

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Badji Mokhtar Annaba



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté de médecine

كلية الطب

Département de pharmacie

قسم الصيدلة

Thèse

En vue de l'obtention du Doctorat En Sciences Médicales (D.E.S.M)

Spécialité Toxicologie

Evaluation biotoxicologique de l'exposition professionnelle au benzène contenu dans le carburant

Réalisée par : Dr KERKOUB Fazia

Maitre Assistante Hospitalo-Universitaire en Toxicologie

Soutenue publiquement le 26/10/2025 devant le jury :

Pr REZK-KALLAH Haciba	Présidente	Toxicologie (Faculté de médecine Oran)
Pr DJAFER Rachid	Directeur de thèse	Toxicologie (Faculté de médecine Annaba)
Pr BELMAHI Med Habib	Membre examinateur	Toxicologie (Faculté de médecine Constantine)
Pr BENBOUDIAF Sabah	Membre examinateur	Toxicologie (Faculté de médecine Constantine)
Pr TIGHA Nadia	Membre examinateur	Médecine de travail (Faculté de médecine Annaba)

Année universitaire 2024-2025

GRATITUDE

*Avant toute chose, je rends grâce à **Dieu**, source de toute force, de toute patience et de toute lumière.*

*C'est à **Lui** que je dois l'endurance physique et mentale qui m'a permis de persévérer malgré les obstacles, les incertitudes et les silences.*

Dans les moments de doute, de solitude ou de fatigue, Il a été mon refuge.

Dans les instants de découragement, Il a renouvelé mon souffle.

*Je **Lui** suis profondément reconnaissante pour les portes qu'Il a ouvertes avec sagesse, pour les prières exaucées parfois sans bruit, et pour la paix intérieure qu'Il m'a accordée tout au long de ce chemin exigeant.*

Ce travail a été rédigé dans un contexte personnel particulièrement éprouvant, c'est dans cette épreuve que j'ai appris à puiser plus profondément encore, à m'accrocher à l'essentiel, et à transformer la peine en persévérance.

Cette thèse est le fruit d'un travail scientifique, mais elle est aussi le reflet d'un chemin tissé de résilience, de foi et de gratitude.

Rien n'aurait été possible sans cette force invisible qui m'a portée, guidée et relevée.

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

« وفوق كل ذي علم عليم »

DEDICACES

*À **Mes chers Parents** ; dont l'amour, le courage et la dignité m'ont guidée bien au-delà des mots. Malgré le fardeau des maladies, leurs soutien et prières discrètes m'ont enveloppée de bénédiction. Ce travail est aussi le leur. Leur patience, leur abnégation et leur foi ont été une lumière dans l'ombre des exigences scientifiques.*

*À **Mon cher Mari** ; pour son aide inestimable, sa présence constante, sa patience précieuse et son écoute généreuse. Dans les moments d'épuisement, il cherchait les mots justes et les solutions discrètes qui redonnent du souffle. Merci d'avoir cru en moi sans réserve, même quand je doutais et d'avoir traversé ce parcours à mes côtés.*

*À **Mes chères Sœurs** ; alliées de cœur et de vie, pour les rires partagés, les conseils sincères et leur soutien infaillible et profond qui m'a portée tout au long de ce parcours.*

*À **Mes précieux enfants** ; mes joyaux lumineux. Vous m'avez tant attendue, jour après jour, dans cette période où j'étais absorbée, distraite parfois indisponible. Vous avez prié pour moi avec vos petites voix et vos grands cœurs. Malgré vos jeunes âges, vous m'avez insufflé une force inégalée, et inondée d'amour. J'espère être pour vous un exemple de persévérance, de courage et de résilience, à la hauteur de l'immense inspiration que vous m'offrez.*

*À **Ma Belle Famille** ; pour leur respect, leurs prières, leur bienveillance et leur confiance dans mes choix.*

*À **Ma Spécialité La Toxicologie** ; champ rigoureux et passionnant, qui m'a offert un regard critique sur la santé et l'environnement.*

*À **Mon Pays l'Algérie** Puissent mes travaux contribuer, modestement, à son rayonnement scientifique et humain.*

REMERCIEMENTS

A Pr Rachid DJAFER

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur *Pr DJAFER*, dont l'accompagnement a été essentiel à la réalisation de cette thèse.

