


UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTERISATION IN VITRO DES INTERACTIONS
METABOLIQUES ENTRE LE N-HEXANE, LE TOLUENE, LE
CYCLOHEXANE ET L'ISOOCTANE CHEZ LE RAT



MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
IMANE NECHAD

SEPTEMBRE 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Voilà enfin la partie la plus facile à écrire, voici le temps des remerciements.

Ces années de maîtrise ont été riches pour moi que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain. Je tiens alors à remercier de nombreuses personnes pour cela.

Ma plus grande reconnaissance et ma gratitude à mon directeur de recherche, le docteur Sami Haddad. Je le remercie d'avoir été un directeur disponible pour ce projet de maîtrise et plus encore de m'avoir montré ce qu'était le monde de la recherche. Je remercie aussi mon professeur et mon codirecteur le docteur Kannan Krishnan pour son soutien.

Mes vifs remerciements s'adressent au docteur Robert Tardif pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire ainsi que pour m'avoir traitée comme l'une de ses étudiantes.

Je tiens aussi à remercier très sincèrement une formidable personne, madame Ginette Charest-Tardif, sans qui ce mémoire ne serait pas ce qu'il est. Son soutien inégalé, son encadrement judicieux et sa bonne humeur m'ont beaucoup inspirée.

Une dédicace spéciale à ma merveilleuse amie et ma fidèle collègue Mouna. Je tiens à la remercier pour sa très grande générosité, sa sincérité et son soutien sans équivoque. Merci Mouna pour tout ce que tu as fait pour moi, ton amitié est le bien le plus précieux que j'ai eu durant ces années de maîtrise.

Ma profonde gratitude et mon amour sans limite à ma très chère mère, mon adorable papa, mon mari Khalid, mes magnifiques sœurs et mon frère, tous les mots de reconnaissance ne peuvent exprimer ce que je ressens pour eux.

Merci à Dieu.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	i
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I	
COMPOSÉ À L'ÉTUDE.....	3
1.1. n-Hexane.....	4
1.1.1. Caractéristiques physicochimiques.....	4
1.1.2. Sources d'exposition.....	5
1.1.3. Toxicocinétique.....	5
1.1.4. Toxicité.....	7
1.2. Toluène.....	8
1.2.1. caractéristiques physicochimiques.....	8
1.2.2. Sources d'exposition.....	10
1.2.3. Toxicocinétique.....	10
1.2.4. Toxicité.....	12
1.3. Cyclohexane.....	14
1.3.1. Caractéristiques physicochimiques.....	14
1.3.2. Sources d'exposition.....	15
1.3.3. Toxicocinétique.....	15
1.3.4. Toxicité.....	18
1.4. Isooctane.....	18
1.4.1. Caractéristiques physicochimiques.....	18
1.4.2. Sources d'exposition.....	18
1.4.3. Toxicocinétique.....	19
1.4.4. Toxicité.....	21

CHAPITRE II	
L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES.....	23
CHAPITRE II	
MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE À BASE PHYSIOLOGIQUE (PBPK)	
ET INTERACTIONS.....	26
3.1. Absorption.....	29
3.1.1. Transport passif.....	29
3.1.2. Transport actif.....	30
3.2. Distribution.....	30
3.3. Excrétion.....	31
3.4. Métabolisme.....	31
3.4.1 Interactions métaboliques.....	34
3.4.2 Inhibition métaboliques.....	35
CHAPITRE IV	
ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DU MÉTABOLISME.....	40
CHAPITRE V.....	
PROBLÉMATIQUE.....	43
CHAPITRE V	
OBJECTIF DE RECHERCHE.....	45
CHAPITRE VII	
ARTICLE.....	47
7.1. Résumé.....	50
7.2. Introduction.....	51
7.3. Objectif.....	52
7.4. Matériels et méthodes.....	52
7.4.1 Animaux et produits chimiques.....	52
7.4.2 Préparation des microsomes.....	53
7.4.3 Détermination des coefficients de partage.....	54
7.4.4 Incubations microsomales.....	55
7.4.5 Analyses chimiques.....	56
7.5. Résultats.....	57

7.5.1 Estimation des coefficients de partage	57
7.5.2 Linéarité.....	58
7.5.3 Cinétique enzymatique substances seules.....	59
7.5.4 Cinétique enzymatique mélanges binaires.....	59
7.6. Discussion	60
7.8. Références Bibliographiques :	63
7.9. Légendes des figures.....	66
CHAPITRE VIII	
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	80
8.1. Le coefficient de partage.....	80
8.2. Les paramètres métaboliques K_m et V_{max}	81
8.3. Les interactions métaboliques	82
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	84
BIBLIOGRAPHIE	85

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1. 1 Voies métaboliques de l'hexane USEPA (2005b)	9
Figure 1. 2 Voies métaboliques du toluène. Tiré de Pierce et <i>al.</i> (2002).....	13
Figure 1. 3 Voies métaboliques du cyclohexane. Tiré de Perbellini.L et Brugnone.F. (1980).....	17
Figure 1. 4 Voies métaboliques de l'ISO. Tiré de Charbonneau et <i>al.</i> (1987)	22
Figure 1. 5 Représentation conceptuelle du modèle PBPK pour la distribution du TOL dans le corps tiré de Xiaozhong et <i>al</i> (1989).	28
Figure 1. 6 Représentation schématique de la disposition du toxique et de son effet chimique (Klaaseen 2001)	33
Figure 1. 7 Principales étapes de la méthode d'équilibration de fiole	42
Figure 7. 1 Variation de la concentration d'HEX (A), CHX (B), ISO (C), TOL (D) en fonction du temps d'incubation.....	68
Figure 7. 2 Profil temporel du n-hexane dans le milieu d'incubation pour un temps de 45 min.....	69
Figure 7. 3 Représentation en Michaelis - Menten du taux de métabolisme (V) en fonction de la concentration en substrat pour le TOL (A), l'HEX (B) et le CHX (C).....	70
Figure 7. 4 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet du HEX sur le métabolisme du TOL	72
Figure 7. 5 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet du CHX sur le métabolisme du TOL	73
Figure 7. 6 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet de l'ISO sur le métabolisme du TOL	74

Figure 7. 7 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet du TOL sur le métabolisme du HEX.....	75
Figure 7. 8 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet du CHX sur le métabolisme du HEX.....	76
Figure 7. 9 Représentation par graphique deDixon de l'effet de l'ISO sur la biotransformation du HEX.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1. 1 Principales caractéristiques physicochimiques de l'HEX ^a	1
Tableau 1. 2 Coefficients de partage tissu : air de l'HEX chez l'humain et chez le rat	1
Tableau 1. 3 Principales caractéristiques physicochimiques du TOL ^a	1
Tableau 1. 4 Principales caractéristiques physicochimiques du CHX ^a	1
Tableau 1. 5 Les coefficients de partages tissu :air, sang :air, saline :air et huile :air du CHX	1
Tableau 1. 6 Principales caractéristiques physicochimiques de l'ISO ^a	1
Tableau 7. 1 Estimation du coefficient de partage du TOL, HEX, CHX et ISO.	1
Tableau 7. 2 Constantes métaboliques (Vmax et Km) du TOL, HEX, et CHX	1
Tableau 7. 3 Types d'inhibitions observées entre TOL, HEX, CHX et ISO.....	1

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> (États-Unis)
¹⁴ C	Carbone-14
CAS	le numéro du <i>Chemical Abstract Service</i>
CHX	Cyclohexane
C	Concentration
Ca	Concentration artérielle
Cair	Concentration dans l'air de la fiole
Cexh	Concentration dans l'air exhalé
Cinh	Concentration dans l'air inhalé
Cm	Concentration dans la matrice d'incubation
Cv	Concentration dans le sang veineux
Cvf	Concentration dans le sang veineux quittant le foie
Cvg	Concentration dans le sang veineux quittant le gras
Cvm	Concentration dans le sang veineux quittant le muscle
Cvr	Concentration dans le sang veineux quittant les tissus richement perfusés
CO	Monoxyde de carbone
¹⁴ CO ₂	Dioxyde de carbone radiomarqué au carbone-14
COVs	Composés organiques volatils
CYP	Cytochrome P450
E	Enzyme
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ES	Complexe enzyme-substrat
ESI	Complexe enzyme-substrat-inhibiteur
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GC	Chromatographie en phase gazeuse
G6PO ₄	Glucose-6-phosphate déshydrogénase

2,5-HD	2,5-hexanedione
HEX	Hexane
I	Inhibiteur
INRS	Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents de travail et des maladies professionnelles (France).
ISO	Isooctane
KH_2PO_4	Phosphate de potassium monobasique
K_2HPO_4	Phosphate de potassium dibasique
K_i	Constante d'inhibition
K_{iCH}	Constante d'inhibition du cyclohexane sur le métabolisme de l'hexane
K_{iCT}	Constante d'inhibition du cyclohexane sur le métabolisme du toluène
K_{iHT}	Constante d'inhibition de l'hexane sur le métabolisme du toluène
K_{iTH}	Constante d'inhibition du toluène sur le métabolisme de l'hexane
K_{iIH}	Constante d'inhibition de l'isooctane sur le métabolisme de l'hexane
K_{iIT}	Constante d'inhibition de l'isooctane sur le métabolisme du toluène
K_m	Constante d'affinité Michaëlis-Menten
K_{ow}	Coefficient de partage n-octanol:eau
MEK	Méthyl éthyle cétone
MgCl_2	Le chlorure de magnésium
β -NADP	le β -Nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate
P_{alk}	Coefficient de partage alkamuls :air
PBPK	Pharmacocinétique à base physiologique
P cerveau :air	Coefficient de partage cerveau : air
P coeur :air	Coefficient de partage cœur :air
P foie :air	Coefficient de partage foie :air
P graisses :air	Coefficient de partage graisse :air
P huile d'olive :air	Coefficient de partage huile d'olive :air
P_m :air	Coefficient de partage milieu : air
P_{micr}	Coefficient de partage microsomes :air

P muscle :air	Coefficient de partage muscle air
P poumon :air	Coefficient de partage poumon :air
P rein :air	Coefficient de partage rein :air
P saline :air	Coefficient de partage saline :air
P sang :air	Coefficient de partage sang :air
Ptp	Coefficient de partage tampon :air
Q	Débit
Qalv	Débit alvéolaire
Qf	Débit sanguin au tissu adipeux
Qg	Débit sanguin au gras
Qm	Débit sanguin aux muscles
Qr	Débit sanguin aux tissus richement perfusés
Qtotale	Quantité de substance dans la fiole
S	Substrat
SD	<i>Sprague - Dawley</i>
SNC	Système nerveux central
TOL	Toluène
V	Vitesse de biotransformation
Valk	Volume d'Alkamuls dans la fiole
Vfi	Volume de la fiole
Vmax	Vitesse maximale de biotransformation
Vmicrs	Volume des microsomes dans la fiole
Vs	Volume de la solution d'incubation
Vt	Volume totale dans la fiole
Vtp	Volume du tampon dans la fiole
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency (Etats-Unis)</i>

RÉSUMÉ

Le toluène (TOL), le n-hexane (HEX), le cyclohexane (CHX) et l'isooctane (ISO) sont des composés organiques volatils (COVs) omniprésents dans les milieux industriels et résidentiels. L'exposition aux mélanges soulève de nombreuses interrogations en regard des possibilités d'interaction. L'inhibition métabolique étant le mécanisme d'interaction le plus plausible, pourrait aboutir à une augmentation de leur concentration interne et donc de leur toxicité. L'objectif de cette étude était de caractériser les interactions métaboliques entre le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO, en utilisant les préparations microsomiales de foie de rat. Nous avons donc étudié le potentiel d'inhibition du métabolisme du TOL par HEX, CHX et ISO, aussi bien que l'inhibition du métabolisme du HEX par TOL, CHX et ISO. Initialement, la mesure du coefficient de partage milieu : air (P_m :air) a aussi été faite pour permettre une estimation des concentrations des inhibiteurs et des substrats dans le milieu d'incubation (CHX : 0,23 ISO : 0,21, TOL : 2,35 et HEX : 0,04). Aussi en mesurant le taux de disparition des substrats par chromatographie en phase gazeuse après des incubations de 45 min. pour TOL et de 4 min. pour HEX, le taux de métabolisme a été déterminé pour ces 2 composés incubés individuellement ou en présence des autres COVs. Les résultats suggèrent que le métabolisme du TOL est inhibé de façon compétitive par HEX et de façon incompétitive par CHX et ISO (K_i égale respectivement 0,49, 1,84 et 1,798 μM). L'inhibition de HEX par TOL est de type mixte ($K_i = 4,5339 \mu\text{M}$), alors que le CHX et l'ISO agissent sur le métabolisme de l'HEX par inhibition compétitive (K_i respectif de 0,75 et 1,54 μM). Ces données *in vitro* sur les interactions métaboliques pourront être intégrées dans un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) pour prédire la dose interne résultant d'une exposition à ces mélanges chimiques.

Mots-clés : toluène, hexane, cyclohexane, isooctane, métabolisme *in vitro*

INTRODUCTION GENERALE

Les humains sont exposés directement ou indirectement et de façon quotidienne à des contaminants environnementaux d'origines diverses, (toxines végétales et animales, dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvants, colorants, etc.). Ces substances sont susceptibles de présenter un risque de toxicité, soit en raison de leurs propriétés physico-chimiques ou en raison de leur réactivité chimique. Compte tenu de la grande diversité de ces xénobiotiques, les êtres vivants doivent donc disposer d'un ensemble diversifié d'enzymes permettant leur détoxification ou facilitant leur élimination.

Les composés organiques volatils (COVs) font partie de ces polluants de l'environnement qui, par leur volatilité, ont la faculté de s'évaporer de leur milieu d'émission pour se retrouver ultérieurement dans l'organisme. Une fois absorbés, ils se distribuent dans différents tissus du corps dont le foie où se déroulent les réactions de biotransformation majoritairement catalysées par des cytochromes P450. Ces réactions s'inscrivent dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme.

L'exposition aux contaminants implique très souvent plus qu'une substance, et quoique que nous connaissions bien les profils toxicologiques et toxicocinétiques de plusieurs contaminants industriels, nos connaissances demeurent cependant fort limitées en ce qui a trait aux conséquences pouvant découler d'expositions concomitantes. De telles expositions sont susceptibles de mener à des interférences toxicocinétiques. Ces interférences peuvent modifier sensiblement le processus de détoxification des substances impliquées et conséquemment, le risque toxique qui s'y rattache.

Toutefois, en général, les auteurs s'accordent à dire que l'inhibition métabolique représente le mécanisme principal à l'origine de la plupart des interactions toxicocinétiques (Tardif et al. 1997). Dans une revue étendue de la littérature, Krishnan et Brodeur (1991) ont relevé

qu'une vaste majorité des interactions toxicocinétiques résultait des interactions métaboliques (c.-à-d., inductions ou inhibitions de la biotransformation) causées par certains composants des mélanges. De telles interactions peuvent causer une modulation de la dose tissulaire en produits chimiques menant ainsi à une modification du risque de toxicité des composants du mélange. Prenant comme exemple l'HEX, les observations expérimentales et cliniques ont suggéré que la neurotoxicité de l'HEX pourrait être augmentée par l'administration simultanée d'autres solvants, et le TOL en est un (Perbellini *et al.* 1982, Iwata *et al.* 1983, Xiaozhong *et al.* (1998).

Dans le présent projet, nous avons tenté d'investiguer les interactions métaboliques et plus particulièrement la possibilité d'une inhibition métabolique entre quatre composés organiques volatils : le toluène (TOL), l'hexane (HEX), le cyclohexane (CHX) et l'isooctane (ISO).

CHAPITRE I

COMPOSÉ À L'ÉTUDE

Le TOL, l'HEX, l'ISO et le CHX sont des composés organiques volatils (COVs). Ces hydrocarbures ont un faible poids moléculaire et des caractéristiques physicochimiques plus ou moins similaires. Ils ont la propriété commune de se volatiliser rapidement à température ambiante. Ils peuvent se trouver dans plusieurs types de matériaux et produits de rénovation. Leur plus large utilisation émane de l'industrie des peintures et des revêtements. Viennent ensuite les adhésifs, les encres d'imprimerie et les nettoyants industriels des métaux. Précisons qu'une quantité importante peut s'évaporer dans le cadre de leur utilisation.

1.1. n-Hexane

1.1.1. Caractéristiques physicochimiques

L' HEX est un hydrocarbure saturé de la famille des alcanes, constitué de six atomes de carbone. C'est un liquide incolore, très volatil, ayant une odeur d'hydrocarbures semblable à celle des carburants (INRS 2008a) il est pratiquement insoluble dans l'eau (environ 9,5 mg/l à 25°C), ses principales caractéristiques physicochimiques sont décrites dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 Principales caractéristiques physicochimiques de l'HEX^a

Caractéristiques	Hexane
CAS	110-54-3
Formule chimique	C ₆ H ₁₄
Masse molaire	86,17
Densité	0,659 g/ml
Apparence	Liquide incolore ayant une odeur de carburants
Point de fusion	-94,3 °C
Point d'autoinflammation	225 °C
Solubilité dans l'eau	9,5mg/l (à 25°C)
Tension de vapeur	150 mm Hg (à 25°C)
Log du Kow	3,29

^a valeurs tirées de l'USEPA (2005b) et de l'INRS (2010)

1.1.2. Sources d'exposition

L'HEX est un solvant ubiquitaire largement utilisé dans l'industrie chimique et alimentaire, sous forme pure ou comme composant de mélanges commerciaux. Il est utilisé dans l'extraction des huiles végétales, dans la fabrication des polyoléfines, des caoutchoucs synthétiques et des produits pharmaceutiques. Il fait partie de la formulation de divers produits, notamment les colles, les peintures et les encres d'imprimerie. Hautement purifié, l'HEX peut être utilisé comme phase mobile dans les séparations chromatographiques (USEPA 2005b).

1.1.3. Toxicocinétique

1.1.3.1. Absorption

Compte tenu de sa grande volatilité, l'HEX est absorbé essentiellement par la voie respiratoire. Mutti *et al.* (1984) ont mesuré l'HEX dans l'air inhalé et expiré de 10 travailleurs qui ont l'habitude d'inhaler des vapeurs de solvants pendant leur quart de travail dans une usine de chaussures. Les auteurs ont énoncé que le taux d'absorption était d'environ 17%..

D'autres preuves d'absorption après une exposition par inhalation de l'HEX ont été mises en évidence par la présence de métabolites de l'HEX dans les urines. Veulemans *et al.* (1982) ont étudié l'absorption respiratoire et l'élimination de l'HEX chez des volontaires sains de sexe masculin. Les sujets ont été exposés au repos à 360 ou 720 mg/m³ (102 ou 204 ppm) et l'air inspiré et expiré a été contrôlé et des échantillons de sang ont été recueillis. Les auteurs ont signalé qu'au repos, environ 22 à 24% de l'hexane inhalé est absorbé par les poumons, ce taux augmentant avec l'augmentation de l'activité physique.

L'HEX peut aussi être absorbé par la voie orale (Baelum et al.1998; Ono et al, 1981; Krasavage et al, 1980), ou par la voie cutanée. Cependant, cette dernière mesurée *in vitro* sur la peau humaine est faible (0,83 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2/\text{h}$) (INRS 2008)

1.1.3.2. Distribution

L'HEX est absorbé rapidement par les poumons et distribué largement dans le corps vers divers organes entre autre les poumons, le cerveau, les reins, le tissu adipeux et le foie qui est le site majeur du métabolisme. Des études chez l'humain (Perbellini et al. 1985) et chez le rat (Gargas et al.1989) ont rapporté des coefficients de partage tissus :air semblables entre les deux espèces (Tableau 1 2).

Tableau 1. 2 Coefficients de partage tissu : air de l'HEX chez l'humain et chez le rat

Tissu	Coefficient de partage	
	Rat ^a	Humain ^b
muscle	5,0	2,9
foie	5,2	5,2
graisse	104	159

^a Perbellini et al 1985

^b Gargas et al 1989

1.1.3.3 Métabolisme

L'HEX est principalement métabolisé dans le foie. Deux voies de métabolisme sont mises en jeu (Figure 1.1) : une bioactivation en 2-hexanol, et une détoxication en 1- ou 3-hexanol, toutes les deux catalysées par les cytochromes P450 (CYP). Deux isozymes sont impliqués

dans la conversion de l'HEX en ses produits métaboliques : le CYP 2E1 et le CYP 2B1. Plusieurs groupes de recherche ont démontré dans leurs études *in vivo* que le CYP 2E1 est impliqué dans la biotransformation de l'HEX en 2, 5-hexanedione (Iba *et al.* 2000; Nakajima *et al.* 1991). Des études *in vitro* menées par Toftgard *et al.* (1986) et Crosbie *et al.* (1997) ont indiqué l'implication du CYP 2B1 dans l'hydroxylation de l'HEX en trois métabolites intermédiaires : 2-, 3-, et 1-hexanol.

1.1.3.4. Élimination

Chez l'homme, une partie de l'HEX absorbé (jusqu'à 10%) (Muti *et al.* 1984) est éliminée sous forme inchangée dans l'air expiré. Cette élimination est rapide et biphasique. La demi-vie d'excrétion des métabolites urinaires est de 13 à 14h (Perbellini *et al.* 1981, 1986). Plusieurs études menées chez des volontaires humains ou des travailleurs exposés à l'HEX (Saito *et al.* 1991; Cardona *et al.* 1993; Mayan *et al.* 2001 et Dos Santos *et al.* 2002) ont révélé une augmentation significative du 2,5-hexanedione dans les urines durant l'exposition, ainsi que durant les quelques heures qui ont suivi. Chez l'animal, Bus *et al.* (1982) ont remarqué que des rats exposés au ^{14}C -hexane éliminent plus de 50% du carbone par expiration sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ ou par excrétion urinaire.

1.1.4. Toxicité

La toxicité aigue de l'HEX est relativement faible. Il est un dépresseur du système nerveux central (SNC), ainsi qu'un irritant respiratoire et cutanée. L'exposition répétée ou à long terme à l'HEX peut induire une irritation respiratoire, des atteintes pulmonaires et des lésions testiculaires, ainsi qu'une neuropathie périphérique qui peut progresser vers la paralysie et éventuellement une quadriplégie. La valeur limite d'exposition professionnelle aux États-Unies est de 50 ppm (INRS 2008).

1.2. Toluène

1.2.1. caractéristiques physicochimiques

Le TOL est un hydrocarbure aromatique sous forme d'un liquide transparent d'odeur caractéristique douceâtre rappelant celle des dissolvants de peinture. Il est moyennement soluble dans l'eau (590 mg/l à 25°C) et miscible à de nombreux solvants organiques (acétone, chloroforme, ethanol). Il est aussi un excellent solvant naturel ou de synthèse (huiles, graisses, résines). Ses principales caractéristiques physicochimiques sont décrites dans le tableau 1.3.

