0.04–49	0.938	<0.0001	0.88	12,337	236.3	0.0026
1-OH-Pyr	Milk	0.04–7	0.884	0.0003	0.78	12,759	–906.9	0.0797
1-OH-Pyr	Urine	0.04–49	0.969	<0.0001	0.94	105,219	–20,100	0.0005
1-OH-Pyr	Urine	0.04–7	0.878	<0.0001	0.77	99,131	–6416	0.0007
1-OH-Phe	Urine	0.04–49	0.962	<0.0001	0.93	2585.8	6599.6	0.3653
2-OH-Phe	Urine	0.04–49	0.969	<0.0001	0.94	6522.7	17,767	0.7275
3-OH-Phe	Urine	0.04–49	0.958	<0.0001	0.92	12,438	2779.9	0.0064
4-OH-Phe	Urine	0.04–49	0.971	<0.0001	0.94	929	–393	0.0035
3-OH-BaP	Urine	0.04–49	0.904	<0.0001	0.82	111.4	16.7	0.7058

significantly affect the transfer rates of metabolites. SAS PROC GLM using goats as an uncontrolled factor demonstrated that goats were significantly interacting with the dose factor, thus showing heterogeneity between goats in terms of absorption and/or metabolism of PAHs. As listed in Table 5, linear relationships could be established between amounts of metabolites found in urine versus daily ingested doses of phenanthrene and benzo(a)pyrene in the range 0.04–49 mg/day. Whatever the transfer equation, the intercepts listed in Table 5 were shown to be not significantly different from 0. Given the higher hydrophobicity of pyrene (four rings PAH) as compared to phenanthrene (three rings PAHs), the transfer rate of OH-phenanthrene toward urine could be expected to be higher as compared to the transfer coefficient of 1-OH-pyrene. This is not the case, which means that size and hydrophobicity are not the only one characteristic to consider in terms of PAHs absorption and metabolism.

3.5. Literature based approach for an improved use of 1-OH-pyrene as a bioindicator of oral exposure of goat to PAHs

Next to the establishment of relationship between ingested pyrene and 1-OH-pyrene concentrations in urine or milk under controlled and repeated exposure conditions, a question of importance remains how to use these concentrations to evaluate, if possible, the levels of ingestion of other PAHs congeners with 3, 4, 5 or even 6 rings. In order to answer to this question we suggest, as a first approach, to follow the literature based

methodology depicted in Fig. 6. This approach consists in confronting the evaluated amount of daily ingested pyrene with an “average fingerprint” of PAHs proportions inside vegetal covers derived from the compilation of relevant literature data. Table 6 represents the respective % of 13 different PAHs, including pyrene, on 14 different vegetal covers. Twelve of these PAHs belong to the US-EPA priority list. Combining these data made it possible to generate an average PAHs profile representative of a vegetal cover PAHs contamination. Among the 13 PAHs considered in Table 6, it can be observed that phenanthrene, fluoranthene, pyrene, chrysene and benzo(b)fluoranthene represent $23.9 \pm 10.5\%$, $20.4 \pm 4.5\%$, $14.5 \pm 4.6\%$, $7.5 \pm 1.9\%$, $8.2 \pm 5.7\%$, respectively, of the sum of the 13 PAHs, that is about 75% of the total contamination due to the 13 PAHs of the dataset. PAHs contaminations profiles of Table 6 are quite similar and, excepted with benzo(k)fluoranthene, average PAHs % are systematically higher than their corresponding standard deviations. This is probably due to quite similar PAHs anthropogenic sources. Any pyrene ingestion derived from 1-OH-pyrene in urine and potentially in milk should be confronted to the “average contamination fingerprint” of Table 6 in order to evaluate daily ingested doses of the 12 other PAHs. Such preliminary approach should be helpful in evaluating whether further exhaustive, cost and time consuming analytical investigations are necessary or not. Finally, it should be stressed here that the robustness of such approach could be increased by implementing the dataset used to generate the “average contamination fingerprint”. For instance, it would certainly be fruitful to establish an average fingerprint based on vegetal cover

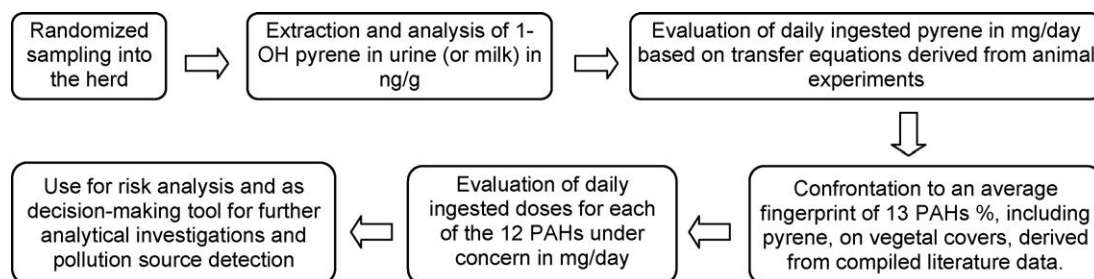


Fig. 6. Proposed flowchart for using 1-OH-pyrene (in urine or milk) as a bioindicator of oral exposure of dairy ruminants to pyrene and 12 other PAHs. Such approach might be used with any other bioindicator and for various numbers of molecular congeners depending on available literature data.

Table 6

Respective % of 13 PAHs quantified on various vegetal covers (F: fluorene, Ph: phenanthrene, An: anthracene, Fl: fluoranthene, Py: pyrene, BaA: benzo(a)anthracene, Chr: chrysene, BeP: benzo(e)pyrene, BbF: benzo(b)fluoranthene, BkF: benzo(k)fluoranthene, BaP: benzo(a)pyrene, Bpr: benzo(g,h,i)perylene and InP: indeno(1,2,3-cd)pyrene.

Authors	Country	Analysis on:	% of \sum 13 PAHs													Total %
			F	Ph	An	Fl	Py	BaA	Chr	BeP	BbF	BkF	BaP	Bpr	InP	
Crepineau et al. (2004)	France	Pasture 50 m from a highway	1.2	14.0	1.4	20.6	18.2	4.8	10.1	7.5	8.4	2.8	2.9	4.6	3.4	100.0
Crepineau et al. (2004)	France	Grass near a motorway	3.7	26.3	1.9	18.1	12.5	3.8	8.9	4.4	9.0	2.2	3.7	2.7	2.9	100.0
	France	Grass near an airport	2.5	29.9	2.3	19.3	12.8	1.0	3.7	13.1	11.8	0.0	1.6	1.2	0.9	100.0
Wagrowski and Hites (1997)	USA	Vegetal cover urban	1.1	16.0	1.1	21.3	16.0	6.4	9.6	4.3	9.6	1.1	5.3	3.2	5.3	100.0
	USA	Vegetal cover suburban	2.2	16.3	2.2	27.2	16.3	6.5	9.8	2.2	7.6	3.3	6.5	0.0	0.0	100.0
	USA	Crops	7.5	48.3	0.0	21.5	10.7	2.1	5.4	0.8	1.1	0.5	1.1	0.2	0.8	100.0
Gocht et al. (2007)	Germany	Open field	2.3	12.8	0.9	15.4	10.2	3.9	8.4	6.5	17.8	0.0	4.9	6.9	9.9	100.0
	Germany	Open field	2.8	18.4	0.8	15.8	11.2	3.7	7.6	5.8	15.5	0.0	4.2	6.6	7.5	100.0
	Germany	Open field	2.6	16.5	0.9	15.8	11.4	4.4	8.0	5.4	16.1	0.0	4.5	6.0	8.4	100.0
Zhang et al. (2008)	China	Dustfall suburb Beijing	4.7	30.2	4.0	25.5	13.7	3.3	7.1	1.5	3.6	2.6	0.9	1.3	1.6	100.0
Smith et al. (2001a,b)	U.K.	<i>Holcus lanatus</i> (winter)	4.7	30.2	4.0	25.5	13.7	3.3	7.1	1.5	3.6	2.6	0.9	1.3	1.6	100.0
		<i>Holcus lanatus</i> (summer)	6.9	19.7	1.5	14.8	9.9	2.0	6.9	5.9	6.9	5.9	5.9	5.9	7.9	100.0
Crépineau-ducoulombier et al. (2004)	France	<i>Lolium perenne</i> near national highway	0.9	28.6	1.8	20.2	27.7	2.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	4.0	100.0
	France	<i>Lolium perenne</i> near national road	0.8	12.3	0.5	16.2	19.0	3.7	5.7	3.2	11.3	4.4	5.8	8.9	8.2	100.0
Malawska et al. (2002)	Poland	<i>Ledum palustre</i> (peat plant)	9.2	39.2	0.0	28.6	14.3	0.0	8.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
		Average	3.6	23.9	1.5	20.4	14.5	3.4	7.5	4.1	8.2	1.7	3.2	3.9	4.2	100.0
		Std. dev.	2.6	10.5	1.2	4.5	4.6	1.8	1.9	3.5	5.7	1.9	2.3	3.3	3.4	

specifically and usually consumed by goats in various geographical zones.

4. Conclusion

Whatever the PAH under concern, it appears that transfer rates toward milk or urine are not significantly affected by extremely large changes in levels of exposure to PAHs, which is probably due to a powerful induction of the metabolic CYP450 machinery by PAHs themselves. It was also demonstrated that slopes of the transfer equations achieved in the low range 0.04–7 mg/day and in the large range 0.04–49 mg/day were not significantly different, which confirms the linearity of excretion level versus daily ingested PAHs dose, as observed for high levels of exposure by Chahin et al. (2008). Proposed equations should therefore be considered with interest for evaluating moderate to high levels of oral exposure of goats to PAHs. Heterogeneity between goats in terms of ability to absorb and/or metabolize phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene should be taken into account by performing randomized sampling on a representative goats sample at the level of the herd. Finally, results achieved based on our experimental conditions confirm that 1-OH-pyrene should be considered as an interesting bioindicator of exposure to pyrene and other PAHs when analysed in urine but also in milk, which may be of practical interest since milk is much easier to sample as compared to urine. However, and because intercepts of our transfer equations were shown to be not significantly different from 0 whatever the metabolite under concern, we advise to use these transfer equations without their intercept. Such equations, in combinations with a literature based average PAHs fingerprint on vegetal covers such as the one proposed in this study, should be considered as a practical tool in order to evaluate the “average level” of exposure to pyrene but also to other PAHs in a herd of goat or possibly other dairy ruminants. Finally, further investigations tuned toward EROD activity induction by PAHs will also be required to check whether such activity could also be used as a relevant bioindicator of exposure to CYP450 1A1 and 1B1 inducing PAHs.

References

- Agarwal, T., Khillare, P.S., Shridhar, V., Ray, S., 2008. Pattern, sources and toxic potential of PAHs in the agricultural soils of Delhi, India. *J. Hazard. Mater.* 163, 1033–1039.
- Booggard, P.J., Van Sittert, N.J., 1994. Measurement of exposure to PAH in petrochemical industries by determination of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup. Environ. Med.* 51, 250–258.
- Bouchard, M., Viau, C., 1998. Urinary and biliary excretion kinetic of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology* 127, 69–84.
- Bozlaker, A., Muezzinoglu, A., Odabasi, M., 2008. Atmospheric concentrations, dry deposition and air-soil exchange of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an industrial region in Turkey. *J. Hazard. Mater.* 153 (3), 1093–1102.
- Buchet, J.P., Gennart, J.P., Mercado-Calderon, F., Delavingnette, J.P., Cupers, L., Lauwerys, R., 1992. Evaluation of exposure to PAH in a coke production and graphite electrode manufacturing plant. *Br. J. Ind. Med.* 49, 761–768.
- Chahin, A., Guiavarc'h, Y., Dziurla, M.A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2008. 1-Hydroxypyrene in milk as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1780–1786.
- Chetiyankornkul, T., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N., 2006. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 712–718.
- Ciganek, M., Ulrich, R., Neca, J., Raszyk, J., 2002. Exposure of pig fatteners and dairy cows to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Vet. Med.* 47, 137–142.
- Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *EU Off. J. L* 358, 1986, 0001–0028.
- Crépineau, C., Rychen, G., Feidt, C., Le Roux, Y., Lichtfouse, E., Laurent, F., 2003. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4841–4845.
- Crépineau-Ducoulombier, C., Dan Badjo, A.T., Rychen, G., 2004. PAH contamination of the grass *Lolium perenne* exposed to vehicular traffic. *Agronomie* 24, 503–506.
- Crépineau-Ducoulombier, C., Rychen, G., 2003. Assessment of soil and grass polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminations levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23, 345–348.
- De Vos, R.H. Van, Dokkum, W., Schouten, A., De Jong-Berkhout, P., 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J. Food Protect.* 66 (7), 2325–2331.
- Gocht, T., Klemm, O., Grathwohl, P., 2007. Long-term atmospheric bulk deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rural areas of southern Germany. *Atmos. Environ.* 41, 1315–1327.
- Grimmer, G., Dettbarn, G., Jacob, J., 1993. Biomonitoring of PAH in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenanthrene and pyrene metabolites. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65, 189–199.
- Grova, N., Feidt, C., Crépineau, C., Laurent, C., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Rychen, G., 2002. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4640–4642.
- Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., Andre, F., Rychen, G., 2005. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography–mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 29 (3), 175–181.
- Grova, N., Rychen, G., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., 2006. Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat's milk contamination. *Agron. Sust. Dev.* 26, 195–199.
- Guiavarc'h, Y., Chahin, A., Dziurla, M.A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2008. 1-Hydroxypyrene in milk as a bioindicator of exposure of ruminants to polycyclic aromatic hydrocarbons: a valuable tool for dairy products safety assessment. Oral communication n(06.1 at the 1st European Food Congress organized by EFOST (European Federation of Food Science and Technology), 4–9 November 2008, Ljubljana, Slovenia. Abstract available in the Delegate Manual.
- Healy, W.B., Ludwig, T.G., 1968. Barium content of teeth, bone and kidney of twin sheep raised on pastures of differing barium content. *Arch. Oral Biol.* 13, 559–563.
- Hinton, T.G., Kopp, P., Ibrahim, S., Bubyak, I., Syomor, A., Tober, L., Bell, C., 1995. A comparison of techniques used to estimate the amount of resuspended soil on plant surfaces. *Health Phys.* 68, 1–9.
- Jongeneelen, F.J., 2001. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.* 45, 3–13.
- Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B.M., Henderson, P.T., 1987. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromatogr.* 413, 227–232.
- Jongeneelen, F.J., Leijdekkers, C.M., Bos, R.P., Theuws, J.L., Henderson, P.T., 1985. Excretion of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene and mutagenicity in rat urine after exposure to benzo(a)pyrene. *J. Appl. Toxicol.* 5, 277–282.
- Jongeneelen, F.J., Van Leeuwen, F.E., Oosterink, S., 1990. Ambient and biological monitoring of cokeoven workers; determination of the internal dose of PAH. *Br. J. Ind. Med.* 47, 454–461.
- Lapole, D., Rychen, G., Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., 2007. Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants. *J. Dairy Sci.* 90, 2624–2629.

- Levin, J.O., 1995. First international workshop on 1-hydroxypyrene as biomarker for PAH exposure in man—summary and conclusions. *Sci. Tot. Environ.* 163, 165–168.
- Lodovici, M., Dolara, P., Casalini, C., Ciappellano, S., Testolin, G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Addit. Contam.* 12 (5), 703–713.
- Lutz, S., Feidt, C., Monteau, F., Rychen, G., Le Bizec, B., Jurjanz, S., 2006. Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 54, 263–268.
- Malawska, M., Bojakowska, I., Wilkomirski, B., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in peat and plants from selected peat-bogs in the north-east of Poland. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 686–691.
- Motelay-Massei, A., Ollivon, D., Garban, B., Teil, M.J., Blanchard, M., Chevreuil, M., 2004. Distribution and spatial trends of PAHs and PCBs in soils in the Seine River basin, France. *Chemosphere* 55, 555–565.
- Murphy, J., Morgan, D., 1983. Effect of inclusion of protected and performance of lactating dairy cows. *Anim. Prod.* 37, 203–210.
- Nam, J.J., Song, B.H., Eom, K.C., Lee, S.H., Smith, A., 2003. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere* 50, 1281–1289.
- Park, S.S., Kim, Y.J., Kang, C.H., 2002. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmos. Environ.* 36 (17), 2917–2924.
- Pereira Netto, A.D., Cunha, I.F., Kranss, T.M., 2004. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons in the soil of a burned area for agricultural purposes in Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 1072–1077.
- Ruzgyte, A., Bouchard, M., Viau, C., 2005. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of pyrene-1,6- and 1,8-dione in animal and human urine. *J. Anal. Toxicol.* 29, 533–538.
- Ruzgyte, A., Bouchard, M., Viau, C., 2006. Comparison of the urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione and 1-hydroxypyrene in rats intravenously exposed to pyrene. *Biomarkers* 11, 417–427.
- Sharma, H., Jain, V.K., Khan Zahid, H., 2007. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban air of Delhi during 2003. *Environ. Monit. Assess.* 147, 43–55.
- Smith, K., Thomas, G., Jones, K., 2001a. Seasonal and species differences in the air–pasture transfer of PAHs. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2156–2165.
- Smith, K.E.C., Thomas, G.O., Jones, K.C., 2001b. Seasonal and species differences in the air–pasture. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2156–2165.
- Tang, L., Tang, X.-Y., Zhu, Y.-G., Zheng, M.-H., Miao, Q.-L., 2005. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. *Environ. Int.* 31, 822–828.
- Trapido, M., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. *Environ. Pollut.* 105, 67–74.
- Wagrowski, D., Hites, R., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban and rural vegetation. *Environ. Sci. Technol.* 31, 279–282.
- Wang, Y., Zhang, W., Dong, Y., Fan, R., Sheng, G., Fu, J., 2005. Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 804–809.
- WHO (World Health Organization), 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons: 1-hydroxypyrene in urine, in: WHO (Ed.), *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace: Guidelines*. Geneva, pp. 190–201.
- Wilcke, W., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil—a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163, 229–248.
- Wong, F., Harner, T., Liu, Q.-T., Diamond, M.L., 2004. Using experimental and forest soils to investigate the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) along an urban–rural gradient. *Environ. Pollut.* 129, 387–398.
- Yin, C.Q., Jiang, X., Yang, X.L., Bian, Y.R., Wang, F., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils in the vicinity of Nanjing, China. *Chemosphere* 73 (3), 389–394.
- Zapata-Perez, O., Gold-Bouchot, G., Ortege, A., Lopez, T., Albores, A., 2002. Effect of pyrene on hepatic cytochrome P450 1A (CYP1A) expression in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 477–485.
- Zhang, S., Zhang, W., Shen, Y., Wang, K., Hu, L., Wang, X., 2008. Dry deposition of atmospheric polycyclic hydrocarbons (PAHs) in the southeast suburb of Beijing, China. *Atmos. Res.* 89, 138–148.

Chapitre IV :
Cinétique d'excrétion du 1-OH pyrène et d'induction de l'activité EROD lymphocytaire lors d'une exposition orale subchronique (40 jours) du ruminants laitiers aux HAP

4.1 Introduction chapitre IV

Les deux chapitres précédents ont révélé la pertinence de l'utilisation du 1-OH pyrène dans le lait ou l'urine comme un indicateur d'exposition orale au pyrène et aux autres HAP, pour des périodes d'exposition n'excédant pas 7 jours.

Dans l'étude présentée ci-contre, l'un des objectifs a visé à valider ce potentiel bioindicateur sur une période plus longue (40 jours) s'apparentant davantage aux expositions réelles des animaux d'élevage en pâture.

Une exposition subchronique de plusieurs semaines, bien que plus lourde sur le plan expérimental, présente l'avantage de prendre en compte les adaptations métaboliques éventuelles des animaux. En effet, Lutz et al. (2006) ont observé qu'une exposition longue de vaches laitières à des HAP en mode subchronique pouvait se traduire par une augmentation progressive des quantités de métabolites dans l'urine comme dans le lait. Bien que cela n'ait pas été vérifié, cette augmentation reflétait probablement une induction du potentiel métabolique de l'animal vis-à-vis des HAP, en particulier une induction des systèmes enzymatiques de phase I que sont les cytochrome P450 oxydases, connus pour leur capacité à être plus ou moins induits par certains HAP.

Dans la perspective de l'utilisation du 1-OH pyrène comme bioindicateur fiable de l'exposition aux HAP, il était donc nécessaire de nous assurer qu'un plateau était obtenu en terme d'excrétion du pyrène dans le lait comme dans l'urine tout en évaluant à partir de quand ce plateau était atteint. Ceci lors d'une exposition modérée comme lors d'une exposition forte. En effet, les linéarités de nos courbes dose-réponse obtenues après 7 jours d'exposition à chaque doses n'étaient peut-être pas dues au fait que nous avons atteint un plateau en terme d'excrétion mais tout simplement que, pour chaque dose, les échantillonnages avaient tous été effectués après exactement 7 jours d'exposition et peut-être encore en phase d'augmentation des niveaux d'excrétion de métabolites tout comme en phase d'induction des activités CYP450 oxydasiques.

Un autre objectif de cette étude a consisté à tester la possibilité d'utiliser l'activité EROD (ethoxyresorufin-o-dééthylase) lymphocytaire comme bioindicateur aspécifique et non invasif des niveaux d'exposition du ruminant laitier aux HAP. En effet, à ce jour, l'induction de l'activité EROD qui reflète principalement l'induction des cytochromes P450 oxydases 1A1 et 1B1 par divers composés xénobiotiques tels que les HAP, PCB ou dioxines pouvant se fixer sur le récepteur Aryl Hydrocarbon (AHR), a presque toujours été mesurée dans les

microsomes de foie, duodenum, reins ou branchies (Roos et al., 2002 ; Abrahamson et al., 2007 ; Buchelli et Fent, 1995) et surtout chez le poisson. Quelques rares études se sont penchées sur la mesure de l'activité EROD dans les lymphocytes de sang périphérique chez le rat (Dey et al, 2001) ou l'humain (Van Duursen et al., 2005) mais aucune d'entre elles ne s'est penchée de manière précise sur la modélisation de véritables cinétiques d'induction et/ou l'ébauche de courbes dose-réponse. Par ailleurs, aucune étude n'avait encore été menée à ce jour sur le potentiel bioindicateur de l'activité EROD lymphocytaire chez le ruminant laitier. Un tel outil pourrait pourtant se révéler fort pratique pour jauger, en première analyse et de manière non-invasive et aspécifique, l'exposition du ruminant laitier aux xenobiotiques CYP450 inducteurs.

La présente étude s'est donc attachée à la mise en oeuvre d'une méthodologie appropriée d'isolement de lymphocytes de sang périphérique caprin en vue d'une étude précise et multidoses des cinétiques d'induction EROD, permettant ainsi de mieux appréhender les phénomènes d'induction métaboliques et, via l'ébauche d'une courbe dose réponse, leur utilisation potentielle comme outil d'évaluation préalable et aspécifique de l'exposition du ruminant laitier aux xénobiotiques CYP450 inducteurs.

EROD activity in peripheral blood lymphocytes and 1-hydroxypyrene in urine or milk as bioindicators of exposure of dairy ruminant to long term oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons

Yann P. Guiavarc'h†, Abir Chahin†, Marie-Antoinette Dziurla†, Frances Yen-Potin‡, Catherine Jondreville†, Guido Rychen†*

*Submitted to the Journal of Environmental Toxicology and Chemistry
(Avril 2010)*

*†: Research Unit on Animal and Functionality of Animal Products (UR AFPA)
Nancy University-Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*

*ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

‡: Lipidomix Laboratory

*Nancy University
ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

4.2 Abstract

To date, there is a real lack of biomarker-based approaches for the evaluation of environmental exposure of dairy ruminants to persistent organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In the present study, two sets of 3 Alpine goats were orally submitted to 1 or 50 mg respectively of pyrene, phenanthrene and benzo(a)pyrene every day over a 40-day period. 1-hydroxypyrene in milk and urine as well as Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) activity in peripheral blood lymphocytes were quantified every ten days in parallel with hydroxyphenanthrenes and 3-hydroxybenzo(a)pyrene in urine. 1-OH pyrene excretions in milk and urine were shown to significantly increase up to about 10 days without further significant evolution. Transfer rates of 1-OH pyrene were found to be about 0.5 % and 25 % in milk and urine, respectively. Excretions appeared to be proportional to the ingested doses. Such results demonstrate that 1-hydroxypyrene in milk or urine may be used as a biomarker for evaluating the exposure of dairy ruminants to PAH over a long exposure period. Constitutive EROD activity in lymphocytes was 0.5 ± 0.3 pmol resorufin/min/mg protein and was significantly induced over time exposure, to stabilize after 40 days at 6.30 ± 1.3 and 18.89 ± 1.12 pmol resorufin/min/mg protein with doses of 1 mg/day and 50 mg/day, respectively. Induction kinetics could be described using a logistic-like model and approximate dose-response curves were proposed. EROD activity in peripheral blood lymphocytes appears as a potentially relevant, convenient and non-invasive biomarker of exposure of dairy ruminants to CYP450 inducing PAH under subchronic conditions.

Key words: Dairy ruminants, EROD activity, peripheral blood lymphocytes, biomarkers of exposure, polycyclic aromatic hydrocarbons

4.3 Introduction

While urinary 1-hydroxypyrene has been widely used as a bioindicating tool for evaluating levels of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), little is known about this bioindicating potential when applied to dairy ruminants [1]. Numerous papers have attempted to relate human urinary 1-hydroxypyrene concentrations to professional, occupational or cigarette smoke exposure to PAH [2-4]. Although, except for smokers and specific professional exposures, diet was shown to represent about 90 % of the exposure to PAH with about 3-17 µg ingested per day for an adult [5-7], none of these investigations was able to establish equations allowing for evaluations of daily oral exposure to pyrene and other PAH based on urinary 1-hydroxypyrene concentrations.

Pyrene is a four-ring PAH always present in environmental polluting PAH mixtures, which also contains 2, 3, 4, 5 and 6 ring-PAH belonging to the 16 USEPA (United State Environment Protection Agency) PAH priority list. It was found to count for about 15±5 % of the total of the 13 heaviest PAH of the USEPA priority list when analysed on various vegetal covers such as pastures [8].

1-OH pyrene is considered as a valuable biomarker of exposure to PAH because it is one of the main hydroxymetabolites of pyrene, and is found in a significant quantity in urine. Its concentration in urine therefore directly indicates an approximate amount of ingested pyrene and other PAH. Ingested PAH are partially absorbed through the gastro-intestinal tract via passive or active transport. Then they are metabolically activated by phase I enzymes (CYP450 oxydases) into reactive intermediates that can bind covalently to nucleic acids and proteins with possible negative effects (endocrine disruption, carcinogenicity). PAH can be hydroxylated by phase I enzymes before being converted into more hydrophilic glucuronide or sulphate conjugates via phase II enzymes. These conjugates are then eliminated in urine via the kidney, or in faeces via the bile.

Taking into account experimental data from numerous articles [9-24], it was estimated that grazing dairy cows may ingest about 11 mg PAH per day in semi-rural areas considering both the contamination of soil and the contamination of fodder [25]. This observation is in accordance with daily intake of about 15 mg PAH/day found in cattle from semi-rural Czech farms exposed to industrial activities [25]. To date, very few studies have attempted to investigate the transfer of PAH and/or their metabolites in ruminant milk while it has however been demonstrated that PAH metabolites are transferred into milk and urine in much larger amounts compared to their corresponding native molecules [27-30]. These results show that

attention should be paid to both native and metabolized PAH excretion into milk, and that milk may indeed significantly contribute to the daily intake of PAH in native and metabolized forms, in the human diet.

In order to compensate for the lack of data on dairy ruminant exposure to PAH and PAH transfers into urine and milk Guiavarc'h et al. [8] submitted goats to a one-week daily exposure to five low heavy doses (0.04, 0.028, 1, 7 and 49 mg/day) of a PAH mixture consisting of phenanthrene (Phe, 3 rings), pyrene (Pyr, 4 rings) and benzo(a)pyrene (BaP, 5 rings). Despite some interindividual variations, they observed a good linear correlation between 1-OH pyrene concentrations in milk and urine and ingested PAH doses after 7 days of exposure to each dose. Transfer equations of 1-OH pyrene towards urine and milk could be established as a potential bioindicating tool for an evaluation of oral exposure to PAH. These data showed that 1-OH pyrene in goats' milk or urine should be considered with interest as a biomarker of exposure to PAH. However the bioindicating potential of this tool should be tested over a much longer period before it can be validated.

In other respects, PAH such as Pyrene or Benzo(a)pyrene can induce numerous Phase I and Phase II enzymes involved in their own activation and detoxication via their binding to the aromatic hydrocarbon receptor, AhR [1]. These are for instance cytochrome P450 oxydases such as cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) and 1B1 (CYP1B1), whose activity can be, besides other possibilities, measured in liver microsomes and also in peripheral blood lymphocytes [31]. Pyrene was shown to induce CYP450 1A1 and 1B1 isoforms [32]. The BaP inducible CYP 1A1 as also been clearly identified as being the key enzymatic system in detoxication and protection against BaP oral toxicity [33]. From a more general standpoint, CYP 1A1, 1B1 or 1A2 enzymes can be induced by many different kinds of xenobiotics such as co-planar polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans, and certain PAH in the environment, which can bind to the Ah-receptor. Consequently, the measurement of CYP1A1 and CYP1B1 activity, which catalyses the 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) reaction, as become a well-established biomarker for the Ah-receptor agonist in humans as well as in fauna, especially fish in which the EROD activity is measured in the liver or in the gill tissue [34, 35]. EROD activity, which was shown to reflect almost exclusively CYP1A1 and 1B1 activities, is often used as a non-specific bioindicator of the exposure of animals to environmental (including diet) pollution [36]. Although, due to interindividual differences in CYP450 expressions, it has been shown that the measurement of EROD activity in human peripheral blood lymphocytes doesnot seem to be appropriate for evaluating the exposure to xenobiotics such as PAH [31], it should nevertheless be useful to

check whether this observation still holds with herds of animals of the same species/races, with similar genetic profiles and diets, such as dairy cows, goats or sheep.

One objective of the present study was therefore to investigate whether EROD activity in peripheral blood lymphocytes can be used as a bio-indicator of dairy ruminant exposure to PAH, using goats as a model of dairy ruminants with a 40-day daily oral exposure to Phe (3 rings), Pyr (4 rings) and BaP (5 rings). The second objective of this work was to assess whether the bioindicating capability of 1-OH pyrene in milk or urine, which was demonstrated over a 7 day period of exposure, still holds over a much longer period of exposure [8, 37].

4.4 Materials and methods

4.4.1 Animals

Six Alpine goats (50 ± 5 kg; second lactations) from the herd of the “Domaine Experimental de la Bouzule” (Champenois, France) were used as a small and convenient model of dairy ruminant. A one week adaptation period was used to ascertain the health status of goats as well as their adaptation to their experimental environment. Goats were placed in individual 2 m^2 boxes at an average day temperature of 22°C and under natural light conditions. The animals were mechanically milked twice a day, providing an average milk production of 1030 ± 147 mL/day at the end of the adaptation week just before the experiment was run. The goats were fed with meadow hay, water, and mineral salt ad libitum and received 900 g of granulated mix consisting of dehydrated maize, alfalfa, wheat, sunflower grains, sugar beet, colza and soybean cattle cakes mixed with palm oil, sugar beet molasses, and other organic additives and specific salts. This diet met the nutritional requirements of goats and has already been proven to be sufficient to maintain milk production at about 3 L/day over three milkings [28]. Measurements of the milk production were performed each day as well as renewal of the litters.

4.4.2 Experimental design

The goats were divided in two groups of three animals. These two groups, just after the end of the adaptation week, were submitted to a daily oral ingestion of 1 mg/goat (0.02 mg/kg body weight) and 50 mg/goat (1 mg/kg body weight) respectively of a ternary PAH mixture consisting of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene, over a 40 consecutive days period. Each animal served as its own reference and blood, urine and milk samples were

collected at Day 0. The animal protocol was in accordance with the general directive 86/609/EEC on animal care used in the European Community.