Depuis mes dernières années en faculté, jusqu'à ma spécialisation en toxicologie, il a toujours été un enseignant exigeant et engagé. Son encadrement, basé sur la rigueur et la confiance, m'a permis de me dépasser et de progresser dans un cadre scientifique structurant.

Durant cette thèse, il m'a permis de relever des défis qui ont forgé mon approche méthodologique et scientifique. Son exigence m'a permis de me dépasser, d'aller au-delà des objectifs fixés, et d'explorer des horizons que je n'aurais peut-être pas osé envisager seule.

Au-delà de son rôle de directeur de thèse, il a été un mentor déterminant, m'ouvrant des portes et me poussant à toujours aller plus loin.

A travers ces lignes, je lui témoigne mon respect pour son soutien et sa confiance indéfectibles.

REMERCIEMENTS

A Pr Roberta ANDREOLI

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à *Roberta*, dont l'engagement et la générosité ont été déterminants dans la réalisation de ce travail. Bien que ne me connaissant pas au départ, elle a répondu avec bienveillance à mon premier contact et m'a ouvert les portes de son laboratoire en Italie.

Son soutien scientifique a été précieux ; elle a accepté de réaliser des analyses complexes et coûteuses, sans contrepartie, et a guidé ma réflexion à chaque étape du projet. Toujours rigoureuse et disponible malgré un emploi du temps chargé, elle n'a cessé de me prodiguer des conseils avisés, de suivre l'évolution de mon travail, et d'apporter des recommandations essentielles.

Son sens du détail, sa bienveillance face à mes erreurs, ainsi que son intérêt sincère pour mon avancement ont été autant des « marqueurs » de son professionnalisme et de sa générosité. Au-delà de l'aspect scientifique, elle a également veillé à rendre mon séjour agréable en Italie.

À travers ces lignes, je souhaite lui témoigner ma reconnaissance pour son aide précieuse et son engagement sans faille et j'espère que cette belle collaboration sera couronnée par un papier scientifique de haut niveau.

REMERCIEMENTS

A Pr Haciba REZK-KALLAH ; Professeure en toxicologie

Madame la présidente du jury, je tiens à vous adresser mes remerciements les plus sincères, pour l'attention bienveillante et rigoureuse que vous porterez à mon travail.

Je suis particulièrement honorée de votre présence à la tête de ce jury, et reconnaissante pour la considération que vous m'avez témoignée tout au long de ce processus.

Votre exigence intellectuelle, alliée à une grande humanité, m'inspireront toujours.

A Pr Mohamed Habib BELMAHI ; Maitre de conférences A en toxicologie

Je tiens Monsieur, à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour la disponibilité et l'intérêt porté à mon travail.

Votre participation au jury constitue pour moi un grand honneur, et vos observations éclairées contribueront sûrement à approfondir l'analyse scientifique de cette recherche.

A Pr Sabah BENBOUDIAF ; Maitre de conférences A en toxicologie

Je vous remercie chaleureusement Madame, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je suis honorée de pouvoir bénéficier de votre expertise et votre regard critique sur ce travail. Vos remarques pertinentes et suggestions constructives vont grandement enrichir ma réflexion.

A Pr Nadia TIGHA ; Professeure en Médecine du travail

Madame, vous me faites l'honneur et le grand plaisir d'évaluer cette thèse. Qu'il me soit permis de vous présenter le témoignage de mon grand respect et l'expression de ma profonde reconnaissance. Je suis honorée de pouvoir bénéficier de votre évaluation critique et de votre soutien bienveillant.

REMERCIEMENTS

À *Sofiana Brahimi*, pour son engagement exemplaire dans l'analyse du t,t-MA par HPLC-DAD, la gestion rigoureuse des échantillons et son professionnalisme empreint de sincérité et d'intégrité.