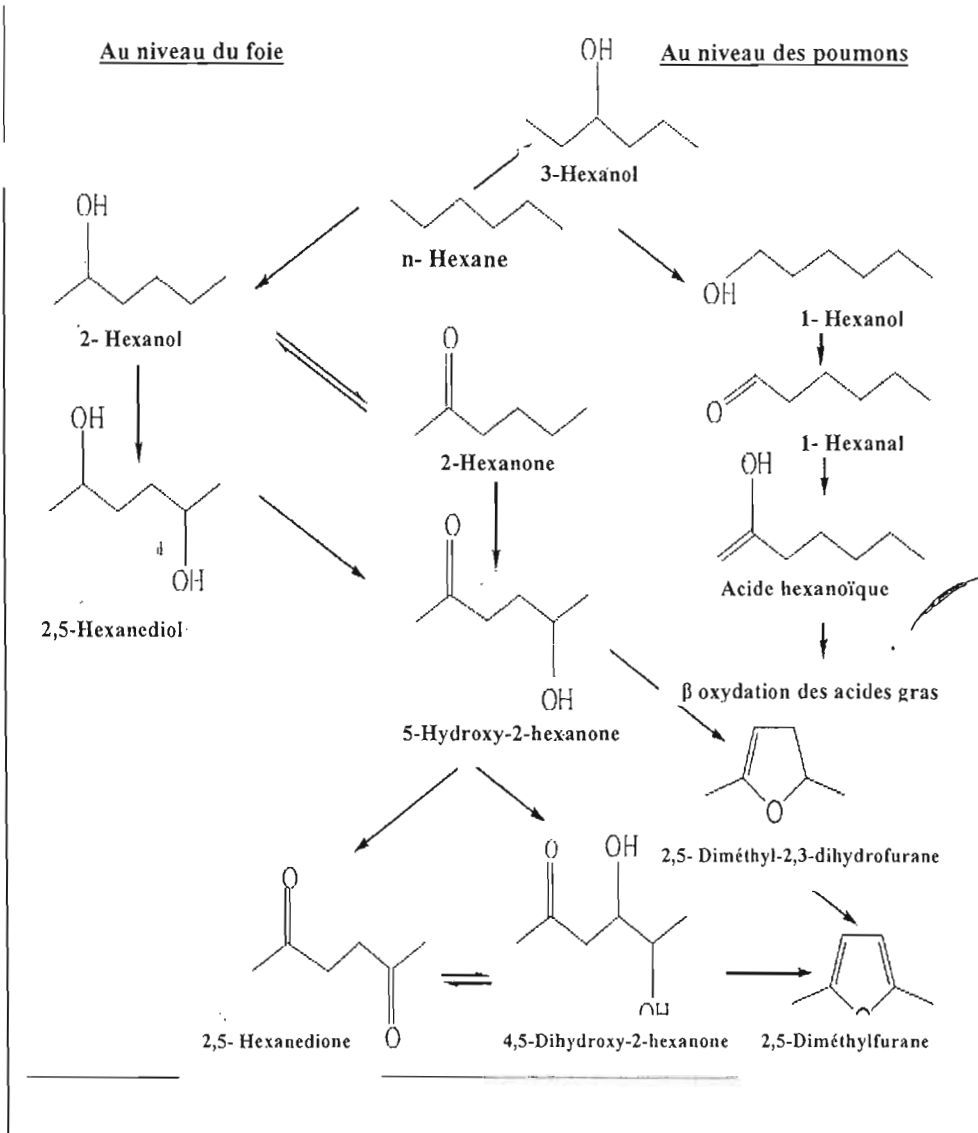


Figure 1. 1 Voies métaboliques de l'hexane USEPA (2005b)

1.2.2. Sources d'exposition

Le TOL est l'un des solvants organiques industriels les plus populaires. Faisant partie intégrante de la composition de la gazoline, il est aussi un ingrédient des diluants et un intermédiaire de synthèse de plusieurs produits chimiques (Fishbein 1985). On le retrouve dans de nombreux produits pétroliers. Il est aussi un composant intégral des vernis, encres d'imprimerie, colles, cires et solvants pour peintures. Par ailleurs, le TOL est utilisé comme solvant d'extraction dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique (ATSDR 2000).

1.2.3. Toxicocinétique

1.2.3.1. Absorption

Chez l'homme et l'animal, l'absorption pulmonaire du TOL est rapide. Il apparaît dans le sang après 10 à 15 minutes d'exposition, avec une forte corrélation entre la concentration alvéolaire et la concentration sanguine. Le taux d'absorption est fortement influencé par le taux de ventilation pulmonaire (INRS 2008b)

Le TOL est absorbé complètement par le tractus gastro-intestinal de l'homme et du rat (ATSDR 2000), tandis qu'il est absorbé lentement à travers la peau humaine (14 à 23 mg/cm²/h) avec des variations individuelles importantes. Chez l'animal, le taux de pénétration cutanée est faible pour le toluène liquide et pratiquement inexistant pour la forme vapeur (INRS 2008b).

Tableau 1.3 Principales caractéristiques physicochimiques du TOL^a

Caractéristiques	Toluène
CAS	108-88-3
Formule chimique	C ₆ H ₅ CH ₃
Masse molaire	92,14
Densité	0,865 g/ml
Apparence	Liquide incolore ayant une odeur aromatique
Point de fusion	-95 °C
Point d'autoinflammation	535 °C
Solubilité dans l'eau	590 mg/l (à 25°C)
Tension de vapeur	28,4 mm Hg (à 25°C)
Log du Kow	2,72

^a valeurs tirées de l'USEPA 2005 et de l'INRS 2008b

1.2.3.2. Distribution

Une fois absorbé, le TOL sera acheminé par la circulation sanguine vers divers organes et tissus. Il se distribue dans les tissus riches en lipides et fortement vascularisés comme le cerveau, en particulier la matière blanche, la moelle osseuse, la moelle épinière, le foie, le tissu adipeux et les reins. Sa concentration dans le cerveau semble plus importante que dans le sang. Le tissu adipeux joue le rôle de réservoir pour cette substance (INRS 2008b; USEPA 2005a).

1.2.3.3. Métabolisme

La voie principale du métabolisme du TOL (figure 1.2) est l'hydroxylation par des isozymes du cytochrome P450, principalement le CYP 2E1 et très faiblement le CYP 2B6, le CYP2C8 et le CYP1A2, donnant le benzyl alcool. Ce métabolite conduit, suite à une oxydation, à la formation d'acide benzoïque qui par conjugaison avec la glycine formera l'acide hippurique, le plus important métabolite du toluène. Il y a aussi une voie mineure impliquant une époxydation par les CYP 1A2, CYP 2E1 et CYP 2B6 suivie d'une conjugaison menant à la formation de l'ortho et para-crésol et une troisième voie, qui est celle de la conjugaison au glutathion donnant l'acide S- benzyl mercapturique (USEPA 2005a).

1.2.3.4. Élimination

Chez l'homme comme chez l'animal, le TOL est éliminé dans l'air expiré sous forme inchangée (10-20 %) (INRS 2008b). Cependant la grande majorité (80 %) est éliminée dans les urines sous forme de métabolites, tels que l'acide hippurique (60-70 %), le benzoylglucuronide (10-20 %), des acides mercapturiques ou crésols conjugués, (Löf et al., 1990, 1993; Turkall et al., 1991; Tardif et al., 1992, 1998).

1.2.4. Toxicité

Le TOL a une faible toxicité aiguë, sa cible première est le SNC. Il est irritant pour la peau, les yeux et le système respiratoire. En exposition prolongée ou répétée, le TOL provoque, chez le rat et la souris, une augmentation du poids de nombreux organes, des lésions histopathologiques dans le foie ont été remarquées suite à une hypertrophie hépatocellulaire, survenant à des doses supérieures à 1786 mg/kg par jour (l'USEPA 2003). L'inhalation des vapeurs de toluène provoque aussi une modification du taux de neurotransmetteurs, une neurotoxicité au niveau de l'hippocampe, du cervelet et une perte auditive (INRS2008b).

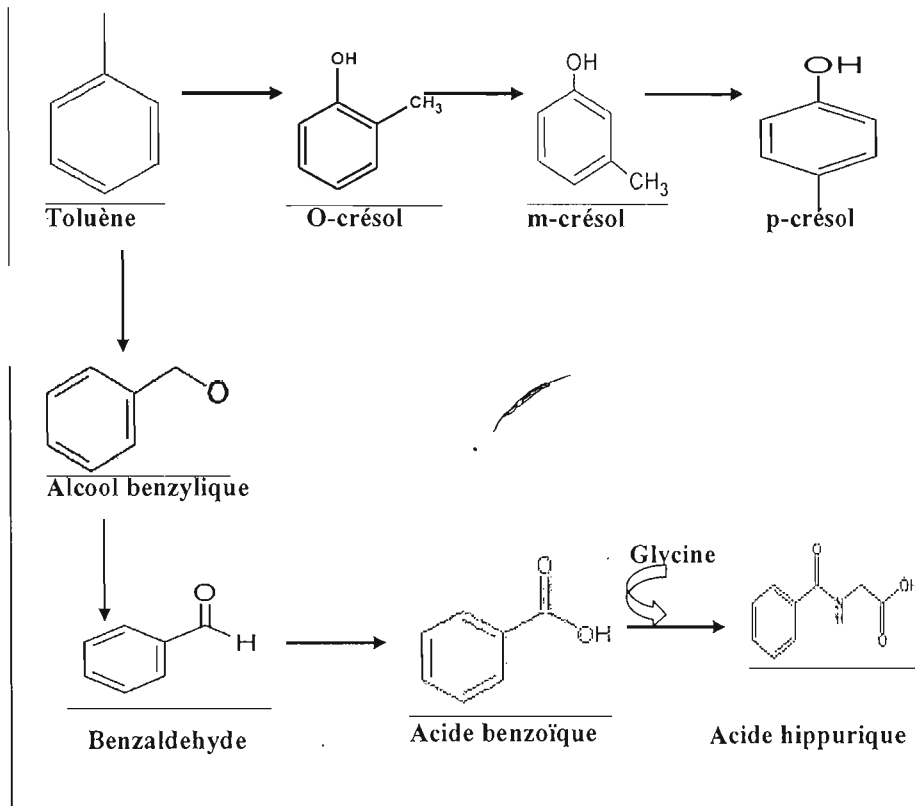


Figure 1.2 Voies métaboliques du toluène. Tiré de Pierce et al. (2002)

1.3. Cyclohexane

1.3.1. Caractéristiques physicochimiques

Aussi nommé hexahydrobenzène, hexaméthylène et hexanaphtène, le CHX est un hydrocarbure cyclique saturé de la famille des cycloalcanes. On le retrouve sous la forme d'un liquide incolore qui est pratiquement insoluble dans l'eau mais soluble dans l'alcool, l'éther et l'acétone. Il est stable dans les conditions normales d'utilisations. Toutefois, il peut réagir violemment avec les oxydants puissants (risques d'incendie et d'explosion). Ses principales caractéristiques physicochimiques sont décrites dans le tableau 1.4.

Tableau 1. 4 Principales caractéristiques physicochimiques du CHX^a

Caractéristiques	Cyclohexane
CAS	110-82-7
Formule chimique	C ₆ H ₁₂
Masse molaire	84,2
Densité	0,778 g/ml à 20°C
Apparence	Liquide transparent ayant une odeur de solvants
Point de fusion	7 °C
Point d'autoinflammation	245-260 °C
Solubilité dans l'eau	55 mg/l (à 25°C)
Tension de vapeur	97 mm Hg (à 25°C)
Log du Kow	3,44

^a valeurs tirées de l'USEPA 2003 et de l'INRS 2010

1.3.2. Sources d'exposition

Le CHX est en premier lieu utilisé dans la fabrication du nylon. On le retrouve dans les solvants, les insecticides et dans les plastifiants (Kavaler 1998). Il est présent dans toutes les formes de pétrole brut à des concentrations s'étendant de 0,1 à 1 %. C'est un des composants de la gazoline (Eastman et Mears 1995) et il est aussi couramment utilisé comme adhésif dans les usines à chaussures (L. Perbellini et F. Brugnone. 1980).

1.3.3. Toxicocinétique

1.3.3.1. Absorption

Le CHX est absorbé en quasi-totalité par voie orale ou par inhalation (USEPA 2005, INRS 2010). On peut estimer à 5% l'absorption du cyclohexane mis en contact avec la peau (INRS 2010). Ce pourcentage d'absorption cutanée varie en fonction de la concentration de la substance

1.3.3.2. Distribution

Perbellini *et al.* (1985) et Gargas *et al.* (1989) ont utilisé différentes méthodes expérimentales pour déterminer les coefficients de partage tissus :air, saline :air, sang :air et huile: air pour le CHX chez des cadavres humains et rats (tableau 1.5). Le CHX se partitionne préférentiellement dans les tissus riches en lipides tels que les graisses, le foie et le cerveau.

1.3.3.3. Métabolisme

La voie principale de métabolisme du CHX est hépatique faisant intervenir certaines enzymes des cytochromes P450. À ce jour, aucune étude ne semble avoir déterminé quelles isoenzymes sont spécifiquement impliquées dans son métabolisme. Des études métaboliques (USEPA 2003) utilisant le système microsomial (monooxidases) du foie confirment l'hydroxylation du cyclohexane en cyclohexanol qui est le métabolite primaire du CHX. Ce métabolite est oxydé en cyclohexanone ou hydroxylé en 1,2 cyclohexanediol ou en 1,4-cyclohexanediol (Figure 1.3). La répartition entre ces différents métabolites et les éventuelles glucurono ou sulfo-conjugaisons dépend de la dose administrée et de l'espèce considérée. Les données existantes sur le métabolisme du CHX demeurent tout de même insuffisantes chez l'animal et incomplètes chez les humains (USEPA, 2003).

Tableau 1.5 Les coefficients de partages tissu :air, sang :air, saline :air et huile :air du CHX

Tissu /substance	Perbellini et al. (1985) ^a	Gargas et al. (1989)
P saline :air	-----	< 0,01 (approximativement)
P sang :air	1,3 ± 0,1	1,41 ± 0,14 (humain) 1,39 ± 0,09 (rat)
P poumon :air	2,7 ± 0,1	-----
P coeur :air	5,8 ± 1,0	-----
P rein :air	7,2 ± 1,0	-----
P foie :air	10,8 ± 0,9	7,88 ± 0,59 (rat)
P cerveau :air	10,7 ± 1,4	-----
P muscle :air	10,5 ± 0,7	1,03 ± 0,17 (rat)
P graisses :air	260 ± 11,0	235 ± 4 (rat)
P huile d'olive :air	293 ± 11,0	293 ± 2

^a Analyse réalisée sur des tissus de deux cadavres humains âgés de 30 et 40ans décédés d'un arrêt cardiaque.

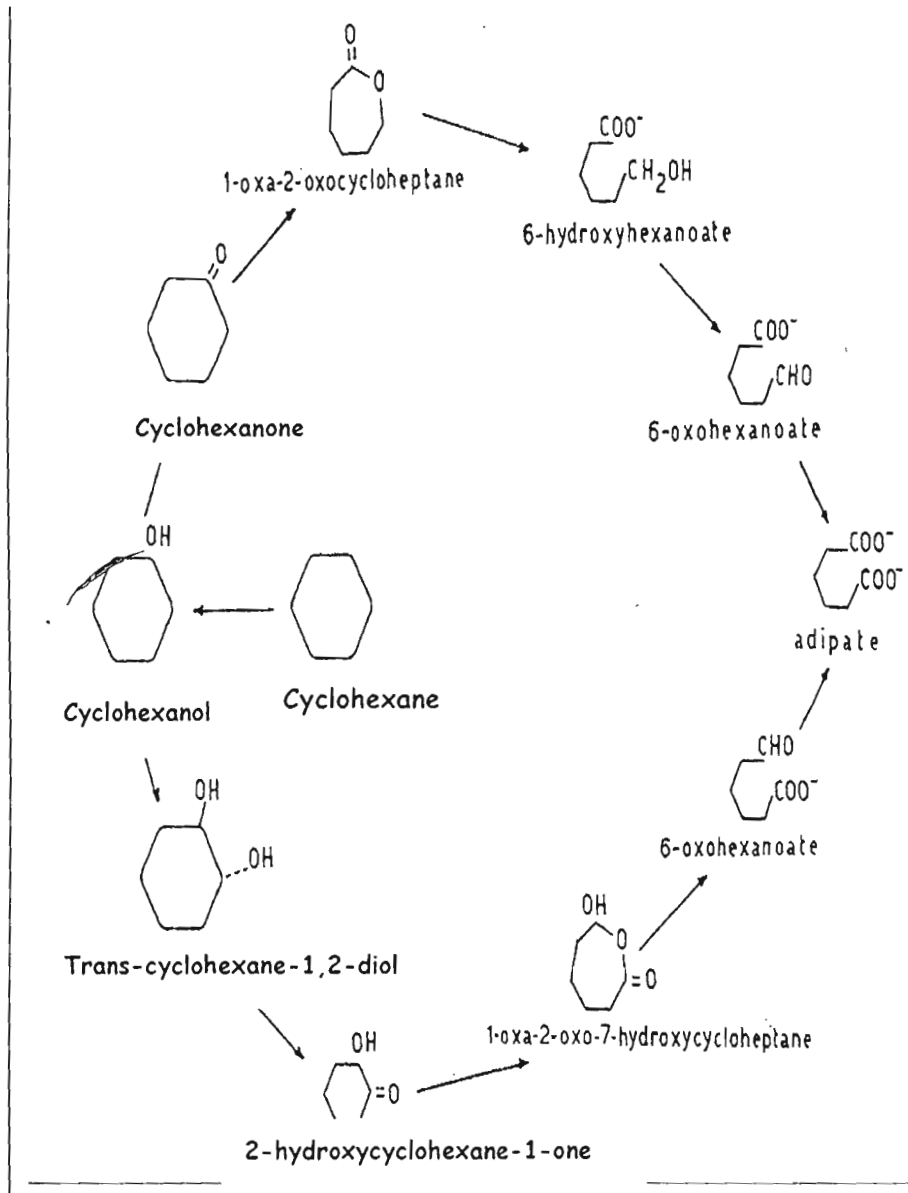


Figure 1.3 Voies métaboliques du cyclohexane. Tiré de Perbellini.L et Brugnone.F. (1980)

1.3.3.4 Élimination.

L'élimination du CHX est essentiellement pulmonaire, sous forme inchangée ou après métabolisation complète, sous forme de CO_2 . Le passage dans le lait maternel est également possible (INRS 2010).

1.3.4. Toxicité

Le CHX est d'une toxicité modérée, sa cible première est le SNC. À des doses assez élevées, cette toxicité se manifeste par des troubles neurocomportementaux (difficulté de concentrations, tremblement, vertiges, pertes de conscience et nausées) (USEPA 2003, INRS 2010). La substance est dépourvue d'effets mutagènes, cancérigènes ou de toxicité sur la reproduction (USEPA 2003, INRS 2010).

1.4. Isooctane

1.4.1. Caractéristiques physicochimiques

Le 2, 2,4-triméthylpentane, ou ISO, est un hydrocarbure à chaîne ramifiée de formule brute C_8H_{18} . C'est un liquide transparent avec une odeur de gazoline. Ses principales caractéristiques physicochimiques sont décrites dans le tableau 1.6.

1.4.2. Sources d'exposition

L'ISO est l'un des deux composés chimiques utilisés dans l'établissement de l'indice d'octane de la gazoline reflétant la qualité de l'essence. Il est libéré dans l'environnement par les manufactures utilisant et disposant de produits associés à l'industrie pétrolière. Les véhicules

à moteur sont une importante source d'émission d'ISO atmosphérique. Ainsi, la voie d'exposition la plus probable est par inhalation (USEPA 2007).

1.4.3. Toxicocinétique

1.4.3.1. Absorption

Dahl *et al* (1989) ont étudié l'absorption de l'ISO par inhalation, chez des rats males F344 exposés à de faibles (0,79 ppm) et de hautes (385 ppm) concentrations de l'ISO. Approximativement 7 à 12 % de la substance inspirée est absorbée par les parois alvéolaires.

Tableau 1.6 Principales caractéristiques physicochimiques de l'ISO^a

Caractéristiques	isooctane
CAS	540-84-1
Formule chimique	C ₈ H ₁₈
Masse molaire	114,23
Densité	0,69
Apparence	Liquide transparent avec odeur de gazoline
Point de fusion	-107°C
Point d'autoinflammation	417°C
Solubilité dans l'eau	2,4 g/ml
Tension de vapeur	5,1 KPa à 20 °C

^a Valeurs tirées de USEPA 2007 et de INRS 2004

1.4.3.2. Distribution

Des travaux de Kloss *et al* (1986) ont rapporté la distribution de l'ISO radiomarké. La majorité de la radioactivité a été repérée dans les reins et une infime partie dans le foie et les graisses. Ces travaux ont été reproduits par Charbonneau *et al.* (1987) qui ont observé des pics de concentration dans les reins et le foie. Cela dit, l'ISO est donc majoritairement distribué dans les reins, en premier lieu, et le foie en second rang.

1.4.3.3. Métabolisme

Peu nombreuses sont les études qui ont investigué le métabolisme de l'ISO. Communément aux autres hydrocarbures, l'ISO est métabolisé par le système des cytochromes P450 en alcools aliphatiques qui sont convertis ensuite en aldéhydes par des alcool déshydrogénases (Jakoby, 1982). L'analyse qualitative des urines provenant des rats traités par l'ISO a montré que ce composé est biotransformé par une oxydation conduisant aux triméthyl pentanols ramifiés, ainsi qu'aux acides pentanoïques et hydroxypentanoïques (Olson *et al* 1985).

Charbonneau *et al.* (1987) ont mis en évidence les voies métaboliques de l'ISO après une administration orale de la substance radiomarkée au C¹⁴ chez des rats F344 mâles et femelles. L'identification et la quantification des métabolites urinaires dans cette étude ont démontré que les rats des deux sexes métabolisent l'ISO via la même voie oxydative avec le même taux. Cependant, le 2, 4, 4-triméthyl-2-pentanol était le métabolite majeur présent dans les reins du rat mâle, alors qu'il est absent chez la femelle. Les principaux métabolites identifiés sont les triméthyl pentanols, ainsi que les acides pentanoïques et hydroxypentanoïques (Figure 1.4)

1.4.3.4. Élimination

Kloss *et al* (1986) ont étudié l'élimination de l'ISO radiomarké chez les rats F344. La majorité de la radioactivité a été récupérée dans l'urine (67% pour les mâles, 50% pour les femelles) et dans l'air exhalé (43% pour les mâles, 49% pour les femelles) (USEPA 2007).