PAH were dissolved in cremophor oil and directly administrated into the mouth of the animal with a 2 mL syringe. The latter was then flushed once with 2 mL of cremophor oil, and the contaminated oil was given to the animals. It was previously demonstrated that this amount of ingested oil did not affect the rumen activity [37]. Each 10 days, the full volumes of urine and milk produced over the 24 hours after last PAH ingestion were collected and stored at -80°C for further 1-OH pyrene analysis.

4.4.3 Isolation of lymphocytes

Lymphocytes were isolated from the anticoagulated whole blood using density gradient centrifugation on sodium diatrizoate polysucrose. In brief, 3 mL of whole blood were carefully layered over 3 mL of an Accuspin System-Histopaque -1077 falcon tube (Sigma-Aldrich, Poole, UK) previously centrifuged before use at 1000 x g for 30 seconds at room temperature. After addition of the blood over the porous high density polypropylene barrier (frit) of the tube, the latter was centrifuged at 1000 x g for 20 min at 18 -20°C. The upper layer (plasma) was then discarded leaving about 0.5 cm of plasma above an opaque and thin layer containing mononuclear cells at the interface between the histopaque solution and the residual plasma. This thin layer was transferred into a clean centrifuge tube and the lymphocytes were washed twice with 10 mL of warm PBS buffer at 37°C (Invitrogen, UK) by centrifugations at 250xg at 18-20°C for 15 min. The resulting pellet was resuspended in 0.6 mL of PBS buffer and used for ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity determination. The total protein content of the samples was determined by using a bicinchoninic Acid Kit (Sigma Aldrich, Germany) using BSA (Bovine Serum Albumin) as protein standard. According to [38] lymphocytes and monocytes represent 99% and 1% respectively of mononuclear cells in goat blood, thus ensuring the good purity of the isolated lymphocytes.

4.4.4 Enzyme activity

Cells were suspended in 100 mM Tris buffer (pH 7.8), containing 5mM MgCl₂. A volume of cell suspension containing 40 µg of protein was added in wells of a 96 microplate together with 2mM of 7-ethoxyresorufin. Microplate was placed in a 37°C pre-heated FluoStar plate reader (BMG, Germany) for 5 min incubation. NADPH (10mM) was then added to start the EROD reaction. The plates were then placed at 37°C and the EROD activity in the wells was determined fluorometrically by measuring resorufin production, using an

excitation wavelength of 530 nm and emission wavelength of 590 nm, every 2 min for 30 minutes. A calibration curve of resorufin was used for quantification of the activity.

4.4.5 1-OH pyrene extraction in milk

1-OH pyrene was extracted from milk according to the method of [28]. In brief 5 mL milk samples were collected in 50 mL Falcon tubes (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany), complemented with 50 μ L of β -glucuronidase and sulfatase solutions respectively. β -glucuronidase type H-2 from *Helix pomatia* was provided in crude solution by Sigma-Aldrich (Poole, United Kingdom) with a volume activity of 99000 Unit/mL, where one Unit is the amount of glucuronidase that can liberate 1 μ g of phenolphthalein from phenolphthalein glucuronide at 37°C and pH 5, in 30 min. Sulfatase type H-2 from *Helix pomatia* was provided in crude solution by Sigma-Aldrich (Poole, United Kingdom) with a volume activity of 2000 Unit/mL, where one Unit is the amount of sulfatase that can hydrolyse 1 μ mole of p-nitrocatechol sulfate per hour at pH 5 and at 37°C. Milk samples were then incubated at 37°C during 16 hours in order to convert glucuronide and sulphate conjugates of 1-OH pyrene into 1-OH pyrene. Internal standard 6-OH chrysene was then added to the samples, which were subsequently mixed in 20 mL cyclohexane (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) and 20 mL ethyl acetate (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France) before to be thoroughly shaken with an horizontal Agitest shaker (CAT, Staufen, Germany) at a maximum speed of 700 shakings per min during 30 min at ambient temperature. After centrifugation (15 min at 1000 g) in a Jouan CR4I centrifuge (Chateau Gontier, France), the supernatant was evaporated with a Buchi RE121 rotovapor (Flawil, Switzerland) under automated vacuum control. Residual volume was recovered with 6 mL of cyclohexane and applied onto an Envi-Chrom P SPE column (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) previously conditioned with 5 mL of ultra pure water, 5 mL of methanol (Prolabo, Leuven, Belgium) and 5 mL of cyclohexane. After elution of interfering compounds with 2*3 mL cyclohexane, pyrene and 1-OH pyrene were co-eluted with 12 mL cyclohexane/ethyl acetate (50:50, v/v). The samples were totally evaporated to dryness at 40°C using a gentle nitrogen flow and a multi-channels evaporator (Liebisch, Bielefeld, Germany). The dry residue was then dissolved in 2 mL cyclohexane and 2 mL methanol-water (80/20; v/v), vortexed at least 10 s, and centrifuged at 1500 g and ambient temperature during 5 min, the two phases were then separated with a Pasteur pipette. This step, which was repeated once, allowed the separation of pyrene and fatty acids (cyclohexane fraction) from 1-OH pyrene and 6-OH chrysene metabolites (methanol/water

fraction). Methanol/water fraction was collected, and totally evaporated to dryness at 40°C under nitrogen flow before to be redissolved in 4 mL ethyl acetate-water solution (50/50, v/v) and then centrifuged at 1500 g and ambient temperature during 5 min. 50 µl of 1000 ng/mL Anthracene as an external standard (Cluzeau Synthe Labo, Paris, France) was then added to the supernatant. Extracts were finally evaporated to dryness and redissolved into 225 µl acetonitrile before HPLC-fluorimetry analysis.

4.4.6 1-OH pyrene extraction in urine

Samples were treated using the method described by [39] and modified by [36]. In brief, 5 mL urine sample was transferred to a 50 mL flask (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany). The pH of the solution was adjusted to 5.0 with HCl, and then 5 mL of 0.5 M acetate buffer (pH 5.0) was added and complemented with 25 µL of β-glucuronidase and sulfatase solutions respectively, before incubation at 37°C during 16 hours. Internal standard 6-OH chrysene was then added to the samples. After hydrolysis, samples were centrifuged at 1500 g for 3 min in a Jouan CR41 centrifuge (Chateau Gontier, France), and supernatant was used for solid phase extraction. C₁₈ cartridges were pretreated with 5 mL of methanol and 5 mL of ultra pure water. The hydrolyzed urine sample was then loaded onto the cartridge at a flow rate lower than 1 mL.min⁻¹. The column was washed with 10 mL water and 10 mL of methanol-water (30/70, v/v) to remove the matrix interferences. Purity of methanol was 99.8 %. 1-OH pyrene and internal standard were eluted with 4 mL of methanol. The eluate was totally evaporated to dryness at 40° C using a gentle flow of nitrogen and multi-channels evaporator (Liebisch, Bielefeld, Germany). The dry residue was then dissolved in 1 mL of methanol and vortexed at least 10s. The solution was filtered through 0.2 µm filter, and 50 µL of external standard Chrysen-*d*12 (Cluzeau Synthe Labo, Paris, France) was finally added before storage at -20°C and subsequent HPLC-fluorimetry analysis. Before injection, the extracts must be diluted at 50/50 (v/v) with a 10 mM acetate buffer solution at pH 4.

4.4.7 HPLC analysis of 1-OH pyrene in milk

The HPLC system consisted of an auto-sampler 717+ programmed for 100 µL of volume injection, a gradient controller 625 with column temperature control and a 2475 multi-wavelength fluorescence detector (all from Waters, Milford, Massachusetts, USA). 1-OH pyrene, internal standard 6-OH chrysene, and external standard anthracene were separated on a reverse phase C₁₈ column (250×4.6 mm I.D., 5 µm, Grace-Vydac, Hesperia, California,

USA) with a guard column (C₁₈, 20x4 mm I.D., 5 µm, Grace-Vydac). Based on a method recently designed in our Laboratory, HPLC conditions were as follows: eluent A, 4 mg/L ascorbic acid solution (daily prepared and stored in brown glass bottle); eluent B, methanol; gradient program at constant temperature (35°C) and flow rate (0.8 ml/min), 0-17.5 min (eluent B composition, 45%), 20.5-30.5 min (B, 50-60%), 30.5-52.5 min (B, 60-80%), 52.5-63.5 min (B, 80-95%), 63.5-81 min (B, 95-40%); detection wavelength program (excitation/emission in nm), 0-50 min (240/387) for 1-OH pyrene, 50-56.3 min (346/400) for 6-OH chrysene and 56.3-81 min (250-420) for Anthracène. After the end of the washing step, the initial mobile phase conditions were kept during 15 min before the next sample was injected.

4.4.8 HPLC analysis of 1-OH pyrene in urine

Analysis was carried out using a method developed by [36] and based on the method of [40], for the simultaneous analysis of 1, 2, 3 and 4OH-phenanthrene, 1-OH pyrene and 3-OH Benzo(a)pyrene (only results on 1-OH pyrene are introduced in this article) . Autosampler, gradient controller and fluorescence detector were similar to the ones used for analysis in milk. 1-OH pyrene (and other metabolites), internal standard 6-OH chrysene, and external standard Chrysene-*d*12 were separated on a Discovery reverse phase amide C₁₆ column (250x4.6 mm I.D., 5 µm, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) with a guard column (C₁₆, 20x4 mm I.D., 5 µm, Supelco). HPLC conditions were as follows: eluent A, acetonitrile (purity of 99.8%); eluent B, 10 mM acetate buffer at pH 4 (daily prepared and stored in brown glass bottle); gradient program at constant temperature (40°C) and flow rate (1 ml/min), 0-25 min (eluent A composition, 45%), 25-50 min (A, 45-65%), 50-60 min (A, 65%), 60-63 min (A, 65-90%), 63-68 min (A, 90%), 68-71 min (A, 90-45%). 71-86 min (A, 45%); Detection wavelength program (excitation/emission in nm), 0-32 min (256/70) for 1, 2, 3 and 4OH-phenanthrene, 32-42.2 min (240/387) for 1-OH pyrene, 42.2-56 min (270/378) for internal standard 6-OH chrysene and external standard chrysene *d*12, over 56 min (375-435) for 3-OH Benzo(a)pyrene. Injection volume was 100µL. After the end of the washing step, the initial mobile phase conditions were kept during 15 min before the next sample was injected.

4.4.9 Curve fitting and statistical analysis

Curve fittings were performed using non-linear regression with Matlab 7.1 (The Mathworks Inc., Lowell, MA, USA). Normality of residuals was assessed using a Shapiro-Wilk test with SAS statistical software (version 9.1, 2004, SAS Institute, Cary, NC, USA). The excretion of 1OH-pyrene toward milk or urine was evaluated through three descriptive parameters: concentrations, amounts excreted over 24 hours post-ingestion, transfer rates. The effect of the day on the excretion of 1-OH pyrene in milk and urine was analysed within each dose using a MIXED procedure considering the goat as the experimental unit. Two sided p values of <0.05 were considered to be statistically significant. Pairwise differences between least square means were also considered different for two sided p values of <0.05. No statistical test was required to investigate the effect of the doses on the levels of 1-OH pyrene excretion because this effect was obvious. Instead, a simple ratio between average levels of excretion was calculated. The MIXED procedure was run on data for days 10, 20, and 30.

4.5 Results and discussion

4.5.1 Quantification limits, detection limits, extraction yields and accuracy

The detection and quantification limits of the analytical methods (MLD and MLQ) were evaluated using the intercept of the extracted calibration curves, b , the standard deviation on these intercept, s_b , and the slope of the extracted calibration curves, m . MLQ was defined as $[(b+10*s_b)/m]$ and MLD was defined as $[(b+3*s_b)/m]$, according to standard AFNOR procedure FD V 01-100 (1999). MLD and MLQ for urinary 1-OH pyrene were hence found to be 0.6 ng/g and 0.8 ng/g respectively. MLD and MLQ for 1-OH pyrene in milk were found to be 0.1 ng/g and 0.9 ng/g respectively. Our seven-point standard curves in milk and urine showed an excellent linearity ($R^2 = 0.99$) in the range of 0-400 ng of 1-OH pyrene/g of milk and in the range of 0-2000 ng of 1-OH pyrene/g of urine. Our extraction yields were calculated as follows: $[100*(\text{internal standard area}/\text{external standard area})_{\text{extracted sample}}]/(\text{internal standard area}/\text{external standard area})_{\text{standard solution}}$. In this way we obtained an average extraction yield of $32 \pm 5 \%$ for 1-OH pyrene in milk and $60 \pm 2 \%$ for 1-OH pyrene in urine. Our accuracies were calculated by comparing the concentrations of clean milk or urine samples spiked with various amounts of 1-OH pyrene with our analytical results. Accuracy ranged from 96% to 120% in the range 10-500 ng/L for 1-OH pyrene in milk and from 88% to 107% in the range 10-2000 ng/L for 1-OH pyrene in urine.

4.5.2 Induction kinetic of EROD activity in goat peripheral blood lymphocytes

As shown in Figure 1 and detailed in Table 1, significant inductions of EROD activity in goats' peripheral blood lymphocytes occurred versus time of oral exposure to the ternary PAH mixture thus showing that these PAH can pass through the gastrointestinal barrier toward the peripheral blood flow and that a metabolic adaptation to these PAH versus time is immediately initiated. This 40 days induction kinetic of EROD activity, followed by ten days without exposure, provides a great deal of information on this metabolic adaptation. At first, for the low (1 mg/day) as well as for the high (50 mg/day) levels of exposure and during the 40 days of exposure, the evolution of the EROD activity versus time can be expressed using a logistic-like model (Equation 1) whose parameters are listed in Table 2 for both levels of exposure.

$$A_{\text{EROD}} = \frac{A_{\text{ERODmax}}}{1 + \exp(-k_1 \cdot \text{days} - k_2)} \quad (1)$$

The rate of EROD activity induction increases slowly during the five first days of exposure before significantly increasing and finally reaching a plateau, reflecting the achievement of a stable metabolic adaptation to a stable level of daily exposure. The reaching of a plateau is an extremely important point with the view to using EROD activity in goat peripheral blood lymphocytes as a bioindicator of exposure to xenobiotics such as PAH. The ten additional days between day 40 and day 50 were used to evaluate the rate of decrease in EROD activity. They show a moderately rapid decay of this activity, especially for the low level of exposure. Another interesting observation is that, except during the period of rapid increase of EROD activity, a relatively good homogeneity of EROD response is observed between animals, which is another key point for using EROD activity in blood lymphocytes as a bioindicator of exposure to PAH in a herd of goats and probably other dairy ruminants. This homogeneity is probably due to the fact that the 6 goats (3 per dose) were from the same race, the same herd, and fed in similar ways. Quantitatively speaking, constitutive EROD activity was found to be 0.50 ± 0.27 pmol resorufin/min/ mg protein (n=6) using blood samples from our six goats. The plateau was reached at day 30 and 6.31 ± 1.49 pmol resorufin/min/ mg protein (n=3) for dose 1 mg/day and at day 40 and 18.89 ± 1.12 pmol resorufin/min/ mg protein (n=3) for dose 50 mg/day. In other words, this means that the maximal EROD activity achieved at the plateau is not at all proportional to the level of exposure. EROD activity is indeed 12.6 fold induced with dose 1 mg/day and 37.8 fold induced with dose 50 mg/day, as compared to constitutive

EROD activity. The establishment of a dose-response curve based on only 12 experimental points and only three doses (0, 1 and 50 mg/day with n=6, n=3 and n=3 respectively) should be considered with some caution. This said, and as can be seen in Figure 2, a 12-fold increase of the plateau EROD activity is observed in the narrow dose range of 0-1 mg/day while only a 2.9-fold increase in plateau EROD activity is observed in the large dose range of 1-50 mg/day. It is therefore reasonable to assume that a plateau was reached before the dose of 50 mg/day. This assumption is supported by the work performed by Roos et al. [42], who investigated hepatic EROD induction in minipigs orally exposed over 28 days to a mixture containing PAH such as benzo(a)pyrene, known as being an excellent CYP1A1 and 1B1 inducer, and therefore an EROD activity inducer. Considering 5 and 6 rings PAH, these authors observed a significant inflexion point at 0.18 mg PAH/kg body weight/day in their dose-response curve and they almost reached a plateau at 0.53 mg PAH/kg body weight/day. Our highest daily dose was 1 mg/kg body weight/day of each of our three PAH (Phe, Pyr, BaP), which is clearly more as compared to Roos et al. [42]. Furthermore, a good linear correlation between EROD activities in liver and peripheral blood lymphocytes of rats subchronically exposed to PAH was recently demonstrated [43]. The achievement of a plateau before the dose of 50 mg/day (1 mg/kg body weight/day) can therefore be considered as likely. Based on this reasonable assumption, we used the Hill equation, which was for instance successfully used by De Vito et al. [44] to fit EROD activity in mouse liver and skin versus administered doses of polyhalogenated dioxins and dibenzofurans under subchronic exposure conditions. The Hill equation is given as

$$A_{EROD} = A_{EROD_0} + \frac{A_{EROD_{max}} \cdot Dose^n}{b^n + Dose^n} \quad (2)$$

where A_{EROD_0} is the estimated initial background EROD activity when Dose is 0 mg/day, $A_{EROD_{max}}$ is the maximum possible increase (above background) in EROD activity, b is the estimated EC50 and n is a shaping parameter influencing the fitting curvature. As shown in Table 1, $A_{EROD_{max}}$ was set to 18.89 pmol resorufin/min/mg protein before performing the non-linear regression on our twelve experimental points. Fitting parameters are listed in Table 3 and the corresponding curve is shown in Figure 2 with its 95% confidence limits.

As an alternative to the Hill equation, we also used the Michaelis-Menten Equation with the initial activity as an additional term. This equation, which corresponds to the Hill equation with $n=1$, is given as

$$A_{\text{EROD}} = A_{\text{EROD}_0} + \frac{A_{\text{EROD}_{\text{max}}} \cdot \text{Dose}}{b + \text{Dose}} \quad (3)$$

where the parameters have the same meaning as compared to the Hill Equation. In the fitting corresponding to this equation, the value of $A_{\text{EROD}_{\text{max}}}$ was not fixed but estimated together with A_{EROD_0} and b . These fitting parameters are listed in Table 3 and the corresponding curve is shown in Figure 2 with its 95% confidence limits.

As can be seen in Table 3, narrow 95% confidence intervals found with all parameters demonstrate that, despite the limited number of experimental points, there was no overparameterization when the regressions were performed. R^2 values of 0.991 revealed the appropriateness of both models. The use of the Michaelis-Menten equation gave a $A_{\text{EROD}_{\text{max}}}$ value of 19.24 pmol resorufin/min/mg protein in the 95% confidence interval (17.82-20.66 pmol resorufin/min/mg protein), which includes the experimental average EROD activity of 18.89 pmol resorufin/min/mg protein achieved with our highest dose of 50 mg/day and used with the Hill equation. However, the lack of experimental points in the range 10-30 mg/day precluded any accurate evaluation of the EC 50-value as well as of the daily dose starting from which $A_{\text{EROD}_{\text{max}}}$ was reached. However, based on our initial assumption that $A_{\text{EROD}_{\text{max}}}$ was achieved for doses below 50 mg/day, and considering both fittings and their respective 95% confidence intervals details, the EC50 value was found to be somewhere in the range 1-3.5 mg/day. In the same way, we found that 99% of $A_{\text{EROD}_{\text{max}}}$ activities should be reached in the range 12-46 mg/day (0.24 mg/kg/day-0.92 mg/kg/day). This $A_{\text{EROD}_{\text{max}}}$ value is of interest since it can be considered as indicating a maximal adaptation level to PAH ingestion in terms of EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes. Animals are usually not exposed to such high levels of subchronic or chronic exposure to PAH in normal conditions (0.025 mg/kg body weight/day of PAH, as seen above, is the most severe level of exposure reported in the literature). This means that goat's metabolism can withstand much more severe exposures to PAH, compared to the most severe environmental conditions. On the basis of the above discussion, it appears that EROD activity in peripheral blood lymphocytes may be considered as a fairly relevant bioindicator of exposure of small dairy ruminants such as goats to oral ingestion of PAH. Although we were unfortunately not in a position to add a fourth dose in the range 10-30 mg/day in our experimental protocol, this is, to our knowledge, the first time that EROD activity in blood lymphocytes has been used to attempt an evaluation of the level of exposure of dairy ruminants to persistent organic pollutants based on a kinetic

and multi-dose approach. Further investigations will be required to evaluate the extent to which the dairy ruminant specie as well as the race, age, and the diet may influence EROD induction into peripheral blood lymphocytes. But the present results already indicate that EROD activity in peripheral blood lymphocytes should be considered as a potential “non-invasive” bioindicator for assessing the level of exposure of dairy ruminants to EROD inducing (i.e. mainly CYP1A1 and CYP1B1 inducing), persistent organic pollutants (PAH, PCBs, Dioxins...).

4.5.3 1-OH pyrene excretion in milk

A basal 1-OH pyrene level of 0.13 ± 0.05 ng per g of milk (n=6) was found at day 0 before starting the oral exposure to PAH. This value is just above the detection limit and clearly below the quantification limit of 1-OH pyrene in milk. Converting the standard deviation into standard error of the mean and establishing a 95% confidence interval on the mean, the latter appeared to be significantly different from 0 (between 0.08 and 0.18 ng/g). The basal 1-OH pyrene level found in milk therefore reflects an extremely slight pyrene contamination of the diet. Table 4 provides details on the transfer of pyrene under 1-OH pyrene form in milk for each of the two tested doses (1 and 50 mg/day). In this table we consider concentrations, excreted amounts over 24 hours post-ingestion, and transfer rates. Average transfer rates of pyrene under the 1-OH pyrene form in milk were extremely low (about 0.5%) and not significantly affected by the large difference between doses, as already observed by Guiavarc'h et al. [8]. This confirms the observation made by these authors according to whom the conversion of pyrene into 1-OH pyrene is not affected by a competition with phenanthrene or benzo(a)pyrene, ingested in similar amounts, in order to access the enzymatic machinery leading to hydroxylated metabolites and glucuronides/sulfates conjugates. Time of exposure was not found to significantly affect the excretion of 1-OH pyrene into milk, when comparing days 10, 20 and 30 ($p < 0.05$). Although it would have been appreciable to work on more than three goats per investigated dose, such statistical observation reasonably makes it possible to consider that, after 10 days of exposure to the ternary PAH mixture, a plateau is reached in terms of 1-OH pyrene excretion toward milk. The ratio between average concentrations or excreted amounts of 1-OH pyrene achieved with doses 1 and 50 mg/day appear to be not far from 50 (46.3 and 75.7 for concentration and amount excreted over 24 hours post ingestion respectively). This observation, which would be reinforced with additional goats in the experimental design, is in accordance with the results achieved by Lapole et al. [30] who observed a good correlation between levels of excretion in

milk and daily ingested doses, after 7 days. The plateaus observed in excretion levels between day 10 and day 30 allow the extension of these authors' conclusions from 7 days of exposure, to a much longer time of exposure to PAH. 1 OH-pyrene in milk therefore appears to reliably reflect the level of oral exposure to pyrene and therefore other PAH. Its use as a bioindicator of exposure of goats and probably other dairy ruminants to PAH can therefore be considered as relevant.

4.5.4 1-OH pyrene excretion in urine

A basal 1-OH pyrene level of 0.78 ± 1.14 ng per g of urine (n=6) was found at day 0 before starting the oral exposure to PAH. This value is clearly above the detection limit and just below the quantification limit of 1-OH pyrene in urine. Converting the standard deviation in standard error of the mean and establishing a 95% confidence interval on the mean, the latter appeared to be not significantly different from 0. Table 4 provides details on the transfer of 1-OH pyrene in urine for each of the two doses tested (1 and 50 mg/day). Average transfer rates of pyrene under the 1-OH pyrene form in urine were significantly higher (about 25 %) as compared to those observed in milk (about 0.5%) and not significantly affected by large difference between doses. The ratio between average concentrations or excreted amounts over 24 hours post-ingestion of 1-OH pyrene achieved with doses 1 and 50 mg/day appear to be quite close to 50 (56.6 and 43.6 respectively) thus reflecting a correlation between ingested doses of pyrene and levels of excretion into urine, as previously observed [8, 37]. Since transfer rates were not significantly affected by time of exposure between day 10 and day 30 ($p < 0.05$) considering dose 1 (1 mg/day) and 2 (50 mg/day), once more it is reasonable to consider that urinary 1-OH pyrene can be used as a relevant bioindicator of exposure of goats or other dairy ruminants to pyrene and therefore other PAH for much longer than 7 days of exposure.

4.6 Conclusion

The 50-day kinetic study on EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes of goats subchronically and orally exposed to PAH demonstrated that such activity should be considered as a potential non-invasive bio-indicator of goat exposure to PAH under controlled conditions. In general, because the EROD activity in lymphocytes is a non-specific bioindicator of exposure to POP (PAH, PCB, dioxins...), its use as a preliminary tool for evaluating the exposure of herds of goats and probably other dairy ruminants to POPs may

help to determine whether further exhaustive, time consuming and expensive extraction/analytical methods on POPs are required or not. The kinetics of EROD activity induction could be appropriately fitted with a logistic-like model and corresponding plateau EROD activities, achieved after 30 and 40 days of exposure with doses of 1 mg/day and 50 mg/day respectively, could be subsequently fitted versus daily doses of PAH (Phe, Pyr, BaP) using Hill or Michaelis-Menten-like equations. Although the curved zone of the achieved dose-response relationships should be considered with caution because of a lack of data points for PAH doses in the range 10-30 mg/day, our results showed that (i) the EROD activity induction level, after reaching of a plateau, is not at all proportional to ingested PAH doses, (ii) that the EC50 value should be in the range 1-3.5 mg/day and (iii) that the theoretical and maximal level of EROD activity of about 19 pmol resorufin/min/mg protein, reflecting a limit in terms of physiological adaptation, should be reached starting from subchronic ingestion of a daily dose somewhere in the range 12-46 mg/day (0.26-0.92 mg/kg/day) of each of these three PAH: phenanthrene (3 rings), pyrene (4 rings) benzo(a) pyrene (5 rings). This observation is not problematic since such levels of exposure to PAH are much higher than what has been observed in typical environmental conditions. In addition, the achievement of a maximum level of EROD activity induction at a given critical dose of PAH does not mean that goat's metabolism cannot face much higher exposures to these PAH. Indeed, we observed a correlation between excretion of 1-OH pyrene in urine or milk and ingested PAH doses, even up to 50 mg/day. 1-OH pyrene, when analysed in milk and urine over 30 days, also showed that it can be used as a specific bioindicator of chronic oral exposure of goats to pyrene and other PAH. This bioindicating property is "guaranteed" by (i) the achievement of a plateau in excretion levels in urine and milk after 10 days of exposure, and (ii) the correlation between ingested pyrene doses and levels of excretion. Unlike EROD activity, 1-OH pyrene levels in milk or urine have the advantage of being specific of the pyrene ingestion and therefore PAH family molecules. In addition, since milk is much easier to collect as compared to urine, 1-OH pyrene in milk should be considered in order to evaluate the level of exposure of dairy ruminants to PAH. The non specificity of the bioindication of exposure to POPs based on EROD activity in lymphocytes is complementary to the specific bioindication of exposure to PAH based on 1-OH pyrene in milk or urine and both approaches can contribute to a better risk evaluation.

Acknowledgement

This research was supported by a PhD fellowship granted by the Syrian Ministry of Higher Education.

4.7 References

1. Denison MS, Whitlock JP. 1995. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* 4: 18175-18178.
2. Booggard PJ, Van Sittert NJ. 1994. Measurement of exposure to PAH in petrochemical industries by determination of urinary 1-hydroxypyrene. *Occ. Environ. Med.* 51: 250-258.
3. Petry T, Schmid P, Schlatter C. 1996. Airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. *Ann. Occup. Hyg.* 40: 345-357.
4. Huang W, Caudill P, Grainger J, Needham L, Patterson D. 2006. Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: a study based on U.S. reference range values. *Toxicol. Lett.* 163: 10-19.
5. De Vos RH, Van Dokkum W, Schouten A, De Jong-Berkhout P. 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem. Toxicol.* 28: 263-268.
6. Lodovici M, Dolara P, Casalini C, Ciappellano S, Testolin G. 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the italian diet. *Food Addit. Contam.* 703-713.
7. Falco G, Domingo JL, Llobet JM, Teixido A, Casas C, Müller L. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: Human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J. Food Protect.* 66: 2325-2331.
8. Guiavarc'h Y, Chahin A, Dziurla MA, Toussaint H, Feidt C, Rychen G. 2010. Evaluation of Small Ruminant exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a biomarker approach. *Small Ruminant Research*. Accepted for publication, in press.
9. Healy W.B. 1968. Ingestion of soil by dairy cows. *N.Z.J. Agric Res.* 11: 487-499.
10. Hinton TG, Stoll JM, Tobler L. 1995. Soil contamination of plant surfaces from grazing and rainfall interactions. *J. Environ. Radioactiv.* 29: 11-26.
11. Trapido M. 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. *Environ. Pollut.* 105: 67-74.
12. Grova N, Laurent C, Feidt C, Rychen G, Laurent F, Lichtfouse E. 2000. Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *Eur. J. Mass Spectrom.* 6: 457-460.
13. Wilcke W. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 163: 229-248.
14. Muller AK, Westergaard K, Christensen S, Sorensen S. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 11-19.
15. Smith KEC, Northcott GL, Jones KC. 2006. Influence of the extraction methodology on the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pasture vegetation. *J. Chromatogr. A* 1116 (1-2): 20-30.
16. Crépineau-Ducoulombier C, Rychen G. 2003. Assessment of soil and grass Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) contaminations levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23: 345-348.
17. Nam JJ, Song BH, Eom KC, Lee SH and Smith A. 2003. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere* 50: 1281-1289.

18. Pereira Netto AD, Cunha IF and Kranss TM. 2004. Persistence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Soil of a Burned Area for Agricultural Purposes in Brazil. *B. Environ. Contam. Tox.* 73: 1072-1077.
19. Motelay-Massei A, Ollivon D, Garban B, Teil MJ, Blanchard M, Chevreuil M. 2004. Distribution and spatial trends of PAH and PCBs in soils in the Seine river basin, France. *Chemosphere* 55: 555-565.
20. Wong F, Harner T, Liu QT, Diamond ML. 2004. Using experimental and forest soils to investigate the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) along an urban-rural gradient. *Environ. Pollut.* 129: 387-398.
21. Tang L, Tang XY, Zhu YG, Zheng MH, Miao QL. 2005. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urban soils in Beijing China. *Environ. Int.* 31: 822-828.
22. Lutz S, Feidt C, Monteau F, Rychen G, Le Bizec B, Jurjanz S. 2006. Effect of exposure to Soil-Bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites. *J. Agr. Food Chem.* 54: 263-268.
23. Yin CQ, Jiang X, Yang XL, Bian YR, Wang F. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils in the vicinity of Nanjing, China. *Chemosphere* 389-394.
24. Agarwal T, Khillare PS, Shridhar V, Ray S. 2008. Pattern sources and toxic potential of PAH in the agricultural soils of Delhi, India. *J. Haz. Mat.* 163: 1033-1039.
25. Guiavarc'h Y, Chahin A, Dziurla MA, Toussaint H, Feidt C, Rychen G. 2008. 1-hydroxypyrene in milk as a bioindicator of exposure of ruminants to polycyclic aromatic hydrocarbons: a valuable tool for dairy products safety assessment ? Oral communication n° 06.1 at the 1st European Food Congress organized by EFFoST (European Federation of Food Science and Technology), 4-9 November 2008, Ljubljana, Slovenia. Abstract available in the Delegate Manual.
26. Ciganek M, Ulrich R, Neca J, Raszyk J. 2002. Exposure of pig fatteners and dairy cows to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Vet. Med.* 47: 137-142.
27. Grova N, Feidt C, Crépineau C, Laurent C, Lafargue PE, Hachimi A, Rychen G. 2002. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *J. Agr. Food Chem.* 50 (16): 4640-4642.
28. Grova N, Monteau F, Le Bizec B, Feidt C, Andre F, Rychen G. 2005. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 29(3): 175-181.
29. Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Akiyama S, Nakashima K. 2003. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 789 (2): 257-264.
30. Lapole D, Rychen G, Grova N, Monteau F, Le Bizec B, Feidt C. 2007. Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants. *J. Dairy Sci.* 90: 2624-2629.
31. Van Duursen MBM, Sanderson JT, Van den Berg M. 2005. Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility. *Toxicol. Sci.* 85: 703-712.

32. Kim YD, Todoroki H, Oyama T, Isse T, Matsumoto A, Yamaguchi T, Kim H, Uchiyama I, Kawamoto T. 2004. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene. *Environ. Res.* 94: 262-266.
33. Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2004. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: Detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* 65 (5), 1225-1237.
34. Bucheli TD, Fent K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 25 (3): 201-268
35. Abrahamson A, Andersson C, Jönson ME, Fogelberg O, Örberg J, Brunström B, Brandt I. 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish-A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquat. Toxicol.* 85: 1-8.
36. Chun HS, Kim HJ, Choi, EH. 2001. Modulation of cytochrome P450 mediated bioactivation of benzo(a)pyrene by volatile allyl sulfides in human hepatoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(10): 2205-2212.
37. Chahin A, Guiavarc'h Y, Dziurla MA, Toussain H, Feidt C, Rychen G. 2008. 1-Hydroxypyrene in milk and urine as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of ruminants. *J. Agr. Food Chem.* 56: 1780-1786.
38. Murphy J, Morgan D. 1983. Effect of inclusion of protected and performance of lactating dairy cows. *Anim. Prod.* 37: 203-210.
39. Ndoutamia G, Ganda K. 2005. Determiration des paramètres hématologiques et biochimiques des petits ruminants du Tchad. *Rev. Med. Vet.* 156 (4): 202-206.
40. Wang Y, Zhang W, Dong Y, Fan R, Sheng G, Fu J. 2005. Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 383: 804-809.
41. Chetianukornkul T, Toriba A, Kameda T, Tang N. 2006. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Bioanal. Chem.* 386: 712-718.
42. Roos PH, Tschirbs S, Welge P, Hack A, Theegarten D, Mogilevski G, Wilhelm M. 2003. Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch. Toxicol.* 76, 326-334.
43. Chahin A, Peiffer J, Schroeder H, Rychen G, Guiavarc'h Y. 2010. EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues of rats submitted to long term oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Submitted to *Food. Chem. Toxicol.* in January 2010.
44. De Vito MJ, Diliberto JJ, Roos DG, Menache MG, Birnbaum LS. 1997. Dose-Response Relationships for Polyhalogenated Dioxins and Dibenzofurans Following Subchronic Treatment in Mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147: 267-280.

Table 1. Details on EROD activity and their standard error of the mean versus time of exposure and dose of ingested pyrene, phenanthrene and pyrene.

Day	EROD activity in pmol resorufin/mg protein/min	
	Dose 1	Dose 2
	(1 mg/day)	(50 mg/day)
0	0.61±0.34 ^a	0.40±0.18 ^a
10	2.24±0.15 ^b	4.13±0.55 ^b
20	5.47±2.71 ^c	13.61±2.71 ^c
30	6.31±1.49 ^c	17.91±0.99 ^d
40 ¹	6.30±1.30 ^c	18.89±1.12 ^d
50	5.05±0.73 ^c	10.19±1.07 ^c

^{a-d} For each column and dose, mean values with similar letter did not differ significantly, $p > 0.05$.

¹ End of exposure at day 40.

Table 2. Kinetic parameters and their associated 95% confidence bounds applied to equation 1 describing EROD induction versus time in goat peripheral blood lymphocytes. EROD Activity is expressed in pmol resorufin/min/mg protein.

Dose (mg/day)	A_{EROD max}	k₁	k₂	R²
1	6.31	0.29 (0.16, 0.29)	-2.81 (-3.68, -1.95)	0.997
50	18.89	0.22 (0.20, 0.24)	-3.49 (-3.79, -3.19)	0.999

Table 3. Parameters and their associated 95% confidence bounds applied to Hill and Michaelis-Menten equations describing EROD induction in goat peripheral blood lymphocytes as a function of the daily ingested dose of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene. EROD activities are expressed in pmol resorufin/min/mg protein. Resulting curvatures of the fittings remain to be considered with caution, due to the lack of data points for doses in the range 10-20 mg/day.

Model	Equation	Assumption	Parameters				R ²
			A _{EROD 0}	A _{EROD max}	b	n	
Hill	(2)	A _{EROD max} =18.89 ¹	0.50 (-0.27, 1.27)	/	2.056 (0.88, 3.24)	1,13 (0.45, 1.81)	0.991
Michaelis-Menten with additional term, A _{EROD 0}	(3)	none	0.50 (-0.27, 1.27)	19.24 (17.82, 20.66)	2.32 (1.55, 3.09)	/	0.991

¹: Assumption based on our experimental results and discussion.

Table 4. Transfer of pyrene under 1-OH pyrene from toward milk and urine.

Dose (mg/day)	Day	1-OH pyrene in milk (μg) ¹	1-OH pyrene in urine (μg) ¹	1-OH pyrene in milk (ng/g)	1-OH pyrene in urine (ng/g)	Transfer ² rate in milk	Transfer ² rate in urine
1	10	3.18 ^a	255 ^a	3.56 ^a	72.93 ^a	0.0032 ^a	0.2553 ^a
1	20	4.63 ^a	301 ^a	6.66 ^a	83.97 ^a	0.0046 ^a	0.3011 ^a
1	30	1.93 ^a	237 ^a	2.83 ^a	76.10 ^a	0.0019 ^a	0.2369 ^a
50	10	241 ^a	9565 ^a	158 ^a	3817 ^a	0.0048 ^a	0.1913 ^a
50	20	297 ^a	17282 ^b	257 ^a	6384 ^b	0.0057 ^a	0.3457 ^b
50	30	199 ^a	7717 ^a	189 ^a	2992 ^a	0.0040 ^a	0.1544 ^a
Averages ratio between doses		75.66	43.58	46.28	56.62	0.67	0.87

^{a,b}, for each column and dose, mean values with similar letter did not differ significantly, $p > 0.05$.

¹, Amount of 1-OH pyrene excreted in the volume of milk or urine excreted within the 24 hours after ingestion.

², Transfer rate is defined as the ratio between daily ingested dose of pyrene and amount of 1-OH pyrene excreted into milk or urine produced within the 24 hours after ingestion.

Legend

Fig. 1. Average EROD activities and their corresponding standard deviations in peripheral blood lymphocytes of goat daily exposed, during 40 days, to 1 mg/day (▲) or 49 mg/day (△) of each of the following PAH: phenanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene. (n=3). Curves were derived from a logistic-like model as described in Equation 1 and Table 1.

Fig. 2. Plateau EROD activities versus daily ingested PAH doses (n=6 for dose 0 mg/day, n=3 for doses 1 and 50 mg/day). Triangles are experimental points. (a) fitting based on Hill equation with A_{ERODmax} assumed to be 18.89 pmol resorufin/min/mg protein, (b) fitting on Michaelis-Menten equation with $A_{\text{EROD}0}$ as an additional term and no assumption on A_{ERODmax} . Thin curves represent the 95% confidence limits of the fittings. The curvatures of these fittings remain to be considered with some caution due to the lack of experimental points for doses in the range 10-20 mg/day.

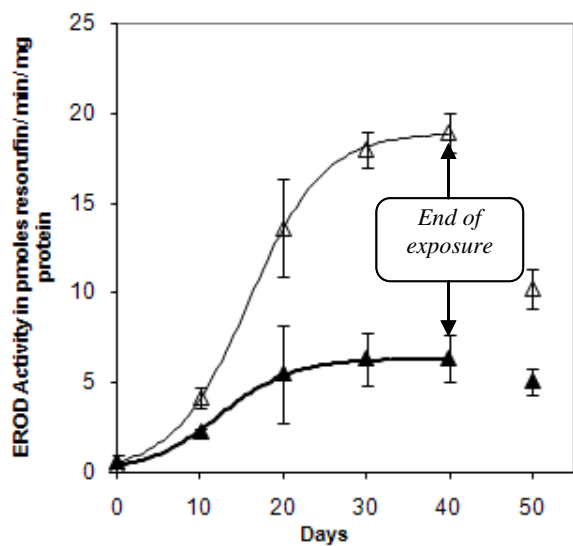
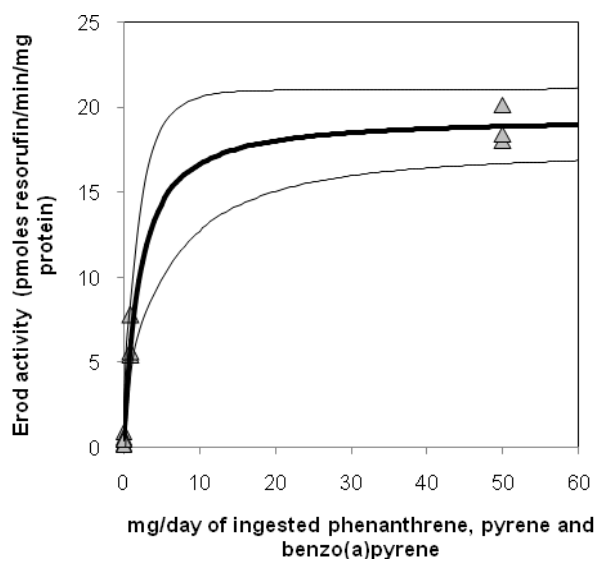
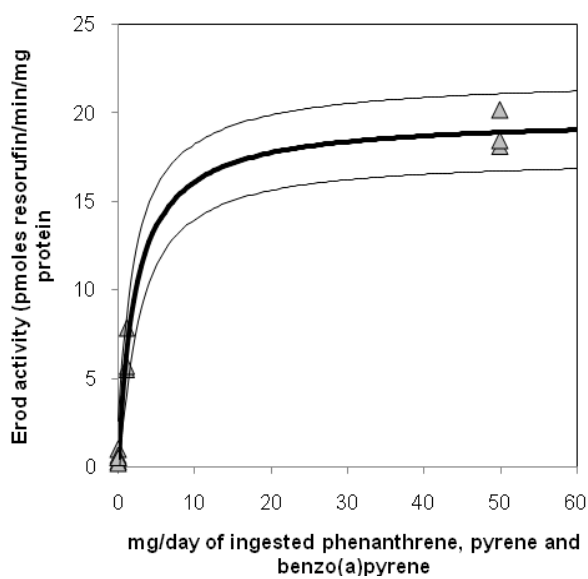


Figure 1



(a)



(b)

Figure 2a and 2b

Chapitre V :
Cinétique d'induction de l'activité EROD dans les lymphocytes, le foie et le cerveau de rats soumis à une exposition orale subchronique (28 jours) aux hydrocarbures aromatiques polycycliques

5.1 Introduction chapitre V

Dans le chapitre précédent il a été démontré :

↳ Que l'ingestion du mélange phénanthrène, pyrène, benzo(a)pyrène, aux doses de 1 et 50 mg/jour provoquait une induction significative de l'activité EROD dans les lymphocytes de sang périphérique caprin.

↳ Que cette induction était peu variable d'un individu à l'autre, sans doute parce que les animaux étaient de même race, appartenaient au même troupeau et étaient nourris de la même manière.

↳ Que cette induction pouvait être modélisée par un modèle de type logistique avec identification, pour chaque dose testée, d'un plateau atteint après environ 30-40 jours d'exposition au mélange ternaire de HAP.

↳ Que les activités aux plateaux n'étaient absolument pas proportionnelles aux niveaux d'exposition.

↳ Qu'une ébauche de relation dose-réponse à 12 points sur seulement 3 doses (0, 1 et 50 mg/j) pouvait être parfaitement modélisée par un modèle de type Michaelis-Menten avec identification d'une EC50 et d'une activité EROD lymphocytaire maximale atteignable chez la chèvre.

↳ Que cette activité maximale (à tout le moins son évaluation), qui reflète un maximum d'induction CYP450 1A1 et 1B1 atteignable chez la chèvre, c'est-à-dire une limite adaptative en terme d'induction métabolique, est atteinte pour des niveaux d'exposition en mode subchronique/chroniques nettement supérieurs à ce qui peut-être rencontré dans l'environnement.

Ces observations ont clairement démontré, ce qui est une nouveauté, la possibilité d'utiliser la mesure de l'activité EROD lymphocytaire comme bioindicateur non invasif et aspécifique de l'exposition du ruminant laitier aux HAP et autres POP CYP450 inducteurs tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH).

Le caractère aspécifique de cette bioindication doit selon nous être considéré plus comme un avantage que comme un inconvénient. En effet, en première approche et préalablement à tout « scanning analytique » coûteux du « champ des possibles », l'activité EROD lymphocytaire pourrait être utilisée chez le ruminant laitier comme un moyen simple d'évaluer de manière aspécifique le niveau d'exposition d'un troupeau à des xénobiotiques CYP450 inducteurs. Seules les situations dans lesquelles les activités EROD les plus fortes

seraient rencontrées mériteraient alors que l'on y consacre une investigation analytique spécifique par familles de POP (HAP, PCB, PCDF, PCDD...) avec également la possibilité d'utiliser le 1-OH pyrène dans le lait ou l'urine comme biomarqueur spécifique d'une éventuelle exposition significative aux HAP.

Une question demeure cependant. Dans quelle mesure l'activité EROD lymphocytaire peut-elle refléter l'activité EROD hépatique ? Il est en effet établi que c'est dans le foie que se concentre la majeure partie du potentiel oxydatif des HAP et de l'activité EROD (c'est à dire des activités CYP4501A1 et 1B1). Pouvoir évaluer une activité EROD hépatique « majeure » à partir d'une activité EROD lymphocytaire périphérique à priori « mineure » pourrait donc s'avérer précieux en termes de compréhension du métabolisme hépatique des HAP CYP450 inducteurs, et plus généralement des POP CYP450 inducteurs.

Dans la présente étude, deux séries de rats Wistar ont été exposés par voie orale pendant 0, 3, 7, 14, 21 ou 28 jours à un mélange ternaire de phénanthrène, pyrène, et benzo(a)pyrène à des doses de 6 µg et 600 µg par jour de chaque HAP dissous dans de l'huile. Une troisième série de rats, recevant une huile non contaminée, a été utilisée comme contrôle. L'activité EROD a été mesurée simultanément dans le foie, les lymphocytes du sang périphérique et le cerveau.

Ce chapitre présente :

- les cinétiques d'induction EROD obtenues dans les 3 compartiments.
- une ébauche de relation dose réponse dans chaque compartiment avec un justificatif quand à la possibilité d'établir une telle ébauche à partir de 3 niveaux d'exposition seulement.
- une synthèse des corrélations inter-compartiments observées tout au long de l'expérimentation, y compris 4 jours après la fin de l'exposition.
- une discussion sur les implications des résultats obtenus, faisant le lien entre les inductions EROD observées chez la chèvre et les courbes dose-réponses observées en excrétion du 1-OH pyrène dans le lait et l'urine.

Ce chapitre a fait l'objet d'un manuscrit soumis en 2010 dans la revue Food & Chemical Toxicology. Le manuscrit correspondant est présenté en l'état dans les pages suivantes.

**EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver
and brain tissues of rats submitted to long term oral exposure to
polycyclic aromatic hydrocarbons**

*Abir Chahin, Julie Peiffer, Henri Schroeder, Guido Rychen, Yann Guiavarc'h**

*Submitted to Food and Chemical Toxicology
(Mars 2010)*

Authors are affiliated to:

Research Unit on Animal and Functionality of Animal Products (UR AFPA)

Nancy University-Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172

54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

France

**Author to whom correspondence should be addressed*

☎: +33 (0)383595888

Fax: +33 (0)383595889

Short title: "EROD activities in lymphocytes, liver and brain tissues of rat"

Keywords: Cytochrome P450 1A1 and 1B1; EROD activity induction kinetic; Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); Peripheral blood lymphocytes; Liver; Brain.

5.2 Abstract

Little is known in terms of multi compartmental cytochrome P450 activity induction under long term repeated oral exposure to planar halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons (PHHs, PAHs). In the present study, 60 rats were daily submitted, during 28 days, to oral ingestion of a PAH mixture consisting of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene at 0, 6, or 600 µg/day. EROD activity, reflecting almost exclusively CYP1A1 and CYP1B1 activities, was measured in brain and liver microsomes as well as in peripheral blood lymphocytes (PBL). All induction kinetics could be appropriately fitted using logistic-like models. After 28 days of exposure EROD activity was for instance found to be 93 folds, 151 folds and 95 folds increased in lymphocytes, liver and brain respectively, as compared to day 0 and with dose 6µg/day. Maximum expectable activities could be appropriately fitted versus ingested doses using a Michaelis-Menten like model and correlations between compartments made it possible to conclude that EROD activity in PBL is a sensitive, convenient and non-destructive approach for (i) evaluating EROD activity in liver, which was found to represent 98% of the observed EROD activities and (ii) evaluating oral exposure of homogeneous groups of animals (race, diet) to CYP inducing PAHs and PHHs.

Keywords

- | | |
|---|---------|
| 1-Cytochrome P450 1A1 and 1B1 | 5-Liver |
| 2-EROD activity induction kinetic | 6-Brain |
| 3-Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) | |
| 4-Peripheral blood lymphocytes | |

5.3 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous by products from incomplete burning of organic materials and are present as mixtures in air and food. They belong to the group of persistent organic pollutants (POPs), which, according to the protocol on POPs signed in 1998 in Denmark, fulfill the five following points: (i) they possess toxic characteristics; (ii) they are persistent; (iii) they can bioaccumulate; (iv) they are prone to long-range transboundary atmospheric transport and deposition; and (v) they are likely to cause significant adverse human health or environmental effects near to and distant from their emission source. Considering their toxicity and presence in the environment, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has identified 16 unsubstituted PAHs as priority pollutants, these being approximately 80% of the PAHs found in United States. Especially since the mid-90th, their production, dispersion and adverse effects (cytotoxicity, carcinogenicity, endocrine disruption) have been largely investigated in animal and humans, although many efforts will still have to be provided to better understand their transfer and metabolism after absorption as well as the variability of their bioavailability depending on the matrix in which they are included. Excepted for smokers and specific professional exposures, diet was shown to represent about 90 % of the exposure to PAHs with about 10 µg PAH ingested per day, whose about 50% are carcinogenic, for an adult (De Vos et al., 1989; Lodovici et al., 1995; Falco et al., 2003). In an agronomic standpoint, it was also shown that dairy cows may ingest up to about 11 mg/day of the sixteen priority PAHs in semi-rural areas with subsequent transfer toward milk, mainly in metabolized forms (Ciganek et al., 2002; Guiavarc'h et al., 2009). In a toxicological standpoint, the evaluation of exposure (especially oral) of human or animals to PAHs is therefore a key point for risk assessment. To evaluate this exposure, the use of an extensive analytical investigation of concentrations into the diet, based on LC or GC/MS, appears to be the most appropriate. However, because extensive analytical investigations may rapidly become cost and time consuming, especially when extractions have to be performed in complex food matrixes, the use of a biomarker of exposure to PAHs was suggested by many authors as an interesting preliminary tool to evaluate whether further analytical investigations are required (Jongeneelen et al., 2001; Chahin et al., 2008). Measurement of ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in biological tissues is considered with interest as a potential *in vivo* biomarker of exposure of animals and humans to certain planar halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons (PHHs and PAHs) and other structurally similar compounds (Whyte et al., 2000, Bucheli and

Fent, 1995). EROD activity is a highly sensitive indicator of contaminant uptake in animal and human, providing evidence of receptor mediated induction of cytochrome P450-dependant monooxygenases (the CYP1A subfamily specifically) by xenobiotic chemicals. Cytochromes P450 (CYP) comprise a superfamily of enzymes that catalyze the detoxification and bioactivation of a wide variety of xenobiotics and endogenous compounds (Whyte et al., 2000). To date, about 8100 CYP sequences have been identified in all domains of life (mammals, birds, fish, insects, plants, fungi...) and about 57 CYP enzymes of 18 families have been identified in humans according to the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee (Karolinska Institute, Sweden, 2009). CYP1, CYP2 and CYP3 families mainly contribute to the metabolism of xenobiotics with a broad specificity (Shimada et al., 1994) and EROD activity was shown to be mainly catalysed by CYP1A1 and to a lesser extent by CYP1B1 and CYP1A2 (Chun et al., 2001). For instance, with regards to *in-vivo/vitro* exposure to CYP inducible polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), it is now established that EROD activity is almost totally (more than 95%) reflecting CYP1A1 (about 80%) and CYP1B1 (about 15%) activities (Kim et al., 2003; Iba et al., 2003). One key point of the use of EROD activity (CYP1A1 and 1B1 activity) as biomarkers of exposure to xenobiotics is that tested individuals do not show too large interindividual differences in constitutive and inducible CYP1A1 and 1B1 profiles and that large differences in group/ethnicity CYP1A1 and 1B1 polymorphism are limited. Such large differences are unfortunately often observed in human populations due to large differences in genetic/historical background as well as differences in diet and environmental exposures, thus partially precluding the use of EROD activity as a relevant biomarker of exposure to PHHs and PAHs in humans (Landi et al., 2003; Van Duursen et al., 2005). Hopefully, these differences are much less limited in the animal domain when focusing on a given specie with similar genetic profile, thus making possible to use EROD activity for evaluating levels of exposures to PHHs and PAHs. EROD activity has therefore been and is still extensively used as a valuable investigation tool to evaluate exposures of fishes, birds or mammals to PHHs and PAHs under uncontrolled real environmental conditions (van Duursen et al., 2005; Abrahamson et al., 2007; Numata et al., 2008;) or to compare the inducible potential of various PHHs and PAHs on CYP1A1 and 1B1 in animals (especially laboratory rodents but also dairy ruminants or minipigs) submitted to controlled oral, intra-venous, intra peritoneal, or even atmospheric exposures to PHHs or PAHs (Roos et al., 2002; Uno et al., 2004; Dey et al. 2000; Kang et al.; 2007; Chahin et al.; 2008). EROD activities have been found in various animal tissues such as liver, kidney, duodenum but also in brain, lung, spleen, peripheral

blood lymphocytes and even in gill tissues (Roos et al., 2002 a,b; Iba et al., 2003; Abrahamson et al., 2007). But among the numerous investigations on CYP 1A1 and 1B1 inductions by xenobiotics under controlled oral exposure conditions, only two aimed to compare the simultaneous induction kinetics of EROD activity in several compartments over a subchronic exposure period to PAHs (Roos et al., 2002 a,b) and, very often, induction kinetics are not sufficiently described and run in *in-vitro* conditions. Such investigation would yet be useful for an appropriate comparison of CYP activities versus time of exposure curves as well as dose/response curves. These comparisons would for instance allow us to know in which extent CYP 1A1 and 1B1 inductions in peripheral blood lymphocytes properly reflect CYP 1A1 and 1B1 inductions in the liver, which may be useful for evaluating animal exposures to PAHs in a non-invasive way.

In the present study, two sets of Wistar rats were orally and daily exposed during four weeks to an oily mixture contaminated with three US-EPA priority PAHs: phenanthrene, the most common PAHs in the environment, pyrene, the usual indicator of environmental PAHs contamination (Chahin et al., 2008), and benzo(a)pyrene, the reference PAH in terms of toxicity according to US-EPA. A set of rats, receiving non-contaminated oil, was used as a control. EROD activity was measured simultaneously in liver, peripheral blood lymphocytes and brain. The use of a specific CYP1B1 inhibitor made it possible to differentiate between CYP1A1 and CYP1B1 inductions into the brain. An additional 4 days period after the end of ingestion was used to evaluate the rate of decay in CYP1A1 and CYP1B1 activity. Finally, induction kinetics as well as dose/response data were extensively analyzed allowing for quantified conclusions and comparisons between liver, lymphocytes and brain

5.4 Materials and methods

5.4.1 Animals

Sixty Wistar male rats weighing 225-250 g (8-9 week age) were used for this study. They were purchased from Harlan (Gannat, France) and were housed (5 rats per cage) in a regulated environment at 22 ± 2 ° C and $40 \pm 5\%$ relative humidity maintained under a reversed light/dark cycle (light on from 8:00 p.m. to 8:00 a.m.). A one week adaptation period was used to ascertain the health status of rats as well as their adaptation to their experimental environment. Food pellets (Teklad Global 2016, Harlan, Gannat, France) and tap water were provided *ad libitum*. All rats were handled in the same way, and were

randomly allocated to the experimental groups. All procedures were in compliance with the rules provided by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

5.4.2 Experimental design

Rats were divided in three groups of 18 animals and one group of 6 animals. Just after the adaptation period, the two first groups of 18 rats were daily submitted during 28 consecutive days to an oral ingestion of a mixture consisting of 6 µg or 600 µg respectively of each of the three PAHs (phenanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene) dissolved in 1 mL ISIO 4 vegetal oil (Lesieur, France). This oil is a mixture of sunflower, colza and grape seed oils. In parallel, the third group of 18 rats was daily submitted to the ingestion of 1 mL of non contaminated oil. This group was used as a control to check whether oil alone could lead to CYP450 1A1 and 1B1 activities inductions. The last group of 6 rats was used as a day 0 (control) reference in terms of EROD activity. After sacrifice, blood, liver and brains were collected at day 0 (n=6), day 3, 7, 14, 21, 28 and 32 (n=3 for each of the three groups of 18 rats). Samplings were performed between 10h00 and 12h00 a.m. Livers and brains were immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C waiting for isolation of their microsomal fractions for measurement of EROD activity. Peripheral blood lymphocytes were isolated from fresh blood (collected in heparinised tubes) within the two hours after sampling and EROD activity was measured the same day as the sampling day.

5.4.3 Isolation of lymphocytes

Lymphocytes were isolated from the anticoagulated whole blood using density gradient centrifugation on sodium diatrizoate polysucrose. In brief, 3 mL of whole blood were carefully layered over 3 mL of an Accuspin System-Histopaque -1077 falcon tube (Sigma-Aldrich, Poole, UK) previously centrifuged before use at 1000 x g for 30 seconds at room temperature. After addition of the blood over the porous high density polypropylene barrier (frit) of the tube, the latter was centrifuged at 1000 x g for 20 min at 18 -20°C. The upper layer (plasma) was then discarded leaving about 0.5 cm of plasma above an opaque and thin layer containing mononuclear cells at the interface between the Histopaque solution and the residual plasma. This thin layer was transferred into a clean centrifuge tube and the lymphocytes were washed twice with 10 mL of warm PBS buffer at 37°C (Invitrogen, UK) by centrifugations at 250 x g at 18-20°C for 15 min. The resulting pellet was resuspended in 0.6 mL of PBS buffer and

used for ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity determination. The total protein content of the samples was determined by using a bicinchoninic acid total protein assay kit (Sigma Aldrich, Germany) using BSA (Bovine Serum Albumin) as protein standard.

5.4.4 Preparation of liver and brain microsomes

Rat liver and brain tissues from rats exposed to PAHs contaminated oil were used to prepare liver and brain microsomes using standard differential ultracentrifugation. The cells were homogenized in microsomal homogenization buffer (20 mM tris, 250 mM sucrose, and 1 mM EDTA) pH 7.4 and centrifuged at 600 x g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was centrifuged at 10000 x g for 30 minutes at 4°C. Then the supernatant was ultra-centrifuged at 100000 x g for 1 hour at 4°C and the pellet was resuspended in 0.6 mL of microsome dilution buffer before subsequent ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity determination. The concentration of total protein content of the samples was determined using Bicinchoninic Acid Kit using BSA as protein standard. Livers of control rats (submitted to non-contaminated oil) were also used for microsomal isolation.

5.4.5 EROD activity

Cells were suspended in 100 mM Tris buffer (pH 7.8), containing 5 mM MgCl₂. A 170 µL cell suspension volume containing 40 µg of protein was added in wells of a 96 wells microplate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) together with 10 µL of 2 mM 7-ethoxyresorufin. The microplate was then placed in a preheated FluoStar plate reader (BMG Labtech, Offenbourg, Germany) for 5 min incubation at 37°C. A 20 µL volume of 10 mM NADPH in 100 mM Tris buffer (pH 7.8) was then added to start the EROD reaction. The plates were then placed at 37°C and the EROD activity in the wells was measured through resorufin production using fluorescence detection with an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm, every 2 min for 30 minutes. A calibration curve of resorufin was used for quantification of the activity. In order to distinguish between CYP1A1 and CYP1B1 activities, we inhibited the CYP1B1 activity with homoeriodictyol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). A 1 mM homoeriodictyol stock solution was prepared in absolute ethanol and stored at -20 °C. A volume of 10 µL of 1.5 µM homoeriodictyol was used in each well in order to inhibit CYP1B1 activity.

5.4.6 Statistical analysis

Curve fittings were performed using linear or non-linear regression with Matlab 7.1 (The Mathworks Inc., Lowell, MA, USA). Normality of residuals was assessed using a Shapiro-Wilk test with SAS statistical software (version 9.1, 2004, SAS Institute, Cary, NC, USA).

5.5 Results

5.5.1 EROD activity in lymphocytes and liver of control rats

In lymphocytes as well as in liver of rats exposed to non contaminated oil, slight but significant increases in EROD activities over the 28 days of exposure could be observed (Figure 1). Average activities increased from 1.0 ± 0.1 to 2.97 ± 0.19 pmol resorufin/min/mg protein and 2.18 ± 0.85 to 6.78 ± 0.40 pmol resorufin/min/mg protein in lymphocytes and liver respectively. These activities decreased to 1.99 ± 0.14 and 6.12 ± 0.10 pmol resorufin/min/mg respectively during the four additional days after the end of exposure to oil at day 28. As seen later in this study, these level of EROD activity induction are negligible as compared to the one achieved with exposure to contaminated oil. It is likely that this induction is due to a slight oil contamination. Vegetable oils for human consumption are indeed known to contain small amounts of PAHs and their maximal concentration in benzo[a]pyrene, a well known CYP 1A1 and 1B1 inducer, was laid down to 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the European Regulation (EC) No.1881/2006.

5.5.2 EROD activity in lymphocytes, liver and brain of rats exposed to PAH contaminated oil

Scatter plots from Figures 2a and 2b represent the evolutions of EROD activity achieved in peripheral blood lymphocytes, brain and liver for doses 6 $\mu\text{g}/\text{day}$ and 600 $\mu\text{g}/\text{day}$ of each of the three PAHs respectively, during the 32 days of the animal experiment. Several observations can be made. At first, interindividual heterogeneity in EROD activity between animals is quite low with an average variation coefficient of $12.84 \pm 4.28 \%$ in lymphocytes, $7.57 \pm 3.63 \%$ in liver and $10.31 \pm 5.05 \%$ in brain. Second, whatever the exposure level or the compartment under concern, strong EROD (CYP450 1A1 and 1B1) activity inductions were observed up to day 28, before a rapid decay over the 4 last days without exposure. At day 28 and with dose 6 $\mu\text{g}/\text{day}$, EROD activity was found to be 93 folds, 151 folds and 95 folds increased in lymphocytes, liver and brain respectively, as compared to day 0. With dose 600 $\mu\text{g}/\text{day}$, EROD activity was found to be 191, 329 and 213 folds increased as compared to day 0, thus showing that EROD inducibility, in lymphocytes, liver and brain is not at all

proportional to the daily ingested PAHs dose. Evaluating the daily ingested dose starting from which maximal EROD induction is achieved in “detoxication” potential (see later in this study). Since phenanthrene is known to have no CYP 1A1 and 1B1 induction capability, at the opposite of pyrene and benzo(a)pyrene, the observed EROD inductions mean that these two PAHs are also able to reach the brain tissue. As a third comment, for both levels of exposure, a plateau in EROD activity is achieved in brain around day 28 while it is not yet the case in liver and lymphocytes. This may be due to (i) a smaller expression/traduction potential of CYP1A1 and 1B1 cytochromes inside the brain as compared to peripheral blood lymphocytes and liver and/or (ii) to a smaller fraction of pyrene and benzo(a)pyrene entering into contact with brain tissue as compared with the fraction entering into contact with lymphocytes and liver tissue, thus leading to an earlier plateau in EROD activity. Finally, it is interesting to see that lymphocytes and brain tissue show quite similar EROD activities, which are not so smaller than EROD activity observed in the liver, yet known as the main detoxication compartment in the body.