1.4.4. Toxicité

Aucune étude épidémiologique, rapports de cas ou études cliniques n'ont été rapportés chez l'humain (USEPA 2007). Cependant une récente étude de Boys *et al.* (2010) a démontré une atteinte du système nerveux central chez des rats mâles Long-Evans exposés par inhalation à 500 et 1000 ppm pendant 60 min.

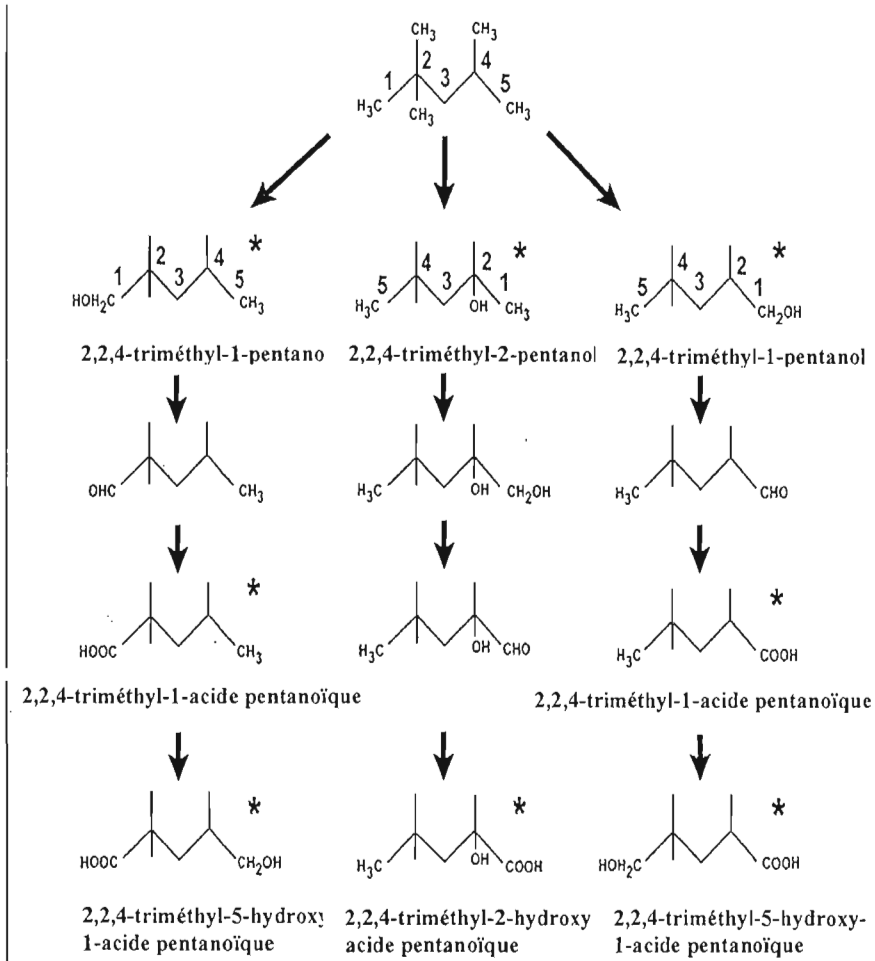


Figure 1. 4 Voies métaboliques de l'IZO. Tiré de Charbonneau et *al.* (1987)

CHAPITRE II

L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Comme on a pu le voir, ci dessus, les quatre composés étudiés peuvent être présents dans notre environnement de travail et/ou résidentiel (utilisés dans les matériaux d'isolation). Ils sont potentiellement toxiques et présentent un risque pour la santé humaine. Il importe donc de les considérer en mélanges et de vérifier la possibilité d'interactions entre ces substances. Plusieurs travaux faits pendant les deux dernières décennies ont réussi à franchir de grandes étapes dans l'étude des mélanges.

Perbellini et son équipe ont étudié un aspect important du métabolisme de l' HEX qui n'était pas pris en considération auparavant (Perbellini *et al.* 1982). Ils ont démontré que le TOL, souvent en mélange avec l'HEX, interagit avec son métabolisme. Les interactions métaboliques entre l'HEX et le TOL ont été étudiées *in vivo* et *in vitro*. Une étude *in vivo* a été effectuée sur l'élimination urinaire des métabolites de l'HEX et du TOL chez des rats exposés aux deux solvants séparément et en combinaison (Perbellini *et al.* 1982). Celle-ci a démontré une diminution significative de l'excrétion urinaire des métabolites de l' HEX chez les rats traités par le mélange binaire (HEX; TOL) comparativement à ceux soumis à un traitement à l'HEX uniquement. Les données expérimentales ont suggéré qu'il y a une inhibition non compétitive entre l'HEX et le TOL. Les observations ainsi recueillies, autant *in vivo* qu'*in vitro*, convergent vers la même conclusion : que le TOL interfère considérablement avec la biotransformation de l' HEX.

En 1998, Xiaozhong *et al.* (1998) ont évalué les interactions métaboliques entre le HEX et le TOL, mais cette fois-ci, chez des volontaires humains. Ils ont aussi établi un modèle PBPK

(*physiologically based pharmacokinetic*) pour ce genre d'interactions. Le modèle PBPK pour la co-exposition binaire a été établi initialement par validation et amélioration des modèles PBPK du TOL et de l'HEX préexistants dans la littérature. Ensuite ils ont lié ces deux modèles au niveau du métabolisme hépatique, en supposant que le TOL exerce une inhibition non compétitive sur celui de l'HEX et les paramètres métaboliques utilisés pour la simulation ont été tirés de la littérature (Johanson G. 1986, Davis et *al.* 1981, Perbellini et *al.* 1985, Perbellini et *al.* 1990, Fiserova – Bergerova et *al.* 1992, Gargas et *al.* 1989). Ceci a permis de simuler adéquatement les expositions suivantes: i) co-exposition continue à l'HEX et au TOL (50 ppm chacun) pour une durée de 8 heures; ii) quatre co-expositions d'une heure à l'HEX et au TOL (100 ppm chacun) durant une journée; iii) deux co-expositions d'une heure à l'HEX et au TOL (200 ppm chacun) sur une période de 24 h. Les résultats ont démontré que les excrétions urinaires du 2,5-hexanedione (2,5-HD), qui est un métabolite de HEX étaient remarquablement différentes pour les différents scénarios d'exposition. Ils ont noté une diminution respective de 17%, 40% et 67% dans les scénarios d'exposition (i), (ii) et (iii) comparativement à une exposition unique à l'HEX. Iwata et *al.* (1983) se sont aussi intéressés aux interactions pouvant survenir entre l'HEX et le TOL. Ils ont remarqué que la concentration totale des métabolites de l'HEX dans les urines des rats Wistar exposés par inhalation à un mélange d'HEX et de TOL diminuent d'un facteur de 6 par rapport à la valeur contrôle.

Plusieurs études ont démontré que la présence d'autres composés chimiques peut affecter le métabolisme de l'HEX. Van Engelen et *al.* (1997) ont examiné l'effet d'une coexposition au méthyle éthyle cétone (MEK) sur la toxicocinétique de HEX chez des volontaires humains. Ils ont ainsi décelé une diminution de la concentration du 2,5 HD dans le sérum tandis que le taux de l'HEX exhalé n'avait pas changé. Les auteurs ont suggéré que le MEK inhibe une des étapes intermédiaires de la conversion du HEX en 2,5-HD. L'effet du MEK sur le métabolisme de l'HEX a été investigué par d'autres groupes de recherche (Robertson et *al.* 1989; Shibata et *al.* 1990a, 1990b). Ces groupes ont remarqué que le niveau des métabolites libres et conjugués de l'HEX diminuait dans le sérum sanguin des rats exposés à l'HEX lorsqu'il y a coexposition avec du MEK.

Une analyse de la littérature scientifique nous amène donc à conclure que le risque évalué par rapport à l'exposition à un composé chimique peut être différent s'il se retrouve seul ou en mélange. Étant donné la multitude de composés toxiques présents dans notre environnement, l'exposition aux mélanges est plutôt la norme que l'exception.

Compte tenu de la grande complexité des mélanges auxquels l'être humain est exposé, la communauté scientifique est maintenant intéressée aux risques potentiels pouvant découler de l'exposition à une multitude de composés nocifs. L'étude du devenir métabolique des composés organiques volatils présents dans des mélanges complexes est l'enjeu de plusieurs recherches dans le domaine de l'évaluation de risque.

Une étape importante de l'évaluation du risque toxicologique est l'estimation de l'exposition. Étant donné que les interactions toxicocinétiques pouvant survenir lors d'une exposition à des mélanges de contaminants influencent les concentrations sanguines et tissulaires de ces composés dans les organes cibles (exposition interne), il est important d'utiliser des méthodes permettant de mieux estimer ces niveaux d'exposition. Plusieurs travaux de recherches ont démontré que l'utilisation de la modélisation pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) permettrait de combler ce besoin (Tardif *et al.* 1997; Haddad *et al.* 1999, 2000; Krishnan *et al.* 2002).

CHAPITRE III

MODÉLISATION PHARMACOCINÉTIQUE À BASE PHYSIOLOGIQUE (PBPK) ET INTERACTIONS

Les interactions toxicocinétiques entre composés chimiques peuvent être décrites quantitativement avec la modélisation PBPK qui intègre les déterminants mécanistiques de l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion d'un xénobiotique et permet de prédire les altérations de la dose tissulaire pour différentes situations d'exposition. Dans ce type de modèle, le corps est divisé en un nombre de compartiments tissulaires, dont chacun est défini par un volume approprié, un débit sanguin et des caractéristiques de solubilité. Le compartiment peut représenter un simple tissu ou un groupement de plusieurs tissus qui ont un débit sanguin et des caractéristiques de solubilité similaires (Krishnan et *al.* 2001) (Figure 1.5). Ces modèles PBPK permettent de décrire le cheminement d'un contaminant dans l'organisme et de calculer la concentration d'un agent chimique dans tous les compartiments de l'organisme à tout moment après le début d'une exposition et pour tout scénario d'exposition. Ils représentent donc de puissants outils d'étude et de prédiction des effets d'un ensemble de facteurs sur le profil toxicocinétique des contaminants (Tardif et *al.* 1997).

À l'aide de modèles PBPK, Haddad et *al.* (2000) ont réussi à prédire et valider l'impact maximal des interactions métaboliques sur le profil de la concentration sanguine pour chaque composé dans des mélanges de COVs (Haddad et *al.* 2000). Ils ont étudié un mélange de 10 produits (dichlorométhane, benzène, toluène, tétrachloroéthylène, éthylbenzène, trichloroéthylène, styrène aussi bien que para-, ortho- et méta-xylène) chez le rat.

Une autre méthodologie permettant de prédire les interactions dans des mélanges plus complexes de façon beaucoup plus précise a été développée par ces mêmes auteurs (Haddad

et al. 1998, 1999, 2000; Krishnan *et al.* 2002). Cette méthodologie consiste à utiliser les données des interactions binaires dans le métabolisme pour prédire les interactions dans les mélanges complexes. Pour passer de mélanges binaires aux mélanges plus complexes, la première étape est de créer un modèle PBPK pour chaque composé et, ensuite, les connecter au niveau binaire par la description de l'interaction métabolique. La validation de cette approche d'extrapolation d'interactions binaires aux interactions complexes a été accomplie en utilisant des mélanges ternaires, quaternaires et quaternaires contenant du benzène, du toluène, du m-xylène, de l'éthylbenzène et du dichlorométhane. La méthodologie étudiée facilite l'addition ou la substitution des composés chimiques aux mélanges. Il faut, pour ce faire que les interactions binaires soient caractérisées.

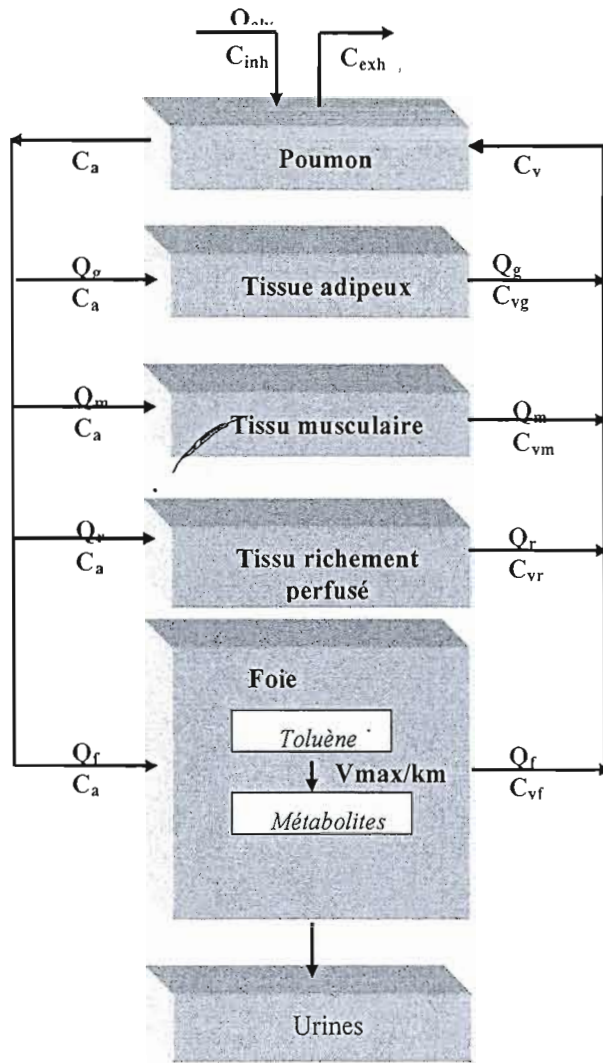


Figure 1.5 Représentation conceptuelle du modèle PBPK pour la distribution du TOL dans le corps tiré de Xiaozhong et al (1989).

Les symboles C, Q signifient respectivement concentration et débit sanguin (ou taux de ventilation). Les sous-symboles a, alv, c, exh, f, g, inh, m, r, et v signifient artériel, alvéolaire, cardiaque, exhalé, foie, gras, inhalé, musculaire, tissus richement perfusé, et veineux

3.1. Absorption

La peau, les poumons, le tractus gastro-intestinal sont des barrières qui séparent les organismes évolués d'un environnement contenant une multitude de composés chimiques. Ces composés doivent traverser une de ces barrières afin d'exercer leurs effets délétères sur un ou plusieurs sites du corps. L'absorption est ce processus par lequel le toxique traverse les membranes du corps pour s'introduire dans la circulation sanguine.

Vu que presque la majorité des contaminants doivent traverser plusieurs membranes du corps avant d'exercer leur toxicité, nous allons commencer par un survol des différents moyens qu'une molécule peut prendre pour traverser une membrane.

3.1.1. Transport passif

Diffusion simple : C'est un transport qui se fait sans consommation d'énergie, les molécules traversent la membrane plasmique selon un gradient de concentration (du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré). Les molécules hydrophobes (tel que les COVs) diffusent à travers le domaine lipidique membranaire (la couche phospholipidique). Les molécules hydrophiles et ionisées ont généralement une faible liposolubilité. Ceci qui peut retarder leur passage à travers la couche phospholipidique.

Diffusion facilitée : Plusieurs solutés dont la polarité ou la charge est trop élevée pour qu'ils diffusent à travers la bicouche lipidique peuvent franchir la membrane plasmique par diffusion facilitée. Le soluté se lie à un transporteur spécifique d'un côté de la membrane puis il est largué de l'autre côté par changement de conformation du transporteur. C'est aussi un transport qui se fait dans le sens du gradient de concentration. Il peut aussi utiliser des canaux ioniques ou des pores. Ce type de passage est saturable et assujettie au phénomène de compétition.

3.1.2. Transport actif

Le transport actif est un mécanisme requérant la participation de transporteurs spécialisés (protéines) et une dépense d'énergie, il permet un transfert contre le gradient de concentration. Il est donc saturable et assujéti au phénomène de compétition. Ce moyen de transport n'est pas utilisé par les COVs.

Il est bien connu que la réponse toxique à des produits chimiques peut résulter de leur absorption par inhalation, les xénobiotiques absorbés par les poumons sont souvent des gaz, ou des vapeurs des liquides volatils et c'est le cas des quatre composés étudiés dans ce mémoire. L'absorption des gaz par les poumons diffère des deux autres voies (intestinale et percutanée) parce que la diffusion transmembranaire n'est pas un facteur limitant l'absorption pulmonaire (Klaassen 2001). Deux raisons sont mises en cause, d'abord les molécules ionisées sont de faible volatilité et par conséquent leur concentration dans l'air ambiant est insignifiante, et ensuite, les pneumocytes sont minces et sont en contact étroit avec les vaisseaux capillaires et donc la distance de diffusion est très courte.

Un facteur important à tenir en compte, est le *coefficient de partage sang : air*. Le coefficient de partage est un rapport de concentration entre ces deux milieux à l'équilibre. Il dépendra de la concentration des composés dans les deux milieux en question (sang et air). Quand les molécules gazeuses sont inhalées par les poumons, elles diffusent de l'espace alvéolaire vers le sang pour se dissoudre et subir le processus de la distribution. La ventilation alvéolaire et le débit sanguin pulmonaire sont deux autres facteurs ayant un impact sur le taux d'absorption pulmonaire.

3.2. Distribution

Après leur introduction dans la circulation systémique. Les xénobiotiques sont distribués via le sang dans les divers tissus et organes où ils exercent leur toxicité. La distribution se produit souvent rapidement, son taux est déterminé en premier lieu par les débits sanguins et par le taux de diffusion hors du lit capillaire vers les cellules de certains tissus ou organes particuliers.

Souvent, il y a des substances chimiques qui s'accumulent dans les graisses, dû à leur grande liposolubilité. Cette accumulation peut être vue comme un processus limitant la distribution du composé de la circulation vers l'organe cible. La liaison protéique est aussi un facteur important dont il faut tenir compte. Certaines protéines plasmatiques possèdent la propriété de fixer des produits exogènes comme des xénobiotiques. Seule la forme libre du composé chimique est active toxicologiquement. La forme liée est inactive et n'est pas disponible pour se distribuer dans l'organisme.

3.3. Excrétion

Les COVs sont éliminés du corps essentiellement par l'air expiré. Le taux d'excrétion pulmonaire de ces composés est dicté par le coefficient de partage sang :air. Un autre type d'élimination important pour les COVs est la biotransformation.

3.4. Métabolisme

Le métabolisme des xénobiotiques, synonyme de la biotransformation, désigne l'ensemble des réactions qui ont pour effet de rendre ces composés qui sont plutôt liposolubles au départ, plus polaires (ionisables), plus solubles dans l'eau et ainsi plus facilement excrétables dans les urines. Ainsi en est-il, par exemple pour l'exposition au TOL. La biotransformation de ce solvant en acide hippurique hydrosoluble permet l'élimination du TOL du sang et du système nerveux et son excrétion urinaire sous forme de métabolites. Par contre, il arrive qu'au cours

de ce processus, certains composés chimiques qui ont une faible toxicité inhérente puissent être activés pour donner naissance à des métabolites toxiques et la réponse dépendra dans ce cas du niveau de production de ces métabolites. Par exemple, le benzo[a]pyrène, composé très lipophile, est éventuellement biotransformé dans l'organisme en diol époxyde, un métabolite très électrophile pouvant se lier à l'ADN. Les réactions de biotransformation peuvent donc induire une détoxification de certains composés toxiques, comme elles peuvent résulter en une bioactivation donnant naissance à des métabolites toxiques (Figure 1.5).

Deux classes de réactions enzymatiques peuvent intervenir pour transformer un composé en un métabolite (produit de biotransformation) : les réactions de phase 1 et les réactions de phase 2.

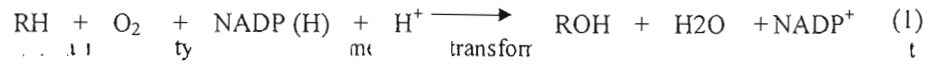
a. Réactions de phase 1

Ces réactions impliquent l'hydrolyse, la réduction et l'oxydation. Ces dernières sont les plus importantes. Elles font intervenir principalement un groupe d'enzymes appelés monooxygénases à fonction mixte incluant les cytochromes P450 situés dans le réticulum endoplasmique des cellules du foie, des poumons, de l'intestin et des reins.

Découverts il y a environ 50 ans, les cytochromes P450 regroupent une classe d'enzymes ubiquitaires. Ils affichent un large spectre d'affinité de substrat (Bernhardt 2006). Ils doivent leur nom à leur spectre d'absorption qui est 450 nm (lorsque liés au CO).

Les cytochromes P450 englobent en réalité un grand nombre d'iso-enzymes qui se subdivisent en différentes familles, en fonction de leurs ressemblances dans la séquence des acides aminés. Ces isoformes possèdent une affinité pour des substrats ou des familles de substrats particuliers. Les CYP 2E1 sont, selon la littérature, (Perbellini *et al.* 1982; Xiaozhong *et al.* 1998; Kloss *et al.* 1986; USEPA 2003; USEPA 2005a; INRS 2006) la sous famille responsable de la biotransformation des composés organiques volatils et plus particulièrement de ceux qui font l'objet de notre étude (TOL, HEX, CHX, ISO).

Le système des cytochromes P450 catalyse la présente réaction d'oxydation :



hydrophile, souvent par l'introduction d'une fonction hydroxyle. Pour cela, il a besoin d'une molécule d'oxygène, de 2 protons et 2 électrons. Les toxiques ainsi rendus hydrosolubles peuvent être facilement excrétés dans les urines ou la bile.