5.5.3 Fitting of EROD activity induction kinetics in lymphocytes, liver and brain

For each daily dose (6 and 600 µg of each PAH/day), induction kinetics in lymphocytes, liver and brain could be appropriately fitted with a logistic-like model as described in equation 1 where $A_{\text{EROD max}}$ represents the maximum expectable EROD activity, k_1 and k_2 the coefficients to find using non-linear regression, and $n/(1+\text{day})$ a correction term used to improve fittings during the first days of the exposure.

$$A_{\text{EROD}} = \frac{A_{\text{EROD max}}}{1 + \exp(-k_1 \cdot \text{day} - k_2)} - \frac{n}{(1+\text{day})} \quad (1)$$

In order to guess the best $A_{\text{EROD max}}$ to use in the non linear regressions, we applied iterative non-linear regressions testing several $A_{\text{EROD max}}$, without the correction term. The $A_{\text{EROD max}}$ leading to the best R^2 value was then kept and, when deviations of the model as compared to the experimental points were observed in the first days of the experiment, a correction term was applied choosing an appropriate n value. A new non-linear regression was then performed modifying slightly the $A_{\text{EROD max}}$, k_1 and k_2 values and leading to an improved quality of the fitting. Table 1 lists the kinetic parameters applied to equation 1 describing EROD activity induction versus time of exposure in peripheral blood lymphocytes, liver and brain. This table also lists the kinetic parameters used to fit the experimental data achieved using homoeriodictyol as an inhibitor of CYP 1B1 activity thus making possible to

distinguish between CYP1B1 and CYP1A1 activity inductions in the brain. Figure 3a, 3b and 3c represent experimental data points and corresponding fittings of EROD activity induction in lymphocytes, liver and brain respectively. Figure 4a and 4b represent experimental data points and corresponding fittings for CYP450 1A1 and CYP450 1B1 activity inductions in brain, respectively. It is interesting to note that, whatever the compartments, ratios between A_{ERODmax} at 600 $\mu\text{g/day}$ and 6 $\mu\text{g/day}$ of PAHs are systematically close from 2 instead of 100. We indeed found ratios equal to 1.74 in lymphocytes, 2.04 in liver, 1.93 in brain for EROD activity while ratios of 1.95 and 1.71 were observed for CYP450 1A1 and CYP450 1B1 respectively in the brain. It is quite surprising to observe that, for a given dose, A_{ERODmax} achieved per mg of protein in lymphocytes and brain are close to each other and not so low as compared to A_{ERODmax} achieved in liver. A_{ERODmax} per mg/protein in the liver are indeed only about 4 folds higher as compared to the ones found in lymphocytes and brain. According to fittings, A_{ERODmax} would have been achieved around day 40 in lymphocytes and in liver, which is much longer than the 28 days necessary in brain. It should be stressed, here, that the time of exposure required for reaching A_{ERODmax} is not significantly affected by the very large change in level of exposure (6 $\mu\text{g/day}$ to 600 $\mu\text{g/day}$ of each of the three PAHs). Table 2 presents the maximum expectable EROD activities, based on fittings, in peripheral blood lymphocytes, liver and brain. Whatever the daily dose considered, liver, peripheral blood lymphocytes and brain represent about 98.1 %, 1.1% and 0.9% respectively of the sum of A_{ERODmax} expectable per rat in the three compartments.

5.5.4 Fitting of maximum EROD activities versus daily ingested PAHs doses

As shown in Figure 5, maximum expectable EROD activities versus daily ingested PAHs doses could be appropriately fitted, for each compartment, with a Michaelis-Menten like model according to equation 2. In this equation, the 'a' parameter corresponds to the theoretical maximum EROD activity that can be found in one compartment, while the 'b' parameters corresponds to the level of PAH ingestion in mg/day necessary for reaching half of the theoretical maximum EROD activity. Figure 6 represents the maximum expectable EROD, CYP1A1 and CYP1B1 activities versus daily ingested PAHs doses in the brain. Kinetic parameters used in Figures 5 and 6 are listed in Table 3.

$$A_{\text{EROD}} = \frac{(a = A_{\text{ERODmax}}) \cdot \text{dose}}{b + \text{dose}} \quad (2)$$

Several observations can be drawn from these "dose/response" curves. At first, and as can be seen through the 'a' parameters, the maximum EROD activities per mg of protein, A_{ERODmax} ,

is about 4.1 folds higher in liver (1112 pmol resorufin/min/mg protein) as compared to brain (292.8 pmol resorufin/min/mg protein) and peripheral blood lymphocytes (272 pmol resorufin/min/mg protein) thus showing that brain tissues and lymphocytes are also capable to metabolize PAHs such as pyrene or benzo(a)pyrene and that this capability, when activity is expressed per min/mg protein, is not so low as compared to the one observed in liver tissue. Second, the maximum achievable CYP1B1 activity (55.4 pmol/resorufin/min/mg protein) is about 5.3 folds lower as compared to EROD activity in brain tissue. Keeping in mind that EROD activity is almost 100% represented by CYP1A1 and CYP1B1 activities, maximum CYP1A1 activity was found to be 237.3 pmol resorufin/min/mg protein (that is about 4.3 folds the activity found in CYP1B1). Such results are in accordance with observations made by Grova et al. (2009). But the main interest of Figure 5 and 6 is that they can be used to detect starting from which daily ingested PAHs dose the maximum achievable EROD, CYP1A1 or 1B1 activity should be achieved. According to Table 3, whatever the compartment or the activity considered, half of the $A_{EROD\ max}$ would be achieved with “only” about 4 to 6 $\mu\text{g/day}$ of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene, which corresponds approximately to a dose of 0.02 mg/kg/day of each of these PAHs considering an average rat weight of 300 g. In parallel, 95% of $A_{EROD\ max}$ would be achieved with, 80, 105, 92, 94 and 74 $\mu\text{g/day}$ (0.27, 0.35, 0.31, 0.31, 0.25 mg/kg/day) of each of the three PAHs, for EROD activities in lymphocytes, liver and brain, and for CYP1A1 and CYP1B1 activities in brain respectively. These “critical” daily doses therefore reflect a limitation of CYP1A1 and 1B1 oxydases in terms of inducibility, that is in term of potential to contribute to the metabolism of ingested and absorbed PAHs.

5.5.5 Correlation between EROD, CYP1A1 and CYP1B1 activity induction

As described in Figure 7, linear correlations with R^2 values explaining 94%, 92%, 96% and 99% respectively of the variance were achieved when comparing EROD activities in liver and lymphocytes (a), brain and lymphocytes (b), liver and brain (c) as well as CYP1B1 and CYP1A1 activities in brain (d) with $n=42$ (21 rats per dose). Such linear correlations support the idea that, all along the experiment, the relative bioavailability of EROD inducing PAHs in brain and liver tissues as well as in lymphocytes remained stable until achievement of maximum levels in EROD activity. These linear relationships may be used as predictive tool for monitoring EROD activity in other compartments knowing EROD activity in just one. The linear correlations observed with peripheral blood lymphocytes and liver is of special interest in terms of bioindication since it puts in evidence the possibility to use the

measurement of EROD activity in peripheral blood lymphocytes for evaluating, in a non destructive way, (i) EROD activity in the liver, which represents 98% of the EROD activities investigated in the present study and (ii) the daily ingested PAHs doses, that is the level of daily oral exposure to PAHs. An excellent correlation coefficient was achieved between CYP1A1 and 1B1 activities in brain tissue, thus demonstrating that the ratio between their induction rates was constant all along the experiment. This is, to our knowledge, the first time that such correlation is demonstrated based on a long term (28 days) repeated daily exposure to a ternary PAHs mixture consisting of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene.

5.6 Discussion

After 28 days of oral exposure of Wistar rats to 6 µg of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene, EROD activity was found to be 93 folds, 151 folds and 95 folds increased in lymphocytes, liver and brain respectively, as compared to day 0. With dose 600 µg/day, EROD activity was found to be 191, 329 and 213 folds increased as compared to day 0, thus showing that EROD inducibility, in lymphocytes, liver and brain is not at all proportional to the daily ingested PAHs dose. Whatever the investigated compartment (liver, brain or PBL), EROD activity induction as well as CYP1B1 and 1A1 activity induction could be appropriately fitted with a logistic-like model, allowing for evaluation of their maximum expectable value $A_{EROD\ max}$, $A_{CYP1A1\ max}$ or $A_{CYP1B1\ max}$. Confronting maximum EROD activities with blood volume as well as liver and brain weights of a 300 g rat, we observed that whatever the daily dose considered, liver, peripheral blood lymphocytes and brain were counting for about 98.1 %, 1.1% and 0.9% respectively of the sum of $A_{EROD\ max}$ per rat in the three compartments. While observing that liver plays a major role in PAHs oxidation is somewhat logical, it is however interesting to note that brain tissues also possess their own inducible PAH oxidation potential and that this oxidation potential is almost the same as the one observed in peripheral blood lymphocytes. Using a CYP1B1 inhibitor we observed that CYP1B1 activity was counting for about 25 % of CYP1A1 activity and that EROD activity was consisting of about 80% CYP1A1 activity and 20% CYP1B1 activity in brain tissues, which is comparable with recent observations made in liver (Grova et al., 2009). Another interesting finding of the present kinetic study is that maximum expectable EROD activities versus daily ingested PAHs doses could be appropriately fitted, for each compartment, with a Michaelis-Menten like model. Whatever the compartment, 95% of $A_{EROD\ max}$ would be achieved with 80, 105, 92, 94 and 74 µg/day (0.27, 0.35, 0.31, 0.31, 0.25 mg/kg/day) of each

of the three PAHs, for EROD activities in lymphocytes, liver and brain, and for CYP1A1 and CYP1B1 activities in brain respectively. These “critical” daily doses therefore reflect a limitation of CYP1A1 and CYP1B1 oxydases in term of inducibility, that is in term of potential to contribute to the metabolism of ingested and absorbed PAHs. However, exceeding these critical levels of oral exposures does not necessary mean that corresponding CYP1A1 and CYP1B1 activity levels would be insufficient to oxidize PAHs passing through the gastro-intestinal tract with possible subsequent health affections. Our rats exposed to 600 µg/day of Phe, Pyr and BaP during 14, 21 or 28 days did not show lower weight gain as compared to control rats. Furthermore, Uno et al. (2004) observed that CYP1A1 (-/-) mice orally exposed to 125 mg/kg/day of benzo(a)pyrene showed a 0 % survival rate after 30 days of exposure as compared to CYP1A1 (+/+) mice, which showed a stable 100% survival rate without external sign of toxicity. Low residual blood BaP concentrations were found in blood of CYP1A1 (+/+) mice as compared to concentration found in blood of CYP1A1 (-/-) mice. Comparing the above mentioned critical daily doses of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene with the daily dose of 125 mg/kg/day of benzo(a)pyrene used by Uno et al., it becomes obvious that largely exceeding (more than 400 folds) the critical daily doses mentioned in the present study (about 0.3 mg/kg/day) did not generate any mortality in the CYP1A1 (+/+) mice population used by Uno et al., even if the latter observed few changes in aspartate aminotransferase, total hemoglobin, methemoglobin, and hematocrits levels as well as in thymus size as compared to control mice. Given the fact that oral exposure to 125 mg/kg/day of benzo(a)pyrene is an absolutely unrealistic level of exposure as compared to the approximate 10 µg/day (0.0001 mg/kg/kg body weight) of PAHs daily ingested by adult humans or even the maximum 0.02 mg/kg/day that can be ingested by cows in semi-rural farms, the confrontation of our results on rats with the results achieved by Uno et al. on mice allows us to reasonably claim that the limitation in levels of CYP1A1 (an likely CYP1B1) induction cannot lead to limitation in terms of PAHs oxidation in normal and even severe repeated exposure conditions. Simply said, maximum inducible CYP1A1 and likely 1B1 activities remain largely sufficient to face the oxidation of ingested amounts of PAHs by far exceeding normal exposure levels in humans or animals such as grazing dairy cows. It should also be stressed here that the bioavailability of ingested PAHs is largely dependant on the nature and the amount of food matrix in which they are dispersed. Adding 1 ml of PAHs contaminated oil to the daily diet of a rat (few grams for a monogastric animal of 300 g) or to daily diet of a grazing cow (at least 15 kg dry weight of fodder for an polygastric animal of 600 kg) will of course lead to large differences in terms of PAHs bioavailability and therefore

CYP1A1 and 1B1 induction. In a recent study (Guiavarc'h et al., submitted), we observed that adding 2 mL of contaminated oil to goat diet in order to get an exposure of 0.02 mg/kg/day of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene led to a maximum EROD activity of 19 pmol resorufin/mg/day in peripheral blood lymphocytes, which is about 14 folds less as compared to what we observed with our rats exposed to similar daily doses of these 3 PAHs. This simple example shows how far bioavailability should be considered with interest in risk assessment. Finally, good correlations were observed between EROD activities in different compartments as well as between CYP1A1 and 1B1 activities in brain tissues. In a practical standpoint, the good correlation between EROD activity in peripheral blood lymphocytes and liver tissues should be considered with interest since it means that blood sampling for subsequent lymphocytes isolation and EROD measurement could be used as a reliable and non destructive way to evaluate EROD activity in the liver and more generally ingestion levels of planar halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons. This is the first time, to our knowledge, that such bioindication potential of EROD activity in peripheral blood lymphocytes is clearly established via a kinetic study. It should however be kept in mind that extending such results to other animals with different diets, although certainly leading to similar induction patterns, would lead to different levels in EROD induction due to variations in PAHs bioavailability. The present kinetic study, whose objective was to contribute to a better knowledge in EROD (CYP1A1 and 1B1) induction by PAHs under repeated oral exposure conditions, would therefore deserve to be extended to other contaminated food matrices in order to better understand the matrix effect on PAHs bioavailability.

To conclude, EROD activity in peripheral blood lymphocytes, when applied to animal of the same specie submitted to similar diet, is a promising tool for evaluating oral exposure to CYP inducing PAH and PHH via the diet. Applying such approach to other species such as poultry, pigs or farm fishes may help to rapidly evaluate their level of exposure to CYP inducing PAHs and PHH prior to any further cost and time consuming analytical investigation on native and metabolized molecules PAHs and PHHs molecules.

Acknowledgements

This research was performed in the framework of a PhD grant funded by the Syrian Ministry of Higher Education.

5.7 References

- Abrahamson, A., Andersson, C., Jönsson, M.E., Fogelberg, O., Örborg, J., Brunström, B., Brandt, I., 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish- A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquat. Toxicol.* 85, 1-8.
- Bucheli, T.D. and Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.* 25(3), 201-268.
- Chahin, A., Guiavarc'h, Y.P., Dziurla, M.A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2008. 1-Hydroxypyrene in milk and urine as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of ruminants. *J. of Agricul. And Food Chem.* 56, 1780-1786.
- Chun, H.S., Kim, H.J., Choi, E.H., 2001. Modulation of cytochrome P450 mediated bioactivation of benzo(a)pyrene by volatile allyl sulfides in human hepatoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(10) 2205-2212.
- Ciganek, M., Ulrich, R., Neca, J., Raszyk, J., 2002. Exposure of pig fatteners and dairy cows to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Vet. Med.* 47, 137-142.
- De Vos, R.H., Van Dokkum, W., Schouten A., De Jong-Berkhout P., 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem. Toxicol.* 28, 263-268.
- Dey, A., Parmar, D., Dayal, M., Dhawan, A., Seth, P.K., 2001. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in blood lymphocytes Evidence for catalytic activity and mRNA expression. *Life Sci.* 69, 383-393.
- Falco, G., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Teixido, A., Casas, C., Müller, L., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: Human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J. food Protect.* 66, 2325-2331(7).
- Guiavarc'h, Y.P., Chahin, A., Dziurla, M.A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2009. Evaluation of dairy ruminant exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A biomarker approach. Submitted in *J. Agr. Food Chem.*
- Iba, M.M., Stroch, A., Ghosal, A., Bennett, S., Reuhl, K.R., Lowndes, H.E., 2003. Constitutive and inducible levels of CYP1A1 and CYP1A2 in rat cerebral cortex and cerebellum. *Arch. Toxicol.* 77, 547-554.
- Jongeneelen, F.J., 2001. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann. Occup. hyg.* 45, 3-13.
- Kim, Y.D., Todoroki, H., Oyama, T., Isse, T., Matsumoto, A., Yamaguchi, T., Kim, H., Uchiyama, I., Kawamoto, T., 2004. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene. *Environ. Res.* 94, 262-266.
- Lodovici, M., Dolara, P., Casalini, C., Ciappellano, S., Testolin, G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the italian diet. *Food Addit. Contam.* 703-713.
- Numata, M., Fawcett, J.P., Rosengren, R.J., 2008. Induction of in vitro activity and in vivo caffeine metabolism in tow species of New Zealand birds. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 358-364.

- Roos, P.H., 2002 a. Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Toxicol.* 76, 75-82.
- Roos, P.H., Tschirbs, S., Welge, P., Hack, A., Theegarten, D., Mogilevski, G., Wilhelm, M., 2002 b. Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch. Toxicol.* 76, 326-334.
- Schellengerger, M.T., Grova, N., Willieme, S., Farinelle, S., Prodhomme, E.J.F., Muller, C.P., 2009. Modulation of benzo[a]pyrene induced immunotoxicity in mice actively immunized with a B[a]P-diphtheria toxoid conjugate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 37-45.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., and Guengerich, F. P., 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 414-423.
- Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2004. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: Detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* 65 (5), 1225-1237.
- Van Duursen, M.B.M., Sanderson, J.T., Van den Berg, M., 2005. Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility. *Toxicol. Sci.* 85, 703-712.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillit, D.E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure, 2000. *Crit. Rev. Toxicol.* 30(4), 347-570.

Table1. Kinetic parameters applied to equation 1 describing (i) EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues and (ii) CYP450 1A1 and CYP450 1B1 activity induction in brain.

EROD activity in:	Dose (µg/Day)	A _{EROD max} (pmol resorufin /min/mg protein)	k ₁ (95% confidence bound)	k ₂ (95% confidence bound)	Correction term	R ²
Lymphocytes	6	155	0.142 (0.123, 0.160)	-3.655 (-4.089, -3.220)	-2.65/ (1+Day)	0.98
	600	270	0.159 (0.138, 0.179)	-3.318 (-3.749, -2.888)	-8.40/ (1+Day)	0.98
Liver	6	525	0.169 (0.149, 0.189)	-3.112 (-3.488, -2.737)	-20/ (1+Day)	0.98
	600	1100	0.191 (0.179, 0.202)	-3.299 (-3.499, -3.097)	-36/ (1+Day)	0.99
Brain	6	150	0.247 (0.195, 0.298)	-4.329 (-5.258, -3.400)	-1/ (1+Day)	0.97
	600	290	0.303 (0.239, 0.367)	-4.621 (-5.606, -3.636)	-1/ (1+Day)	0.98
Brain (CYP4501A1)	6	120	0.238 (0.192, 0.284)	-4.213 (-5.044, -3.383)	-0.5/ (1+Day)	0.98
	600	235	0.277 (0.231, 0.323)	-4.297 (-5.030, -3.565)	-2/ (1+Day)	0.98
Brain (CYP4501B1)	6	32	0.208 (0.162, 0.253)	-3.989 (-4.863, -3.115)	0	0.96
	600	55	0.303 (0.224, 0.382)	-4.526 (-5.691, -3.360)	0	0.98

Table 2. Comparison of maximum EROD activities $A_{\text{EROD max}}$ per mg of protein with maximum EROD activities $A_{\text{EROD max}}$ per rat in peripheral blood lymphocytes, liver and brain.

Dose ($\mu\text{g/day}$)	Matrix	Matrix amount /rat	Sample size	$A_{\text{EROD max}}$ (pmol resorufin/min/mg protein)	$A_{\text{EROD max per rat}}$ (pmol resorufin/min)	% of $\Sigma A_{\text{EROD max}}$ per rat ³
6	PBL ¹	12 mL (blood) ²	3 mL	155	687	1.15
	liver	9.76 g	1 g	525	58603	98.03
	brain	1.9 g	1.9 g	150	492	0.82
	Total				59783	100
600	PBL ¹	12 mL (blood) ²	3 mL	270	1197	0.96
	liver	9.76 g	1 g	1100	122787	98.28
	brain	1.9 g	1.9 g	290	951	0.76
	Total				124936	100

¹: Peripheral Blood Lymphocytes

²: 4.5 % of rat weight (average weight 300g)

³: Considering an average rat weight of 300 g

Table 3. Kinetic parameters applied to Equation 2 describing EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain as well as CYP450 1A1 and 1B1 activity induction in brain as a function of the daily ingested dose of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene.

EROD activity in:	a=A _{EROD max} in pmol resorufin /min/mg protein (95% confidence bound)	b (95% confidence bound)	R ²
Lymphocytes	272.0 (259.5, 284.6)	4.531 (3.558, 5.503)	0.99
Liver	1112 (1074, 1151)	6.712 (5.692, 7.732)	1
Brain	292.8 (292.8, 292.8)	5.710 (5.710, 5.710)	1
Brain (CYP4501A1)	237.3 (237.3, 237.3)	5.865 (5.865, 5.865)	1
Brain (CYP4501B1)	55.4 (51.8, 59.1)	4.388 (3.028, 5.747)	0.99

Legend

Fig. 1. EROD activities in peripheral blood lymphocytes (▲) and liver (◇) of control Wistar rats daily exposed to ingestion of non contaminated oil over 28 days, (n=3).

Fig. 2. EROD activities in peripheral blood lymphocytes (▲), brain (○) and liver (◇) of Wistar rats daily exposed, during 28 days, to 6 µg/day (a) or 600 µg/day (b) of each of the following PAHs: phenanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene, (n=3).

Fig. 3. Fitting of EROD activities versus days of exposure of Wistar rats to 6 µg/day (↔) or 600 µg/day (—) of each of the following PAHs: phenanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene, (n=3). Peripheral blood lymphocytes (a), liver (b), and brain (c). Curves were derived from a logistic-like model as described in Equation 1 and Table 1.

Fig. 4. Fitting of maximal expectable EROD activities (plateaus) versus daily ingested doses of each of the following PAHs: phenanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene, by Wistar rats. Peripheral blood lymphocytes (---), brain (—) and liver (↔) curves were derived from a Michaelis-Menten like curvilinear model as described in Equation 2 and Table 2.

Fig. 5. Fitting of CYP4501B1 (a) and CYP4501A1 (b) activities in brain versus days of exposure of Wistar rats to 6 µg/day (↔) or 600 µg/day (—) of each of the following PAHs: phenanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene, (n=3). Curves were derived from a logistic-like model as described in Equation 1 and Table 1.

Fig. 6. Fitting of maximal expectable CYP4501B1, CYP4501A1 and CYP4501A1+CYP4501B1 activities (plateaus) versus daily ingested doses of each of the following PAHs: phenanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene, by Wistar rats. CYP4501A1+CYP4501B1 (—), CYP4501A1 (—) and CYP4501B1 (---) curves were derived from a Michaelis-Menten like curvilinear model as described in Equation 2 and Table 2.

Fig. 7. Correlations between EROD activities: Liver vs. Lymphocytes (a), Brain vs. Lymphocytes (b), Liver vs Brain (c) and correlation between CYP1B1 and CYP1A1 activities in brain (d) (n=42).

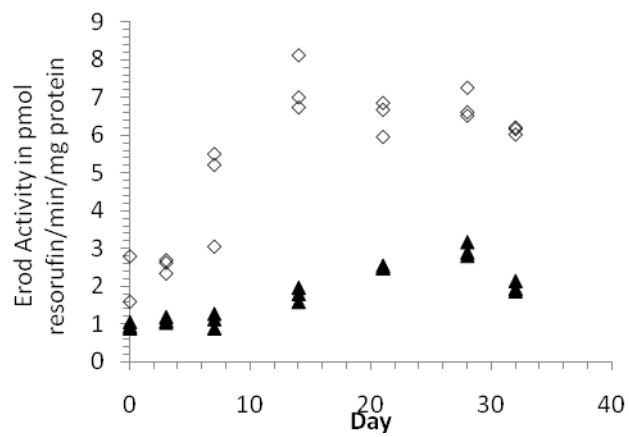
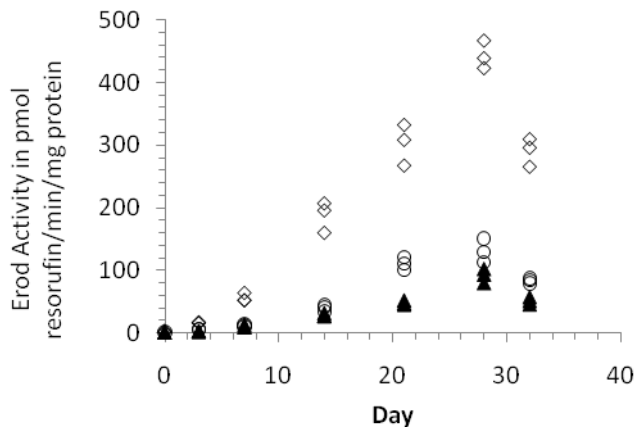
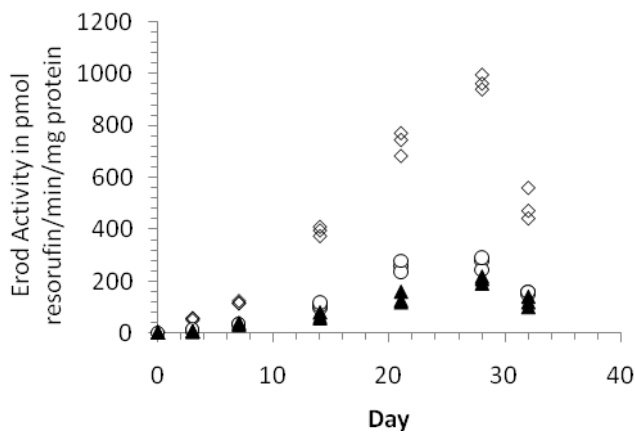


Fig.1.

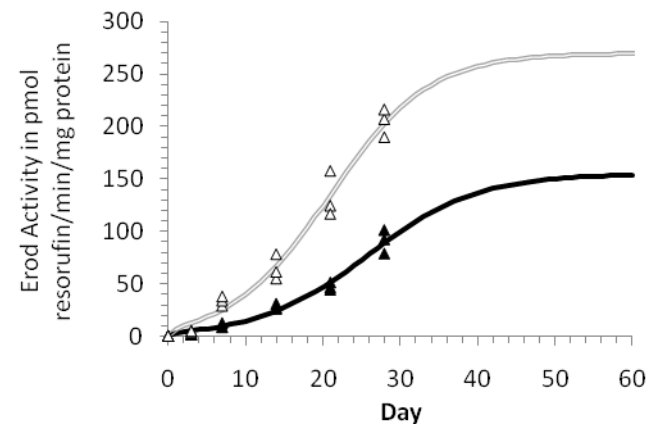


(a)

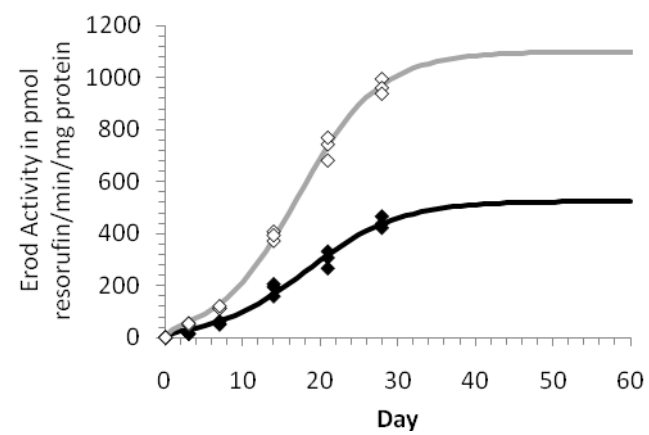


(b)

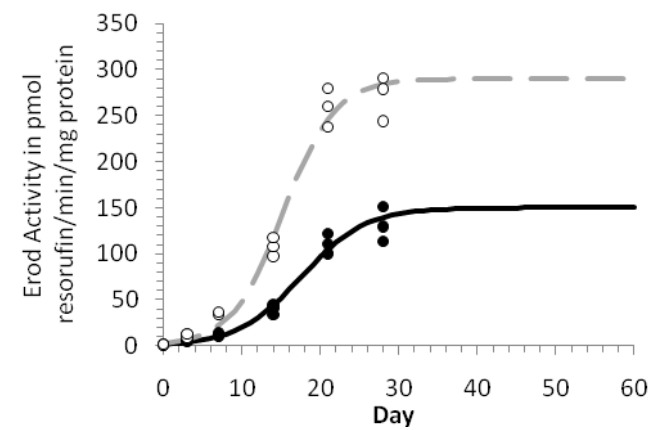
Fig.2. (a) and (b)



(a)



(b)



(c)

Fig.3. (a), (b) and (c)

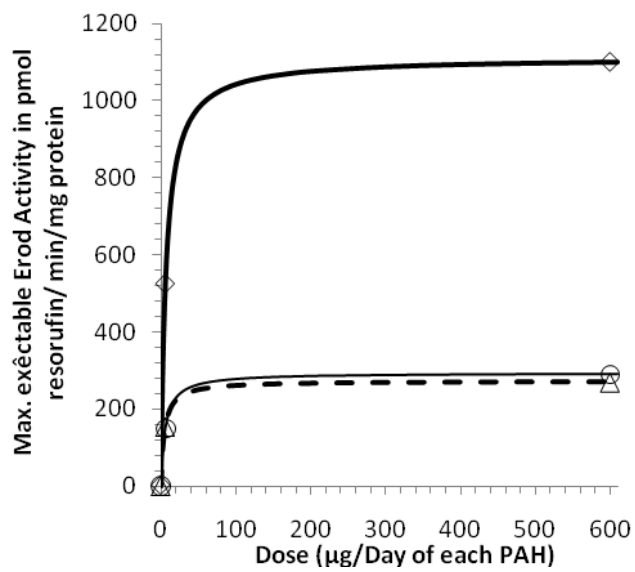
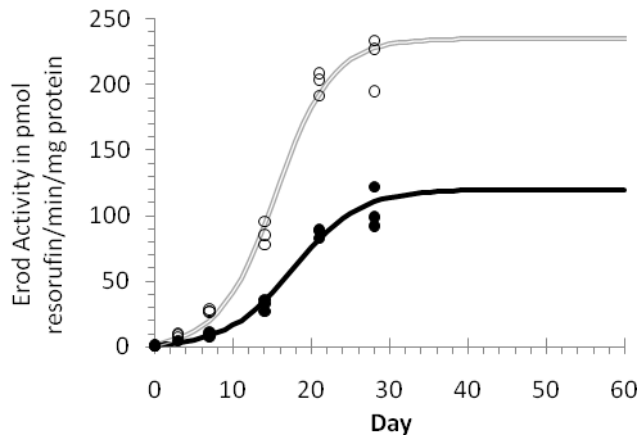
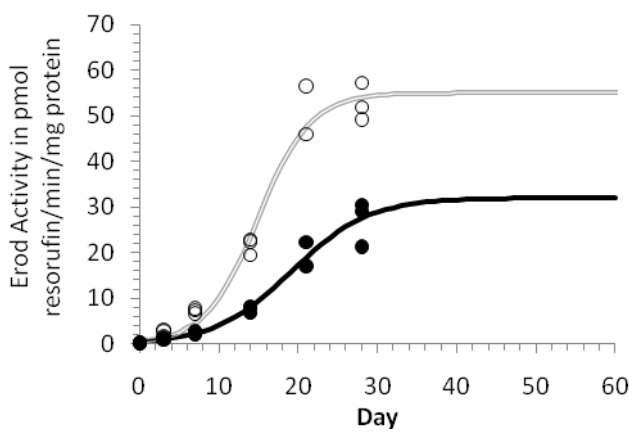


Fig.4.



(a)



(b)

Fig.5. (a) and (b)

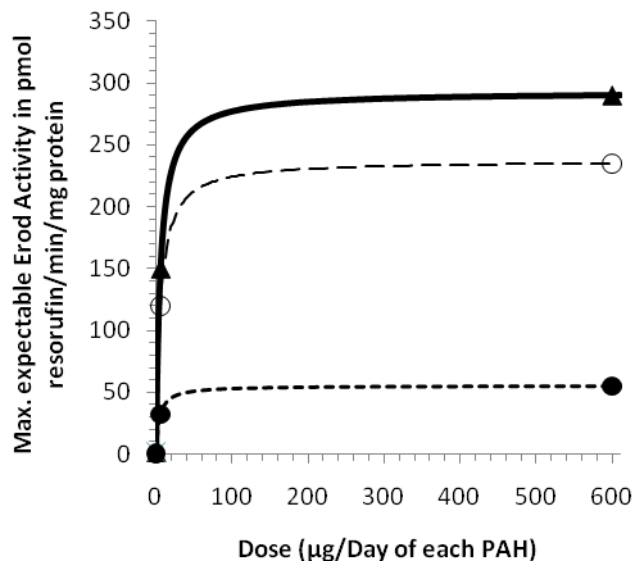


Fig. 6.

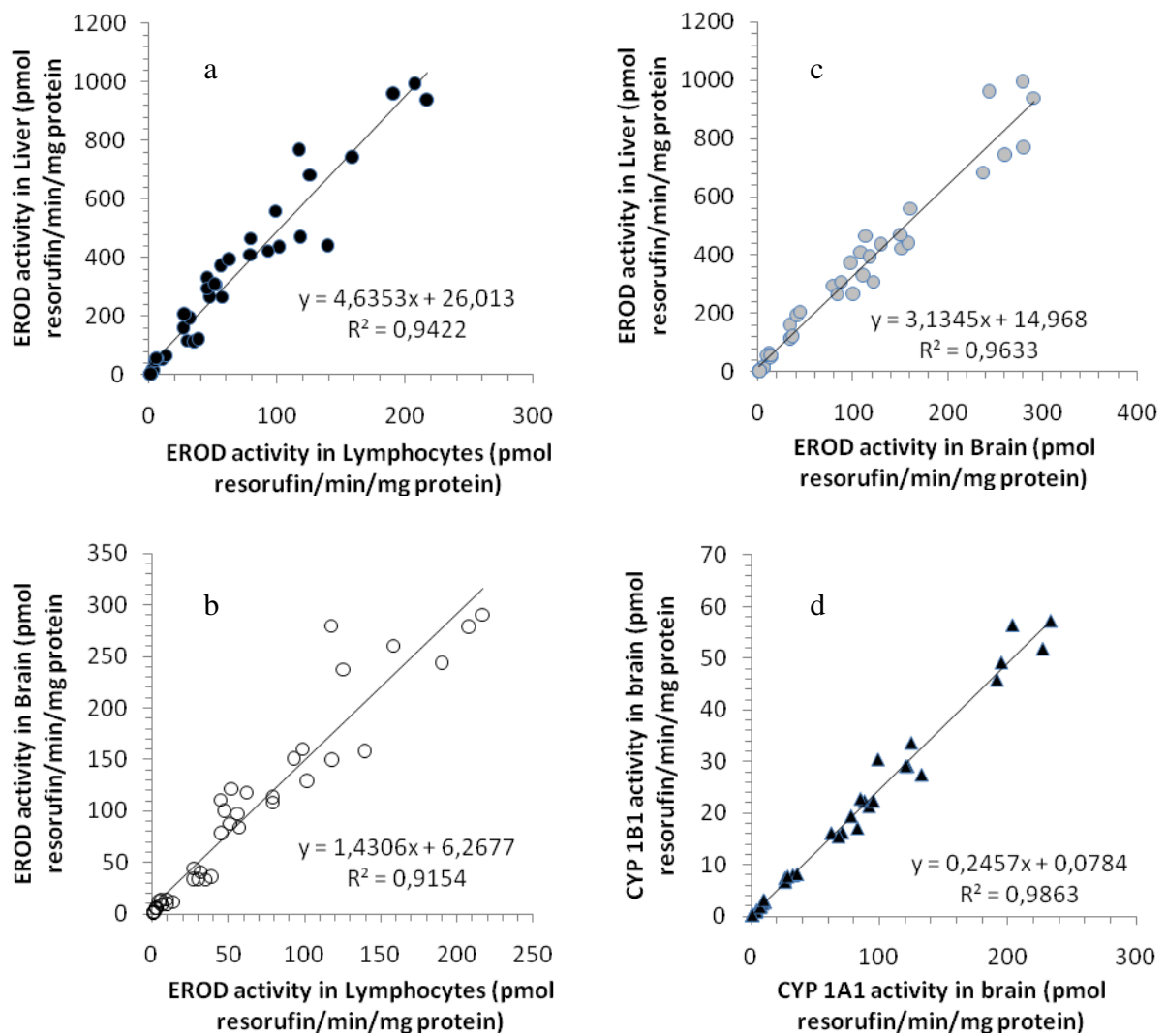


Fig. 7. (a), (b), (c) and (d)

Discussion générale

➤ Contexte de l'étude et réflexion préalable

Comme évoqué dans les chapitres précédents, la présente thèse s'inscrit dans un objectif de contribution à une meilleure évaluation de l'exposition des ruminants laitiers aux polluants organiques persistants tels que les HAP, PCB ou les dioxines (PCDD et PCDF), dans un souci de sécurisation des produits laitiers et d'information des collectivités. En dépit de leur caractère multi-sources, de leur capacité à se disperser loin de leur lieu d'émission sous forme gazeuse ou particulaire, de leurs potentiels toxiques/térogènes/cancérogènes avérés ou supposés, le transfert de ces polluants vers les produits animaux demeure en effet encore trop peu étudié, que cela soit sous forme native ou métabolisée. Ce n'est par exemple qu'en 2005 que la présence significative de métabolites de HAP a été mise en évidence dans le lait (Grova et al., 2005), démontrant par ailleurs que la lipophilicité des HAP, largement dépendante de leur nombre de cycles, n'était pas forcément corrélée à leur taux de transfert vers le lait sous forme métabolisée. Les métabolites présentant une toxicité potentiellement supérieure à leur molécule mère, cette observation a éclairé d'un jour nouveau la complexité de l'évaluation du risque lié à la consommation d'un produit animal tel que le lait, mais aussi d'autres produits animaux (œuf, chair de poisson...). Evaluer un risque alimentaire lié à l'ingestion d'une matrice animale contaminée en POP ou métabolites de POP peut se faire de plusieurs manières. En toute rigueur, il faudrait effectuer une analyse exhaustive des POP et de leurs métabolites dans le produit animal puis confronter les résultats obtenus à des VTR (valeurs toxicologiques de références) telles que les LOAEL (Lowest Acceptable Effect Levels). En dépit des progrès effectués dans le domaine de l'extraction et du dosage des polluants et de leurs métabolites en matrices complexes, cette approche n'est pas réaliste. Les HAP constituent en effet à eux seuls une famille de plusieurs milliers de molécules et sont fortement métabolisables en de nombreux dérivés. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH) tels que les PCB (209 congénères), les PCDD (75 congénères) et PCDF (145 congénères), bien que moins sujets à des phénomènes de métabolisation, représentent eux aussi un grand nombre de cibles analytiques supplémentaires. On comprend alors aisément le coût exorbitant que nécessiterait une tentative d'approche analytique exhaustive en termes de savoir-faire, de temps et de standards analytiques. A cela s'ajoute le fait qu'il n'existe de toute façon pratiquement pas de standards analytiques disponibles commercialement pour les métabolites de POP. Enfin, l'établissement

systematique de VTR pour chaque molécule native ou métabolisée, en dehors d'une pertinence discutable, est absolument impossible. C'est pour faire face à cette trop grande multiplicité des cibles analytiques que l'US-EPA a par exemple proposé de focaliser les efforts de quantification des HAP sur 16 HAP prioritaires fortement présents dans l'environnement et présentant une toxicité plus ou moins grande représentée au travers d'un facteur d'équivalence Toxique TEF (Toxic Equivalent Factor). De même, en 2008, L'EFSA a proposé de concentrer les efforts analytiques sur 16 HAP, dont 8 sont communs avec la liste de l'US-EPA, produits lors des procédés thermiques de fabrication/conservation des produits alimentaires ou présents dès le départ dans ces derniers (matières grasse animales et végétales). Cette restriction du nombre de cibles analytiques, bien que représentant dans une certaine mesure un « abandon scientifique », a grandement favorisé la comparaison des profils de contamination en POP dans les matrices environnementales et alimentaires. Pourtant, encore aujourd'hui, l'étude analytique des profils en molécules de POP natives et métabolisées dans les produits animaux, même restreintes aux molécules prioritaires, demeure absolument impossible pour les raisons mentionnées plus haut. De même, vouloir établir de manière analytique un profil d'exposition journalière de l'animal aux molécules natives de HAP et HAPH via une étude sur son alimentation peut se révéler très coûteux. Et d'un point de vue pratique, même si cela était possible, l'utilité d'une telle approche systématique serait limitée car il faudrait pouvoir relier les niveaux de contamination obtenus à des contaminations en molécules natives et métabolisées dans le produit animal (lait dans cette étude) via la définition préalable de taux de transfert nécessitant des expérimentations animales lourdes. Et ces taux de transfert sont eux-mêmes susceptibles d'être affectés (i) d'une espèce de ruminant laitier à l'autre (vache, chèvre, brebis) ; (ii) par la biodisponibilité probablement variable des POP ingérés en fonction de la matrice contaminée ; (iii) par l'état physiologique des animaux, et bien sûr (iv) par le niveau d'appétit de l'organisme à métaboliser le « cocktail de POP » auquel il est confronté via son alimentation (phénomènes de compétition/saturation éventuels).

Tous ces éléments pouvant potentiellement interagir, on conçoit alors plus concrètement le challenge que constitue la volonté de fournir aux toxicologues environnementaux et alimentaires des données d'exposition des ruminants laitiers aux POP et des données de transferts de ces POP vers les produits animaux, sous forme métabolisée ou non.

➤ **Choix effectués et axes de recherche privilégiés**

Afin de contrer partiellement les limitations mentionnées ci-dessus, dans la présente étude, nous avons effectué plusieurs choix d'importance.

1- Nous avons focalisé notre attention sur l'exposition du ruminant laitier aux HAP, POP les plus présents dans l'environnement.

2- Nous avons étudié uniquement le mode d'exposition orale aux HAP car ce dernier représente plus de 90% de l'exposition globale.

3- Par souci de praticité expérimentale, et en première approche, nous avons utilisé la chèvre comme petit modèle de ruminant laitier exposé aux HAP.

4- Nous nous sommes consacrés à des modes d'exposition répétés pouvant s'étendre de 7 à 40 jours d'exposition journalière.

5- Nous avons exposé les animaux à un mélange ternaire de phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène. Le premier (3 cycles, TEF=0.001) étant le plus retrouvé dans l'environnement, le second (4 cycles, TEF=0.001) étant systématiquement présent dans les mélanges de HAP environnementaux, et le troisième (5 cycles, TEF=1) étant considéré comme le HAP de référence en terme de toxicité environnementale (Dans la liste de l'EFSA, 3 HAP ont un TEF de 10 !).

6- Nous avons fait appel au concept de bioindication d'exposition comme alternative partielle, mais potentiellement très pratique, à une approche analytique exhaustive impossible à mettre en œuvre.

Deux grands modes de bioindication d'exposition ont été étudiés :

➤ La bioindication d'exposition aspécifique

6.1 Bioindication d'exposition aspécifique chez la chèvre comme modèle de ruminant laitier

6.1.1 De quoi parle t'on ?

La bioindication aspécifique est basée, dans notre étude, sur l'induction aspécifique de l'activité Ethoxyresorufin-o-dééthylase (EROD) reflétée à plus de 90 %, par les activités Cytochrome P-450 oxydases (CYP450 oxydase) des cytochromes P450 1A1 et 1B1. Le caractère aspécifique de cette bio-indication, par ailleurs très utilisée en toxicologie aquatique, est du au fait que l'activité EROD peut-être induite à des degrés divers par de nombreux polluants organiques persistants, HAP ou HAPH. Chez les HAP, le phénanthrène n'est par exemple pas connu comme étant inducteur EROD alors que le pyrène et le benzo(a)pyrène le sont. Il est d'ailleurs intéressant de noter que ce sont, en tendance, justement les HAP les plus lourds et donc les plus toxiques, qui induisent le plus l'activité EROD. Dès lors, en dehors de conditions d'exposition contrôlées, la mesure de l'activité EROD ne peut que refléter une tendance à l'ingestion de POP inducteurs de cette activité. Plus cette dernière est forte plus l'animal a de chances d'être fortement exposé. Mais il est impossible de remonter jusqu'au profil de contamination en HAP et plus généralement en POP. Ce caractère aspécifique de la bioindication d'exposition par mesure de l'activité EROD représente selon nous plus une chance qu'un inconvénient au sens où il peut-être utilisé comme « marqueur global » de contamination aux POP permettant ainsi de savoir si une investigation analytique complémentaire, fine et spécifique, est justifiable ou non.

6.1.2 Originalité de notre approche

L'originalité de notre travail sur la bioindication d'exposition aspécifique aux HAP via la mesure de l'activité EROD réside dans le fait que nous avons mis en évidence la possibilité de suivre cette dernière de manière sensible et non invasive en la mesurant dans les lymphocytes de sang périphériques isolés de ruminant laitier exposé oralement aux HAP. D'ordinaire, cette activité est en effet mesurée dans des microsomes de foie ou de cellules branchiales chez le poisson (Bucheli et Fent, 2001 ; Abrahamson et al., 2007), de foie chez l'oiseau (Numata et al., 2008), de foie, duodenum ou reins chez le rat ou le mini porc (Roos et al., 2002 ; Roos, 2002, Kang et al., 2007). Quelques études ont été consacrées à l'étude de l'induction de l'activité EROD dans les lymphocytes de sang périphérique mais elles ont été

effectuées sur le rat ou la souris uniquement et ceci sur un temps beaucoup trop court pour observer l'entièreté de l'induction et/ou avec un nombre de points insuffisants pour pouvoir proposer un véritable modèle de cinétique d'induction (5 jours et deux points à J0 et J5 par Dey et al., 2000). Ces études nécessitaient par ailleurs toutes les sacrifices des rats en raison de leur faible volémie et de la quantité de sang requis. Aucune étude d'induction EROD lymphocytaire périphérique n'avait encore été tentée chez le ruminant laitier.

Notre étude a été menée sur une durée de 50 jours dont 40 d'exposition journalière de chèvres alpine à un mélange ternaire de phénanthrène, pyrène, benzo(a)pyrène (1mg/jour et n=3 ou 50 mg/j et n=3) avec dosage des activités EROD lymphocytaire périphérique à J0, J10, J20, J30, J40 et J50.

6.1.3 Analyse de 6 points clés en vue d'un usage de l'activité EROD lymphocytaire comme biomarqueur d'exposition orale aux HAP chez le ruminant laitier

Les six points suivants méritent selon nous d'être discutés:

1) Une activité EROD basale est détectable dans les lymphocytes sanguins des 6 chèvres prises au troupeau. Cette activité est de l'ordre de 0.50 ± 0.27 pmol resorufin/min/mg protéine (n=6) et reflète essentiellement une présence et un fonctionnement des cytochromes P450 oxydases 1A1 et 1B1 probablement lié à une faible contamination en composés CYP inducteurs dans leur alimentation (granulés, fourrage). On constate une homogénéité correcte de ce niveau d'activité EROD basal parmi les 6 animaux prélevés dans le troupeau.

2) L'exposition orale au mélange ternaire de nos trois HAP s'accompagne d'une induction notable de l'activité EROD lymphocytaire. La cinétique d'induction s'est révélée être parfaitement modélisable via un modèle de type logistique caractérisant une induction lente durant les 4 premiers jours, puis plus rapide jusqu'à J20 avec la dose 1 mg/J et J30 avec la dose 50 mg/J (avec une plus forte variabilité entre individus), pour ralentir significativement jusqu'à obtention d'un plateau à J30 avec la dose 1 mg/J et à J40 avec la dose 50 mg/J. C'est à notre connaissance la première fois que le modèle logistique est clairement appliqué à une cinétique d'induction EROD jusqu'au plateau dans des lymphocytes. Aux plateaux, les activités EROD sont ainsi 12.6 et 37.8 fois plus fortes que le niveau d'activité basal avec les doses 1 mg/J et 50 mg/J respectivement (6.31 pmoles resorufin/min/mg de protéine et 18,89 pmoles resorufin/min/mg de protéine avec les doses 1 mg/J et 50 mg/J respectivement).

4) La relation « dose-réponse » entre l'activité EROD au plateau et les doses journalières ingérées s'est révélée être tout à fait non proportionnelle et modélisable via un

modèle curvilinéaire de type Hill ou de type Michaelis-Menten permettant ainsi d'évaluer l'activité EROD lymphocytaire maximale A_{ERODmax} atteignable chez l'animal ainsi que la dose journalière nécessaire, EC 50, pour atteindre 50% de cette activité maximale. Cependant, le manque de points dans la zone de courbure de notre courbe dose-réponse (entre 10 et 30 mg/J) nous oblige à considérer les ajustements effectués dans cette plage de concentration avec une certaine prudence. Cela se traduit par une plage d'incertitude assez forte pour la dose critique journalière permettant d'atteindre A_{ERODmax} (12-46 mg/J soit 0.24-0.92 mg/kg/jour) alors que les plages d'incertitudes à 95% pour l' A_{ERODmax} (17.8-20.7 pmoles resorufin/mg/jour) et l'EC50 (1-3.5 mg/jour) sont, elles, nettement moins importantes.

C'est là aussi, à notre connaissance, la première fois qu'une ébauche de relation entre activités EROD au plateau et doses de HAP ingérées est proposée. L'activité EROD maximale de cette relation (activité à l'asymptote), ne représente rien d'autre qu'une limite adaptative et physiologique propre à l'animal. 99% de cette activité EROD lymphocytaire maximale est atteinte chez la chèvre à partir d'une exposition journalière répétée à une dose comprise entre 12-46 mg/J soit 0.24-0.92 mg/kg/jour de chacun de nos 3 HAP (Phe, Pyr, BaP). Cette nouvelle information nous semble particulièrement « rassurante » dans la mesure où, comme cela a été montré dans la partie bibliographique de ce travail, un ruminant laitier est très rarement exposé à plus de 0.025 mg de HAP par kg et par jour. Notre limite physiologique impliquerait donc l'ingestion d'un mélange 10 à 37 fois plus concentré que ce qui représente déjà un maximum d'exposition orale au HAP, pour atteindre l'activité EROD lymphocytaire maximale atteignable par l'organisme. En d'autres termes, il est donc possible d'affirmer que dans le compartiment lymphocytaire périphérique, le potentiel d'adaptation à une exposition orale aux HAP est largement surdimensionné par rapport aux expositions, même extrêmes, susceptibles d'être rencontrées. Dans la suite de cette discussion nous aborderons la thématique de la corrélation entre activité EROD lymphocytaire périphérique et activité EROD hépatique, afin de savoir si la première peut être reliée de manière fiable à la seconde.

5) le profil d'induction EROD obtenue avec la dose de 1mg/J (0.02 mg/kg/J) permet tout à fait d'envisager la possibilité de détecter des activités EROD significatives et différenciables, même pour des niveaux beaucoup plus faibles et donc fréquents d'exposition (0.002 mg/kg/J).

6) Au-delà de l'obtention d'un plateau après un temps d'exposition donné, un point particulièrement important dans la perspective d'une utilisation de l'activité EROD lymphocytaire périphérique en tant que biomarqueur d'exposition orale aux POP est l'obtention

d'une bonne homogénéité des activités EROD au plateau. Les coefficients de variations observées autour de la moyenne sont de 23.6% (n=3) pour la dose de 1 mg/J (0.02mg/kg/J) et 5.9% (n=3) pour la dose de 50 mg/J (1 mg/kg/J). Cette homogénéité tout à fait correcte des résultats démontre que, contrairement à ce qui a été observé par Van Duursen et al. (2003) chez l'humain, la réponse EROD lymphocytaire des animaux d'un même troupeau, d'une même race et nourris de manière similaire, est particulièrement homogène. La variabilité génétique mise en cause par Van Duursen et al. pour déconseiller l'usage de l'activité EROD lymphocytaire chez l'humain ne semble plus être de mise chez les animaux d'élevage, fruits d'une sélection génétique poussée et donc plus homogènes en terme de profil génétique.

6.1.4 L'activité EROD lymphocytaire peut-elle être utilisée comme biomarqueur d'exposition orale contrôlée aux HAP chez le ruminant laitier ?

Au regard des six points discutés ci-dessus (sensibilité et homogénéité de la réponse, obtention de plateaux propres à chaque niveau d'exposition, établissement d'une courbe dose/réponse fiable) la mesure de l'activité EROD lymphocytaire peut indéniablement être considérée comme utilisable en tant que biomarqueur d'exposition orale aspécifique de la chèvre aux HAP CYP inducteurs, en conditions d'exposition contrôlées. Il est raisonnable de penser que cette conclusion peut être étendue à d'autres ruminants laitiers (vaches, brebis) et d'autres POP, tels que les HAPH (PCB, PCDD et PCDF) CYP inducteurs. Ce nouvel outil d'évaluation aspécifique et non invasif de l'exposition orale du ruminant laitier aux POP pourrait donc être utilisé comme outil d'investigation préalable à toute investigation analytique spécifique, plus ou moins détaillée (et donc plus ou moins coûteuse), de ladite exposition.

L'investigation cinétique menée dans ce travail démontre que le potentiel maximal d'induction de l'activité EROD lymphocytaire chez la chèvre est largement suffisant pour faire face à des situations extrême d'exposition aux HAP CYP inducteurs en conditions non contrôlées (et probablement à des cocktails de diverses familles de POP CYP inducteurs: HAP et HAPH).

Une question demeure cependant. Dans quelle mesure l'activité EROD lymphocytaire peut-elle refléter l'activité EROD hépatique ? Il est en effet établi que c'est dans le foie que se concentre la majeure partie du potentiel métabolique des xénobiotiques et de l'activité EROD. Cette dernière représentant, à peu de chose près, la somme des deux activités CYP450 1A1 et 1B1. Pouvoir évaluer une activité EROD hépatique à partir d'une activité EROD lymphocytaire périphérique pourrait donc s'avérer précieux en terme de compréhension du métabolisme hépatique des HAP CYP inducteurs, et plus généralement des POP CYP inducteurs.

6.2 Etude multicompartimentale de l'Induction EROD chez le rat exposé oralement et en mode subchronique aux HAP

6.2.1 Bref rappel sur l'étude

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse à la question ci-dessus, nous avons mené une étude sur l'induction simultanée de l'activité EROD dans les microsomes hépatiques et les lymphocytes périphériques de rats Wistar via une exposition orale et répétée de ces derniers aux HAP. Nous avons également profité de cette étude pour évaluer l'induction de l'activité EROD dans les microsomes cérébraux de nos rats, ceci afin de mettre en évidence un éventuel franchissement de la barrière hémato encéphalique par les HAP CYP inducteurs que sont le pyrene et surtout le benzo(a)pyrene. Cette étude, menée sur 3 compartiments (lymphocytes, foie, cerveau) a été effectuée sur 3 lot de 21 rats respectivement exposés durant 28 jours à des doses de 0 (contrôle), 6 et 600 $\mu\text{g}/\text{J}$ (soit 0, 0.02 et 2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{J}$) de chacun des 3 HAP utilisés dans l'expérience précédentes : phénanthrène, pyrène, benzo(a)pyrène. Pour les 3 lots de rats, 1 mL d'huile végétale était utilisé comme vecteur de contamination. Les mesures d'activités EROD ont été effectuées aux jours 0, 3, 7, 14, 21, 28 et 32. Cette dernière mesure était destinée à évaluer la vitesse de décroissance de l'activité EROD après arrêt de l'exposition orale à J28. C'est la première fois qu'une étude cinétique d'induction EROD par les HAP est menée simultanément sur le foie, le cerveau et les lymphocytes périphériques. Les observations principales sont discutées ci-dessous.

6.2.2 Une induction EROD significative et modélisable dans les 3 compartiments : lymphocytes, foie, cerveau.

Une induction très importante de l'activité EROD a été observée dans les 3 compartiments avec des activités 151, 93 et 95 fois plus élevées à J28 par rapport à J0 avec la dose 6 $\mu\text{g}/\text{J}$, et 329, 191 et 213 fois plus élevées par rapport à J0 avec la dose 600 $\mu\text{g}/\text{J}$ dans le foie, les lymphocytes et le cerveau respectivement. Les cinétiques sont toute modélisables via un modèle logistique, même si les plateaux ne sont en général pas tout à fait atteints. De cette observation plusieurs conclusions peuvent-être tirées et discutées:

- A niveau d'exposition égal par rapport à la chèvre (0.02 $\text{mg}/\text{kg}/\text{J}$), l'activité EROD lymphocytaire est nettement plus stimulée chez le rat que chez la chèvre. En effet, avec cette dose et à J30, l'activité EROD était 12.6 fois plus forte par rapport à J0 chez la chèvre alors qu'elle est déjà 93 fois plus forte à J28 chez le rat. Cela correspond, à niveaux et durées d'exposition identiques, à une induction EROD lymphocytaire 8 fois plus forte chez le rat que chez la chèvre.

- Cette différence importante pourrait selon nous s'expliquer de plusieurs manières différentes. Tout d'abord, la bien moindre dispersion du mL d'huile contaminée dans le bol alimentaire du rat (quelques grammes de pellets et d'eau par jour) par rapport à la dispersion du mL d'huile contaminée dans le bol alimentaire de la chèvre (1 kg de granulés, 2-3 kg de foin et 2 à 4 litres d'eau environ). Cette moindre dispersion dans le bol alimentaire du rat pourrait limiter les interactions entre les composants de ce bol alimentaire et les HAP ingérés, contribuant à une meilleure biodisponibilité de ces derniers et donc à une stimulation plus forte de l'induction EROD lymphocytaire périphérique. Par ailleurs, la volémie d'un rat de 300g est de 12 mL (4.5% du poids corporel) contre 3000 mL chez une chèvre de 50 kg (6% du poids corporel). Donc même en supposant que la différence importante de bol alimentaire ne génère aucune différence de biodisponibilité de nos HAP entre rat et chèvre, la fraction de HAP absorbée et rejoignant le système sanguin périphérique du rat devrait être environ 250 fois moins diluée dans son sang qu'elle ne le serait chez la chèvre, stimulant ainsi de manière plus intense l'activité EROD lymphocytaire du rat que celle de la chèvre. Cette stimulation due à une concentration sanguine environ 250 fois plus forte chez le rat ne devrait cependant pas aboutir à une activité EROD plus de deux fois plus forte que celle obtenue chez la chèvre. En effet, nous avons observé qu'une multiplication par un facteur 100 de l'exposition orale (0.02 mg/kg/J à 2 mg/kg/J) n'aboutissait même pas à un doublement de l'activité EROD lymphocytaire au plateau déduit du modèle logistique. Or nous observons pourtant une activité EROD lymphocytaire 8 fois plus forte chez le rat que chez la chèvre, à niveau et durée d'exposition identiques. Cette réflexion plaide en faveur d'un rôle mineur de la différence de volémie entre rat et chèvre et du rôle majeur d'une différence de biodisponibilité des HAP ingérés entre rat et chèvre. A ces considérations s'ajoute bien sûr le fait que le rat un système digestif monogastrique alors que la chèvre, elle, est un animal polygastrique.

6.2.3 Des relations « dose/réponse » riches d'enseignements

Tout comme chez la chèvre, un modèle curvilinéaire de type Michaelis-Menten a pu être utilisé pour relier les activités EROD aux plateaux à leurs niveaux d'exposition respectifs aux HAP et établir une ébauche de courbe dose-réponse (pour établir une véritable courbe dose réponse, l'ajout d'au moins une dose aux alentours de 60 mg/J aurait été nécessaire en permettant de mieux ajuster la zone de courbure de ladite relation dose-réponse). Ceci dans les 3 compartiments étudiés. Une activité EROD maximale atteignable (A_{ERODmax}), reflet d'une limite adaptative (physiologique), a donc pu être évaluée dans les microsomes de foie, dans les microsomes de cerveau mais également dans les lymphocytes de nos rats. De manière

surprenante, on s'aperçoit alors que les activités EROD maximales atteignables dans les microsomes cérébraux (292.8 pmoles de resorufin/min/mg protein) et dans les lymphocytes (272 pmoles de resorufin/min/mg protein) ne sont pas tellement plus faibles par rapport à l'activité EROD maximale atteignable dans les microsomes hépatiques (1112 pmoles de resorufin/min/mg protein). Il est donc possible de conclure que (i) Le franchissement de la barrière hémato encéphalique par le pyrène et/ou le benzo(a)pyrène est une réalité et que (ii) le cerveau possède une machinerie CYP450 1A1 et 1B1 (ce qui en soit a été démontré depuis longtemps : Ravindranath et al., 1989 ; Minn et al., 1991) inductible par le pyrène et/ou le benzo(a)pyrene ayant traversé la barrière hémato encéphalique. Bien que cette nouvelle observation ne soit que connexe à l'objectif principal de cette thèse, à savoir la recherche de biomarqueurs fiables de l'exposition orale du ruminant laitier aux HAP et plus généralement aux POP, elle pourrait se révéler intéressante pour le toxicologiste neurocomportemental.

En tenant compte des poids de cerveaux entiers (lobe olfactif exclu), des foies entiers et de la volémie de nos rats, nous avons pu mettre en évidence que, dans l'absolu, le compartiment hépatique compte à lui seul pour environ 98 % du potentiel EROD total des 3 compartiments étudiés (1.1 % dans le cerveau et 0.9 % dans les lymphocytes). Bien que ce résultat, en soit, ne constitue pas une véritable surprise (le foie est connu comme étant l'organe clé de la métabolisation des xénobiotiques), il permet en revanche d'avoir une idée plus précise du rôle de chaque compartiment dans l'hydroxylation des HAP.

Les inductions EROD maximales, A_{ERODmax} , ont été obtenues à des doses critiques d'exposition évaluées à 80 µg par jour dans les lymphocytes, 105 µg par jour dans le foie, et 92 µg par jour dans le cerveau (soit des doses de 0.27, 0.35 et 0.31 mg/kg/jour en considérant le poids moyen de nos rats comme étant de 300 g). Au-delà de ces doses journalières considérées comme critiques, l'activité EROD n'augmente plus. Une comparaison entre ces résultats et les résultats obtenus par Uno et al. (2004) sur des souris CYP1A1 déficientes permet cependant de conclure que le dépassement des doses critiques d'exposition mentionnées ci-dessus ne signifie pas pour autant que le pool de cytochrome 1A1 et 1B1 de nos rats serait insuffisant pour faire face à l'oxydation de doses de HAP nettement supérieures à ces doses critiques. En effet, Uno et al. ont constaté 100% de mortalité chez des souris CYP1A1 déficientes après 30 jours d'exposition orale journalière à une dose extrêmement forte et irréaliste sur le plan environnemental de benzo(a)pyrène (125 mg/kg/jour !) alors que les souris non déficientes en CYP1A1 exposées à la même dose journalière étaient toutes survivantes et ne perdaient pas de poids par rapport aux contrôles. Cette dose de 125 mg/kg/jour est environ 400 fois plus élevée que les doses critiques, en terme d'induction EROD, trouvées chez nos rats. Ceci montre qu'il

faut bien distinguer « maximum d'induction EROD obtenu à une exposition donnée » et « capacité de métabolisation effective des HAP par les Cytochrome P450 oxydases ».

6.2.4 Une corrélation forte des activités EROD entre compartiments tout au long de l'expérience

Du point de vue pratique, nous l'avons vu, il a été possible d'établir une ébauche de relation dose/réponse dans le compartiment lymphocytaire, démontrant ainsi la possibilité d'utiliser l'activité EROD lymphocytaire comme biomarqueur d'exposition orale aspécifique aux HAP en conditions contrôlées. Une question d'importance demeure cependant de savoir si cette activité EROD lymphocytaire peut être reliée de manière fiable à une activité EROD hépatique dont on a vu plus haut qu'elle constituait à elle seule environ 98% de l'activité EROD totale dans les 3 compartiments (0.9% dans le compartiment lymphocytaire) et pouvait par exemple être multipliée par plus de 150 en 28 jours avec la dose de 0.02 mg/kg/jour de chacun de nos 3 HAP.