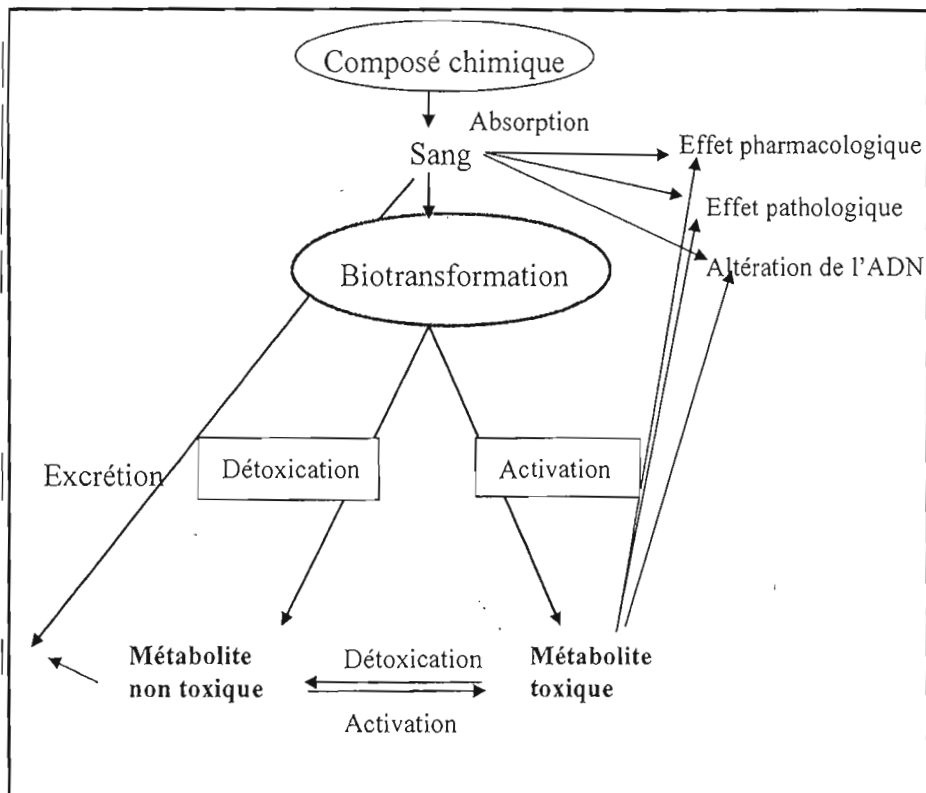


Figure 1. 6 Représentation schématique de la disposition du toxique et de son effet chimique (Klaaseen 2001)

Le taux de biotransformation par ces enzymes saturables est généralement décrit par l'équation de Michaelis Menten.

$$V = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Où, V_{\max} est la vitesse maximale de métabolisme, K_m est la constante d'affinité et représente la concentration du substrat pour laquelle la moitié de la vitesse maximale est atteinte ; S est la concentration du substrat.

b. Réactions de phase 2

Ces réactions ont souvent comme substrat, un produit de biotransformation de la phase 1, elles produisent des conjugués suite au couplage entre un xénobiotique et un produit endogène déjà présent dans l'organisme. Ces réactions sont la glucuronidation, la sulfatation, l'acétylation, la méthylation et la conjugaison avec le glutathion. Ces réactions confèrent également un caractère hydrosoluble aux molécules facilitant ainsi leur excrétion et elles sont aussi saturables.

3.4.1 Interactions métaboliques

Il est possible que chaque contaminant agisse de façon indépendante et ne modifie en rien l'effet de l'autre. Toutefois, l'expérience nous enseigne que l'exposition simultanée à plus d'un contaminant est l'un des facteurs susceptibles de modifier les paramètres de surveillance biologique de l'exposition, modifiant la valeur de ces paramètres et faussant ainsi les conclusions tirées lors de l'exercice d'appréciation du risque toxique. Autrement dit, le devenir métabolique d'une de ces substances une fois celle-ci absorbée dans l'organisme,

peut être modifié par l'introduction simultanée ou séquentielle d'une autre substance. On peut alors dire qu'il y a interaction entre ces contaminants.

Le terme d'interaction en toxicologie désigne l'influence d'une substance sur la toxicité d'une autre substance (Klaassen et Eaton, 1991 ; Beck et *al.*, 1994). On observe une interaction métabolique lorsque la substance A modifie le métabolisme de B. C'est le cas par exemple de deux substances empruntant les mêmes voies enzymatiques de biotransformation comme dans l'exposition simultanée à des concentrations élevées de toluène et de xylène (Tardif et *al.*, 1999). Ces interactions peuvent être des inhibitions causant ainsi une diminution du métabolisme ou des inductions menant à une augmentation de celui-ci.

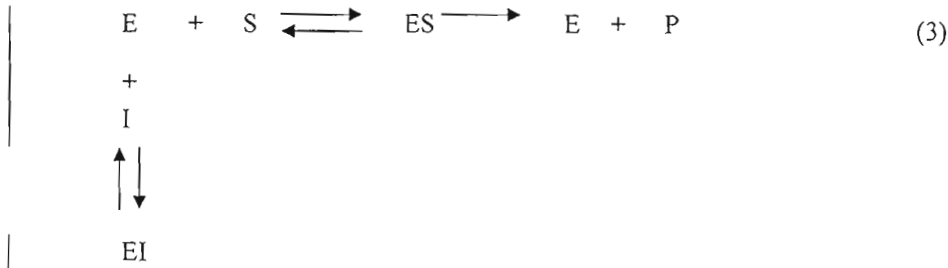
3.4.2 Inhibition métaboliques

Aussi connue sous le nom d'inhibition enzymatique, l'inhibition métabolique est définie comme un effet négatif sur l'activité enzymatique par un substrat (inhibiteur) (Marangoni 2003). La réduction du taux de la réaction peut aussi être causée par d'autres facteurs comme la température, le pH et la force ionique ou la polarité du solvant. L'analyse adéquate des données obtenues nous informe sur la nature de la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme. Majoritairement, l'inhibiteur se lie de façon réversible et peut se détacher de l'enzyme; il s'agit donc d'une inhibition réversible. Toutefois certains inhibiteurs se lient si fortement à l'enzyme qu'ils ne peuvent plus s'y détacher (i.e. liaison covalente) et cela mène à une inhibition irréversible (Marangoni 2003).

3.4.2.1 Inhibition réversible

a) Inhibition compétitive

Ce qui définit l'inhibition compétitive est la liaison mutuellement exclusive du substrat (S) et de l'inhibiteur (I) sur l'enzyme (E) menant à une impossibilité de former un complexe ternaire (ESI). Le modèle général de ce type d'inhibition est le suivant :



L'équation générale de la vitesse est

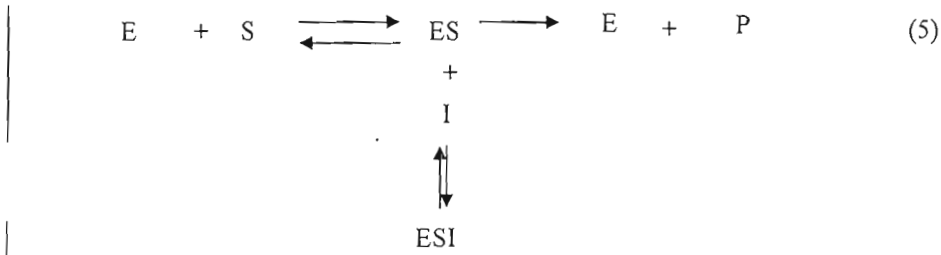
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]} \quad (4)$$

Où, K_i désigne la constante d'inhibition de l'inhibiteur (I) sur le substrat (S). Dans ce type d'inhibition, la vitesse maximale ne change pas, cependant la constante apparente de Michaelis-Menten sera augmentée (Marangoni 2003). Ceci est dû au fait que l'inhibiteur entraîne la diminution de la concentration en enzyme libre disponible pour se lier au substrat alors que ce dernier ne peut se lier au complexe EI.

b) Inhibition incompétitive

Un inhibiteur incompétitif ne se lie sur l'enzyme qu'après la fixation du substrat et empêche la formation du produit. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. Celui-ci, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme le rendant

ainsi catalytiquement inactif. Le modèle général de ce type d'inhibition est comme suit (Marangoni 2003).



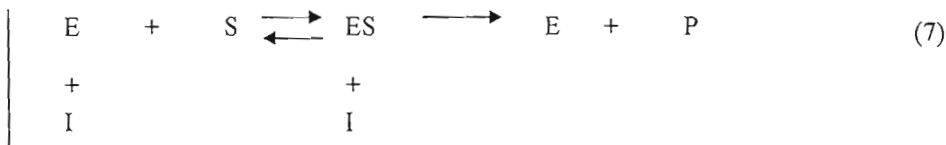
L'équation générale de la vitesse est

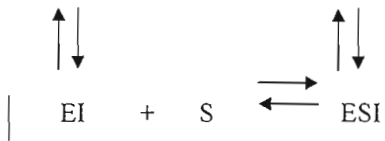
$$V = \frac{\frac{V_{max} [S]}{(1 + [I]/K_i)}}{\frac{K_m}{(1 + [I]/K_i)} + [S]} \quad (6)$$

La formation du complexe ESI diminue le nombre de complexe ES. La vitesse maximale de la réaction diminue, et l'affinité apparente augmente.

c) Inhibition non compétitive

Dans l'inhibition non compétitive, l'inhibiteur et le substrat se lient à l'enzyme, les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts et la fixation se fait d'une manière séquentielle. La formation du complexe ESI est donc possible mais celui-ci est inopérant. Le modèle général est le suivant





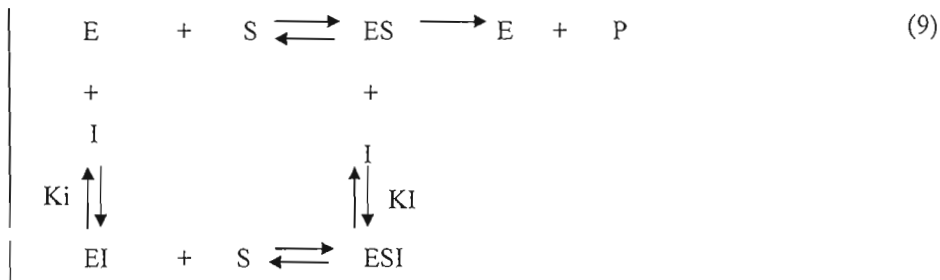
L'équation générale de la vitesse est

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] (1 + [I]/K_i)} \quad (8)$$

Dans ce type d'inhibition, l'affinité de l'enzyme pour le substrat n'est pas affectée car ce dernier peut se lier aussi bien sur l'enzyme libre que sur le complexe enzyme-inhibiteur. En revanche, la vitesse maximale de la réaction diminue car la concentration du complexe enzyme-substrat diminue.

d) Inhibition mixte

L'inhibiteur mixte se fixe avec des affinités différentes avec l'enzyme libre (E) et l'enzyme lié au substrat (ES). Le modèle général est le suivant



L'équation générale de la vitesse est

$$V = V_{\max} \times \frac{\left(\frac{1 + \beta \cdot (1/\alpha \cdot K_i)}{1 + (1/\alpha \cdot K_i)} \right)}{\left(1 + K_m/[S] \right) \times \left(\frac{1 + [I]/K_i}{1 + (1/\alpha \cdot K_i)} \right)} \quad (10)$$

L'inhibition non compétitive peut être vue comme un cas particulier de l'inhibition mixte quand les paramètres α et β sont égaux.

3.4.2.2 Autres types d'interactions

Certains composés peuvent diminuer le nombre d'enzymes fonctionnelles en les inactivant. Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur se lie de façon covalente avec l'enzyme formant ainsi un complexe stable, cette liaison irréversible induit une inactivation de l'enzyme et par la suite un arrêt de sa fonction catalytique (Marangoni 2003).

Certaines substances chimiques sont capables d'augmenter la quantité de certaines enzymes spécifiques, induisant ainsi l'activité métabolique de leurs substrats respectifs. Ces substances connues sous le nom d'activateurs, agissent généralement en augmentant l'expression des enzymes par un effet transcriptionnel.

CHAPITRE IV

ÉTUDE *IN VITRO* DU MÉTABOLISME

Certains groupes de recherches se sont intéressés à l'étude du métabolisme des mélanges de COVs (Haddad *et al.* 1998, 1999, 2000; Krishnan *et al.* 2002, Iwata *et al.* 1983, Xiaozhong *et al.* 1998), en faisant appel à l'animal ou aux volontaires humains, ainsi qu'aux études sur le terrain faisant appel à des travailleurs exposés (i.e., études *in vivo*). Il n'en reste pas moins que l'examen de la littérature n'est pas très révélateur en ce qui a trait aux études *in vitro* sur le devenir métabolique de contaminants environnementaux, aussi bien sous forme individuelle qu'en mélanges. Toutefois, avant de décrire les différentes méthodes d'investigation du métabolisme *in vitro*, il importe de répondre à une première question : pourquoi doit-on s'intéresser au métabolisme *in vitro*?

Des études de toxicologie investigative à l'aide de modèles *in vitro* adaptés et basés sur des hypothèses de travail bien définies peuvent avoir une place très importante aussi bien dans l'analyse du risque que dans l'industrie pharmaceutique. En effet, les résultats ainsi obtenus peuvent contribuer à diminuer l'utilisation d'animaux de laboratoire. En principe, l'apport de ces études au processus de recherche toxicologique de polluants de l'environnement et de leurs mélanges, processus fort difficile, long et coûteux, peut se traduire par une meilleure compréhension des mécanismes d'action biologiques et chimiques, la prédiction du risque d'effets toxiques connus et la possibilité d'extrapolation à la situation *in vivo*. Ceci permettrait donc d'éviter des pertes colossales de temps et de matériel expérimental.

Compte tenu de ce qui précède, certains travaux de recherche avaient pour objectifs l'étude *in vitro* du métabolisme de certains mélanges de composés organiques volatils (Perbellini et

*al.*1982; Kim et *al.*1996; Tofdgard et *al.*1986). Ces travaux se sont basés sur *la méthode d'équilibration de fiole à headspace* rapportée par Sato et Nakajima (1979a). Cette méthode a pour principe d'incuber des microsomes ou du S9 (issu d'une centrifugation de l'homogénat du foie à 9000 g) dans des solutions comportant les produits étudiés, le tout, dans des fioles fermées hermétiquement et mises en incubation dans un bain incubateur mixeur (*Dubnoff shaking wate bath*) à 37°C. Après un certain temps d'incubation, dépendamment des conditions expérimentales, une partie de la phase gazeuse de la fiole est analysée par chromatographie en phase gazeuse (Figure 1.7). Cette méthode utilisée pour analyser la disparition du substrat du milieu d'incubation, est aussi utilisée pour déterminer le coefficient de partage milieu : air. Ce paramètre physico-chimique constitue une composante essentielle dans le développement des modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK) (Ramsey et Andersen, 1984; Gargas et *al.* 1986 a, b; D'Souza et *al.* 1988).

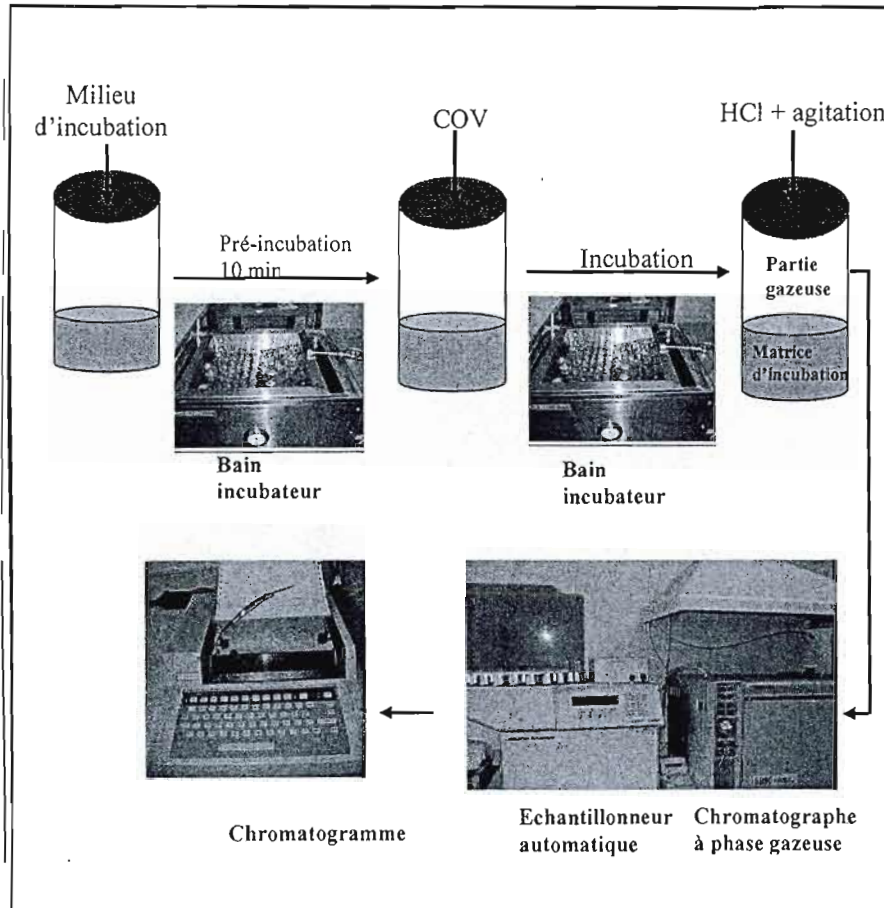


Figure 1. 7 Principales étapes de la méthode d'équilibration de fiole

CHAPITRE V

PROBLÉMATIQUE

Le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO, sont des contaminants dotés d'un potentiel toxique dont le niveau de production et d'utilisation est élevé dans le monde entier. Ces solvants empruntent, selon la littérature, la même voie enzymatique de biotransformation (CYP 2E1). La question suivante est alors soulevée: lorsqu'il y a exposition en mélange, est-il possible que ces contaminants interagissent entre eux?

L'analyse de la littérature scientifique nous a permis de faire le point sur l'état actuel des connaissances. Cet examen nous a montré que jusqu'à maintenant, ce sont certains de ces solvants sous forme individuelles qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études (TOL et HEX), alors que nos connaissances demeurent cependant très limitées en ce qui a trait aux conséquences pouvant découler de l'exposition à des mélanges de TOL, d'HEX, de CHX et d'ISO. Or, l'exposition simultanée à plus d'un contaminant est l'un des facteurs susceptibles d'agir sur les paramètres de surveillances biologiques et il est bien connu en toxicologie qu'un effet biologique qui se manifeste suite à l'exposition à une substance peut être modifié de façon importante sous l'action d'une deuxième substance.

Les interactions métaboliques binaires entre le TOL et l'HEX ont été investiguées par certains groupes de recherche (Tardif et *al.* 1999; Perbellini et *al.* 1982; Iwata et *al.* 1983). D'autres groupes se sont intéressés à l'étude des interactions binaires de l'HEX avec d'autres composés comme le xylène, le MEK et l'acétone (Tofdgard et *al.* 1983; Shibata et *al.* 1990; Cardona et *al.* 1996; Robertson et *al.* 1989), mais aucune étude ne se serait intéressée au

potentiel d'interactions métaboliques dans les mélanges de TOL, d'HEX, du CHX et d'ISO. Pourtant c'est l'une des combinaisons les plus présentes dans notre environnement, aussi bien en milieu de travail qu'en milieu résidentiel. De plus, dans ces études, on néglige souvent l'estimation du coefficient de partage qui est pourtant primordial pour quantifier la concentration des substances volatiles dans le milieu d'incubation, pour mieux estimer les paramètres métaboliques (K_m et V_{max}).

Une étude des interactions métaboliques *in vitro* entre les quatre composés organiques volatils TOL, HEX, CHX et ISO est donc importante. Celle-ci devra tenir compte des paramètres physicochimiques (coefficient de partage milieu :air, solubilité...) et métaboliques (K_m , V_{max}) pour déterminer la nature d'éventuelles interactions pouvant survenir entre ces contaminants et par la suite estimer la constante d'inhibition K_i . La réponse à toutes ces questions (coefficients de partage, K_m , V_{max} , K_i) sera un outil précieux pour l'établissement d'un modèle toxicocinétique à base physiologique PBPK.

CHAPITRE VI

OBJECTIF DE RECHERCHE

L'objectif général du projet est d'identifier et caractériser les interactions métaboliques entre le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO. Les objectifs spécifiques du projet sont les suivants :

1. Dans une première étape, nous avons tenté de déterminer les coefficients de partage milieu : air (P_m : air) pour le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO, parce que la quantification de leur métabolisme *in vitro* est tributaire de l'identification de cet important paramètre cinétique. Dans cette approche, nous nous sommes inspirés de la méthode d'équilibration de fiole formulée par Sato et Nakajima (1979a).
2. Dans le second volet de notre étude, il s'agissait de déterminer les paramètres métaboliques V_{max} (vitesse maximale de métabolisme) et K_m (constante de Michaelis-Menten) propre à chaque composé.
3. Le troisième volet était d'investiguer l'existence d'une inhibition métabolique entre le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO et de déterminer sa nature (une inhibition compétitive, incompétitive ou non compétitive), afin d'extraire les constantes d'inhibition K_i (qui représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés). Nous avons soumis l'hypothèse qu'une fois en mélange les quatre composés à l'étude interagissent par inhibition métabolique.

Les paramètres de distribution (P_m : air) propres à chaque composé, ainsi que ses paramètres métaboliques (K_m , V_{max} et K_i) obtenus, pourront être intégrés dans des modèles prédictifs comme le model PBPK afin de prédire les interactions toxicocinétiques *in vivo*

Les valeurs *in vitro* de V_{max} , K_m et K_i ayant été obtenues dans cette étude permettront ultérieurement d'être comparées aux valeurs *in vivo* obtenues lors d'expositions de rat du même sexe et de la même souche, afin de déterminer le facteur par lequel les valeurs *in vitro* et *in vivo* diffèrent.

CHAPITRE VII

ARTICLE

Préparé pour soumission dans la Revue canadienne de physiologie et pharmacologie.

Caractérisation *in vitro* des interactions métaboliques entre le n-hexane, le toluène, le cyclohexane et l'isooctane chez le rat

Imane Néchad¹, Ginette Charest² Tardif, Robert Tardif², Kannan Krishnan² et Sami Haddad¹

¹*Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada*

²*Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal, Montréal, Canada*

Titre abrégé: Interactions métaboliques entre le n-hexane, le toluène, le cyclohexane et l'isooctane

Correspondence should be addressed to:

Sami Haddad

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888 Succ. Centre-Ville

Montréal (Québec)

Canada

H3C 3P8

Email: haddad.sami@uqam.ca

Téléphone: 514-987-3000 ext. 2451

Fax: 514-987-4647

7.1. Résumé

Les composés organiques volatils sont des polluants atmosphériques abondamment utilisés dans l'industrie et les ménages privés. En milieu de travail ou dans l'environnement, on les retrouve habituellement en mélanges ce qui peut mener à des interactions toxicocinétiques telles que les inhibitions métaboliques. De telles interactions peuvent aboutir ainsi à une augmentation de leur toxicité. L'objectif de cette étude était de caractériser les interactions métaboliques se déroulant entre 4 COVs retrouvés dans les produits dérivés du pétrole nommés n-hexane (HEX), toluène (TOL), cyclohexane (CHX) et iso-octane (ISO), plus spécialement en utilisant les préparations microsomiales de foie de rat. Nous avons donc étudié le potentiel d'inhibition du métabolisme du TOL par HEX, CHX et ISO, aussi bien que l'inhibition du métabolisme de HEX par TOL, CHX et ISO. Initialement, la mesure du coefficient de partage milieu : air ($P_m : a$) a été faite pour permettre une estimation des concentrations des inhibiteurs et des substrats dans le milieu d'incubation (CHX : 0,23 ISO : 0,21, TOL : 2,35 et HEX : 0,04). La concentration dans le milieu d'incubation a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse après incubations de 45 min pour le TOL et 4 min pour l'HEX (parce qu'un arrêt de métabolisme de l'HEX a été remarqué après 6 min). Le taux de métabolisme a été déterminé pour ces deux composés incubés individuellement ou en présence des autres COVs. Les résultats suggèrent que le métabolisme de TOL est inhibé de façon compétitive par HEX alors que CHX et ISO interfèrent avec le métabolisme de TOL par une inhibition incompétitive (K_i égale respectivement 0,49; 1,84 et 1,79 μM). L'inhibition du HEX par TOL est de type mixte ($K_i = 4,53 \mu\text{M}$), alors que le CHX et l'ISO agissent sur le métabolisme de l'hexane par inhibition compétitive (K_i respectifs de 0,75 et 1,54 μM). Ces données *in vitro* sur les interactions métaboliques pourront être intégrées dans un modèle PBPK pour prédire la dose interne résultant d'une exposition à ces mélanges chimiques.

7.2. Introduction

Les composés organiques volatils (COVs) sont des hydrocarbures de faibles poids moléculaires qui, en raison de leur forte pression de vapeur, ont la propriété commune de se volatiliser facilement à température ambiante. Ils sont facilement absorbés par inhalation et peuvent causer divers problèmes de santé au niveau respiratoire, cardiovasculaire, et neurologique. (Santé Canada 2009).

Parmi les COVs les plus abondants en industrie, on retrouve le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO. Ils se retrouvent souvent ensemble dans les produits pétroliers ainsi que dans l'industrie des peintures et des revêtements (USEPA 2003, 2005a, 2005b et 2007). Ils sont principalement biotransformés dans le foie par des cytochromes P450 (Iba et al. 2000; Nakajima et al. 1991; USEPA 2005a; USEPA, 2003; Jakoby. 1982). Contrairement à l'HEX et le TOL, peu de choses sont connues sur les enzymes impliquées dans le métabolisme du CHX et de l'ISO. HEX est métabolisé par le CYP2E1 (Iba et al. 2000; Nakajima et al. 1991) et le CYP2B1 (Toftgard et al. 1986 ; Crosbie et al. 1997). La biotransformation du TOL est principalement médiée par le CYP2E1 et très faiblement par les CYP2B6, le CYP2C8 et le CYP1A2 (Baelum et al. 1993; Nakajima et al. 1997; Tassaneeyakul et al. 1996).

Lors d'une exposition simultanée ou séquentielle, ces substances pourraient interagir entre elles et ainsi affecter leur taux de métabolisme respectif. Ceci pourrait induire une augmentation de leur risque toxicologique si le taux de métabolisme est diminué, étant donné que la concentration de la substance mère inchangée augmente. Il est possible de tenir compte des interactions métaboliques et ainsi prédire les niveaux d'exposition interne suite à des expositions à des mélanges à l'aide de la modélisation pharmacocinétique à base physiologique (PBPK) (Haddad et al. 1999, 2000; Tardif et al. 1997; Krishnan et al. 2002). Pour prédire l'impact des interactions métaboliques entre ces constituants, les modèles PBPK nécessitent de l'information sur les interactions présentes dans chacune des combinaisons binaires du mélange, soit: TOL-HEX, TOL-CHX, TOL-ISO, HEX-CHX, HEX-ISO, et CHX-ISO. Malgré que les interactions métaboliques entre le TOL et l'HEX aient déjà été

investiguées par Perbellini et *al.* (1982), peu de données existent sur les interactions qui pourraient y avoir entre les autres combinaisons de ces substances.

7.3. Objectif

L'objectif général de cette étude était d'identifier et de caractériser, à l'aide de microsomes d'hépatocytes de rats, les interactions entre le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO. Pour ce faire, nous avons cherché à : i) caractériser la cinétique enzymatique du métabolisme de chacune des substances seules, ii) investiguer l'existence d'une inhibition métabolique entre le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO, iii) déterminer leur nature (inhibition compétitive, incompétitive ou non compétitive) afin d'extraire les constantes d'inhibition (K_i). Ces paramètres métaboliques pourront ultérieurement être utilisés dans l'élaboration et l'application des modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK) afin de répondre aux questions concernant les interactions toxicologiques possibles entre ces substances lors de co-expositions environnementales ou en milieu de travail.

7.4. Matériels et méthodes

7.4.1 Animaux et produits chimiques

Le chlorure de magnésium ($MgCl_2$), le phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4), le phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4), le β -Nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate sous sa forme oxydée (β -NADP), le glucose-6-phosphate ($G6PO_4$), le glucose-6-phosphate déshydrogénase, le n-hexane (>99% *purity*), le cyclohexane anhydre (95% *purity*), le 2,2,4-Triméthylpentane anhydre, (99.8% *purity*), le toluène, l'acide chlorhydrique, le Trizma -base et le Trizma -HCl, le chlorure de potassium, le sucrose et l'EDTA ont été achetés chez Sigma-Aldrich®. L'emulsifiant Alkamuls (EL-620) a été acheté chez Debro (Dorval, Québec, Canada)

Des rats mâles Sprague - Dawley (SD) (260-280g) ont été obtenus de *Charles River Laboratories* (Senneville, Qc). Les animaux ont été logés dans des cages en acier inoxydable (2 à 3 rats par cage) dans des chambres à accès limité. Les locaux ont été maintenus à une température de 25°C et 40% d'humidité relative, avec un cycle de lumière de 12hr/lumière-obscurité. Pour la préparation de microsomes hépatiques, le sacrifice a été effectué après une semaine d'acclimatation.

Le protocole expérimental a été soumis à un comité d'éthique sur l'utilisation des animaux en recherche de l'Université de Montréal et les animaux ont été traités en accord avec les lignes directrices dictées par ce comité institutionnel.

7.4.2 Préparation des microsomes

Les rats ont été euthanasiés au CO₂ et exsanguinés par l'aorte abdominale. Les foies pesant environ 11 g ont été prélevés, coupés en gros morceaux et lavés dans du tampon (1 volume du foie + 4 volume du tampon Tris-KCl à 1.15 %, pH 7,4). Ils ont ensuite été transférés dans des tubes à homogénéisation (Potter- Elvehjem). Les homogénats récupérés ont été soumis à une succession de centrifugations à des vitesses de rotation différentes dans un tampon de suspension (sucrose 0.25 M, Tampon Tris-KCl 0,05 M, EDTA 5,4 M, pH 7,4) dans une ultracentrifugeuse avec rotor à angle fixe (L8M de Beckman) qui est réfrigérée à 4°C. Le surnageant d'une première centrifugation de 10 000 g pendant 20 min a été récupéré. Le culot a été récupéré et suspendu pour une dernière centrifugation à 105 000g pendant 60 min. Le surnageant a été éliminé et le culot (microsomes) a été suspendu dans du tampon. Les protéines ont été quantifiées par la méthode de Lowry et *al* (1951) avec quelques modifications, en utilisant le sérum d'albumine bovine comme standard.

7.4.3 Détermination des coefficients de partage

Afin de déterminer les concentrations de COVs dans le milieu d'incubation où a lieu la réaction ainsi que la fraction qui est disponible dans ce milieu, nous avons déterminé les coefficients de partage entre le milieu d'incubation et l'air ($P_{m:air}$) en mesurant directement ce paramètre et en tenant compte de la contribution relative des différents constituants du milieu (i.e., tampon phosphate, Alkamuls et microsomes) étant donné que le milieu d'incubation nommé aussi matrice d'incubation est constitué de ces trois milieux aux proportions suivantes : 81 % (tampon phosphate), 5% (Alkamuls) et 14% (microsomes).

En vue, d'une comparaison des résultats, nous avons aussi utilisé une seconde méthode qui a été inspirée de celle rapportée par Sato et Nakajima (1979) et par Gargas *et al.* (1989) qui est décrite par l'équation suivante :

$$P_i = \frac{(C_{ref} \times V_{fiolle}) - C_i \times (V_{fiolle} - V_i)}{C_i \times V_i} \quad (1)$$

Où P_i représente le coefficient de partage matrice:air, C_{ref} réfère à la concentration du composé dans la fiole de référence (fiole contenant juste le composé sans aucune composante du milieu d'incubation), V_{fiolle} signifie le volume de la fiole (22ml), C_i : concentration du composé dans la phase gazeuse de la fiole d'incubation, et V_i indique le volume de la solution d'incubation.

Pour la détermination des $P_{m:air}$, et des coefficients de partage entre le tampon et l'air ($P_{t:air}$), une série d'étapes consécutives a été entreprise. Tout d'abord, les fioles des différentes solutions ont été préparées en quintuplicatas ($n=5$), afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Ces séries de solutions consistaient en : une première série de fioles contenant uniquement du tampon phosphate tel que mentionné en 7.4.4, une seconde série contenant de l'Alkamuls (émulsifiant tensioactifs qui permet de solubiliser les composés

hydrophobes dans le milieu aqueux), une troisième contenant seulement des microsomes préparés tel que mentionné en 7.4.2 et finalement une quatrième série contenant toutes ces composantes pour former le milieu d'incubation. Ensuite, après les avoir fermés hermétiquement, on a préincubé chacune des fioles à 37°C pendant 10 min. 1 ml d'air a été prélevé de chaque fiole, avant d'injecter 1 ml du standard gazeux (COVs). Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant une heure (temps suffisant pour l'atteinte de l'équilibre). Les échantillons étaient tous dépourvus de β -NAPD (pour éviter de déclencher la réaction enzymatique). Au terme de cette période d'incubation, les fioles ont été analysées alternativement par chromatographie à phase gazeuse (voir plus bas). Les coefficients de partage des différentes solutions ont été estimés selon l'équation 1.

7.4.4 Incubations microsomales

Des études pilotes ont permis de déterminer les conditions qui assurent la linéarité dans les vitesses initiales de réactions (figure 4.1). Après 10 min de préincubation dans un bain agitateur à 37° C, les COVs qui sont dans une solution d'Alkamuls 1% (le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO) seuls ou en combinaisons sont ajoutés au milieu d'incubation afin de démarrer la réaction. Le milieu d'incubation final est un tampon phosphate 0,1M (pH 7,4) contenant des microsomes (2 mg protéines/ml), 0,5 mM de NADP, 1,15% de KCl, 10 μ mole/ml d'EDTA, 0,25 μ mole/ml de Sucrose, 10 μ mole/ml de glucose-6-phosphate, 4 unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase, 5 mmole/ml de $MgCl_2$ et 1% d'Alkamus. Toutes les incubations ont été interrompues après 45 min, sauf celles contenant l'HEX qui ont été suspendues après 4 min, par injection d'un volume de 16 μ l de HCl (4 N). Après un certain temps d'incubation (pouvant aller jusqu'à 45 min dépendamment du substrat à analyser), 1 ml de la partie gazeuse de la fiole est prélevé par une aiguille pour être analysé par chromatographie en phase gazeuse. Afin d'établir les constantes d'inhibition K_i entre les différentes combinaisons étudiées, tous les échantillons ont été préparés en duplicatas avec un contrôle. Nous avons procédé à des co-incubations de l'un des composés du mélange (exemple le substrats (S)) à des concentrations équivalentes à son K_m , à la moitié de son K_m

(1/2 K_m) et au un cinquième de son K_m (1/5 K_m), avec chacun des trois autres composés (qui supposément vont se comporter comme des inhibiteurs) à trois concentrations équivalentes à 15 fois, 5 fois et une fois leur K_m (15 K_m , 5 K_m , K_m), exception faite pour le CHX (inhibiteur), pour lequel nous avons utilisé des concentrations de (5 K_m , K_m et 1/2 K_m) après avoir décelé un problème de variabilité à des concentrations plus élevées .

La méthode est basée sur la mesure de la disparition du substrat du milieu d'incubation. Les concentrations des substances dans la partie gazeuse et liquide de la fiole ont été calculées selon la méthode rapportée par Sato et Nakajima (1979a) en se basant sur la hauteur des pics des chromatogrammes, les vitesses initiales de biotransformation ont été ainsi obtenues pour chaque substrat.

La détermination des paramètres métaboliques V_{max} (vitesse maximale de métabolisme) et K_m (constante d'affinité) a été faite par analyse des courbes Michaelis - Menten du taux de métabolisme V (nmole/mg/hr) versus la concentration du substrat (μM) (Gilette 1971). Les constantes d'inhibition K_i ont été estimées par régressions non-linéaires à l'aide de logiciel informatique Sigma Plot.

7.4.5 Analyses chimiques

L'analyse qualitative et quantitative des COVs a été faite par « headspace » chromatographie en phase gazeuse (GC) (HP 5890 A, d'Agilent). Dans un échantillonneur automatique (Tekmar 7000, ATS), l'échantillon était incubé à 37°C pendant 30 min qui est le temps requis pour atteindre l'équilibre entre la phase liquide de la fiole (matrice d'incubation) et la phase gazeuse. L'azote ultra pur à un débit de 50 psi fut le gaz de pressurisation utilisé. La température du port d'injection était de 130°C. Une injection en mode « split » a été effectuée (5:1). La colonne capillaire sur laquelle les différents COVs ont été séparés était d'une longueur de 30 mètres et son diamètre était de 53 μm . Une température de 80°C a été maintenue. L'hélium ultra pur (99,999 %) fut utilisé comme phase mobile avec un débit de

10 ml/min. La détection a été faite par ionisation par flamme (FID). Le détecteur fonctionnait à un débit de 20 ml/min d'hydrogène. Le temps d'analyse était d'une durée maximale de 5,4 min. Les temps de rétention observés pour l'HEX, le CHX, l'ISO et le TOL étaient respectivement de 2,66 min, 3,32 min, 3,62 min et de 4,60 min. L'acquisition des données était faite par un intégrateur HP- 3396. Dans le cas de la détermination des coefficients de partage, les conditions d'analyses chromatographiques étaient essentiellement les mêmes que celles des incubations microsomiales, à l'exception de deux paramètres: i) il n'y avait pas de temps d'équilibration de 30 min comme dans le cas des incubations microsomiales, ii) la température de la colonne était de 140°C.

7.5. Résultats

7.5.1 Estimation des coefficients de partage

Le tableau 7.1 présente les coefficients de partage mesurés et estimés pour le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO. Les coefficients de partage P_m ont été aussi estimés par une autre méthode qui consistait à l'addition des coefficients de partage des autres composantes du milieu (tampon, alkamuls, microsomes) normalisés par leurs fractions volumiques dans le milieu d'incubation (équation 2).

$$P_{m : air} = (P_{tp} \times (V_{tp} / V_t)) + (P_{alk} \times (V_{alk} / V_t)) + (P_{micrs} \times (V_{micrs} / V_t)) \quad (2)$$

Où $P_{m : air}$, P_{tp} , P_{alk} et P_{micrs} réfèrent respectivement aux coefficients de partage milieu d'incubation : air, tampon : air, alkamuls : air et microsomes : air, V_{tp} , V_{alk} , V_{micrs} et V_t représentent respectivement le volume du tampon, le volume d'Alkamuls, le volume des microsomes et le volume totale dans la fiole. Le P_{tp} , P_{micrs} et le P_{alk} ont été obtenus expérimentalement et en utilisant l'équation 1.

Une fois le $P_{m:air}$ déterminé, la quantité du COVs dans l'air a été estimée en tenant compte de sa distribution dans les deux phases de la fiole selon la méthode rapportée par Sato et Nakajima (1979) :

$$Q_{totale} = C_{air} \times (V_{fi} - V_s) + (C_{air} \times P_{m:air} \times V_s) \quad (3)$$

Où Q_{totale} = quantité de substance dans la fiole (μg), C_{air} = concentration dans l'air ($\mu\text{g/ml}$), V_{fi} = volume de la fiole (ml), V_s = volume de la solution d'incubation (ml), $P_{m:air}$ = coefficient de partage milieu: air

La concentration du substrat dans le milieu d'incubation a été calculée à partir de la concentration dans l'air (équation 4)

$$C_m \text{ (mg/ml de matrice)} = C_{air} \times P_{m:air} \quad (4)$$

Où C_m = concentration dans la matrice

Lorsqu'on analyse les données du tableau 7.1, on remarque que le TOL est le seul composé qui a un coefficient de partage milieu : air supérieur à 1, tandis que l'HEX, le CHX et l'ISO ont des $P_{m:air}$ inférieurs à 1 et ils ont donc tendance à s'échapper de la partie liquide de la fiole pour se retrouver dans la partie gazeuse.

7.5.2 Linéarité

Après avoir fait plusieurs essais à des temps d'incubation allant jusqu'à 180 min, les profils temporels des concentrations (figure 7.1) ont révélé que 45 min était toujours dans l'intervalle linéaire. Le pourcentage éliminé à ce temps était de 36% pour le TOL et de 30% pour le CHX (figure 7.1). Dans le cas du HEX, 54% étaient éliminés après 4 min et sa vitesse de métabolisme diminuait jusqu'à ce qu'elle soit nulle après 6 min (figure 7.1, figure 7.2). Dans les conditions étudiées, aucun métabolisme microsomale n'a pu être observé pour l'ISO.

7.5.3 Cinétique enzymatique substances seules

Une analyse par régression non-linéaire a été faite pour le métabolisme du TOL, de l'HEX et du CHX investigué par des incubations effectuées à différentes concentrations à des temps d'incubation de 45 min pour le TOL et le CHX et de 4 min pour l'HEX. La figure 4.3 rapporte ces résultats sous la forme d'une courbe de Michaelis-Menten. Les vitesses maximales de métabolisme et les constantes d'affinité pour chacun des trois composés sont présentées dans le tableau 7.2. Malgré son assez grande affinité avec l'enzyme (i.e., $K_m = 0,501 \mu\text{M}$), le CHX n'est pas rapidement métabolisé (i.e., $V_{\text{max}} = 8,957 \text{ nmole/mg/hr}$).

7.5.4 Cinétique enzymatique mélanges binaires

Les figures 7.4, 7.5 et 7.6 rapportent les courbes de Dixon ($1/V$ vitesse de biotransformation en fonction de la concentration de l'inhibiteur) des interférences métaboliques de l'HEX, du CHX et de l'ISO sur le TOL, obtenues suite à notre étude *in vitro*. L'ISO et le CHX interfèrent avec le métabolisme du TOL par une inhibition incompétitive avec des K_i respectifs de $1,79 \mu\text{M}$ et $1,84 \mu\text{M}$. Par contre, l'HEX interagit avec le TOL par une inhibition compétitive avec un K_i de $0,49 \mu\text{M}$ (tableau 7.3).

Les résultats de notre analyse *in vitro*, représentés par des courbes de Dixon (figures 7.7, 7.8 et 7.9), ont montré que le TOL interfère avec le métabolisme de l'HEX par une inhibition mixte avec un K_i de $4,53 \mu\text{M}$, tandis que le CHX et l'ISO interagissent avec le métabolisme de l'HEX par une inhibition compétitive avec des K_i respectifs de $0,75 \mu\text{M}$ et $1,57 \mu\text{M}$ (tableau 7.3).

7.6. Discussion

Afin de prédire les expositions des tissus cibles aux COVs en mélanges, il est nécessaire de bien connaître les interactions métaboliques existantes entre les constituants du mélange. Dans la présente étude, nous avons caractérisé le métabolisme *in vitro* (i.e., dans les microsomes de foie de rat) de quatre COVs (TOL, HEX, CHX, et ISO) ainsi que les effets de ces COVs sur le métabolisme du TOL et de l'HEX.

Pour connaître la concentration du produit dans le milieu d'incubation, il fallait déterminer les coefficients de partage P_m : air propres à chaque composé. Mis à part le TOL qui a un P_m :air supérieur à 1, l'HEX, le CHX ainsi que l'ISO ont des P_m :air beaucoup plus faibles (P_m :air < 0,3). Cette particularité fait en sorte que ces composés ont tendance à favoriser l'air plutôt que le milieu d'incubation et donc être en faibles concentrations dans le milieu d'incubation. Ceci a représenté une véritable embûche pour la quantification de leur métabolisme qui dépend en grande partie de leur présence dans le milieu d'incubation. Pour contourner cet obstacle, un moyen efficace était de les solubiliser dans l'Alkamuls 1%. C'est aussi la méthode suivie par Perbellini et *al.* (1982) dans leur étude sur les interactions métaboliques entre le TOL et l'HEX

Une série de tests de linéarité a été réalisée en vue de déterminer les vitesses initiales du métabolisme pour les quatre solvants. À la figure.7.1, on peut déceler un pourcentage d'élimination de 36% pour le TOL et de 30% pour le CHX et ce, pour un temps d'incubation de 45 min. Dans le cas du HEX, un taux d'élimination beaucoup plus grand a été observé (i.e., 54% éliminé en 4 min). On atteint un arrêt de métabolisme après un temps d'incubation avoisinant les 6 min (Fig.7.2). Ceci pourrait être causé par une inhibition irréversible par les métabolites de l'hexane tel que suggéré par Andersen et *al.* (1983). En ce qui concerne la biotransformation de l'ISO, plusieurs essais ont été menés pour investiguer son taux de métabolisme (i.e., différents temps d'incubations et concentrations) sans déceler aucune baisse significative des concentrations de la molécule mère. Un problème de solubilité a été soupçonné, étant donné qu'il a la plus faible solubilité dans l'eau par rapport aux autres

substances (2,4 mg/l). Même une augmentation de l'Alkamuls à 3% dans le milieu d'incubation n'a pu augmenter son taux de métabolisme (résultats non montrés).

Les résultats obtenus sur les paramètres métaboliques K_m et V_{max} lors de ce travail confirment l'idée rapportée par la littérature, énonçant que le TOL, l'HEX et le CHX sont métabolisés par le complexe enzymatique des cytochromes P450 présents dans les microsomes. Selon la présente étude, l'HEX aurait la plus grande affinité pour les CYP avec un $K_m = 0,015 \mu M$ et la capacité maximale de biotransformation la plus importante ($V_{max} = 34,60 \text{ nmole/mg/hr}$).