Les bonnes corrélations observées entre les 39 activités EROD mesurées dans chaque compartiment montrent clairement qu'il est possible d'évaluer de manière non invasive une activité EROD hépatique très forte dans l'absolu, à partir d'une activité EROD lymphocytaire beaucoup plus faible. Les coefficients de détermination R^2 obtenus sont de 0.94 (foie-lymphocytes), 0.92 (cerveau-lymphocytes), et 0.96 (foie-cerveau). Ceci révèle un bon parallèle entre l'évolution des vitesses d'induction dans chaque compartiment tout au long de la phase d'induction et même durant la phase de décroissance de l'activité EROD entre J28 et J32 (cette dernière étant assez rapide avec environ moins 40% en 4 jours). L'activité EROD lymphocytaire peut donc à priori aussi permettre d'évaluer le niveau d'activité EROD cérébral.

Ces bonnes corrélations intercompartiments observées chez le rat constituent selon nous un élément de réponse à la question posée au début de cette section. Il est fort probable qu'il en soit de même chez la chèvre, comme chez les ruminants laitiers et bien d'autres animaux, y compris les humains. L'activité EROD lymphocytaire périphérique peut donc être considérée non seulement comme un bioindicateur d'exposition aspécifique aux HAP mais également comme une source d'information sur les inductions EROD dans le foie et le cerveau.

6.2.5 Une distinction possible entre activités CYP1A1 et CYP1B1 cérébrales

Afin de comprendre plus finement les mécanismes d'induction CYP cérébraux, nous avons profité de cette expérimentation animale sur le rat pour différencier les activités CYP1A1 et 1B1 cérébrales à l'aide d'un inhibiteur CYP1B1 spécifique (homoeriodictyol). Sur la base des observations faites par IBa et al. (2003) montrant que les activités CYP 1A1 et 1B1 comptaient

pour plus de 95% de l'activité EROD, nos propres résultats ont démontré que les activités CYP 1A1 comptaient respectivement pour environ 75% et 25% de l'activité EROD totale dans le cerveau, ce qui est en bon accord avec les résultats obtenus très récemment par Schellenberger et al. (2009) dans des hépatocytes et des splénocytes. Par ailleurs, nous avons observé une excellente corrélation entre les activités CYP 1A1 et CYP 1B1 cérébrales tout au long de l'expérimentation (39 points de mesure). Ce qui était donc vrai concernant l'induction EROD dans plusieurs compartiments demeure donc vrai au sein du compartiment cérébral en distinguant les deux acteurs majeurs de l'activité EROD que sont les CYP1A1 et CYP1B1: il n'y a pas de décalage entre les inductions.

6.2.6 Ce qu'il nous semble important de retenir concernant l'usage de l'activité EROD comme biomarqueur d'exposition aspécifique aux HAP et plus généralement aux POP

Des deux expériences menées sur chèvres puis sur rats en conditions d'exposition orale répétée (subchronique) et contrôlée aux HAP (mélange ternaire de phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrene) nous retenons donc principalement que :

↳ L'activité EROD lymphocytaire peut tout à fait être considérée comme un biomarqueur aspécifique adéquat et non invasif d'exposition orale du ruminant laitier aux HAP et donc probablement aux autres POP (PCB, PCDD, PCDF) CYP 1A1 et 1B1 inducteurs.

↳ Cette activité peut en plus être utilisée pour évaluer les activités EROD hépatiques et cérébrales via les corrélations observées chez le rat et en supposant, dans un premier temps, qu'il en est de même chez la chèvre.

↳ Le pyrène et/ou le benzo(a)pyrène peuvent traverser la barrière hémato encéphalique pour stimuler l'activité EROD cérébrale. Notre étude cinétique différenciée sur les activités CYP1A1 et CYP1B1 dans le cerveau, suite à une exposition in-vivo et orale est à cet égard originale.

↳ A niveau d'exposition et vecteur de contamination identiques, une induction EROD lymphocytaire périphérique nettement moindre est observée chez la chèvre par rapport au rat. Ceci est probablement du, chez la chèvre, à une plus grande dilution de la contamination dans son bol alimentaire générant une moindre biodisponibilité des HAP ingérés. La différence de volémie entre rat et chèvre ne doit normalement pratiquement pas influencer sur les différences d'induction observées entre les deux espèces.

↳ Nous avons pu définir, via l'ébauche de relations doses/réponse, des limites physiologiques d'induction EROD (activités EROD maximales atteignable) par notre cocktail ternaire de HAP. Ceci dans les lymphocytes chez la chèvre, dans les lymphocytes, le foie et le

cerveau chez le rat. D'après nos modèles, ces limites devraient être obtenues à partir de doses critiques toutes significativement plus élevées que les niveaux d'exposition les plus sévères pouvant être rencontrés dans l'environnement.

↳ Une comparaison de la dose critique nécessaire à l'obtention de l'activité EROD maximale atteignable dans les lymphocytes de rats (0.27 mg/kg/jour de chacun de nos trois HAP) avec les résultats obtenus par Uno et al. (2003) sur souris CYP1A1 déficientes exposées à 125 mg/kg/jour de benzo(a)pyrene nous a permis de démontrer que l'animal pouvait faire face à des doses journalières de HAP (benzo(a)pyrene) largement plus élevées que la dose critique en question. Ceci montre qu'il faut bien distinguer « maximum d'induction EROD obtenu à une exposition donnée » et « capacité de métabolisation effective des HAP par le pool de Cytochrome P450 oxydases 1A1 et 1B1 correspondant à ce maximum d'induction ».

➤ La bioindication d'exposition spécifique

6.3 Bioindication d'exposition orale spécifique chez la chèvre comme modèle de ruminant laitier

L'objectif de cette bioindication est de pouvoir relier les quantités excrétées d'une molécule donnée dans un compartiment corporel donné à une ou plusieurs autres molécules dont on souhaite évaluer les quantités ingérées journalièrement. Le lien entre le bioindicateur et la molécule dont on souhaite évaluer les quantités ingérées est donc tout à fait spécifique. Dans notre étude, nous nous sommes principalement consacrés à une bioindication spécifique d'exposition orale aux HAP basée sur le dosage du 1-OH pyrene dans des fluides corporels (lait, urine) comme bioindicateur d'exposition orale au pyrene, HAP à 4 cycles avec un TEF de 0.01 toujours présent en quantité significative dans les mélanges de HAP environnementaux tels que ceux trouvés sur les couverts végétaux. Pour cela, nous avons conduit des expérimentations animales permettant l'établissement d'équations de transfert, et donc de taux de transfert, du pyrène vers le lait et l'urine, sous forme de 1-OH pyrène. Lorsque cela nous a été possible (moyens et savoir-faire analytiques, disponibilité), nous avons également établi des équations de transfert reliant l'ingestion de phénanthrène à l'excrétion de 1, 2, 3, ou 4-OH phénanthrène dans l'urine et l'ingestion de benzo(a)pyrène à l'excrétion de 3-OH benzo(a)pyrène dans l'urine.

6.4 Trois expérimentations animales distinctes

Pour rappel et de manière très résumée, nous avons mené trois expérimentations distinctes :

Dans la première expérimentation, nous avons soumis 4 chèvres à une ingestion journalière orale importante et croissante de notre « cocktail de référence », à savoir phénanthrene, pyrene et benzo(a)pyrene. Pour chaque dose (1, 7 et 49 mg/jour de chacun des 3 HAP), une période d'exposition journalière de 7 jours a été utilisée et les mesures de métabolites ont été effectuées sur le lait et/ou l'urine prélevés juste avant chaque augmentation du niveau d'exposition. Les quantités extraites ont été utilisées pour définir des équations de transfert utilisables pour évaluer un ingéré journalier en pyrène mais aussi en phénanthrene ou benzo(a)pyrene. En dehors de la dose de 1 mg/jour, qui bien que forte demeure réaliste, les doses de 7 et 49 mg/jour étaient en revanche beaucoup plus élevées que ce que l'on peut trouver, même en zone semi-rurale fortement exposée (cf chapitre bibliographique). Dans la suite de cette discussion, cette expérimentation sera donc qualifiée d'expérimentation « aux fortes doses ». Cette dernière a fait l'objet d'un article dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Chahin et al, 2008) dans lequel seuls les résultats liés au 1-OH pyrène sont mentionnés.

Sur la base des résultats obtenus lors de l'expérimentation « aux fortes doses », nous avons effectué une seconde expérimentation dite « aux faibles doses » dans laquelle les animaux ont cette fois-ci été soumis durant 7 jours à des doses journalières de HAP tout à fait réalistes à savoir 0.04 mg/jour puis 0.28 mg/jour de chacun des HAP de notre cocktail ternaire. L'objectif de cette expérimentation aux faibles doses était de nous assurer statistiquement que les pentes des équations de transfert sur la plage basse et donc plus réaliste d'exposition de 0 à 7 mg/jour étaient non significativement différentes des pentes des équations de transfert observées sur la plage 0-49 mg/jour. Les résultats de cette expérience ont été combinés aux résultats de l'expérience aux fortes doses, y compris à ceux liés au transfert de 1, 2, 3, ou 4-OH phénanthrene et 3-OH benzo(a)pyrene dans l'urine et qui n'avaient pas été présentés dans l'article paru dans *JAFCh*. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans la revue « *Small Ruminant Research* » (Guiavarc'h et al., 2010). Dans cet article, la question de l'extrapolation de l'évaluation de l'ingéré journalier en pyrène à l'évaluation de l'ingéré journalier en 12 autres HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA est également évoquée et une approche semi-quantitative est proposée.

Une troisième expérimentation animale a finalement été menée afin de savoir à partir de quand, en conditions normales d'utilisation du 1-OH pyrene comme indicateur d'exposition orale aux HAP, une stabilité métabolique était atteinte en terme d'excrétion du 1-OH pyrene dans le lait ou l'urine tout au long d'une longue période d'exposition journalière (40 jours). En effet, les équations dose-réponse et affines de transfert de pyrene sous forme de 1-OH pyrene dans le lait et l'urine obtenues lors des deux premières expériences pouvaient très bien avoir été obtenues non pas grâce à l'obtention d'un plateau d'excrétion correspondant à chaque dose mais plutôt grâce au fait que les échantillonnages d'urine et de lait étaient systématiquement effectués 7 jours après chaque changements de niveau d'exposition. Or en conditions non accidentelles et récentes d'exposition aux HAP, l'usage d'un métabolite de HAP comme bioindicateur d'exposition à sa molécule mère peut se faire à n'importe quel moment à partir du début de l'exposition, et donc bien après les 7 jours d'exposition par dose mentionnés ci-dessus. Par conséquent, il était primordial (i) de vérifier l'obtention d'un plateau d'excrétion du 1-OH pyrene dans le lait et/ou l'urine et (ii) en cas d'observation de ce plateau, de déterminer à partir de quelle durée d'exposition journalière ce dernier était atteint. C'est lors de cette étude dont le protocole de suivi des animaux a été décrit préalablement que nous avons évalué le potentiel de l'activité EROD lymphocytaire périphérique à être utilisée comme bioindicateur d'exposition orale aspécifique aux HAP et plus généralement aux POP CYP inducteurs. Les résultats de cette troisième expérimentation ont été soumis sous la forme d'un unique article dans la revue « Environmental Toxicology and Chemistry » du SETAC.

6.5 Les principaux constats

De ces 3 expérimentations d'exposition orale de chèvres aux HAP en conditions contrôlées, plusieurs constats ressortent qu'il nous semble important de discuter.

6.5.1 . *Obtention de courbes dose-réponse linéaires (expérimentations 1 et 2)*

Les relations dose-réponse déduites de l'excrétion du 1-OH pyrene dans l'urine mais aussi dans le lait se sont avérées être linéaires, même jusqu'à la dose de 49 mg/jour de chacun des trois HAP. Il y a donc proportionnalité entre dose de pyrène ingérée et dose de 1-OH pyrène excrétée, ceci dans le lait comme dans l'urine. De même, les quantités de 1, 2, 3 et 4-OH phénanthrene ou de 3-OH benzo(a)pyrene excrétées dans l'urine se sont révélées être proportionnelles, respectivement, aux doses de phénanthrene et de benzo(a)pyrene ingérées.

Les pentes des équations affines de transfert des métabolites dans l'urine ou le lait se sont révélées être non significativement différentes dans la plage 0-7 mg/jour et dans la plage 0-49 mg/jour de chacun des HAP. Il n'y a donc pas de différences significatives dans les taux d'excrétions de métabolites aux fortes et aux faibles doses.

6.5.2 Obtention de taux de transferts stables

La linéarité des courbes dose-réponse obtenues reflète des taux de transfert stables quelles que soient les doses de HAP ingérées expérimentalement comme montré dans le tableau ci-dessous, issu de la synthèse des résultats de l'expérience « aux fortes doses » avec l'expérience « aux faibles doses ».

Tableau 15. Taux de transfert moyens observés de métabolites de HAP dans le lait ou l'urine sur la plage 0-49 mg/J de chacun des 3 HAP ingérés.

Matrice	Molécule mère	Hydroxymétabolite	Taux de transfert moyen sur la plage 0-49 mg/jour (%)
Lait	Pyrene	1-OH pyrene	1.25±0.23
Urine	pyrene	1-OH pyrene	10.28±2.17
Urine	phenanthrene	1-OH phenanthrene	3.26±1.69
Urine	phenanthrene	2-OH phenanthrene	1.98±0.61
Urine	phenanthrene	3-OH phenanthrene	2.73±0.97
Urine	phenanthrene	4-OH phenanthrene	2.08±0.20
Urine	phenanthrene	∑ 1, 2, 3 et 4-OH phenanthrene	10.5±2.05
Urine	benzo(a)pyrene	3-OH benzo(a)pyrene	0.011±0.004

6.5.3 Implications métaboliques et réconciliation avec nos résultats de mesure d'activité EROD chez la chèvre et chez le rat.

Cette linéarité traduit une capacité du métabolisme des xénobiotiques, *in vivo*, à faire face à des quantités de HAP ingérées très supérieures aux situations les plus extrêmes pouvant être rencontrées (Pour rappel, d'après notre étude bibliographique, 1 mg de HAP/jour chez une chèvre de 50 kg représente déjà une situation exceptionnelle en zone très exposée). Ceci est d'autant plus vrai que dans notre protocole les chèvres étaient en fait soumises jusqu'à 49 mg/jour, durant 7 jours, de chacun des 3 HAP du cocktail ternaire utilisé (phenanthrène, pyrène, benzo(a)pyrène), soit 147 mg/jour de HAP.

Pourquoi une telle capacité à métaboliser les HAP ingérés en aussi fortes quantités ?

A cette question nous pouvons apporter deux réponses complémentaires :

Tout d'abord, lors de nos travaux sur l'induction de l'activité EROD lymphocytaire chez la chèvre, nous avons mis en évidence que 99% de l'activité EROD lymphocytaire maximale était atteinte chez la chèvre à partir d'une exposition journalière répétée à une dose comprise entre 12 et 46 mg/J (soit entre 0.24 et 0.92 mg/J/kg) de chacun de nos 3 HAP (Phe, Pyr, BaP), c'est-à-dire 36 à 138 mg de HAP par jour (ou 0.72 à 2.76 mg/J/kg). Cette dose correspond donc à une limite d'exposition à partir de laquelle on peut considérer que l'activité EROD lymphocytaire stagne. Elle est donc assimilable à une limite physiologique d'induction EROD lymphocytaire. Cette nouvelle information nous avait semblé particulièrement rassurante dans la mesure où, comme cela a été montré dans la partie bibliographique de ce travail, un ruminant laitier est très rarement exposé à plus de 0.025 mg de HAP par kg et par jour. Notre limite physiologique impliquerait donc l'ingestion d'un mélange environ 29 à 110 fois plus concentré que ce qui représente déjà un maximum d'exposition orale au HAP, pour atteindre l'activité EROD lymphocytaire maximale atteignable par l'organisme. En d'autres termes, il est donc possible d'affirmer que dans le compartiment lymphocytaire périphérique, le potentiel d'adaptation à une exposition orale aux HAP est largement surdimensionné par rapport aux expositions, même extrêmes, susceptibles d'être rencontrées par l'animal. Mais, concernant notre expérimentation « aux fortes doses », comment se fait-il qu'en exposant nos chèvres à 49 mg/jour (1 mg/kg/jour) de chacun de nos 3 HAP (soit 3 mg/kg/jour de HAP), c'est-à-dire un niveau d'exposition environ 1.1 à 4.2 fois supérieur à nos évaluations hautes et basses de niveaux critiques d'exposition (0.72 mg/kg/jour à 2.76 mg/kg/jour) , nous n'ayons pas observé une rupture de linéarité de notre courbe dose-réponse. A priori, nous aurions dû tendre vers l'obtention d'un plateau, ce qui n'a pas été le cas.

Un élément de réponse selon nous intéressant tient dans le fait que, lors de notre expérience sur l'induction EROD chez le rat, nous avons mis en évidence, via une comparaison de nos résultats avec les résultats obtenus par Uno et al. en 2003, qu'atteindre le maximum d'induction obtenu à une exposition critique donnée n'impliquait pas pour autant une incapacité de l'organisme à faire face à la métabolisation de quantités nettement plus importantes de HAP (donc n'impliquait pas nécessairement l'obtention d'un plateau). En effet, des souris soumises oralement à des quantités journalières de 125 mg/kg/jour de benzo(a)pyrène, une dose environ 416 fois plus élevée (139 fois plus élevée si on tient compte de notre mélange ternaire) que la dose critique d'induction EROD trouvée dans le foie, les lymphocytes et le cerveau de nos rats

(environ 0.3 mg/kg/jour), étaient toutes vivantes après 30 jours de traitement. Leurs homologues déficientes en CYP1A1, elles, sont toutes mortes.

Ces deux facteurs conjugués peuvent tout à fait expliquer la linéarité de nos courbes dose-réponses sur les métabolites de HAP dans le lait et l'urine de nos chèvres, même à de forts niveaux d'exposition tels que 49 mg/jour (1 mg/kg/jour) de chacun de nos 3 HAP (soit 3 mg/kg/jour de HAP).

6.5.4 Obtention d'un plateau d'excrétion de 1-OH pyrene vers l'urine et le lait

L'expérience d'exposition orale à notre cocktail ternaire de HAP en mode subchronique sur 40 jours a permis de mettre en évidence, pour les deux niveaux d'exposition étudiés (1mg/J et 50 mg/J), l'obtention d'un maximum d'excrétion vers le lait et l'urine au, et non dès, le 10^{ème} jour d'exposition. Il est en effet probable que ce plateau d'excrétion est atteint avant 10 jours mais n'ayant pas mesuré le niveau d'excrétion entre les jours 0 et 10, nous ne pouvons pas préciser cela. L'obtention relativement précoce de ces plateaux d'excrétion est un point important dans la perspective de l'utilisation du 1-OH pyrene dans l'urine ou le lait comme biomarqueur d'exposition aux HAP. A nouveau, une proportionnalité est observée entre les doses ingérées et les plateaux d'excrétion de 1-OH pyrene obtenus. Ceci tend à montrer que l'obtention de courbes de transfert linéaires lors des expériences aux fortes et faibles doses n'était pas due au simple fait d'avoir effectué tous nos échantillonnages 7 jours après chaque changement de dose. Par ailleurs, et ceci est très important, le plateau d'excrétion apparaît comme stable au cours du temps une fois qu'il a été atteint (pas de différences significatives entre J10, J20 et J30 dans le lait) ce qui confirme la possibilité d'utiliser les équations de transfert proposées plus haut bien au-delà de 7 jours d'exposition pour évaluer un ingéré en HAP.

6.5.5 Biodisponibilité des HAP

Nos équations de transferts de pyrène sous forme de 1-OH pyrène vers le lait et vers l'urine ont été établies en administrant 2 mL d'huile contaminée juste après la traite du matin. Cette huile et les HAP qu'elle contenait se mélangeaient ensuite au bol alimentaire (eau, granulés, fourrage) de l'animal, le tout étant soumis au processus digestif conduisant à un franchissement partiel de la barrière gastro-intestinale par les HAP, dont le pyrène, vers le système sanguin périphérique. Le ratio entre la fraction de HAP rejoignant le système sanguin périphérique et la quantité de HAP ingérée correspond à la biodisponibilité de ce HAP. Cette dernière peut significativement être affectée par le bol alimentaire et le vecteur contenant les

HAP. Les équations de transferts du pyrène vers le lait ou l'urine sous forme de 1-OH pyrène peuvent donc aussi être affectées par le bol alimentaire et le vecteur de contamination. En ce qui concerne notre étude, une question d'importance est de savoir dans quelle mesure les équations de transfert établies avec l'huile comme vecteur de contamination peuvent renvoyer des évaluations d'ingéré en pyrène conformes à une situation dans laquelle le vecteur de contamination serait le fourrage lui-même. Les résultats obtenus par Costera et al. (2009) démontrent que la bioaccessibilité du pyrène lorsqu'il est lié au fourrage ingéré est quasi identique à celle du pyrène lorsqu'il est administré dans de l'huile. Le fourrage constituant l'essentielle source de contamination du ruminant laitier, cette observation tend à montrer que nos équations de transferts de pyrène vers le lait ou l'urine sous forme de 1-OH pyrène peut raisonnablement être appliquée à des animaux en pâture ou ingérant du fourrage pour évaluer leur ingéré quotidien en pyrène.

6.5.6 Dans quelle mesure peut-on évaluer l'ingéré de HAP autres que le pyrène à partir de l'ingéré évalué en pyrène ?

La compilation de profils de contaminations de 15 couverts végétaux différents en 13 HAP appartenant à la liste prioritaire de l'US-EPA a permis de mettre en évidence une certaine homogénéité des profils lorsque les contaminations étaient exprimées de manière relative par rapport à la contamination totale de chaque couvert végétal en ces 13 HAP. Le tableau 16 liste ces profils et leur provenance. Au regard du profil moyen de contamination établi, on peut observer que le phenanthrene, le fluoranthene et le pyrene totalisent à eux trois 60% de la contamination correspondant à la somme des 13 HAP. Nous proposons donc (i) de confronter l'ingéré en pyrène évalué à partir de nos équations de transfert dans le lait ou l'urine au profil de contamination moyen du tableau 15 pour évaluer le profil de contamination absolu par les 13 HAP considérés du couverts végétal ingéré et (ii) de confronter ce profil de contamination absolue à la quantité de couvert végétal ingérée journalièrement par l'animal pour en déduire, in fine, l'ingéré absolu journalier de ces 13 HAP par l'animal, via le couvert végétal. Les niveaux d'excrétions pouvant varier d'un animal à l'autre comme démontré au chapitre 3, il conviendra d'utiliser un ingéré moyen en pyrène évalué à partir de l'application des équations de transfert à plusieurs individus d'un même troupeau. Alternativement, la retenue du cas le plus défavorable (animal montrant un maximum d'excrétion de 1-OH pyrène) pourra être retenue.

Tableau 16: Teneurs relatives en 13 HAP sur 15 couverts végétaux différents (F: fluorene, Ph:phenanthrene, An: anthracene, Fl:fluoranthene, Py: pyrene, BaA: benzo(a)anthracene, Chr:chrysene, BeP:benzo(e)pyrene, BbF:benzo(b)fluoranthene, BkF:benzo(k)fluoranthene, BaP:benzo(a)pyrene, Bpr: benzo(g,h,i)perylene, InP:indeno(1,2,3-cd)pyrene)InP:indeno(1,2,3-cd)pyrene.

Authors	Country	Analysis on:	% of \sum 13 PAHs													Total %
			F	Ph	An	Fl	Py	BaA	Chr	BeP	BbF	BkF	BaP	Bpr	InP	
Crepineau et al. (2004)	France	Pasture 50 m from a highway	1.2	14.0	1.4	20.6	18.2	4.8	10.1	7.5	8.4	2.8	2.9	4.6	3.4	100.0
Crepineau et al. (2004)	France	Grass near a motorway	3.7	26.3	1.9	18.1	12.5	3.8	8.9	4.4	9.0	2.2	3.7	2.7	2.9	100.0
	France	Grass near an airport	2.5	29.9	2.3	19.3	12.8	1.0	3.7	13.1	11.8	0.0	1.6	1.2	0.9	100.0
Wagrowski and Hites (1997)	USA	Vegetal cover urban	1.1	16.0	1.1	21.3	16.0	6.4	9.6	4.3	9.6	1.1	5.3	3.2	5.3	100.0
	USA	Vegetal cover suburban	2.2	16.3	2.2	27.2	16.3	6.5	9.8	2.2	7.6	3.3	6.5	0.0	0.0	100.0
	USA	Crops	7.5	48.3	0.0	21.5	10.7	2.1	5.4	0.8	1.1	0.5	1.1	0.2	0.8	100.0
Gocht et al. (2007)	Germany	Open field	2.3	12.8	0.9	15.4	10.2	3.9	8.4	6.5	17.8	0.0	4.9	6.9	9.9	100.0
	Germany	Open field	2.8	18.4	0.8	15.8	11.2	3.7	7.6	5.8	15.5	0.0	4.2	6.6	7.5	100.0
	Germany	Open field	2.6	16.5	0.9	15.8	11.4	4.4	8.0	5.4	16.1	0.0	4.5	6.0	8.4	100.0
Zhang et al. (2008)	China	Dustfall suburb Beijing	4.7	30.2	4.0	25.5	13.7	3.3	7.1	1.5	3.6	2.6	0.9	1.3	1.6	100.0
Smith et al. (2001a,b)	U.K.	<i>Holcus lanatus</i> (winter)	4.7	30.2	4.0	25.5	13.7	3.3	7.1	1.5	3.6	2.6	0.9	1.3	1.6	100.0
		<i>Holcus lanatus</i> (summer)	6.9	19.7	1.5	14.8	9.9	2.0	6.9	5.9	6.9	5.9	5.9	5.9	7.9	100.0
Crépineau-ducoulombier et al. (2004)	France	<i>Lolium perenne</i> near national highway	0.9	28.6	1.8	20.2	27.7	2.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	4.0	100.0
	France	<i>Lolium perenne</i> near national road	0.8	12.3	0.5	16.2	19.0	3.7	5.7	3.2	11.3	4.4	5.8	8.9	8.2	100.0
Malawska et al. (2002)	Poland	<i>Ledum palustre</i> (peat plant)	9.2	39.2	0.0	28.6	14.3	0.0	8.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Average			3.6	23.9	1.5	20.4	14.5	3.4	7.5	4.1	8.2	1.7	3.2	3.9	4.2	100.0
		Std. dev.	2.6	10.5	1.2	4.5	4.6	1.8	1.9	3.5	5.7	1.9	2.3	3.3	3.4	

Conclusion générale

Le questionnement initial et principal de ce travail de thèse était de déterminer dans quelle mesure le concept de bioindication d'exposition pouvait être appliqué à l'évaluation de l'exposition du ruminant laitier aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polluants organiques persistants majeurs dans notre environnement et pouvant être transférés dans le lait sous formes natives et métabolisées. L'idée sous-jacente de cette étude était de proposer une alternative, au moins partielle, à l'évaluation de cette exposition par une approche analytique qualitative, quantitative et plus ou moins exhaustive des contaminants et de leurs métabolites dans tous les compartiments et fluides corporels de l'animal. Comme évoqué plus haut, cette dernière approche, que Levin (1995) appelle « Biological Monitoring », est en effet difficilement applicable pour des raisons (i) techniques (extraction sur matrices complexes, disponibilité limitée ou nulle des standards analytiques, durée des analyses); (ii) financières (prix particulièrement élevé des standards et des consommables nécessaires aux extractions) ; (iii) éthiques (évaluer une exposition à des polluants organiques persistants via un abattage systématique de l'animal, pose bien sûr plus de problèmes chez le ruminant laitier que chez le poisson ou l'oiseau par exemple).

Les deux bioindicateurs d'exposition étudiés dans cette thèse, à savoir le 1-OH pyrène et l'activité EROD, sont tous les deux des bioindicateurs métaboliques au sens où le premier résulte du métabolisme du pyrène et où le second reflète la présence plus ou moins marquée de cytochrome P450 oxydases de type 1A1 et 1B1 essentiellement. Par ailleurs, le premier est spécifique du pyrène et donc des HAP alors que le second est aspécifique et reflète une exposition plus ou moins forte à tous les composés CYP 450 (1A1 et 1B1) inducteurs et en particuliers à de nombreux POP (HAP, PCB, PCDD, PCDF...).

Concernant le 1-OH pyrène, nous avons pu mettre en évidence une linéarité de la courbe dose-réponse sur la très large gamme d'exposition orale de chèvres en mode subchronique (0.04-50 mg/jour sur 7 jours par dose) à chacun des HAP du mélange ternaire phénanthrene + pyrène + benzo(a)pyrène, ceci aussi bien dans l'urine que dans le lait, et avec des taux de transfert constants de l'ordre de 1% dans le lait et 10% dans l'urine. Cette linéarité a également été observée avec les 1, 2, 3 et 4-OH phénanthrenes et le 3-OH benzo(a)pyrène dans l'urine, reflétant des taux de transfert constants et très faibles, quel que soit le niveau d'exposition. Une étude cinétique complémentaire sur 40 jours a pu mettre en évidence l'obtention d'un plateau d'excrétion stable, pour les doses 1 et 50 mg/jour de chacun des 3

HAP étudiés, au plus tard après 10 jours d'exposition orale environ, mais probablement avant. L'obtention de ce plateau autorise l'utilisation de nos équations de transfert de 1-OH pyrène dans l'urine et le lait comme outil d'évaluation spécifique d'exposition subchronique à chronique au pyrène. Une synthèse bibliographique des profils de contaminations relatives de 15 couverts végétaux en 13 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA, dont le pyrène, a montré que ces derniers, quel que soit le pays et le type de couvert végétal, étaient très similaires. Ceci a permis la génération d'un profil de contamination moyen en ces 13 HAP, utilisable en première approche comme base d'évaluation d'une exposition à ces derniers à partir du niveau d'exposition au pyrène déduit de nos équations de transfert.

La stabilité des taux de transfert de 1-OH pyrène vers le lait ou l'urine, quelle que soit la dose journalière utilisée (0.04 mg/jour à 50 mg/jour), montre que la machinerie métabolique permettant de convertir le pyrène en 1-OH pyrène (tel quel ou sous forme conjuguée) supporte parfaitement une multiplication du niveau d'exposition par un facteur 1250. Il en est de même avec les autres métabolites de phénanthrène et benzo(a)pyrène mesurés dans l'urine. Il n'y a donc pas de compétition limitative, en tout cas après 7 jours d'exposition, pour l'accès au métabolisme oxydatif. Ce point nous semble assez remarquable.

Du point de vue strictement pratique, la mesure du 1-OH pyrène dans le lait présente un avantage pratique évident en terme d'échantillonnage. Une mesure dans un échantillon de lait issu du tank d'une exploitation permettrait d'avoir une idée de l'exposition moyenne de son troupeau aux HAP, alors qu'un échantillonnage sur un camion de collecte permettrait de « scanner » directement le niveau moyen de contamination sur plusieurs exploitations avant de resserrer l'étau sur la ou les exploitations sur lesquelles les niveaux d'exposition moyens dépassant le bruit de fond analytique en 1-OH pyrène dans le lait.