L'étude des mélanges binaires a montré que le devenir métabolique de l'HEX pouvait être influencé par la présence des trois autres solvants. Le TOL a été démontré comme étant un inhibiteur mixte ($K_{i_{TH}} = 4,533 \mu M$), le CHX et l'ISO comme des inhibiteurs compétitifs (respectivement $K_{i_{CH}} = 0,75 \mu M$ et $K_{i_{IH}} = 1,54 \mu M$). La biotransformation du TOL peut à son tour être inhibée par la présence concomitante de l'HEX par inhibition compétitive ($K_{i_{HT}} = 0,49 \mu M$), alors que le CHX ou de l'ISO agissent par inhibition incompétitive (respectivement $K_{i_{CT}} = 1,84 \mu M$ et $K_{i_{IT}} = 1,79 \mu M$, respectivement). Nos résultats convergent vers ceux obtenus par Perbellini et *al.* (1982) dans le sens que le TOL et l'HEX interfèrent mutuellement sur leur biotransformation par une inhibition métabolique, mais les valeurs de K_i obtenues et le type d'inhibition ne concordent pas (tableau 4 3). Cette divergence peut être due à plusieurs causes. Tout d'abord, Perbellini et *al.* (1982) ont utilisé la fraction S9 (sumageant de l'homogénat du foie centrifugé à 10000g pendant 10min) plutôt que des microsomes. Durant leur analyse, le temps d'incubation était de 10 min alors que dans la présente étude 4 min étaient suffisantes, ce qui nous laisse perplexes quant à la linéarité. Après 6 min, le taux de biotransformation était pratiquement nul.

L'ISO interfère avec le métabolisme du TOL par une inhibition incompétitive et interagit avec la biotransformation de l'HEX par une inhibition compétitive. Cependant, aucune baisse de sa concentration en incubation individuelle n'a pu être décelée, même en augmentant le temps d'incubation à 180 min, la concentration enzymatique à 4 mg/ml au lieu de 2 mg/ml et

aussi en le solubilisant dans l'Alkamuls à 3%. Ceci suggère qu'il est possiblement très peu métabolisé, voire même peut-être non métabolisé, par les CYP, mais qu'il pourrait toutefois avoir une affinité pour certains de ceux-ci. Autrement dit, il pourrait agir exclusivement comme inhibiteur. Dans une perspective de recherche, on pourrait étudier le métabolisme de l'ISO en procédant à des incubations dans du surnageant S9 (centrifugation de l'homogénat hépatique à 10000g) ou avec des hépatocytes afin de voir s'il y a d'autres enzymes impliquées que les enzymes microsomiales.

Le fait que l'ISO inhibe de façon différente le métabolisme du TOL et de l'HEX suggère que les CYP impliqués dans le métabolisme de ces deux derniers sont différents. On remarque la même chose avec le CHX. De plus, il est clair que le TOL et l'HEX ne sont pas des compétiteurs réciproques. Bien que l'HEX inhibe de façon compétitive le métabolisme du TOL, l'inverse n'est pas vrai.

Au terme de ce projet, nous avons pu mettre en évidence les interférences métaboliques entre quatre composés organiques volatils (TOL, HEX, CHX et ISO) ubiquistes, souvent présents en mélanges dans notre environnement résidentiel/professionnel (Santé Canada 2009; USEPA 2003, 2005a, 2005b, 2007). Plusieurs des interactions entre ces composés ont été caractérisées pour la première fois. Dans le cadre de ce projet, nous avons mesuré leurs paramètres métaboliques (K_m et V_{max}) ainsi que leurs constantes d'inhibition K_i . Ces différentes données pourront être intégrées dans des modèles prédictifs tels que les modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK) afin de mieux prédire le risque toxicologique lors d'expositions mixtes (Haddad *et al* 2001; Tardif *et al* 1997).

7.8. Références Bibliographiques :

Andersen, ME, HJ Clewell, III (1983). Pharmacokinetic interaction of mixtures. Proceedings of the 14th annual Conference on Environmental Toxicology, Dayton, Ohio. AFAMRL-TR-83-099: 226-238.

Baelum, J; Molhave, L; Honore Hansen, S; et al. (1993) Hepatic metabolism of toluene after gastrointestinal uptake in humans. *Scand J Work Environ Health* 19:55-62.

Andersen, ME, HJ Clewell, III (1983). Pharmacokinetic interaction of mixtures. Proceedings of the 14th annual Conference on Environmental Toxicology, Dayton, Ohio. AFAMRL-TR-83-099: 226-238.

Crosbie SJ, Blain PG, and Williams FM. (1997). Metabolism of n-hexane by rat liver and extrahepatic tissues and the effect of cytochrome. *Human & Experimental Toxicology* 16:131-137

Frommer U, Ullrich V, Standinger H, Orrenius S (1972) The monooxygenation of n-heptane by rat liver microsomes *Biochem Biophys Acta* 280:487-494

Frommer U, Ullrich V, Orrenius S (1974) Influence of inducers and inhibitors on the hydroxy-lation pattern of n-hexane in rat liver microsomes *FEBS Lett* 41: 14-16

Gargas, M. L., Burgess, R. J., Voisard, D. E., Cason, G. H., and Andersen, M. E. (1989). Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98, 87-99.

Gillette JR (1971) Techniques for studying drug metabolism in vitro In: La Du BN, Mandel HG, Way EL (eds) *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition* The Williams & Wilkins Co , Baltimore, pp 400-418.

Haddad S, Tardif R, Charest-Tardif G, and Krishnan K, (1999) Physiological Modeling of Toxicokinetic Interactions in Quaternary mixture of Aromatic Hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 166: 249-257

Haddad S, Charest-Tardif G, Krishnan K (2000). Physiologically Based Modeling of the maximal effect of metabolic interactions of the kinetics of components of complex chemical mixtures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 61: 209-233.

Iba, MM; Fung, J; Gonzalez, FJ (2000). Functional CYP2E1 is required for substantial in vivo formation of 2, 5 hexanedione from n-hexane in the mouse. *Arch Toxicol* 74:582-586

Krishnan, K.; Haddad, S.; Béliveau, M.; and Tardif, R. (2002). Physiological Modeling and Extrapolation of Pharmacokinetic Interactions from Binary to More Complex Chemical Mixtures. *Environmental Health Perspectives*. 110 (suppl 6): 989-994.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 – 275

Nakajima, T; Elovaara, E; Park, SS; *et al.* (1991) Immunochemical detection of cytochrome P450 isozymes induced in rat liver by n-hexane, 2-hexanone and acetyl acetone. *Archives of Toxicology* 65:542-547

Nakajima, T; Wang, RS; Elovaara, E; *et al.* (1997) Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 53:271-277.

Perbellini L, Leone R, Fracasso ME, Brugnone F, and Venturini MS (1982). Metabolic Interaction Between n-Hexane and Toluene in vivo and in vitro *International Archives of Occupational and Environmental Health* 50: 351-385.

Sato, A., and Nakajima, T. (1979a). A vial-equilibration method to evaluate the drug-metabolizing enzyme activity for volatile hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 47, 41–46.

Santé Canada (2009). www.sc-hc.gc.ca. Santé de l'environnement et du milieu de travail

Tardif R, Charest-Tardif G, Brodeur J, and Krishnan K. (1997) Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of a ternary Mixture of Alkyl Benzenes in Rats and Humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 120-134

Tassaneeyakul, W; Birkett, DJ; Edwards, JW; *et al.* (1996) Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m-, and p-xylene. *J Pharmacol Exp Ther* 276:101-108.

Toftgard R, Haaparanta T, Eng L, *et al.* (1986) Rat lung and liver microsomal cytochrome 450 isozymes involved in the hydroxylation of n-hexane. *Biochemical Pharmacology* 35:3733-3738

USEPA (2003) Toxicological review of cyclohexane, EPA 635/R-03/008. *US Environmental Protection Agency, Washington DC.*

USEPA (2005a) Toxicological review of toluene. *EPA/635/R-05/004 US Environmental Protection Agency, Washington D.C*

USEPA (2005b) Toxicological review of n-hexane. *EPA/635/R-03/012 US Environmental Protection Agency, Washington D.C*

USEPA (2007) Toxicological review of isooctane, *EPA EPA/635/R-07/003 U.S Environmental Protection Agency, Washington DC.*

Xiaozhong Y, Gunnar J, Gaku I, Eiji S, Michihiro K, Yuichiro O and Yasuhiro T (1998). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Metabolic Interactions between n-Hexane and Toluene in Humans. *Occupational Health* 40: 293-301.

4.1

7.9. Légendes des figures

Figure 7.1. Variation de la concentration d'HEX (A), CHX (B), ISO (C), TOL (D) en fonction du temps d'incubation. (--- Témoins; — Échantillon).

Figure 7.2. Variation des concentrations d'HEX en fonction du temps d'incubation (45 min). Les symboles \blacklozenge et \blacktriangle représentent respectivement les témoins (sans microsomes) et les échantillons.

Figure 7.3. Représentation en Michaelis - Menten du taux de métabolisme (V) en fonction de la concentration en substrat pour le TOL (A), l'HEX (B) et le CHX (C).

Figure 7.4 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet de l'HEX sur la biotransformation du TOL. Les données expérimentales sont représentées par les symboles (concentration moyenne \pm écart type; 45 min d'incubation, n=2). Les symboles \bullet ; \circ ; \blacktriangledown représentent respectivement les concentrations de TOL utilisées dans le milieu d'incubation, soit 0,81, 2,02 et 4,06 μM .

Figure 7.5 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet du CHX sur la biotransformation du TOL. Les données expérimentales sont représentées par les symboles (concentration moyenne \pm écart type; 45 min d'incubation, n=2). Les symboles \bullet ; \circ ; \blacktriangledown représentent respectivement les concentrations de TOL utilisées dans le milieu d'incubation, soit 0,81, 2,02 et 4,06 μM .

Figure 7.6 Représentation graphique par courbes de Dixon de l'effet de l'ISO sur la biotransformation du TOL. Les données expérimentales sont représentées par les symboles (concentration moyenne \pm écart type; 45 min d'incubation, n=2). Les symboles \bullet ; \circ ; \blacktriangledown représentent respectivement les concentrations de TOL utilisées dans le milieu d'incubation, soit 0,81, 2,02 et 4,06 μM .

Figure 7.7 Représentation par graphique de Dixon de l'effet du TOL sur la biotransformation du HEX. Les données expérimentales sont représentées par les symboles (concentration moyenne \pm écart type; 4 min d'incubation, $n=2$). Les symboles ●, ○, ▼ représentent respectivement les concentrations de HEX utilisées dans le milieu d'incubation, soit 0,0075, 0,019 et 0,041 μM .

Figure 7.8 Représentation par graphique de Dixon de l'effet du CHX sur la biotransformation du HEX. Les données expérimentales sont représentées par les symboles (concentration moyenne \pm écart type; 4 min d'incubation, $n=2$). Les symboles ●, ○, ▼ représentent respectivement les concentrations de HEX utilisées dans le milieu d'incubation, soit 0,0075, 0,019 et 0,041 μM .

Figure 7.9 Représentation par graphique de Dixon de l'effet de l'ISO sur la biotransformation du HEX. Les données expérimentales sont représentées par les symboles (concentration moyenne \pm écart type; 4 min d'incubation, $n=2$). Les symboles ●, ○, ▼ représentent les concentrations respectivement de HEX utilisées dans le milieu d'incubation, soit 0,0075, 0,019 et 0,041 μM .

Figure 7.1

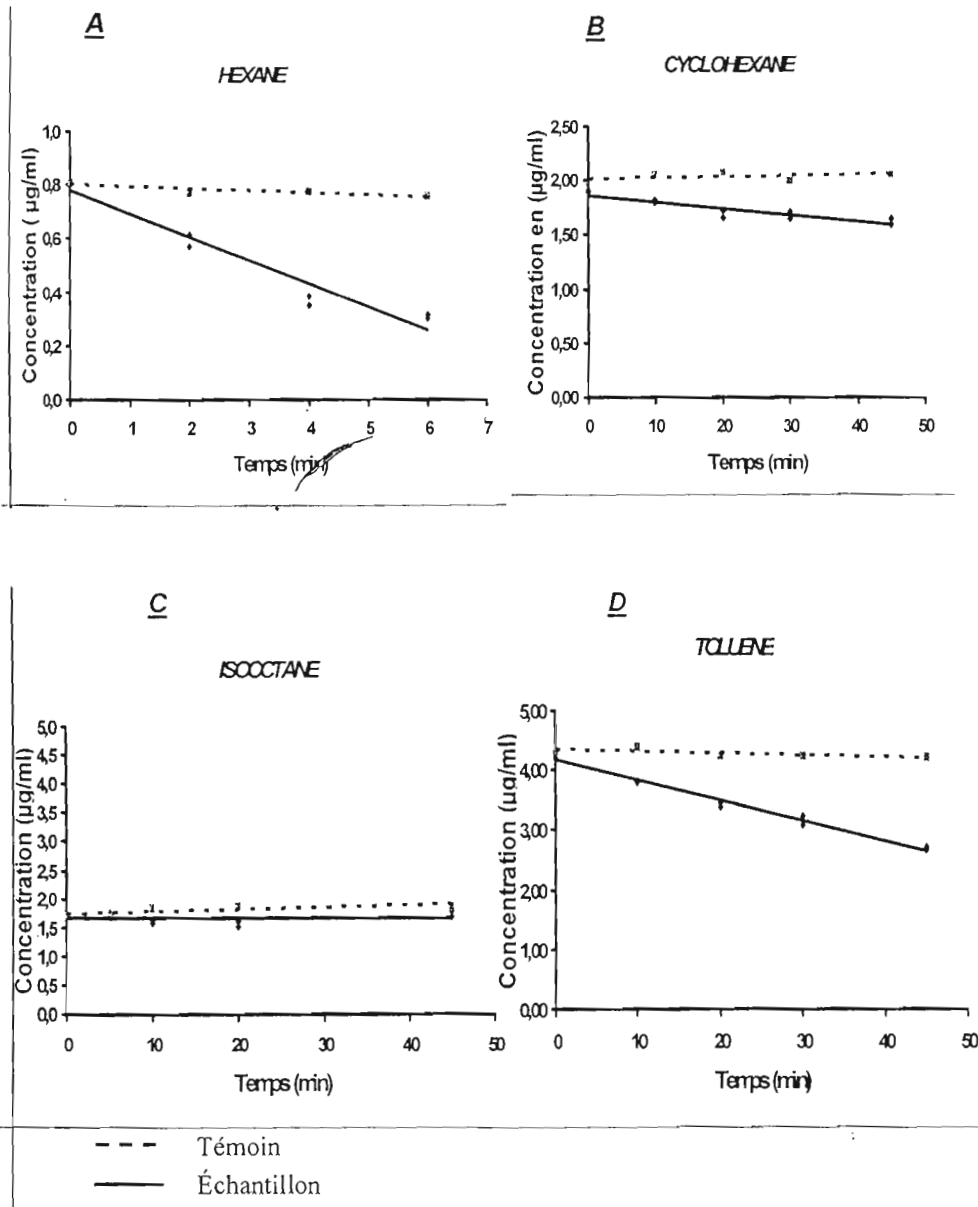


Figure 7.2

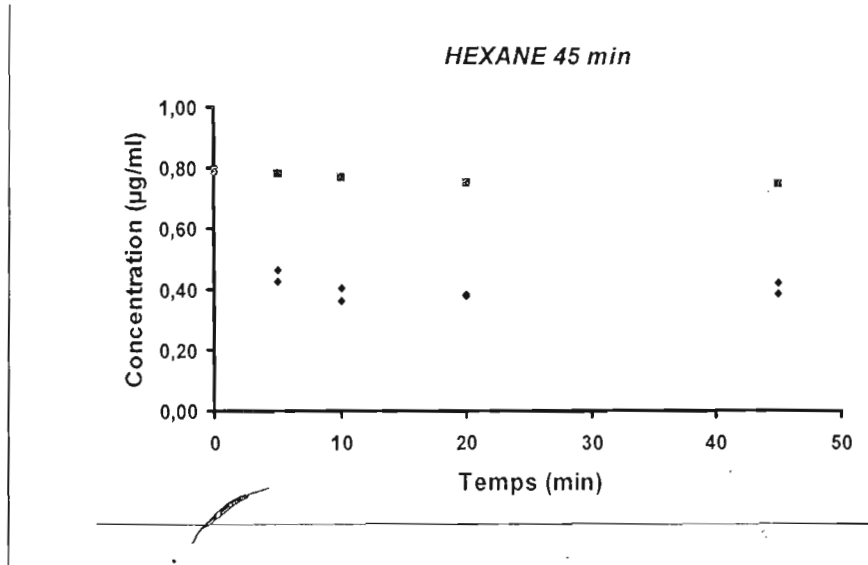
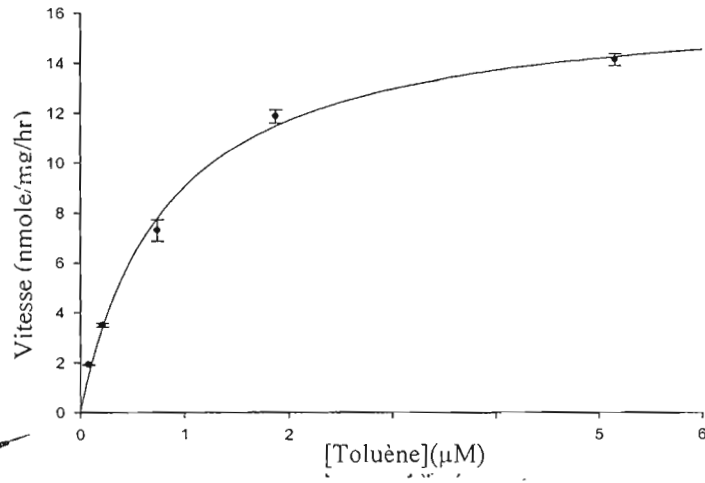
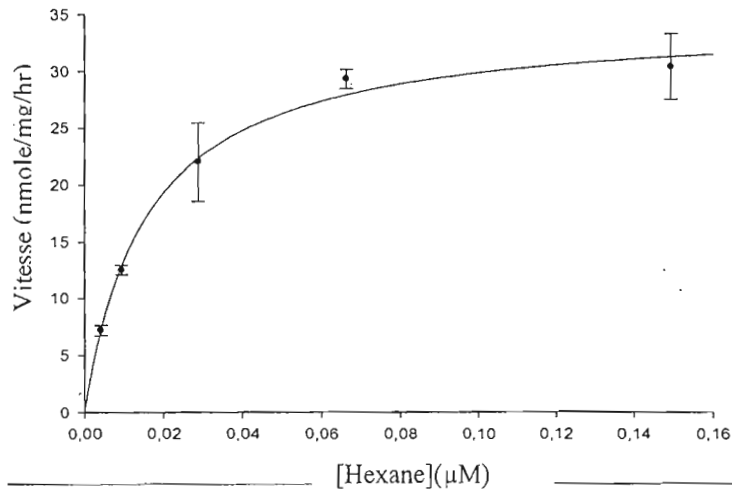


Figure 7.3

A**B**

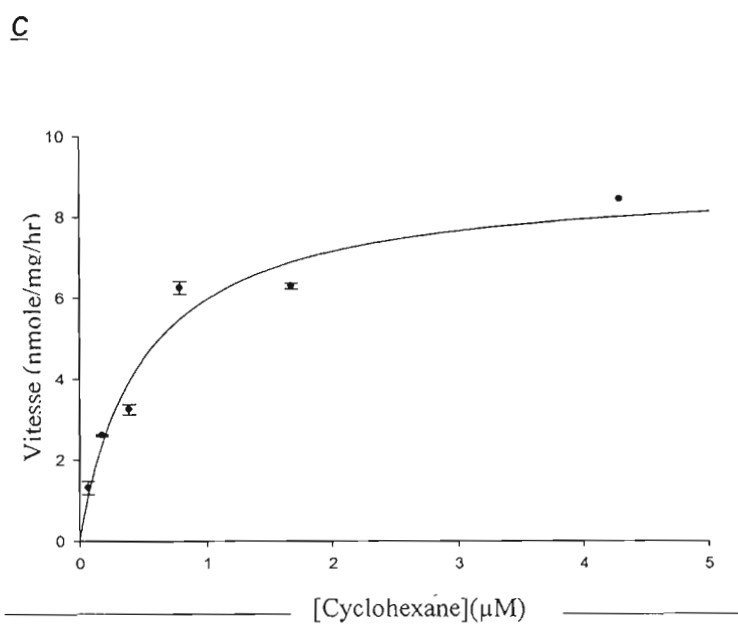


Figure 7.4

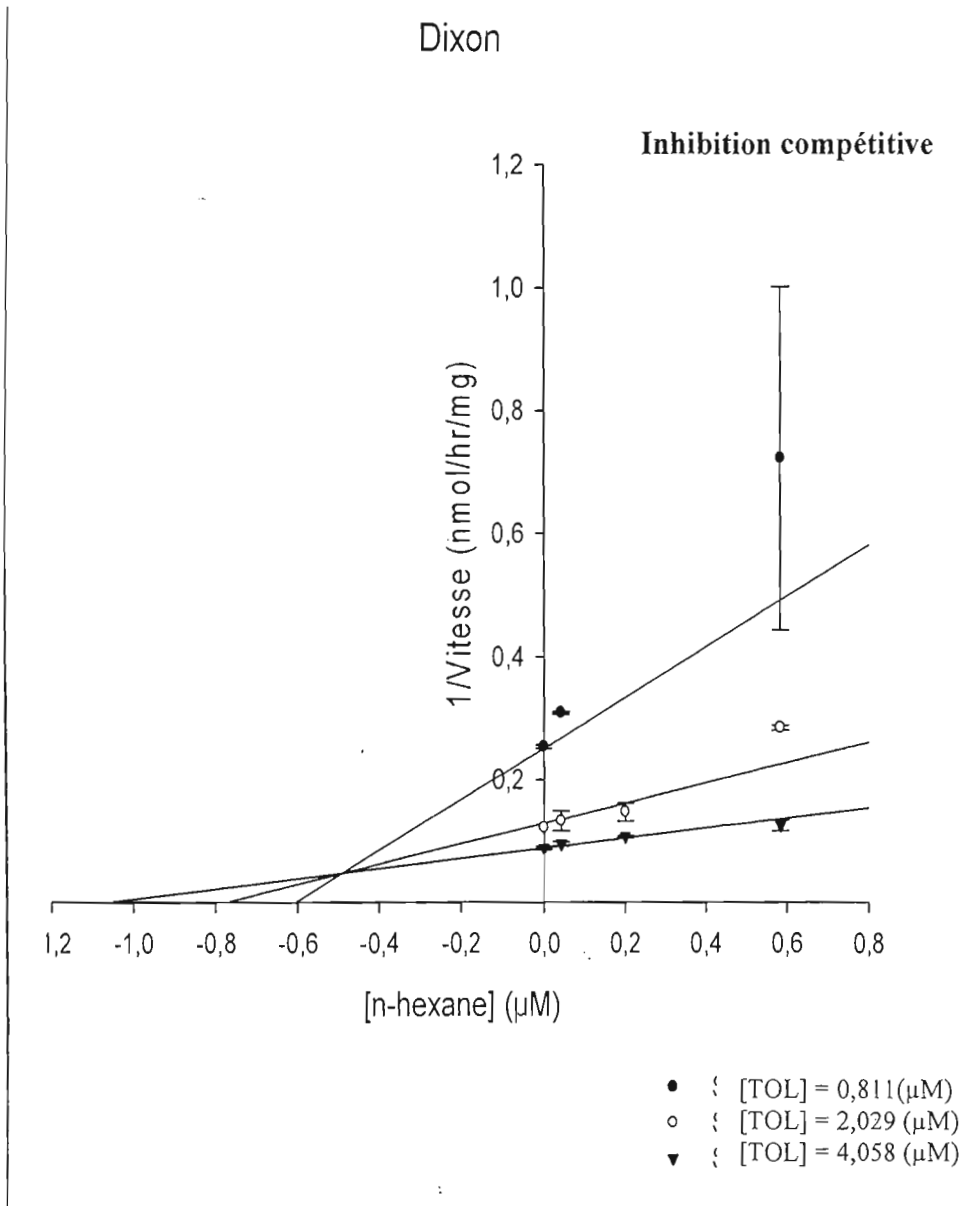


Figure 7.5

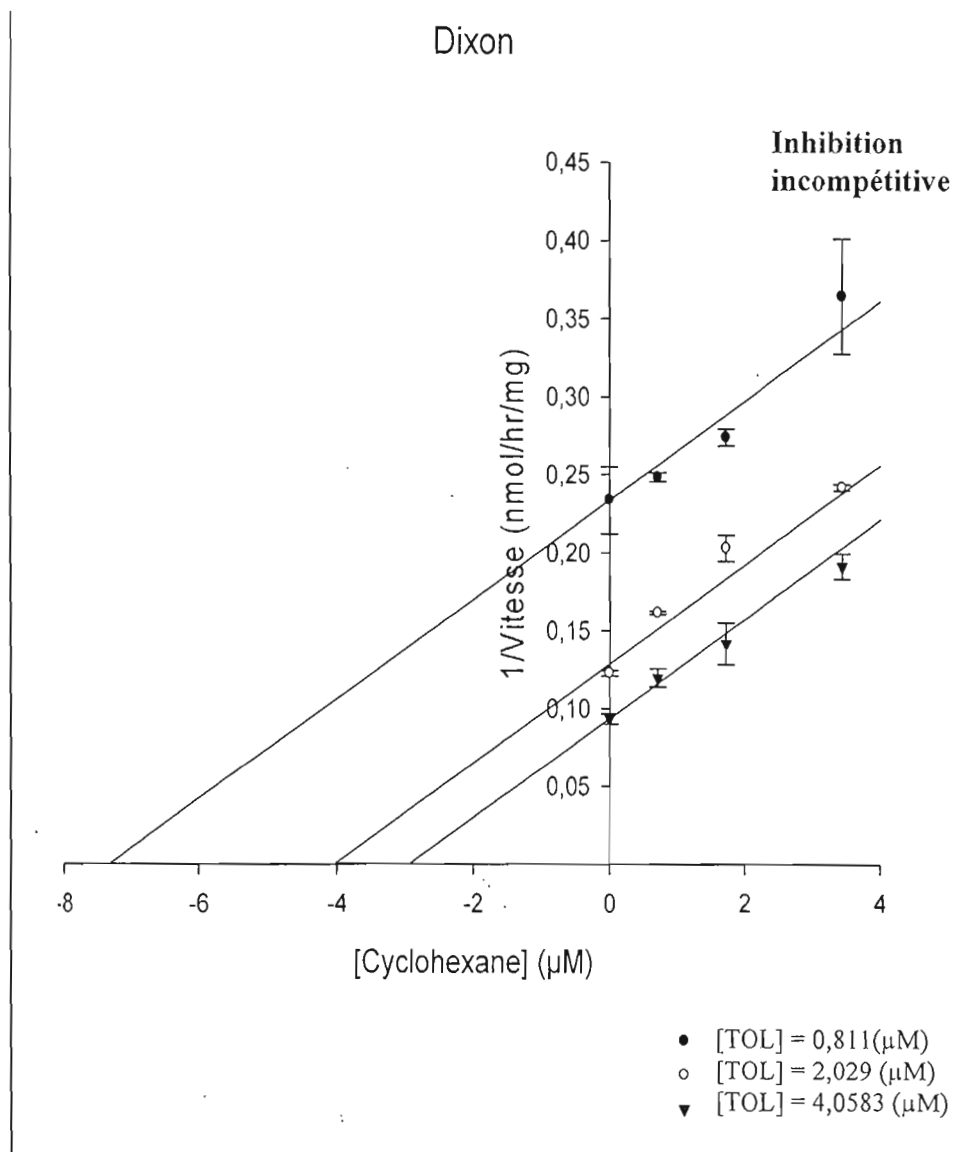


Figure 7.6

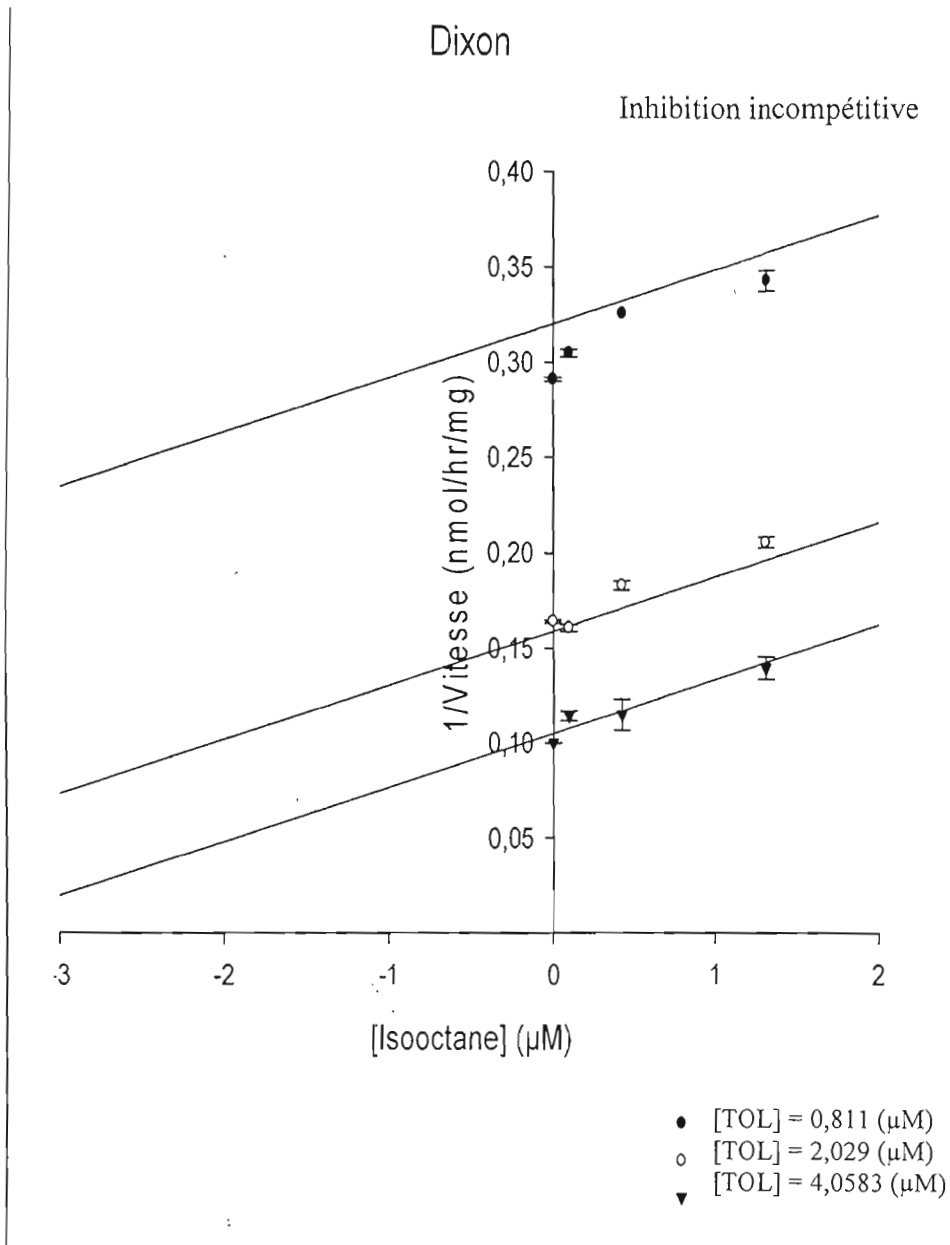


Figure 7.7

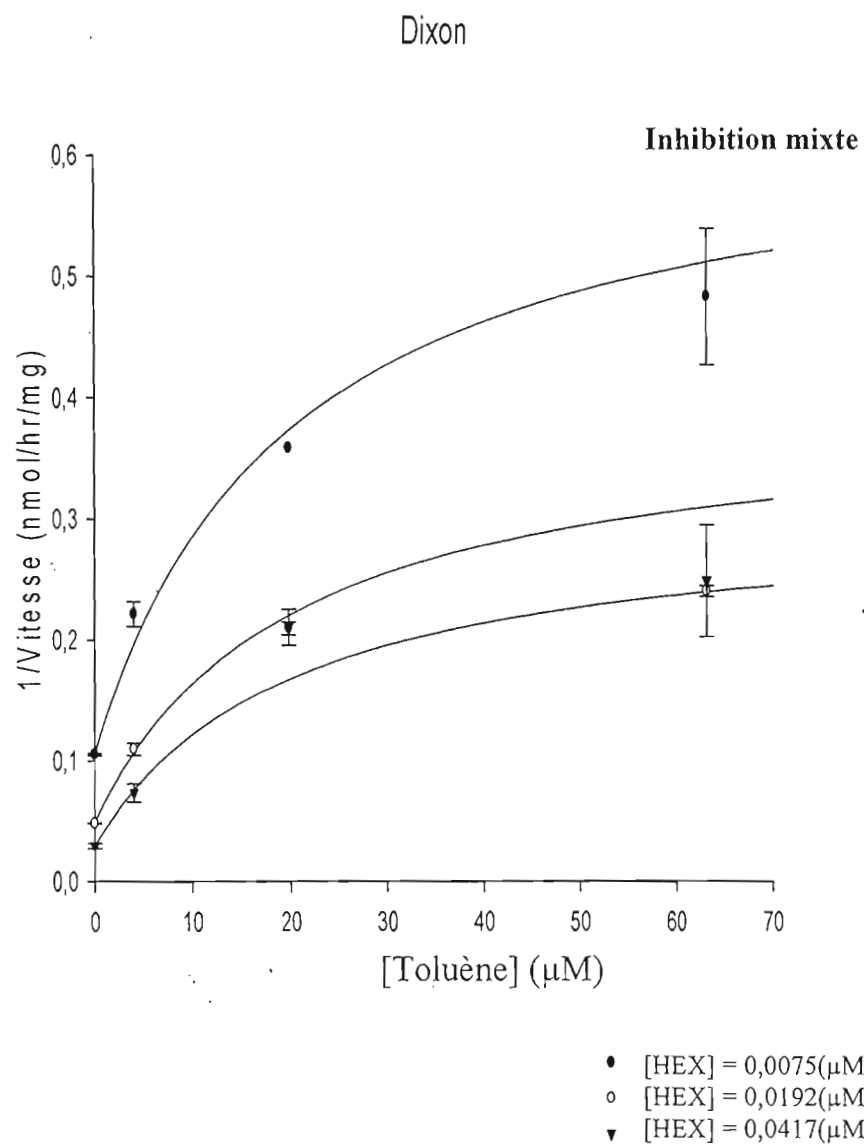


Figure 7.8

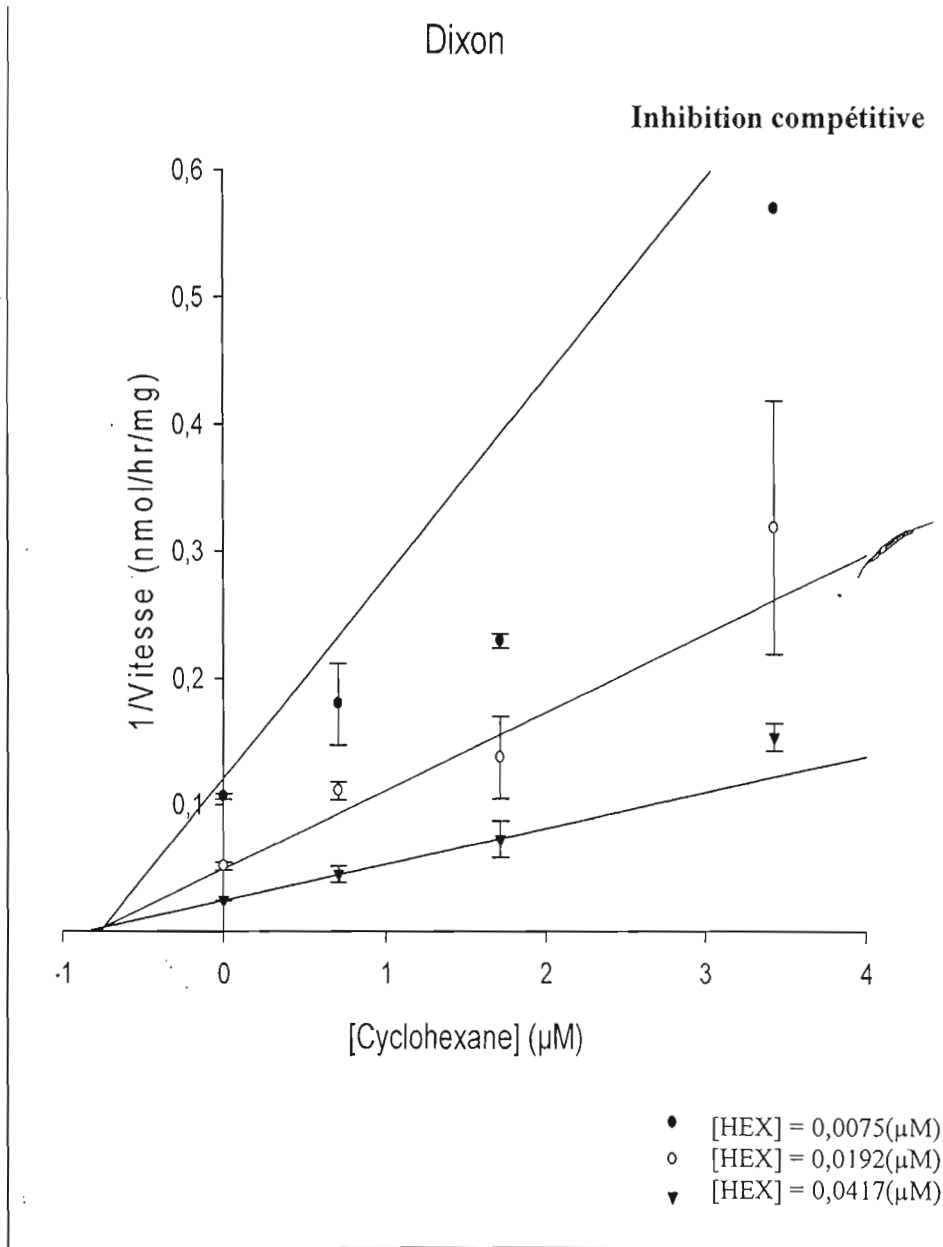


Figure 7.9

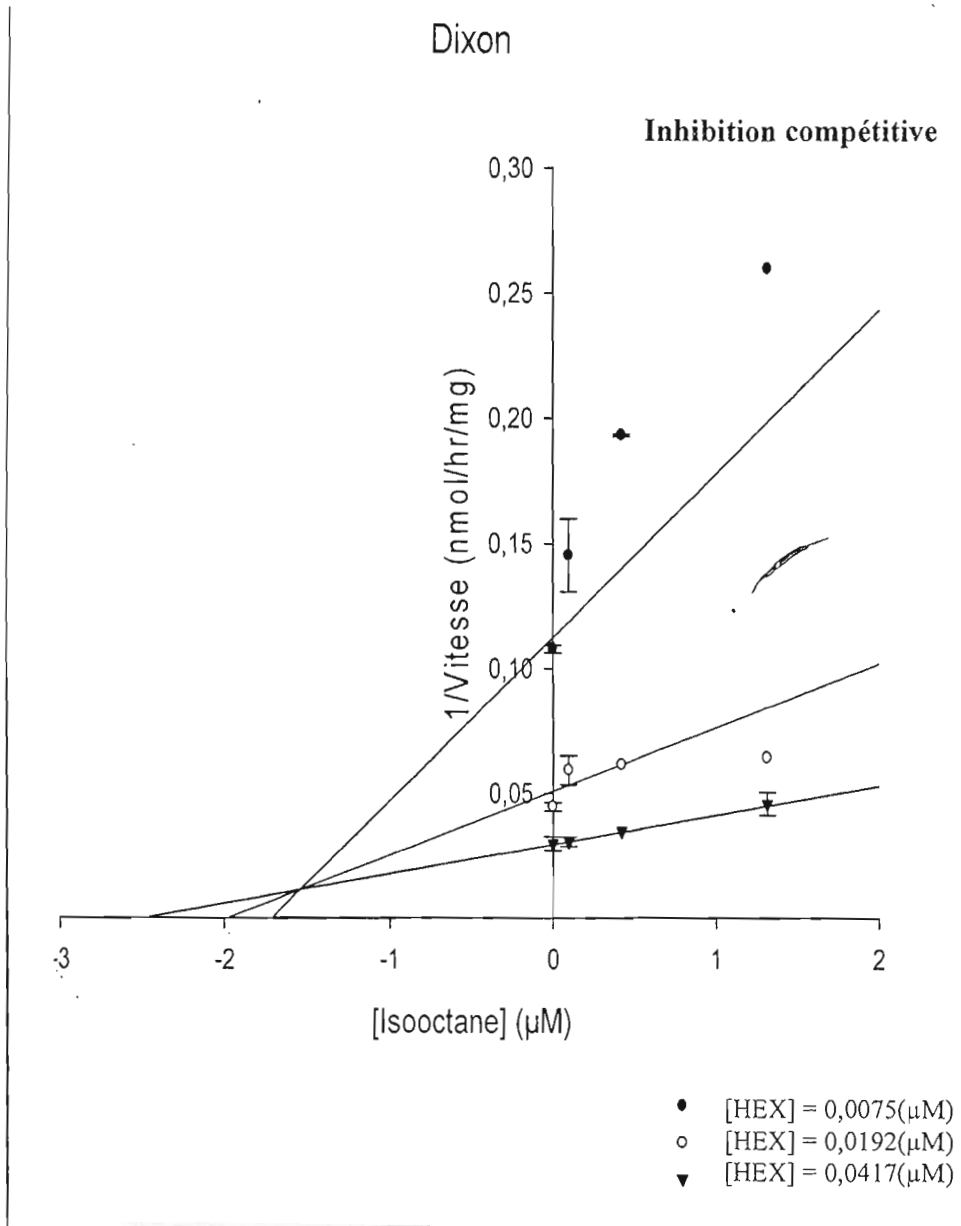


Tableau 7.1 Estimation du coefficient de partage du TOL, HEX, CHX et ISO.

Phase	Volume (μ l)	Coefficient de partage m : air (moyenne \pm SD (=5))			
		TOL	HEX	CHX	ISO
Tampon ^a	1620	1,42 \pm 0,13 (1,750)	\sim 0 (0,026)	\sim 0 (0,010)	\sim 0
Alkamus	100	5,58 \pm 0,51	\sim 0	0,64 \pm 0,19	0,53 \pm 0,20
Microsomes (2 mg/ml)	280	6,55 \pm 0,67	0,27 \pm 0,54	1,40 \pm 0,34	1,29 \pm 0,41
Milieu d'incubation	2000	2,15 \pm 0,34 2,35 ^b	\sim 0 0,04 ^b	\sim 0 0,23 ^b	\sim 0 0,21 ^b

\sim 0 signifie qu'aucune différence n'a pu être mesurée entre la concentration dans la phase gazeuse de la fiole de référence et celle de la fiole d'incubation

^a Données entre parenthèses sont des valeurs de P saline :air mesurées par Gargas et al (1989)

^b Estimation indirect en utilisant les fractions volumiques dans le milieu d'incubation (équation 2) c'est ce coefficient de partage moyen qui est rapporté dans les résultats.

Tableau 7.2 Constantes métaboliques (V_{max} et K_m) du TOL, HEX, et CHX

Substrat	V_{max} (nmole/mg/hr)	K_m (μM)
TOL	$16,60 \pm 0,52$ 0,894 ^a	$0,83 \pm 0,08$ 4,9 ^a
HEX	$34,60 \pm 2,06$ 0,168 ^a	$0,015 \pm 0,003$ 1,7 ^a
CHX	$8,96 \pm 0,66$	$0,50 \pm 0,106$

^a Valeurs de Perbellini et al. (1982).

Tableau 7.3 Types d'inhibitions observées entre TOL, HEX, CHX et ISO

	Ki par Inhibiteur ^a			
	(μM)			
	TOL	HEX	CHX	ISO
TOL	/	$0,491 \pm 0,102$ (c) 30 (n) ^b	$1,84 \pm 0,204$ (i)	$1,798 \pm 0,31$ (i)
HEX	$4,533 \pm 1,77$ (m) $\alpha = 0,23$ $\beta = 0,052$ 7,5 (n) ^b	/	$0,75 \pm 0,112$ (c)	$1,54 \pm 0,37$ (c)

Inhibition incompétitive (i), inhibition compétitive (c), inhibition mixte (m), inhibition non compétitive (n); des inhibitions définies sur la base des regressions non linéaires qui s'ajustent mieux aux résultats expérimentaux, α et β sont les variables de l'inhibition mixte

^(b) Valeurs de Perbellini et al (1982)

CHAPITRE VIII

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'examen de la littérature scientifique et l'étude des rapports produits par les organismes paragouvernementaux œuvrant dans le secteur de la santé et la sécurité au travail montrent que très peu de travaux ont mis la lumière sur les interactions métaboliques entre le TOL, l'HEX, le CHX et l'ISO. Dans cette optique, nous avons entrepris le présent travail afin d'investiguer les interactions métaboliques entre ces composés, étant donné qu'elles peuvent apporter pour l'analyse du risque liée à ces polluants omniprésents des informations utiles à la fois pour le milieu professionnel et pour les expositions environnementales.

Pour caractériser adéquatement ces interactions, il fallait tout d'abord connaître les paramètres de distribution (coefficient de partage) ainsi que les paramètres métaboliques (K_m et V_{max}) propres à chaque composé.