Concernant l'activité EROD lymphocytaire périphérique chez la chèvre exposée oralement et en mode subchronique durant 40 jours à 1 ou 50 mg/jour de chacun des 3 HAP étudiés, nous avons démontré que son induction était d'abord lente durant les 5 premiers jours avant de s'accélérer significativement jusqu'au 20^{ème} jour pour ralentir puis se stabiliser aux alentours du 30^{ème} jour avec la dose 1 mg/jour, et du 40^{ème} jours avec la dose 50 mg/jour. La cinétique d'induction s'est révélée parfaitement modélisable via un modèle de type logistique avec une faible variabilité inter-individus des activités EROD en début et fin de cinétique. Cette faible variabilité des activités EROD observées est sans doute due au fait

que nous avons utilisé des animaux de même race, d'un même troupeau et nourris de la même manière. Les activités EROD aux plateaux ont permis l'ébauche d'une courbe dose-réponse modélisable par un modèle de type Hill ou Michaelis-Menten, montrant au passage que les activités EROD lymphocytaires au plateau ne sont absolument pas proportionnelles aux niveaux d'exposition aux HAP. Alors que l'activité EROD avant exposition était de 0.5 ± 0.27 pmol resorufin/mg/jour ($n=6$), la courbe dose-réponse, quel que soit le modèle retenu, indique une activité EROD maximale atteignable d'environ 19 pmol resorufin/mg/jour correspondant à une limite adaptative propre au métabolisme de l'animal lorsqu'il est exposé oralement et de manière chronique au mélange Phe+Pyr+BaP. 99% de cette limite adaptative seraient atteints pour une exposition « critique » dans la plage 12-46 mg/jour de chacun des 3 HAP d'après le modèle de Hill, et dans la plage 41-43.5 mg/jour de chacun des 3 HAP d'après le modèle de Michaelis-Menten (intervalle de confiance à 95%). Les 2 modèles fournissent une EC50 de 2 mg/jour de chacun des 3 HAP étudiés. L'utilisation d'une dose intermédiaire entre 10 et 30 mg/jour aurait permis d'affiner le modèle mais nous ne pouvions accueillir que 6 animaux ($2 \times n=3$) dans notre animalerie.

Ces résultats tendent à montrer que l'activité EROD lymphocytaire peut être considérée comme un bioindicateur sensible et non invasif d'exposition du ruminant laitier aux HAP en exposition contrôlée et aux contaminants CYP 450 inducteurs en exposition non contrôlée. Ceci d'autant plus que l'induction est particulièrement sensible aux variations de niveau d'exposition.

Notre dernière expérimentation animale, effectuée sur le rat exposé oralement en mode subchronique et multidoses à nos 3 HAP, a démontré (i) que l'activité EROD lymphocytaire pouvait être corrélée de manière linéaire avec les activités EROD hépatiques et cérébrales; (ii) qu'il y avait une très forte induction dans les compartiments foie, lymphocytes et cerveau, démontrant au passage que les HAP CYP inducteurs tels que le pyrène et/ou le BaP peuvent franchir la barrière hématoencéphalique; (iii) que l'activité EROD relative calculée dans la totalité de chacun des 3 compartiments, était de 98% dans le foie contre 1% dans les lymphocytes et 1% dans le cerveau; (iv) que les cinétiques d'induction pouvaient, tout comme chez la chèvre, être modélisées via un modèle de type logistique, conduisant à des activités à J 28 qui étaient respectivement 151, 95 et 93 fois plus fortes que les activités à J0 dans le foie, le cerveau et les lymphocytes. Ceci alors que les plateaux n'étaient pas encore tout à fait atteints; (v) qu'à niveau d'exposition et vecteur de contamination identiques (huile

végétale), une induction EROD lymphocytaire périphérique nettement moindre est observée chez la chèvre par rapport au rat. Ceci est probablement du, chez la chèvre, à une plus grande dilution de la contamination dans son bol alimentaire générant une moindre biodisponibilité des HAP ingérés ; (vi) une comparaison de la dose critique nécessaire à l'obtention de l'activité EROD maximale atteignable dans les lymphocytes de rats (évaluée à 0.27 mg/kg/jour de chacun de nos trois HAP) avec les résultats obtenus par Uno et al. (2003) sur souris CYP1A1 déficientes exposées à 125 mg/kg/jour de benzo(a)pyrene tend à montrer que le rat peut faire face à des doses journalières de HAP (benzo(a)pyrene) largement plus élevées que la dose critique en question. Ceci montre qu'il faut bien distinguer « maximum d'induction EROD obtenu à une exposition donnée » et « capacité de métabolisation effective des HAP par le pool de Cytochrome P450 oxydases 1A1 et 1B1 correspondant à ce maximum d'induction ».

Les courbe dose-réponse obtenues par mesure de l'activité EROD lymphocytaire périphérique chez la chèvre montrent non seulement que l'induction EROD maximale atteignable est atteinte pour des doses journalières « critiques » de HAP dépassant nettement les niveaux d'exposition les plus sévères reportés dans la littérature. Les résultats obtenus sur rats tendent à démontrer que, même si ces doses journalières critiques sont dépassées (plus de 43.5 mg/j de chacun des 3 HAP), la chèvre, bien qu'ayant atteint son activité EROD lymphocytaire maximum, posséderait alors un arsenal « CYP450 1A1 et 1B1 » largement suffisant pour faire face à des niveaux d'expositions bien plus élevés.

C'est selon nous ce qui explique la linéarité observée dans nos courbes dose-réponse d'excrétion du 1-OH pyrène dans l'urine et le lait sur la plage 0.04-50 mg/jour, la dose de 50 mg/j étant nettement supérieures à la dose journalière critique la plus élevée trouvée plus haut (43.5 mg/jour avec Michaelis-Menten).

Pour conclure, les deux biomarqueurs d'exposition étudiés dans le présent travail de thèse peuvent et doivent selon nous être utilisés de manière combinée, chaque fois qu'une présomption de forte exposition aux HAP et/ou POP CYP450 inducteurs a été établie, pour évaluer cette exposition. Une mesure d'activité EROD lymphocytaire permettrait tout d'abord de savoir s'il est justifié ou non de continuer l'investigation. Si oui, alors une mesure de 1-OH pyrène dans le lait ou l'urine permettrait, dans un second temps, de rapidement savoir si les HAP sont responsables d'une activité EROD élevée, sans savoir s'ils sont les

seuls. Finalement, des analyse fines et complémentaires sur molécules natives ou métabolites d'autres POP, dans l'urine, le sang, le lait, ou le tissu adipeux sous cutané seraient alors justifiées pour évaluer la part de responsabilité d'autres familles de molécules telles que les hydrocarbures aromatiques halogénés. L'étape finale serait alors d'identifier les sources de contamination potentielles, essentiellement dans l'alimentation, comme évoqué en bibliographie.

Indépendamment des aspects « biodisponibilités des POP » ne faisant pas l'objet de cette thèse, des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer l'impact de l'espèce et de la race de ruminant laitier sur les deux biomarqueurs, spécifique et aspécifique, de notre étude.

Références Bibliographiques (hors publications)

Références Bibliographiques

A.D.E.M.E. Les micropolluants organiques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. Connaître pour agir, guides et cahiers techniques, Paris, 1997, 16 pages.

Adamo R., Pelosi S., Trotta T., and Sansone G., 1997. Bioaccumulation and biomagnification of polycyclique aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry* 56, 45-49.

The 1998 Aarhus Protocol to the 1979 convention on long-range transboundary air pollution on Persistent Organic Pollutants (POPs). *Rev. Eur. Community Int. Environ. Law* 1999, 8, 224-230.

Albert R.E., Miller M.L., Cody T., 1991. Benzo(a)pyrène-induced skin damage and tumeur promotion in the mouse. *Carcinogenesis* 12, 1273-1280.

Amir S., Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Revel J.C., 2005. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge. *Chemosphere* 58, 449-458.

Anandatheerthavarada H.K., Biswas G., Mullick J., Sepuri N.B.V., Otvos L., Pain D. and Avadhani N.G., 1998. Dual targeting of cytochrome P450B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at Ser128. *The Embo J.* 18, 5494-5504.

Agreste la statistique agricol. service central des enquêtes et études statistiques. *Agreste Primeur*, 2008. Les Français boudent les produits laitiers.

Agarwal T., Khillare P.S., Shridhar V., Ray S., 2008. Pattern, sources and toxic potential of PAHs in the agricultural soils of Delhi, India. *J. Haz. Mat.* 163, 1033-1039.

Artursson P., Palm K., Luthman K., 1996. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Delivery Rev.* 22, 67-84.

A.S.T.D.R. CERCLA Priority List Of Hazardous Substances. 1997.

Back DJ et Rogers SM., 1987. Review: first-pass metabolism by the gastro-intestinal mucosa. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1, 339-357.

Bakker M.I., Casado B., Koerselman J.W., Tolls J., Kollöffel C., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. *Sci. Tot. Environ.* 263, 91-100.

Barrwman JA., Rahman AZ., Lindstrom MB., Borgstrom B., 1989. Intestinal absorption and metabolism of hydrocarbons. *Prog. Lipid Res* 28, 189-203.

Beaune P.H., 1993. Les cytochromes P450 humains. *Thérapie* 48:521-526.

Beaune P.H. et Lorient M.A., 2000. *Médecine Science*, 16, 1051-1056.

Becher G, Bjorseth A, 1983. Determination of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons by analysis of human urine. *Cancer Lett.* 17, 301-11.

- Booggard P.J., Van Sittert N.J., 1994. Measurement of exposure to PAH in petrochemical industries by determination of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup. Environ. Med.* 51, 250-258.
- Bories G., 1993. Résidus alimentaires dans les laits animaux et lait de femme. Biologie de la lactation. Jack Martinet et Louis-marie Houdbine. *Editions INSERM/INRA*.
- Bouchard M, Viau C, 1998. Urinary and biliary excretion kinetic of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology* 127, 69-84.
- Bouchard M., Thuot R., Carrier G., Viau C., 2002. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J. of Toxic. and Envir. Health* 65, 1195-1209.
- Boylard E. and Sims P., 1964. Metabolism of polycyclic compounds. 24. The metabolism of benz[a]anthracene. *Biochem J.* 91, 493-506.
- Brookes P. and Osbome M.R., 1977. Mutation in mammalian cells by stereoisomers of anti-benzo[a]pyrene-diolepoxide in relation to the extent and nature of the DNA reaction products. *Carcinogenesis* 3, 1223-1226.
- Brzeznicki S, Jakubowski M, Czerski B 1997. Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health* 70, 257-260.
- Buchet J.P., Gennart J.P., Mercado-Calderon F., Delavingnette J.P., Cupers L., Lauwerys R., 1992. Evaluation of exposure to PAH in a coke production and graphite electrode manufacturing plant. *Br. J. Ind. Med.* 49, 761-768.
- Buet A., 2002. Impact biologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) chez l'angille européenne. Thèse ADEME, 1^{er} février 2002.
- Buratti M., Pellegrino O., Brambilla G., Colombi A., 2000. Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from different sources. *Biomarkers* 5, 368-381.
- Busquin P., 2003. Pollution atmosphérique intérieure: de nouvelles recherches communautaires mettent en évidence des risques plus élevés qu'on ne le pensait. IP/03/1278. Bruxelles.
- Carbonelle S., Buchet J.P., Bernard A. 2002. Evaluation des risques de la pollution atmosphérique urbaine chez les enfants bruxellois, UCL / IBGE.
- Casset A., de Blay F., 2008. Effets sur la santé des composés organiques volatils de l'habitat. *Revue des maladies respiratoires* 25, 475-485.
- Cavalier E. L., Rogan E., Cremonesi P., 1988. tumorigenicity of 6-halogenated derivatives of benzo(a)pyrene in mouse skin and rat mammary gland. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114, 10-15.
- Chen Y., Sheng G., Bi X., Feng Y., Mai B., and Fu J., 2005. Emission Factors for Carbonaceous Particles and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Residential Coal Combustion in China. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1861-1867.

- Chetiyankornkul T., Toriba A., Kameda T., Tang N., 2006. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluoranthene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 712-718.
- Cho S.H., Kang D., KANG J.W., Ju Y.S., Sung J., Lee C.K., Lee S.K., Lee Y.S. and Strickland P.T., 2000. Use of urinary PAH metabolites to assess PAH exposure Intervention among Coke Oven Workers. *J. of occupational Health* 42, 138-143.
- Ciganek, M., Ulrich, R., Neca, J., Raszyk, J., 2002. Exposure of pig fatteners and dairy cows to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Vet. Med.* 47, 137-142.
- CITEPA, 2003. Estimation des émissions de polluants liées à la combustion du bois en France.
- CITEPA, 2007. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France
- CITEPA, 2008. Emissions dans l'air en France métropole. Substances relatives à la contamination par les polluants organiques persistants.
- Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. EU official Journal L 358, 1986, 0001-0028.
- Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ et Vaz AND., 1992. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 62, 669-673.
- Crépineau C., Rychen G., Feidt C., Le Roux Y., Lichtfouse E., Laurent F., 2003. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *J ; Agr. Food Chem.* 51, 4841-4845.
- Crépineau-Ducoulombier C. and Rychen G., 2003. Assesment of soil and grass Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) contaminations levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23, 345-348
- Crépineau-ducoulombier C., Dan Badjo A.T., Rychen G., 2004. PAH contamination of the grass *Lolium perenne* exposed to vehicular traffic. *Agronomie* 24, 503-506.
- Del Bubba, M., Zanieri, L., Galvan, P., Donzelli, G.P., Checchini, L., Lepri, L., 2005. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and total fats in human milk. *Ann. Chim. (Rome)* 95, 629-641.
- De Maagd P., ten Hulsher D., van den Heuvel H., Opperhuizen A., Sijm D. Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants. *Environ. Toxicol. Chem.* 1998, 17, 251-257.
- De Vos R.H., Van, Dokkum, W., Schouten A., De Jong-Berkhout P. 1990. polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem. Toxicol.* 28, 263-268.

- De Waziers I., Cugnenc P.H., Berger A., Leroux J.P. and Beaune P.H., 1991. Drug-metabolizing enzyme expression in human normal, peritumoral and tumoral colorectal tissue samples. *Carcinogenesis* 12, 905-909.
- Dolora C., Casalini C., Ciapellano S., Testolin G. 1995. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in the Italian diet. *Food Addit. Contam.* 12, 263-268.
- Edwards N.T., 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) in the terrestrial environment : a review. *J. Environ. Qual.* 12, 427.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. The EFSA Journal, 724, 1-114.
- Elovaara E. Vaananen V., Mikkola J., 2003. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with β -naphthoflavone induction in the rat. *Arch. Of Toxicol.* 77, 183-193.
- Falco G., Domingo J.L., Llobet J.M., Teixido A., Casas C., Müller L., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: Human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection* 66, 2325-2331.
- Farrington J.W., 1989. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environ Health Perspect.* 90, 7-84.
- Ferreira, M., Buchet, J. P., Burrion, J. B., Moro, J., Cupers, L., Delavignette, J. P., Jacques, J. and Lauwerys, R. 1994. Determinants of urinary thioethers, D-glucaric acid and mutagenicity after exposure to PAH assessed by air monitoring and measurements of 1-hydroxypyrene in urine; a cross-sectional study in workers of coke and graphite electrode producing plants. *International Archives of Occupational Environmental Health* 65, 329-338.
- Fiala Z., Vyskocil A., Krajak V., Viau C., Ettlerova E., Bukac J., Fialova D. and Emminger S., 2001. Environmental exposure of small children to polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 74, 411-420.
- Fisher S.W., 1995. Mechanisms of bioaccumulation in aquatic systems. *Rev. Environ. Contam. T.* 142, 87-117.
- Fontcuberta M., Arqués J.F., Martínez M., Suárez A., Villalbí J.R., Centrich F., Serrahima E., Duran J., Casas C., 2006. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Samples Collected in Barcelona, Spain. *Intern.l Associat. for Food Protection* 69, 2024-2028.
- Foster J.R., Elcombe C.R., Boobis A.R., Davies D.S., Sesardic D., McQuade J., Robson R.T., Hayward C. et Lock E.A., 1986. Immunocytochemical localization of cytochrome P-450 in hepatic and extra-hepatic tissues of the rat with a monoclonal antibody against cytochrome P-450 c. *Biochem Pharmacol* 35, 4543-4554.
- Fritz, W., 1983. Studies on the behavior of benzo (a) pyrene in the soil and to transition from the soil in harvested crops. *Zbl. Mikrobiol.*, 138, 605-616.

- Garban B., Ollivon D., Teil M.J., Blanchard M., Blanchoud H., Moteley-Massei A., Chesterikoff C., Hanselin L., Rolet J., Le Genti L. Chevreuil M., 2002. Rapport PIREN-Seine, 31p.
- Giessing A., M.B., Mayer L., Forbes T. L., 2003. 1-hydroxypyrene glucuronide as the major aqueous pyrene metabolite in tissue and gut fluid from the marine deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*. *Environ. Toxicol. And Chem* 22, 1107-1114.
- Grimmer G., Dettbarn G. and Jacob J., 1993. Biomonitoring of PAH in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenanthrene and pyrene metabolites. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 65, 189-199.
- Gonzalez FJ, Jaiswal AK et Nebert DW., 1986. P450 genes: evolution, regulation, and relationship to human cancer and pharmacogenetics. *CSH Symposia on Quantitative Biology* 5, 879-890.
- Gonzalez FJ. 1990. Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol Ther* 45, 1-38.
- Gonzalez FJ. 1992. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 13, 346-352.
- Gonzalez FJ et Lee YH. 1996. Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *FASEB J.* 10, 1112-1117.
- Grova N., Laurent C., Feidt C., Rychen G., Laurent F., Lichtfouse E., 2000. Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *European Journal of Mass Spectrometry* 6 (5), pp. 457-460.
- Grova N., Feidt C., Laurent C., Rychen G., 2002. [14C] Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [14C] polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Dairy Journal* 12, 1025-1031.
- Grova N., Feidt C., Rychen G., 2003. [14C] milk, urine, and feces excretion kinetics in lactating goats after oral administration of [14C] polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Dairy Journal* 12, 1025-1031.
- Grova N., Monteau F., Le Bizec B., Feidt C., Andre F., Rychen G., 2005. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 29, 175-181.
- Guengerich FP. 1992a. Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.* 50, 1471-1478.
- Guengerich FP. 1992b. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J.* 6, 745-748.
- Guengerich FP., 1996. In vitro techniques for studying drug metabolism. *J. Pharmacokin Biopharm* 24:521-533.
- Hansen Å. M., Raaschou- Nielsen O. and Knudsen L. E., 2005. Urinary 1-hydroxypyrene in children living in city and rural residences in Denmark. *Science of the total Envir.* 363, 70-77.

- Hermann P, Rodger SD, Remones G, Thenot JP, London DR et Morselli PL., 1983. Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 24, 349-352.
- Howsam M., Jones K.C. and Ineson P., 1999. PAHs in the Soils of a Mature, Mixed-Deciduous (*Quercus-Fraxinus*) Woodland and the Surrounding Pasture. *Water, Air & Soil Pollution* 121, 379-398.
- Healy W.B., Ludwig T.G., 1968. Barium content of teeth, bone and kidney of twin sheep raised on pastures of differing barium content. *Arch. Oral Biol.* 13, 559-563.
- Hinton T.G., Kopp P., Ibrahim S., Bubryak I., Syomor A., Tober L., Bell C., 1995. A comparison of techniques used to estimate the amount of resuspended soil on plant surfaces. *Health. Phys.* 68, 1-9.
- Heudorf U. and Angerer J., 2001. Urinary monohydroxylated phenanthrenes and hydroxypyrene – the effects of smoking habits and changes induced by smoking on monooxygenase-mediated metabolism. *Int. Arch. Occ Env.* 74, 177-183.
- Hietanen E., Husgafvel-Pursiainen K., and Vainio H., 1997. Interaction between dose and susceptibility to environmental cancer: a short review. *Environ Health Persp.* 105, 749–754.
- Hollender J., Koch B. and Dott W.; 2000. Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene, pyrene and benzo[*a*]pyrene hydroxides. *J. of Chromatogr. B: Biomed* 739, 225-229.
- Huang W., Caudill P., Grainger J., Needham L., Patterson D., 2006. Levels of 1-hydroxypyrene and other monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in children: a study based on U.S. reference range values. *Toxicology. Letters* 163, 10-19.
- Hukkanen J., Arja Lassila, Päivärinta K., Valanne S., Sarpio S., Hakkola J., Pelkonen O. and Raunio H., 2000. Induction and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450s in the Human A549 Lung Adenocarcinoma Cell Line. *Am J. Resp Cell Mol* 22, 360-366.
- IARC, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1998.
- INSERM 2001. Expertise collective - Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles. Paris, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. INSERM.
- Jacob J., Raab G., Soballa V.J., Luch A., G. Grimmer, Greim H., Doehmer J., Hilary G., 1999. Species-dependent Metabolism of Benzo[*c*]phenanthrene and Dibenzo[*a, l*]pyrene by Various CYP450 Isoforms. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 16, 199-203.
- Jacob J. and Seidel A., 2002. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J. Chromatogr B* 778, 31-47.
- Johnsen S., Kukkonen J. and Grande M., 1989. Influence of natural aquatic humic substances on the bioavailability of benzo[*a*]pyrene to Atlantic salmon. *Sci Total Environ*, 81/82, 691-702.
- Jones KC., de Voogt P, 1999. Persistent organic pollutants: state of science. *Environ. Polutl.* 100, 209-221.

- Janoszka B., Warzecha L., Błaszczak U., and Bodzek D., 2004. Organic compounds formed in thermally treated high-protein food. *Acta Chromatographica* 14, 130-141.
- Jansen P.L., Mulder G.J., Burchell B. and Bock K.W. 1992. New developments in glucuronidation research: report of a workshop on "Glucuronidation, its role in health and disease" *Hepatology*. 15, 532-544.
- Jongeneelen FJ, Leijdekkers CM, Bos RP, Theuws JL, Henderson PT, 1985. Excretion of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene and mutagenicity in rat urine after exposure to benzo(a)pyrene. *J. Appl Toxicol.* 5 : 277-82.
- Jongeneelen F.J., Bos R.P., Anzion, R.B.M., Theuws, J.L.G., Henderson, P.T., 1986. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolites in urine. *Scand. J. Work Env. Hea* 12, 137-143.
- Jongeneelen F.J., Anzion R.B.M., Henderson P.T., 1987. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromatogr.* 413, 227-232.
- Jongeneelen F. J., 1992. Biological exposure limit for occupational exposure to coal tar pitch volatiles at cokeovens. *Int Arch Occ Env Hea* 63, 511-516.
- Jongeneelen F. J. 2001. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.* 45, 3-13.
- Juhasz A.L. & Naïdu R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeter & Biodegr* 45, 57-88.
- Kazerouni N., Sinha R., Che Han Hsu, Greenberg A., Rothman N., 2001. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epiemiologic study. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 423-436.
- Keiming SD., Kirby KW., Morgan DP., 1983. Identification of 1-hydroxypyrene as a major metabolite of pyrene in pig urine. *Xenobiotica* 13, 415-420.
- Kim S.R., Halden R.U., Buckley T.J., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in human milk of nonsmoking U.S. women. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2663-2667.
- Kishikawa N., Wada M., Kuroda M., Akiyama S., Nakashima K., 2003. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 789, 257-264.
- Kipopoulou AM, Manoli E. and Samara C., 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environ. Pollut.* 106, 69-380.
- Kitchen KT. 1984. An enzymatic approach to biotransformation. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 6, 303-310.
- Koster AS, Frankhuyzen-Sierevogel AC et Noordhoek J. 1985. Distribution of glucuronidation capacity 1-naphthol and morphine along the rat intestine. *Biochem Pharmacol* 34, 3527-3532.

- Krishna DR et Klotz U., 1994. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* 26, 144-160.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard JC., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. In: Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux, ed. L. Lagadic, T. Caquet, JC. Amiard, F. Ramade, 241-85. Londres, Paris, New York: Masson.
- Lafontaine M., Payan J.P., Delsaut P., Morele Y., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in an artificial shooting factory : assessment of 1-hydroxypyrene urinary excretion as a biological indicator of exposure. *Ann. Occup. Hyg.*, 44, 89-100.
- Lange B., Kremer S., Sterner O. and Anke H., 1994. Pyrene Metabolism in *Crinipellis stipitaria*: Identification of *trans*-4,5-Dihydro-4,5-Dihydroxypyrene and 1-Pyrenylsulfate in Strain JK364. *Appl Environ Microb.* 60, 3602-3607.
- Lash T.L. and Aschengrau A., 1999. Active and Passive Cigarette Smoking and the Occurrence of Breast Cancer. *Am J.Epidemiol.* 149, 5-12.
- Laurent C., Feidt C., Laurent F., 2005. Contamination des sols ; transferts des sols vers les animaux. EDP Sciences/ADEME. LesUlis, France.
- Lapole, D., Rychen, G., Grova, N., Monteau F., Le Bizec, B., Feidt, C., 2007. Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants. *J. Dairy Sci.* 90, 2624-2629.
- Levin J.O., 1995. First international workshop on 1-hydroxypyrene as biomarker for PAH exposure in man-summary and conclusions. *Sci. Total. Environ.* 163, 165-168.
- Li C.S. and Ro Y.S., 2000. Indoor characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere of Taipei. *Atmos. Environ.* 34, 611-620.
- Lodovici M., Dolara P., Casalini C., Ciappellano S., Testolin G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the italian diet. *Food Addit.Contam.* 12, 703-713.
- Lu C. and Li A.P., 1998. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem-Biol Interact* 134, 271-281.
- Mackay D., Shiu W.Y. and Ma K.C., 1991. Illustrated handbook of physical chemical properties and environmental fate of organic chemicals, vol II. Polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins and dibenzofurans, Boca Raton, Floride, *Lewis Publisher*.
- Malawska M., Bojakowska I., Wilkomirski B., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in peat and plants from selected peat-bogs in the north-east of Poland. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 165, 686-691.
- Mannering GJ. 1972. Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism. Dans: La Du BN, Mandel HG et Way EL (ed.). *Fundamentals of drug metabolism*. Williams & Wilkins company, Baltimore, 206-252.

- Mayland H. F., Shewmaker G. E., and Bull R. C., 1975. Soil Ingestion by Cattle Grazing Crested Wheatgrass. *Journal of Range Management* 30, 264-265.
- McLachlan M.S., Thoma H., Reissinger M., Hutzinger O., 1995. PCDD/F in an agricultural food chain. Part 1: PCDD/F mass balance of a lactating cow. *Chemosphere*, 20 , 1013-20.
- McCarthy J.F., Jimenez B.D., 1985. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: binding and dissociation. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1072–1076.
- Menzie C.A., Potocki B.B., Santodonato J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278-1284.
- Motelay-Massei A., Ollivon D., Garban B., Teil M.J., Blanchard M. et Chevreuil M., 2004. Distribution and spatial trends of PAHs and BPCs in soils in the Seine River basin, France, *Chemosphere* 55, 555-565.
- Mugford C.A., Kedderis G.L., 1998. Sex-Dependent Metabolism of Xenobiotics. *Drug Metab Rev* 30, 441-498.
- Muller J.F., Hawker D.W., Connell D.W., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Brisbane, Australia. *Chemosphere* 37, 7, 1369-1383.
- Murray M., 1992. P450 enzymes. Inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver disease. *Clin Pharmacokinet* 23, 132-146.
- Nadal R., Taha A. and Pinel P., Le contenu astronomique des Sphériques de Ménélaos. *Archive for History of Exact Sciences* 58, 381-436.
- Nam, J.J., Song, B.H., Eom, K.C., Lee, S.H. and Smith, A., 2003. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere* 50, 1281-1289.
- Narbonne J.F., 1991. Mécanismes de bio-transformation des polluants organiques chez les animaux marins. *Océans*, 17, 449-458.
- NAS/NRC. 1989. Biologic markers in reproductive toxicology. National Academy of Sciences/National Research Council. Washington, DC: *National Academy Press*, 15-35.
- Nebert DW, Nelson DR et Feyereisen R. 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* 19, 1149-1160.
- Nebert DW et Nelson DR. 1991. P450 gene nomenclature based on evolution. *Method Enzymol* 206:3-11.
- Nilsson, S. and Pitt, D., 1994. Protecting the Atmosphere, the Climate Change Convention and its Context. *Earthscan Publications Ltd*: London.
- NRC. 1989a. Biologic markers in reproductive toxicology. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press.
- Pacifici GM, Franchi M, Bencini C, Reppeti F, Di Lascio N et Muraro GB., 1988a. Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica* 18, 849-856.

- Pacifici GM, Franchi M, Gervasi PG, Longo V, di Simplicio P, Temellini A et Giuliani L., 1989. Profile of drug-metabolizing enzymes in human ileum and colon. *Pharmacology* 38, 137-145.
- Pan G., Hanakoa T.Yamano Y., 1998. A study of multiple biomarkers in coke oven workers—a cross-sectional study in China. *Carcinogenesis* 19, 1963–1968.
- Palayer J., 1997. Le point sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Agence de l'eau Seine-Normandie*, 63pp.
- Park BK, Pirmohamed M et Kitteringham NR. 1995. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol. Therapeut.* 68, 385-424.
- Paustenbach D.J., 1989. A methodology for evaluating the environmental and public health risks of contaminated soil. *Petroleum contaminated soils* 20, 225-261.
- Peters WHM, Nagengast FM et van Tongeren JH., 1989a. Glutathione S-transferase, cytochrome P450, and uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase in human small intestine and liver. *Gastroenterology* 96, 783-789.
- Peters WHM, Roelofs HM, Nagengast FM et van Tongeren JH., 1989b. Human intestinal glutathione S-transferases. *Biochem J.* 257, 471-476.
- Peters WHM et Kremers PG., 1989c. Cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of man. *Biochem Pharmacol* 38, 1535-1538.
- Petry T., Schmid P., Schlatter C., 1996. Airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. *Ann. Occup. Hyg.* 40, 345-357.
- Phillips D.H., 1999. Polycyclic Aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.* 443, 139-147.
- Pickering K.T. & Owen L.A., 1994. An Introduction to Global Environmental Issues. *Routledge: London*, 390 pp.
- Popp, W., Vahrenholz, C.Schnell, C., 1997. DNA-single strand breakage, DNA adducts and SCE in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers. *Occupational and Environmental Medicine* 54,176–183.
- Ramesh A., Walker S.A., Hood D.B., Guillen M.D, Schneider K., Weyand E.H., 2001. Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Int J Toxicol* 23, 301-333.
- Raszyk J., Ulrich R., Salava J., Palac J., 1999a. Evaluation and occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in animal feed factories. *Vet. Med. – Czech*, 44, 295–300.
- Raszyk J., Neca J., Salava J., Palac J., 1999b. A pilot study of 1-hydroxypyrene in the urine of pigs and cows. *Vet. Med. – Czech*, 44, 359–363.

- Randerath K., Randerath E, Zhou G.D., Supunpong N., He L.Y., McDonald T.J., Donnelly K.C., 1999. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods. *Environ Mol Mutagen* 33, 303-312.
- Roos P.H., Tschirbs S., Welge P., Hack A., Theegarten D., Mogilevski G., Wilhelm M., 2002. Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch. Toxicol.* 76, 326-334.
- Rychen G., Crépineau C., Grova N., Jurjanz S., Feidt C., 2005. Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. *INRA Productions. Animales.* 18, 355-366.
- Shibik P. and Porta G.D., 1957. Carcinogenesis and acute intoxication with large doses of polycyclic hydrocarbons. *Am. Med. Assoc. Arch. Pathol.* 64: 691-703.
- Shields P.G., Ambrosone C.B., Graham S., Bowman E. D., Harrington A. M., Gillenwater K. A., Marshall J.R., Vena J.E., Laughlin R., Nemoto T., Freudenheim Jo L., 1996. A cytochrome P4502E1 genetic polymorphism and tobacco smoking in breast cancer. *Molecular carcinogenesis* 17, 144-150.
- Sims P., 1970. Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydrocarbons by rat-liver preparations. *Biochem. Pharmacol.* 19, 795-818.
- Sims R.C. et Overcash M.R., 1983. *Residue reviews* 88, 1-68.
- Simth G., 1998. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* 28, 1129-1165.
- Slaughter RL et Edwards DJ. 1995. Recent advances: The cytochrome P450 enzymes. *Ann. Pharmacother* 29, 619-624.
- Strickland P.T., Daehee K., Bowman E.D., Fitzwilliam A., Downing T.E., Rothman N., Groopman J.D., Weston A., 1994. Identification of 1-hydroxypyrene glucuronide as a major pyrene metabolite in human urine by synchronous fluorescence spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. *Carcinogenesis*, 15, 483-487.
- Stroomberg G. J., F. Ariese, C. A. M. van Gestel, Hattum B.v., Velthorst N.H., Straalen N.M., 2009. Pyrene biotransformation products as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in terrestrial isopoda: Concentration-response relationship, and field study in a contaminated forest. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 224-231.
- Sutherland J.B., Selby A.L., Freeman, J.P., Evans F.E., and Cerniglia C.E., 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.* 57, 3310-3316.
- Szeliga J., and Dipple A., 1998. DNA Adduct Formation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dihydrodiol Epoxides. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1-11.
- Tang L., Tang X.-Y., Zhu Y.-G., Zheng M.-H., Miao Q.-L., 2005. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. *Environ. Int.* 31, 822-828.