8.1. Le coefficient de partage

Notre étude a porté sur des composés volatils, autrement dit, des substances connues pour leur tendance à s'échapper de la phase liquide pour se répandre dans l'air. Pour étudier la cinétique de ces substances dans des solutions microsomiales, il était judicieux de déterminer leur P_m :air afin de bien estimer la concentration du composé dans la matrice d'incubation.

Excepté le TOL qui a un P_m :air de 2,35, tous les autres solvants ont des P_m :air particulièrement faibles (Hexane :0,04; Cyclohexane :0,23; Isooctane : 0,21). Cette

caractéristique révèle que ces trois dernières substances très volatiles ont tendance à s'échapper du milieu d'incubation pour se retrouver dans la partie gazeuse de la fiole. Cela nous a donc causé de la difficulté à mesurer leur concentration dans la matrice d'incubation. Pour contourner ce problème, en se basant sur les travaux de Perbellini (1982) avec le TOL et le HEX, nous avons ajouté de l'Alkamuls (1%) pour augmenter la solubilité de ces derniers dans le milieu d'incubation. Cela nous a permis de retenir les substances volatiles dans le milieu d'incubation afin qu'elles soient métabolisées par les microsomes hépatiques de foie de rat.

8.2. Les paramètres métaboliques K_m et V_{max}

Pour investiguer la possibilité d'une inhibition enzymatique, il fallait calculer la vitesse de métabolisme pour la substance ~~seule~~ et en présence de l'éventuel inhibiteur. Selon l'information disponible dans la littérature scientifique, les quatre substances à l'étude sont métabolisées par le complexe enzymatique des cytochromes P450 se trouvant, entre autres, dans les microsomes hépatiques. Ces enzymes agissent par un mécanisme saturable selon l'équation générale de Michaelis - Menten (équation 3).

Dans cette perspective, il fallait tout d'abord déterminer les vitesses initiales. Pour ce faire, nous avons entrepris une série de tests de linéarité pour chacune des substances. Nous avons éprouvé quelques difficultés avec l'HEX. Ce composé, doté d'une grande affinité pour l'enzyme (K_m de $0,015 \mu M$) et d'un V_{max} de $34,60 \text{ nmole /mg /hr}$, atteint un pourcentage de métabolisation de 54% dans un délai de 4 min. Nous avons essayé des temps d'incubation jusqu'à 180 min, mais nous avons remarqué un arrêt total du métabolisme après 6 min. Perbellini et *al.* (1982) ont aussi analysé la cinétique de l'HEX dans un délai de 10 min. Pour expliquer ce phénomène, on ne peut pas suggérer une inhibition par le substrat parce que nous avons travaillé avec des concentrations inférieures à la constante d'affinité K_m et nous observons une dépendance temporelle de l'inhibition (i.e., aucune inhibition avant 4 min). Cet arrêt total du métabolisme pourrait être expliqué par une inhibition enzymatique par son

principal métabolite, le 2,5-HD, comme proposé par Andersen et *al* (1983). Pour vérifier cette hypothèse expérimentalement, on pourrait faire des co-incubations d'HEX et de 2,5 hexanedione dans la même matrice d'incubation et analyser la cinétique métabolique de l'HEX.

8.3. Les interactions métaboliques

Nos travaux ont permis de démontrer qu'en mélanges binaires la cinétique du TOL peut être influencée par la présence d'HEX, de CHX et d'ISO. Ces trois substances interfèrent avec le métabolisme du TOL par différentes sortes d'inhibition. L'HEX agit sur la biotransformation de ce dernier par une inhibition compétitive avec une constante d'inhibition K_i de $0,49 \mu\text{M}$, tandis que le CHX et l'ISO interagissent avec le TOL par une inhibition incompétitive avec des K_i respectifs de $1,84 \mu\text{M}$ et $1,79 \mu\text{M}$.

De même, nos résultats démontrent bien que le TOL, le CHX et l'ISO peuvent interagir avec le métabolisme de l'HEX. En mélange binaire, le TOL agit sur le métabolisme de l'HEX par une inhibition mixte avec un K_i de $4,53 \mu\text{M}$. De plus, les données prouvent que l'inhibition compétitive est le mécanisme par lequel le CHX agit sur la biotransformation de l'HEX avec une constante d'inhibition K_i de $0,75 \mu\text{M}$. Enfin, l'ISO interfère avec le métabolisme de l'HEX par une inhibition compétitive avec un K_i de $1,54 \mu\text{M}$. Contrairement aux données sur le métabolisme du TOL où les courbes de régression s'ajustaient bien aux données expérimentales, celles sur l'inhibition du métabolisme de l'HEX s'ajustent moins bien. Les régressions choisies sont celles qui présentent une meilleure concordance statistique (moins de variabilité).

Perbellini et *al.* (1982) ont étudié les interactions métaboliques *in vitro* et *in vivo* entre le TOL et l'HEX chez les rats Sprague-Dawley. Notre étude *in vitro* a démontré des divergences avec les résultats de ces auteurs. Effectivement, comme mentionné plus tôt, nous avons observé une inhibition compétitive du métabolisme du TOL par l'HEX et une inhibition mixte du métabolisme de l'HEX par le TOL, ce qui diverge de l'inhibition mutuellement non compétitive entre le TOL et l'HEX observée par ceux-ci. Cette divergence

résulte aussi en une différence de valeurs de K_i ($0,49 \mu\text{M}$ pour notre étude vs $30 \mu\text{M}$ pour Perbellini pour le K_i de l'HEX sur le métabolisme du TOL; $4,53 \mu\text{M}$ pour notre étude vs $7,5 \mu\text{M}$ pour Perbellini pour le K_i du TOL sur le métabolisme de l'HEX). Il est difficile d'expliquer cette divergence, mais il y a toutefois des différences méthodologiques à noter entre les deux expériences. En effet, Perbellini *et al* (1982) ont fait des incubations dans des solutions de S9 à une concentration de protéines de $11,64 \pm 2,18 \text{ mg/flacon}$, tandis que nous avons mené nos incubations dans les solutions microsomiales à une concentration de protéines de 2 mg/flacon .

Il faut aussi signaler les difficultés que nous avons rencontrées en investiguant le métabolisme de l'ISO. Ce composé ayant une faible solubilité dans l'eau ($2,4 \text{ mg/l}$) et un coefficient de partage milieu : air ($P_m : \text{air}$) de $0,03$ agit sur le métabolisme du TOL par une inhibition incompétitive ($K_i=1,79 \mu\text{M}$) et une fois en mélange binaire avec l'HEX, il agit sur la biotransformation de celui-ci par une inhibition compétitive ($K_i=1,54 \mu\text{M}$). Nous n'avons cependant pas décelé de baisse de sa concentration en incubations individuelles, même en augmentant le temps d'incubation à 180 min , la concentration enzymatique à 4 mg/ml au lieu de 2 mg/ml et aussi en le solubilisant dans de l'Alkamuls 3%. Ce qui mène à croire qu'il est un inhibiteur du CYP 2E1 (enzyme impliqué dans le métabolisme du TOL) et d'un autre cytochrome responsable du métabolisme de l'HEX, sans être, toutefois, un substrat de ces enzymes.

Un autre type d'interaction que nous n'avons pas pu identifier, est celui de l'effet du TOL, de l'HEX et de l'ISO sur la biotransformation du CHX. Nous nous sommes confrontés à un problème de variabilité qui a fait que, malgré les nombreux essais expérimentaux en co-administration avec le CHX comme substrat, nous n'avons pas été en mesure d'avoir des résultats reproductibles ou significativement différents des contrôles (CHX seul).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette étude a démontré de façon claire qu'une fois en mélanges, les quatre substances à l'étude (TOL, HEX, CHX et ISO) interagissent entre eux par des inhibitions métaboliques. Les conséquences de ces interférences en conditions *in vivo* pourraient mener à: i) une augmentation de la concentration sanguine de la substance mère inchangée, ii) une diminution de la concentration urinaire des métabolites. Dans ces conditions, les paramètres de surveillance biologique de l'exposition peuvent être affectés au point de fausser l'estimation de l'exposition par rapport à la situation qui prévaut lors d'une exposition à une substance unique (Tardif et al 1997).

Les informations générées dans le cadre de ce projet (P_m :air, K_m , V_{max} et K_i) pourront aussi être utilisées dans l'élaboration et l'application de modèles PBPK. Ces modèles nous permettront de prédire l'effet des interactions métaboliques sur le profil de la concentration sanguine pour chaque composé du mélange et donc de faciliter l'estimation des risques découlant des expositions à des mélanges de solvants. De plus, il serait intéressant d'investiguer le métabolisme de l'ISO avec d'autres méthodes d'analyse (S9 ou hépatocytes du foie du rat) afin de pouvoir répondre clairement à la question de son affinité au complexe enzymatique des cytochromes P450.

BIBLIOGRAPHIE

ATSDR (2000). Toxicological profile for toluene. In US Department of health and human services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry

Baelum, J., Molhave, L. et Hansen, SH. 1998. Metabolic interaction between toluene, trichloroethylene and n-hexane in humans. *Scand J Work Environ Health* 24: 30-37.

Beck, B. D., Rudel, R. et E. J. Calabrese. 1994. Use of toxicology in the regulatory process. *A. W. Hayes Principles and Methods of toxicology* 3: 19 – 58.

Bernhardt Rita 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology* 124: 128–145.

Boewer, C., Enderlein, G., Wollgast, U., Nawka, S. et Palowski, FH. 1988. Epidemiological study on the hepatotoxicity of occupational toluene exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 60:181-186

Brucker, JV. et Peterson, RG. 1981. Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse.II. Model development and toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 61:302-312

Bus, J., Demo, D., Cox, M. 1982. Dose-dependent disposition of n-hexane in F344 rats after inhalation exposure. *Fundam Appl Toxicol* 2:226-229.

Cardona, A., Marhuenda, D., Marti, J et al. 1993. Biological monitoring of occupational exposure to n-hexane by measurement of urinary 2,5-hexanedione. *Int Arch Occup Environ Health* 65:71-74.

Cardona, A., Marhuenda, D., Prieto, MJ. et al. 1996 Behaviour of urinary 2,5-hexanedione in occupational coexposure to n-hexane and acetone. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 68:88-93.

Charbonneau, M., Lock, EA., Strasser, J. et al. 1987. 2, 2, 4- trimethyl pentane- induced, nephrotoxicity I. Metabolic disposition of TMP in male and female Fisher 344rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 91: 171-181

- Crosbie, S.J., Blain, P.G. et Williams, F.M. 1997. Metabolism of n-hexane by rat liver and extrahepatic tissues and the effect of cytochrome. *Human & Experimental Toxicology* 16:131-137.
- Dahl, A.R. 1989. The fate of inhaled octane and the nephrotoxicant, isooctane, in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 100: 334-341.
- Davis, M.R., Mapleson, W.W. 1981. Structure and quantification of physiological model of the distribution of injected agents and inhaled anaesthetics. *Brit J Anaesth*, 53: 399-405.
- Dos Santos, C.R., Meyer Passarelli, M.M., De Souza Nascimento, E. 2002. Evaluation of 2,5-hexanedione in urine of workers exposed to n-hexane in Brazilian shoe factories. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778: 237-244.
- D'Souza, R. W., Francis, W. R., et Andersen, M. E 1988. A physiological model for tissue glutathione depletion and increased resynthesis following ethylene dichloride exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 563-568.
- Eastman, A.D., Mears, D.E. 1995. Hydrocarbons (C1-C6). In: *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 13: 812-837.
- Fiserova-Bergerova 1992. Gases and their solubility: a review of fundamentals. In: *Fiserova-Bergerova, eds. Modeling of inhalation exposure to vapor; uptake, distribution and elimination* Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton. Vol I: 3-28.
- Fishbein, L. 1985. An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. II. Toluene. *The Science of the Total Environment* 42: 267-288.
- Gargas, M. L., Andersen, M. E. et Clewell, H. J. III. 1986a. A physiologically based simulation approach for determining metabolic constants from gas uptake data. *Toxicology and Applied Pharmacology* 86: 341-352.
- Gargas, M. L., Clewell, H. J., III. et Andersen M. E. 1986b. Metabolism of inhaled dihalomethanes in vivo : Differentiation of kinetic constants of two independent pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* . 82: 211-233.
- Gargas, L.M, Burgess, R.J., Voisard, D.E., Cason, H.G., Andersen, M. E 1989. Partition coefficients of low-molecular weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* 98: 87-99

Guzelian, P., Mills, S., Fallon, HJ. 1988. Liver structure and function in print workers exposed to toluene. *Journal of Occupational Medicine* 30: 791-796.

Haddad, S., Withey, J., Laporé, S., Law, F., Krishnan, K. 1998. Physiologically- based pharmacokinetic modeling of pyrene in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5: 245 – 255.

Haddad, S., Tardif, R., Charest-Tardif, G. et Krishnan, K. 1999. Physiological Modeling of Toxicokinetic Interactions in Quaternary mixture of Aromatic Hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 166: 249-257.

Haddad, S., Charest-Tardif, G., Krishnan, K. 2000. Physiologically Based Modeling of the maximal effect of metabolic interactions of the kinetics of components of complex chemical mixtures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 61: 209-233.

Hsieh, G., Sharma, R. et Parker, R., D., R. 1989. Immunotoxicological evaluation of toluene exposure via drinking water in mice. *Environmental Research* (1) 49: 93-103.

Iba, MM., Fung, J., Gonzalez, FJ. 2000. Functional CYP2E1 in required for substantial in vivo formation of 2, 5 hexanedione from n-hexane in the mouse. *Arch Toxicol* 74: 582-586.

INRS 2003. Fiche toxicologique du Cyclohexane. *Fiche toxicologique N°17*. Cahier de notes documentaires-hygiène et sécurité du travail -N°190.

INRS 2004. Les mélanges explosifs, 1- Gaz et vapeurs. ED911, p : 20.

INRS 2008a, Fiche toxicologique Hexane. *FT113*.

INRS 2008b, Fiche toxicologique Toluène. *FT74*.

INRS 2010, Fiche toxicologique Cyclohexane. *FT17*.

Iwata, M., Takeuchi, Y., Hisanaga, N. et al. 1983. Changes of n-hexane metabolites in urine of rats exposed to various concentrations of n-hexane and to its mixture with toluene or MEK. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 53: 1-8.

Jackoby, W. B. 1982. Metabolic Basis of Detoxification: Metabolism of Functional Groups. Academic Press, New York.

Johanson, G. 1986. Physiologically based pharmacokinetic modeling of inhaled 2-butoxyethanol in man. *Toxicological Letter* 34: 23-31.

Kavaler, AR, 1998. Chemical marketing reporter. *New York Schnell*. p.53.

Kim, C., Manning, R. O., Brown, R. P. et Bruckner, J. V. 1996. Use of the Vial Equilibration Technique for Determination of Metabolic Rate Constants for Dichloromethane. *Toxicology and applied pharmacology* 139: 243 - 251.

Kalaassen, C. D. et Eaton, D. L. 1991. Principles of toxicology, dans M. O. Amdur, J. Doull et C. D. Kalaassen *Casarett and Doull's Toxicology*, 4^{ième} édition, Pergamon Press, New York, p: 12 - 49.

Klaassen C. D. 2001. *Casarett and Doull's Toxicology*, The Basis science of Poisons. 6^{ième} édition. McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York.

Kloss, MW., Swenberg, J., Bus, JS. 1986. Sex-dependant differences in disposition of [14C-5]-2, 2, 4-trimethylpentane in Fisher 344 rats with cover sheet. Submitted under TSCA Section 8D; EPA Document No 86-870001586 NTIS No. OTS 0516167.

Krasavage, WJ., O'Donoghue, JL., DiVincenzo, GD. et al. 1980. The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*. 52:433-441.

Krishnan, K., Brodeur, J. 1991. Toxicological consequences of combined exposures to environmental pollutants. *Arch. Complex Environ. Studies* 3: 1- 106.

Krishnan, K. et Andersen, ME. 2001. Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes AW, ed). Philadelphia: Taylor and Francis 193-241.

Krishnan, K., Haddad, S., Béliveau, M. et Tardif, R. 2002. Physiological Modeling and Extrapolation of Pharmacokinetic Interactions from Binary to More Complex Chemical Mixtures. *Environmental Health Perspectives*. 110: 989 - 994.

Löf, A; Wallen, M; Hjelm, EW. 1990 Influence of paracetamol and acetylsalicylic acid on the toxicokinetics of toluene. *Pharmacol Toxicol* 66:138-141.

Löf, A; Hjelm, EW; Colmsjo, A; et al. 1993. Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to 2H8-toluene. *Br J Ind Med* 50: 55-59.

- Marangoni, Alejandro G. 2003. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*.
- Mutti, A., Falzoi, M., Lucertini, S. et al. (1984). n-Hexane metabolism in occupationally exposed workers. *Br J Ind Med* 41: 533 - 538.
- Mayan, O., Teixeira, JP., Pires, AF. 2001 Biological monitoring of n-hexane exposure in Portuguese shoe manufacturing workers. *Appl Occup Environ Hyg* 16: 736-741.
- Nakajima, T., Elovaara, E., Park, SS. et al. 1991. Immunochemical detection of cytochrome P450 isozymes induced in rat liver by n-hexane, 2-hexanone and acetyl acetone. *Archives of Toxicology* 65: 542-547.
- O'Brien, ET., Yeoman WB and Hobby JA. (1971). Hepatorenal damage from toluene in a "glue sniffer." *British Medical Journal* 2: 29-30.
- Olson, C. T., Yu, K. O., Hobson, D. W. et Serve, M. P. 1985. Identification of urinary metabolites of the nephrotoxic hydrocarbon 2,2,4-trimethyl-pentane in male rats. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 313-316.
- Ono, Y., Takeuchi, Y., Hisanaga, N. 1981. A comparative study on the toxicity of n-hexane and its isomers on the peripheral nerve. *Int Arch Occup Environ Health* 48: 289-294.
- Perbellini, L., Brugnone, F. 1980. Lung Uptake and Metabolism of Cyclohexane in Shoe Factory Workers. *Int Arch Occup Environ Health* 45: 261-269.
- Perbellini, L., Leone, R., Fracasso, ME., Brugnone, F., et Venturini, MS. 1982. Metabolic Interaction Between n-Hexane and Toluene in vivo and in vitro *International Archives of Occupational and Environmental Health* 50: 351-385.
- Perbellini, L., Brugnone, F., Caretta, D., Maranelli, G. 1985. Partition coefficient of some industrial aliphatic hydrocarbons (C5-C7) in blood and human tissues. *British Journal of Industrial Medicine* 42: 162-167.
- Perbellini, L., Mozzo, P., Olivato, D., Brugnone, F. 1990. "Dynamic" biological exposure indexes for n-hexane and 2,5-hexanedione, suggested by a physiologically based pharmacokinetic model. *Am. Ind. Hyg. Assoc.* 51: 356-362.
- Pierce, C. H., Chen, Y., Dills, R. L., Kalman, D. A. et Morgan, M. S. 2002. Toluene metabolites as biological indicators of exposure. *Toxicol Lett* 129: 65-76.

- Ramsey, J., Andersen, ME. 1984. A physiologically based toxicokinetic description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 73: 159-175.
- Rea, TM., Nash, JF., Zabik, JE., Born, GS., et Kessler, WV. 1984. Effects of toluene inhalation on brain biogenic amines in the rat. *Toxicology* 31: 143-150.
- Rees, DC., Knisely, JS., Jordan, S., Balster, R. 1987 Discriminative stimulus properties of toluene in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 88: 97-104
- Robertson, P., White, E., Bus, J. 1989. Effects of methyl ethyl ketone pretreatment on hepatic mixed-function oxidase activity and on in vivo metabolism of n-hexane. *Xenobiotica* 19: 721 - 729.
- Saito, I., Shibata, E., Huang, J; et al. 1991. Determination of urinary 2,5-hexanedione concentration by an improved analytical method as an index of exposure to n-hexane. *Br J Ind Med* 48:568-574.
- Santé Canada (2009). www.sc-hc.gc.ca. Santé de l'environnement et du milieu de travail.
- Sato, A., Nakajima, T. 1979. Partition coefficients of some aromatics hydrocarbons and ketons in water, blood, and oil. *British Journal of Industrial Medicine* 36: 231-234.
- Shibata, E., Huang, J., Ono, Y. et al. 1990a. Changes in urinary n-hexane metabolites by coexposure to various concentrations of methyl ethyl ketone and fixed n-hexane levels. *Archives of Toxicology* 64: 165-168.
- Shibata, E., Huang, J., Hisanaga, N. et al. 1990b. Effects of MEK on kinetics of n-hexane metabolites in serum. *Archives of Toxicology* 64: 247-250.
- Tardif, R; Plaa, GL; Brodeur, J. 1992. Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. *Can J Physio Pharmacol* 70: 385-395.
- Tardif, R., Charest-Tardif, G., Brodeur, J., et Krishnan, K. 1997. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of a ternary Mixture of Alkyl Benzenes in Rats and Humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144: 120-134.
- Tardif, R; Truchon, G; Brodeur, J. 1998. Comparison of hippuric acid and o-cresol in urine and unchanged toluene in alveolar air for the biological monitoring of exposure to toluene in human volunteers. *Appl Occup Environ Hyg* 13: 127-132.

Tardif, R., S. Laparé, S., Krishnan, K. et Brodeur, J. 1999. A descriptive and mechanistic study of the interaction between toluene and xylene in humans. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 65: S135 - S137.

Toftgard, R., Haaparanta, T., Eng, L. *et al.* 1986. Rat lung and liver microsomal cytochrome 450 isozymes involved in the hydroxylation of n-hexane. *Biochemical Pharmacology* 35: 3733-3738.

Turkall, RM; Skowronski, GA; Abdel-Rahman, MS. 1991. Differences in kinetics of pure and soil-adsorbed toluene in orally exposed male rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 20: 155-160.

USEPA (2003) Toxicological review of cyclohexane, EPA 635/R-03/008. US Environmental Protection Agency, Washington DC.

USEPA (2005a) Toxicological review of toluene. EPA/635/R-05/004 US Environmental Protection Agency, Washington D.C.

USEPA (2005b) Toxicological review of n-hexane. EPA/635/R-05/012 US Environmental Protection Agency, Washington D.C.

USEPA (2007) Toxicological review of isooctane, EPA EPA/635/R-07/003 U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC.

Van Engelen, JG., Rebel-de Haan, W., Opdam, JJ. *et al.* 1997. Effect of coexposure to methyl ethyl ketone (MEK) on n-hexane toxicokinetics in human volunteers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 385-395.

Xiaozhong, Y., Gunnar, J., Gaku, I., Eiji, S., Michihiro, K., Yuichiro, O. et Yasuhiro, T. 1998. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Metabolic Interactions between n-Hexane and Toluene in Humans. *Occupational Health* 40: 293-301.