- Trapido M., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles, *Environ. Pollut.*, 105, 67-74.
- Tredaniel J., Zalczman G., Douriez E., 1995. Gènes et enzymes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes = Genes and enzymes involved in carcinogen metabolism. *Bulletin du cancer* 82, 77S-144S.
- TSM Fiduciaire, 2009.
http://www.lid.ch/fileadmin/user_upload/lid/Pressecorner/2010/20100218_TSM_Milchmarkt_2009_f.pdf
- Van Der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environ Toxicol Phar* 13, 57-149.
- Van Gestel C.A.M., Van Brummelen T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 5, 217-225.
- Vanrooij J.G.M., Bodelier-Bade M.M., Jongeneelen F.J., 1993. Estimation of the individual dermal and respiratory uptake of PAH of 12 cokeoven workers. *Occup. Environ. Med.* 50, 623-632.
- Van Schooten FJ, Moonen EJC, van der Wal L, 1997. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces, and urine of rats orally exposed to PAH contaminated soils. *Arch Environ Con. Tox.* 33, 317-322.
- Van Wijnen J.H., Slob R., 2008. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among Dutch children. *Environmental. Health. Perspectives*, 530-534.
- Varlet V., Serot T., Knockaert C., Cornet J., Cardinal M., Monteau F., Le Bizec B., Prost C., 2007. Organoleptic characterization and PAH content of salmon (*Salmo salar*) fillets smoked according to four industrial smoking techniques. *J. Sci Food Agr* 87, 847-854(8).
- Vyskocil A, Fiala Z, Chenier V, Krajak L, Ettlerova E, Bukac J, Viau C, Emminger S. 2001. Assessment of multipathway exposure of small children to PAH. *Environ. Toxicol. Phar.* 8, 111-118.
- Vu-Duc T., Lafontaine M., 1996. 1-hydroxypyrene in human urines as biomarker of exposure to PAH in work related processes in an aluminum production plant. *Polycyclic Aromat. Compd.* 11, 1-9.
- Waldman JM, Liroy PJ., Greemberg A., Butler J.P., 1991. Analysis of human exposure to benzo[a]pyrène via inhalation and food ingestion in the total human environmental exposure study (thees). *J. Expo. Anal. Env. Epid.* 1, 193-225.
- Wilcke W., 2000, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soils – a review, *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 163, 229-248.
- Wild, S.R. et Jones, K.C., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, *Environ. Pollut.*, 88, 91-108.

Wong F., Harner T., Liu Q.T., Diamond M.L, 2004. Using experimental and forest soils to investigate the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) along an urban-rural gradient. *Environmental Pollution* 129, 387-398.

Wu T., W. Mao, F. C. K. Ho., 1998. Urinary 1-hydroxypyrene concentrations in cokeoven workers. *Occupational and Environmental Medicine* 55, 461–467.

Xue W, Warshawsky D, 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage. A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 206, 73-93.

Yang H, De Boer J.G., Glickman B.W., and Mazur-Melnyk M. 1999. A comparison of mutational specificity of mutations induced by S9-activated B[a]P and benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide at the endogenous APRT gene in CHO cells. *Mutation Research – Fundamental and molecular mechanisms of Mutagenesis* 423, 23-32.

Yilmazer M. , Ada A. O. , Suzen S. , Demiroglu C. , Demirbag A. E. , Efe S., Alemdar Y., Iscan M. and Burgaz S., 2006. Biological Monitoring of Environmental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: 1-Hydroxypyrene in Urine of Turkish Coke Oven Workers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 559-565.

Zanieri L., Galvan P., Checchini L., Cincinelli A., Lepri L., Donzelli G.P. and Del Bubba M., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area. *Chemosphere*. 67, 1265-1274.

Liste de figures

APPROCHE BIBLIOGRAPHIQUE

FIGURE 1. ESSAI DE SCHEMATISATION D'UNE APPROCHE ANALYTIQUE SYSTEMATIQUE ET IDEALISEE, SPECIFIQUE A CHAQUE MOLECULE NATIVE ET A TOUS SES METABOLITES DANS TOUS LES COMPARTIMENTS CORPORELS, POUR L'EVALUATION DU RISQUE LIE A L'INGESTION DE POP PAR L'ANIMAL. LES ASPECTS NOTES EN ORANGE SERONT TRAITES DANS LE PRESENT TRAVAIL DE THESE. DANS CE SCHEMA, SEULE LA VOIE D'EXPOSITION ORALE, LARGEMENT PREDOMINANTE, SERA ABORDEE.	11
FIGURE 2. OBSTACLES A L'EVALUATION DES RISQUES PAR L'APPROCHE ANALYTIQUE GLOBALE ET APPROCHE UTILISEES DANS LA PRESENTE THESE POUR CONTRIBUER A UNE MEILLEURE EVALUATION DE L'INGERE EN HAP (POP) PAR L'ANIMAL AINSI QU'A UNE MEILLEURE CONNAISSANCE DE LEUR TAUX DE TRANSFERT ET DE LEUR METABOLISME.	12
FIGURE 3. ORGANIGRAMME STRUCTUREL DE LA THESE FORMALISEE SOUS FORME DE PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES RAPPORTEES EN L'ETAT DANS CE MANUSCRIT. CHAQUE PUBLICATION, PUBLIEE OU EN COURS DE REVUE, EST INTRODUITE DE MANIERE SPECIFIQUE. LE LECTEUR RETROUVERA AINSI SANS DIFFICULTE LE FIL CONDUCTEUR ET LA DEMARCHE SCIENTIFIQUE MISE EN ŒUVRE.	13
FIGURE 4. DISTRIBUTION SECTORIELLE DES EMISSIONS DE POLLUANTS EN FRANCE METROPOLITAINE EN 2007.	17
FIGURE 5. DISTRIBUTION SECTORIELLE DES EMISSIONS ATMOSPHERIQUES DE HAP EN FRANCE JUSQU'EN 2008	18
FIGURE 6. STRUCTURE CHIMIQUE DE 16 HAP JUGES A RISQUES PAR L'U.S.E.P.A.	21
FIGURE 7. FORME EPOXYDE DU B[A]P.....	23
FIGURE 8. LES DIFFERENTES ETAPES DU METABOLISME HEPATIQUE.	25
FIGURE 9. REACTION DE LA FLAVINE MONONUCLEOTIDE.	28
FIGURE 10. METABOLISME DU BENZO(A)PYRENE DANS DES CELLULES DE MAMMIFERES	32
FIGURE 11. DEVENIR DES HAP EMIS DANS L' ATMOSPHERE.	33
FIGURE 12. RELATIONS ENTRE LES BIOMARQUEURS D'EXPOSITION, L'INDIVIDU ET LA CONCENTRATION DU POLLUANT DANS LE MILIEU	53
FIGURE 13. METABOLISME DU PYRENE.	58
FIGURE 14. METABOLISME DU PHENANTHRENE.	192

APPROCHE EXPERIMENTALE**1. PUBLICATION 1: «1-OH PYRENE IN MILK AND URINE AS BIO-INDICATEUR OF POLYCYCLIQUE AROMATIQUE HYDROCARBONS EXPOSURE OF RUMINANTS»**

FIGURE 1. HPLC-FLUORIMETRY CHROMATOGRAMS OF MILK EXTRACTED FROM MILK AT 50 NG 1-OH PYRENE/G MILK (A) AND URINE EXTRACTED FROM URINE AT 1000 NG 1-OH PYRENE/G URINE (B).

FIGURE 2. AVERAGE 1-OH PYRENE CONCENTRATIONS (NG/G). AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION IN MILK PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF 1 MG/DAY, 7 MG/DAY AND 49 MG/DAY DOSE.

FIGURE 3. AVERAGE 1-OH PYRENE AMOUNTS (NG). AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION FOUND IN MILK PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF 1 MG/DAY, 7 MG/DAY AND 49 MG/DAY DOSES.

FIGURE 4. AVERAGE 1-OH PYRENE CONCENTRATIONS (NG/G). AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION IN URINE PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF 1 MG/DAY, 7 MG/DAY AND 49 MG/DAY DOSES.

FIGURE 5. AVERAGE 1-OH PYRENE AMOUNTS (NG) AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION FOUND IN URINE PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF 1 MG/DAY, 7 MG/DAY AND 49 MG/DAY DOSES.

II. PUBLICATION 2: «EVALUATION OF SMALL DAIRY RIUMINANT EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS: A BIOMARKER APPROACH».

FIGURE 1. AVERAGE 1OH-PYRENE CONCENTRATIONS (NG/G) AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION IN MILK PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF DOSES IN THE RANGE 0.04-49 MG/DAY (A) AND IN THE RANGE 0.04-7 MG/DAY (B).

FIGURE 2. AVERAGE 1OH-PYRENE AMOUNTS (NG) AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION FOUND IN MILK PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF DOSES IN THE RANGE 0.04-49 MG/DAY (A) AND IN THE RANGE 0.04-7 MG/DAY (B).

FIGURE 3. AVERAGE 1OH-PYRENE AMOUNTS (NG) AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION FOUND IN MILK PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF DOSES IN THE RANGE 0.04-49 MG/DAY FOR EACH GOAT: ■ GOAT 1, X GOAT 2, ♦ GOAT 3, ▲ GOAT

FIGURE 4. AVERAGE 1OH-PYRENE CONCENTRATIONS (NG/G) AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION IN URINE PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF DOSES IN THE RANGE 0.04-49 MG/DAY (A) AND IN THE RANGE 0.04-7 MG/DAY (B).

FIGURE 5. AVERAGE 1OH-PYRENE AMOUNTS (NG). AND THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATION FOUND IN URINE PRODUCED 24 HOURS AFTER LAST INGESTION OF DOSES IN THE RANGE 0.04-49 MG/DAY (A) AND IN THE RANGE 0.04-7 MG/DAY (B)

FIGURE 6. PROPOSED FLOWCHART FOR USING 1-OH PYRENE (IN URINE OR MILK) AS A BIOINDICATOR OF ORAL EXPOSURE OF DAIRY RUMINANTS TO PYRENE AND TWELVE OTHER PAHS. SUCH APPROACH MIGHT BE USED WITH ANY OTHER BIONDICATOR AND FOR VARIOUS NUMBERS OF MOLECULAR CONGENERS DEPENDING ON AVAILABLE LITERATURE DATA

III. PUBLICATION 3: «EROD ACTIVITY IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND 1-HYDROXYPYRENE IN URINE OR MILK AS BIOINDICATORS OF EXPOSURE OF DAIRY

RUMINANT TO LONG TERM ORAL EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS».

FIGURE 1. AVERAGE EROD ACTIVITIES AND THEIR CORRESPONDING STANDARD DEVIATIONS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF GOAT DAILY EXPOSED, DURING 40 DAYS, TO 1 MG/DAY (▲) OR 49 MG/DAY (△) OF EACH OF THE FOLLOWING PAHS: PHENANTHRENE, PYRENE, BENZO[A]PYRENE. (N=3). CURVES WERE DERIVED FROM A LOGISTIC-LIKE MODEL AS DESCRIBED IN EQUATION 1 AND TABLE 1.

FIGURE 2. PLATEAU EROD ACTIVITY ACHIEVED VERSUS DAILY INGESTED PAHS DOSES (N=6 FOR DOSE 0 MG/DAY, N=3 FOR DOSES 1 AND 50 MG/DAY). CURVE WAS DERIVED FROM A MICHAELIS-MENTEN-LIKE CURVILINEAR MODEL AS DESCRIBED IN EQUATION 2 AND TABLE 2.

IV. PUBLICATION 4: «EROD ACTIVITY INDUCTION IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES, LIVER AND BRAIN TISSUS OF RATS SUBMITTED TO LONG TERM ORAL EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS»

FIGURE 1. EROD ACTIVITIES IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES (▲) AND LIVER (◇) OF CONTROL WISTAR RATS DAILY EXPOSED TO INGESTION OF NON CONTAMINATED OIL OVER 28 DAYS, (N=3).

FIGURE 2. EROD ACTIVITIES IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES (▲), BRAIN (○) AND LIVER (◇) OF WISTAR RATS DAILY EXPOSED, DURING 28 DAYS, TO 6 µG/DAY (A) OR 600 µG/DAY (B) OF EACH OF THE FOLLOWING PAHS: PHENANTHRENE, PYRENE, BENZO[A]PYRENE, (N=3)

FIGURE 3. FITTING OF EROD ACTIVITIES VERSUS DAYS OF EXPOSURE OF WISTAR RATS TO 6 µG/DAY (←) OR 600 µG /DAY (—) OF EACH OF THE FOLLOWING PAHS: PHENANTHRENE, PYRENE, BENZO[A]PYRENE, (N=3). PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES (A), LIVER (B), AND BRAIN (C). CURVES WERE DERIVED FROM A LOGISTIC-LIKE MODEL AS DESCRIBED IN EQUATION 1 AND TABLE 1

FIGURE 4. FITTING OF MAXIMAL EXPECTABLE EROD ACTIVITIES (PLATEAUS) VERSUS DAILY INGESTED DOSES OF EACH OF THE FOLLOWING PAHS: PHENANTHRENE, PYRENE, BENZO[A]PYRENE, BY WISTAR RATS. PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES (---), BRAIN (—) AND LIVER (←) CURVES WERE DERIVED FROM A MICHAELIS-MENTEN LIKE CURVILINEAR MODEL AS DESCRIBED IN EQUATION 2 AND TABLE 2

FIGURE 5. FITTING OF CYP4501B1 (A) AND CYP4501A1 (B) ACTIVITIES IN BRAIN VERSUS DAYS OF EXPOSURE OF WISTAR RATS TO 6 µG/DAY (←) OR 600 µG/DAY (—) OF EACH OF THE FOLLOWING PAHS: PHENANTHRENE, PYRENE, BENZO[A]PYRENE, (N=3). CURVES WERE DERIVED FROM A LOGISTIC-LIKE MODEL AS DESCRIBED IN EQUATION 1 AND TABLE 1

FIGURE 6. FITTING OF MAXIMAL EXPECTABLE CYP4501B1, CYP4501A1 AND CYP4501A1+CYP4501B1 ACTIVITIES (PLATEAUS) VERSUS DAILY INGESTED DOSES OF EACH OF THE FOLLOWING PAHS: PHENANTHRENE, PYRENE, BENZO[A]PYRENE, BY WISTAR RATS. CYP4501A1+CYP4501B1 (←), CYP4501A1 (—) AND CYP4501B1 (---) CURVES WERE DERIVED FROM A MICHAELIS-MENTEN LIKE CURVILINEAR MODEL AS DESCRIBED IN EQUATION 2 AND TABLE 2

FIGURE 7. CORRELATIONS BETWEEN EROD ACTIVITIES: LIVER VS. LYMPHOCYTES (A), BRAIN VS. LYMPHOCYTES (B), LIVER VS BRAIN (C) AND CORRELATION BETWEEN CYP1B1 AND CYP1A1 ACTIVITIES IN BRAIN (D) (N=42)

Liste de tableaux

APPROCHE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU 1. LISTE DES POP ETABLIE DANS LE CADRE DU PROTOCOLE D’AARHUS ET DE LA CONVENTION DE STOCKHOLM.	16
TABLEAU 2. TENEURS MAXIMALES EN BENZO(A)PYRENE DANS DIVERSES DENREES ALIMENTAIRES.	20
TABLEAU 3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES 16 HAP DE LA LISTE US-EPA.	22
TABLEAU 4. PRINCIPALES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DES XENOBIOTIQUES.	25
TABLEAU.5 PRINCIPALES REACTIONS DE PHASE I	29
TABLEAU.6 PRINCIPALES REACTIONS DE PHASE II	31
TABLEAU.7 ESTIMATION MOYENNE DE LA PRISE JOURNALIERE EN HAP PAR DIFFERENTES VOIES DE CONTAMINATION POUR UN ADULTE NON FUMEUR	36
TABLEAU 8. EVALUATIONS DES INGERES JOURNALIERS EN HAP PAR UNE VACHE LAITIERE DE 600 KG INGERANT 15 KG DE COUVERT VEGETAL (MATIERE SECHE) PAR JOUR. LES CONCENTRATIONS TROUVEES SUR LES DIVERS COUVERTS VEGETAUX ONT ETE UTILISEES POUR LE CALCUL.	39
TABLEAU 9. COMPARAISONS DES NIVEAUX DE CONTAMINATION EN HAP DE SOLS, EN ZONE RURALES PEU EXPOSEES ET ZONES URBAINES FORTEMENT EXPOSEES.	42
TABLEAU 10. COMPARAISON DES 16 HAP PRIORITAIRES DE L’US EPA AVEC LES 16 HAP PRIORITAIRES DE L’EFSA.....	43
TABLEAU 11. LIMITES BASSES (LB) ET HAUTES (UB) POUR LA CONCENTRATION MOYENNE EN $\mu\text{G/KG}$ DE 8 HAP IDENTIFIES DANS DES MELANGES DE GOUDRON DE HOUILLE ET LEURS PROPORTIONS RESPECTIVES AU-DELA DE LA LIMITE DE DETECTION (LOD) CORRESPONDANTE: ANALYSE DANS 4065 PRODUITS ALIMENTAIRES DIFFERENTS.	45
TABLEAU 12. CONCENTRATIONS EN BAP OU SOMMES DE HAP DANS DIVERSES DENREES ALIMENTAIRES ($\mu\text{G/KG}$).....	46
TABLEAU 13. REPARTITION DES KG EQUIVALENT LAIT CONSOMMES, EN 2006, 2007 ET 2008, PAR HABITANT EN SUISSE.	49
TABLEAU 14. ETUDES AYANT UTILISE DES METABOLITES DE HAP COMME BIOINDICATEURS D’EXPOSITION QUALITATIFS OU PSEUDO-QUANTITATIFS AUX HAP CHEZ DIFFERENTES ESPECES ET DANS DIFFERENTS COMPARTIMENTS.	59
TABLEAU 15. TAUX DE TRANSFERT MOYENS OBSERVES DE METABOLITES DE HAP DANS LE LAIT OU L’URINE SUR LA PLAGE 0-49 MG/J DE CHACUN DES 3 HAP INGERES	161
TABLEAU 16. TENEURS RELATIVES EN 13 HAP SUR 15 COUVERTS VEGETAUX DIFFERENTS.	165

APPROCHE EXPERIMENTALE**1. PUBLICATION 1: «1-OH PYRENE IN MILK AND URINE AS BIO-INDICATEUR OF POLYCYCLIQUE AROMATIQUE HYDROCARBONS EXPOSURE OF RUMINANTS»**

TABLEAU 1. 1-OH PYRENE CONCENTRATIONS IN MILK AND % RECOVERY OF INGESTED PYRENE UNDER THE 1-OH PYRENE FORM WITH THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATIONS.

TABLEAU 2. 1-OH PYRENE CONCENTRATIONS IN URINE AND % RECOVERY OF INGESTED PYRENE UNDER THE 1-OH PYRENE FORM WITH THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATIONS.

II. PUBLICATION 2: «EVALUATION OF SMALL DAIRY RIUMINANT EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS: A BIOMARKER APPROACH».

TABLEAU 1. 1-OH PYRENE CONCENTRATIONS, TRANSFER RATE AND AVERAGE TRANSFER RATES IN MILK WITH THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATIONS.

TABLEAU 2. 1-OH PYRENE CONCENTRATIONS, TRANSFER RATES AND AVERAGE TRANSFER RATES IN URINE WITH THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATIONS

TABLEAU 3. 1, 2, 3 AND 4OH-PHENANTRENE CONCENTRATIONS IN URINE AND THEIR AVERAGE TRANSFER RATES OF WITH THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATIONS

TABLEAU 4. 3-OH BENZO[A]PYRENE CONCENTRATIONS IN URINE AND % RECOVERY OF INGESTED BENZO[A]PYRENE UNDER THE 3-OH BENZO[A]PYRENE FORM WITH THEIR ASSOCIATED STANDARD DEVIATIONS

TABLEAU 5. SUMMARIZED REGRESSION ANALYSIS DATA OVER THE EXPERIMENTAL DOMAIN (0.04-49 MG/DAY) FOR ANALYZED AMOUNTS OF PAH METABOLITES (IN NG) IN MILK OR URINE AS A FUNCTION OF DAILY INTAKES EXPRESSED IN MG WITH EACH DATA POINT CORRESPONDING TO A GOAT

TABLEAU 6. RESPECTIVE % OF 13 PAHS QUANTIFIED ON VARIOUS VEGETAL COVERS (F: FLUORENE, PH:PHENANTHRENE, AN: ANTHRACENE, FL:FLUORANTHENE, PY: PYRENE, BAA: BENZO(A)ANTHRACENE, CHR:CHRYSENE, BEP:BENZO(E)PYRENE, BBF:BENZO(B)FLUORANTHENE, BKF:BENZO(K)FLUORANTHENE, BAP: BENZO[A]PYRENE, BPR: BENZO(G,H,I)PERYLENE, INP:INDENO(1,2,3-CD)PYRENE).

III. PUBLICATION 3: «EROD ACTIVITY IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND 1-HYDROXYPYRENE IN URINE OR MILK AS BIOINDICATORS OF EXPOSURE OF DAIRY RUMINANT TO LONG TERM ORAL EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS».

TABLEAU 1. DETAILS ON EROD ACTIVITY AND THEIR STANDARD ERROR OF THE MEAN VERSUS TIME OF EXPOSURE AND DOSE OF INGESTED PYRENE, PHENANTHRENE AND BENZO[A]PYRENE.

TABLEAU 2. KINETIC PARAMETERS AND THEIR ASSOCIATED 95% CONFIDENCE BOUNDS APPLIED TO EQUATION 1 DESCRIBING EROD INDUCTION VERSUS TIME IN GOAT PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES..

TABLEAU 3. PARAMETERS AND THEIR ASSOCIATED 95% CONFIDENCE BOUNDS APPLIED TO EQUATION 2 DESCRIBING EROD INDUCTION IN GOAT PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AS A FUNCTION OF THE DAILY INGESTED DOSE OF PHENANTHRENE, PYRENE AND BENZO[A]PYRENE

TABLEAU 4. TRANSFER OF PYRENE UNDER 1-OH PYRENE FROM TOWARD MILK AND URINE

IV. PUBLICATION 4: «EROD ACTIVITY INDUCTION IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES, LIVER AND BRAIN TISSUS OF RATS SUBMITTED TO LONG TERM ORAL EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS»

TABLEAU 1. KINETIC PARAMETERS APPLIED TO EQUATION 1 DESCRIBING (I) EROD ACTIVITY INDUCTION IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES, LIVER AND BRAIN TISSUES AND (II) CYP450 1A1 AND CYP450 1B1 ACTIVITY INDUCTION IN BRAIN

TABLEAU 2. COMPARISON OF MAXIMUM EROD ACTIVITIES AEROD MAX PER MG OF PROTEIN WITH MAXIMUM EROD ACTIVITIES AEROD MAX PER RAT IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES, LIVER AND BRAIN

TABLEAU 3. KINETIC PARAMETERS APPLIED TO EQUATION 2 DESCRIBING EROD ACTIVITY INDUCTION IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES, LIVER AND BRAIN AS WELL AS CYP450 1A1 AND 1B1 ACTIVITY INDUCTION IN BRAIN AS A FUNCTION OF THE DAILY INGESTED DOSE OF PHENANTHRENE, PYRENE AND BENZO[A]PYRENE

↳ Métabolisme du phénanthrène

Le métabolisme du phénanthrène vu par Sutherland et al. (1991) est présenté en Figure 14. Grimmer et al. (1993) ont analysé des phénanthrènes hydroxylés GC-MS. Popp et al. (1997) en ont fait de même par HPLC. Diverses formes d'hydroxyphénanthrène (1, 2, 3, 4 ou 9-OH) et phénanthrène dihydrodiols ont été identifiées par Heudorf et Angerer (2001), par HPLC -fluorimétrie, dans l'urine de fumeurs et non fumeurs.

Ces analyses ont permis d'établir une relation pseudo-quantitative entre le nombre de cigarettes fumées par jour et les quantités de métabolites retrouvées dans l'urine.

Jacob et al. (1999) ont trouvé une proportion plus faible de phénanthrène 1, 2 dihydrodiol et de phénanthrène 3, 4 dihydrodiol chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Ceci laisse à penser que le tabagisme provoque la formation de 3,4-dihydrodiol phénanthrène via l'induction du cytochrome P450 1A2.

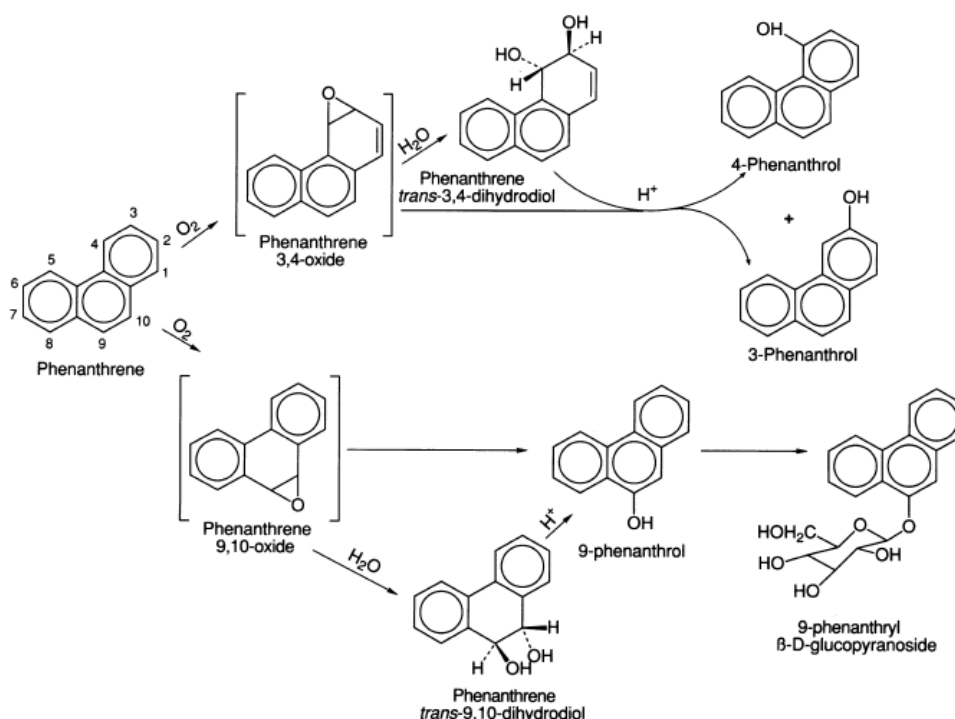


Figure 14. Métabolisme du phénanthrène (Sutherland et al, 1991)

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Alain PARIS, Directeur de Recherche, INRA-AgroParis TECH, Paris

**Monsieur Carlos SIMOES-NUNES, Directeur de Recherche, DSM Nutritional Products,
Villange Neuf**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame CHAHIN Abir

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Bioindicateurs métaboliques de l'exposition des ruminants laitiers aux Hydrocarbures
Aromatiques Polycycliques (HAP). Domaines scientifiques : biochimie, métabolisme des
xénobiotiques, biologie animale"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 15 juin 2010

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants organiques persistants (POP) issus d'une combustion incomplète de matière organique, d'origine naturelle (incendies de forêt) et anthropique (chauffage au gaz, trafic routier, industrie...). La consommation par les animaux d'élevage de couverts végétaux et sols contaminés en HAP, couplée à une forte lipophilie de ces derniers, constitue un risque potentiel en terme de contamination des produits animaux (lait, viande, œufs...). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'exposition du ruminant laitier aux HAP au travers de l'utilisation de biomarqueurs métaboliques d'exposition orale aux HAP. Nous avons tout d'abord testé l'aptitude du 1-hydroxypyrene dans l'urine et/ou le lait à être utilisé comme biomarqueur métabolique spécifique d'exposition orale et subchronique (7 jours, 40 jours) de la chèvre au mélange : phénanthrene, pyrene, benzo(a)pyrene. Ceci en utilisant de l'huile comme vecteur de contamination sur la plage 0.04-50 mg/jour de chacun des 3 HAP. Les résultats démontrent entre autres que (i) le 1-hydroxypyrene est excrété de manière proportionnelle au niveau d'exposition sur toute la plage d'exposition testée dans le lait (taux de transfert stable de l'ordre de 1% dans le lait et 10% dans l'urine) ; (ii) qu'un plateau d'excrétion est obtenu au plus tard 10 jours après le début de l'exposition. La seconde partie de ce travail a permis de démontrer le potentiel de l'activité ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) dans les lymphocytes périphériques sanguins (LPS) à être utilisé comme un biomarqueur d'exposition orale aspécifique du ruminant laitier aux POP CYP450 inducteurs, dont certains HAP. Des cinétiques d'induction EROD lymphocytaire par exposition orale aux HAP ont ainsi pu être modélisées par un modèle de type logistique sur 40 jours d'exposition suivis de 10 jours post-exposition. Une ébauche de courbe dose-réponse de type Michaelis-Menten a par ailleurs pu être déterminée, autorisant plusieurs commentaires relatifs au métabolisme des HAP par le ruminant laitier. Une dernière étude cinétique, menée chez le rat en mode subchronique sur 32 jours, a finalement permis, entre autres, de mettre en évidence une bonne corrélation entre les activités EROD dans les lymphocytes sanguins périphériques, le foie et le tissu cérébral. L'ensemble des résultats obtenus démontre la pertinence de l'usage combiné de l'activité EROD lymphocytaire et du 1-OH pyrene dans le lait ou l'urine comme outils d'évaluation pratiques et accessibles du risque lié à l'ingestion de POP par les ruminants laitiers.

Mot clés : biomarqueur d'exposition, 1-hydroxypyrene, EROD, ruminant laitier, évaluation du risque.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are persistent organic pollutants (POP) produced during the incomplete burning of organic materials. Their production can be of natural origin (forest fire) or anthropic origin (gas heating, vehicular traffic, industry). The ingestion of PAH contaminated vegetal covers or soils by farm animals, coupled with the high lipophilicity of these PAH, therefore represents a potential hazard in terms of contamination of animal products (milk, meat, eggs...). In the present work, we focused on the evaluation of the dairy ruminant exposure to PAH through the use of metabolic biomarkers of exposure. At first we tested the potential of 1-hydroxypyrene excreted in urine or milk to be used as a metabolic and specific biomarker of subchronic (7 to 40 days) and oral exposure of the goat to a ternary mixture consisting of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene. Each PAH was solubilized in oil to reach contamination levels in the range 0.04-50 mg/day. Results demonstrate that (i) 1-hydroxypyrene excretion in milk and urine is proportional to the level of exposure all along the tested exposure range (stable transfer rates of 1-OH pyrene: about 1% in milk and 10% in urine); (ii) excretion of 1-OH pyrene reached a plateau at the latest 10 days after the beginning of exposure. In the second part of this work, it was demonstrated that the ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity, when measured in peripheral blood lymphocytes (PBL), can be used as a convenient and non-specific biomarker of oral and chronic exposure of dairy ruminant to CYP 450 inducing POP, such as many PAH. Induction kinetic of EROD activity PBL could be fitted with a logistic-like model over 40 days of exposure followed by 10 days post-exposure. An approximate dose/response curve could be fitted using a Michaelis-Menten-like model, allowing for several comments about the metabolism of PAH in dairy ruminant. A final kinetic study, which was run on rats under subchronic conditions (32 days), next to other results, showed a good correlation between EROD activities in PBL, liver and brain. Achieved results demonstrate the relevance of the combined use of the EROD activity in PBL and of the 1-OH pyrene in milk or urine as convenient and cost-limited tools for risk assessment in terms of PAH and more generally POP ingestion by dairy ruminants.

Key words: biomarker of exposure, 1-hydroxypyrene, EROD, dairy ruminant, risk assessment.