À *Dr Touati, Dr Bouras, Pr Chaib*, médecins du travail privé, à l'EPSP et au CHU, pour leur collaboration précieuse et leur aide dans l'orientation des travailleurs vers cette étude.

À *Madame Bouarra Nadia* pour son aide généreuse dans l'approvisionnement des cartouches SPE, étape indispensable au bon déroulement des analyses.

À *Piero Lovreglio*, pour sa réactivité bienveillante et son aide dans la mise en relation avec Roberta, ainsi qu'à *Chiara Maccari*, doctorante au laboratoire de toxicologie industrielle de Parme, pour sa contribution à la gestion des analyses par UPLC-MS/MS avec disponibilité.

À *Madame Abba*, infirmière au CHU, pour sa présence active et son aide lors des prélèvements sanguins dans les stations-service, et à *Dr Brahimi Med Chérif*, pour avoir réalisé les bilans FNS des travailleurs dans son laboratoire avec hospitalité et bienveillance.

À *Pr Gouri Adel*, pour m'avoir aidée à acquérir le logiciel SPSS, et à *Dr Gharbi Moufida*, pour son accompagnement patient et généreux lors de mes premiers pas sur le logiciel.

À tous les volontaires « non exposés » qui ont accepté de participer à l'étude avec confiance.

À l'ensemble des gérants des stations-service et garages mécaniques, ainsi qu'aux travailleurs exposés, pour leur accueil chaleureux sur leurs lieux de travail et leur coopération.

À tous les résidents anciens et actuels du laboratoire de toxicologie du CHU Ibn Sina notamment pour leurs encouragements, mots gentils et soutien tout au long de cette aventure.

À l'ensemble du personnel médical et paramédical du laboratoire de toxicologie de Annaba ainsi que mes collègues toxicologues des autres villes : Constantine, Sétif, Tizi-Ouzou, Ouergla, Oran et Alger, pour leurs mots gentils et leurs encouragements fraternels.

À mes collègues enseignants du département de pharmacie, pour leurs messages d'encouragement et leurs vœux bienveillants, ainsi qu'au staff administratif, pour leur accompagnement discret mais précieux.

À mes chères amies **Mina B, Meriem B** et **Amel B**, pour leur écoute sincère, leurs encouragements, soutien infaillible et leur chaleur humaine.

Table des matières

Introduction / Problématique.....	1
Revue bibliographique.....	5
Chapitre I:.....	6
Exposition professionnelle au carburant et au benzène.....	6
I.1. Les carburants et les solvants pétroliers en général	7
I.1.1. Définition	7
I.1.2. Production	7
I.1.3. Utilisations	8
I.1.4. Catégories de carburants et solvants pétroliers	9
I.1.4.1. Les essences carburant	9
I.1.4.2. Les essences spéciales.....	10
I.1.4.3. Le white spirit et autres coupes légères aromatiques	11
I.1.4.4. Le kérosène (pétrole lampant), le gazole et les fiouls.....	11
I.2. Exposition professionnelle aux carburants et solvants pétroliers	12
I.2.1. Secteurs d'activité exposés aux carburants et solvants pétroliers.....	12
I.2.2. Matrice « emplois-expositions » aux carburants et aux solvants pétroliers.....	12
I.2.2.1. Matrice dédiée à l'exposition à l'essence carburant	15
I.2.2.2. Matrice dédiée à l'exposition aux essences spéciales et aux autres coupes pétrolières non aromatiques	16
I.2.2.3. Matrice dédiée à l'exposition aux white-spirits et autres coupes aromatiques légères	17
I.2.2.4. Matrice dédiée à l'exposition à au moins un carburant ou un solvant pétrolier	18
I.3. Le benzène dans le carburant	20
I.3.1. Propriétés physico-chimiques	20

I.3.2. Production	21
I.3.3. Utilisations	21
I.3.4. Utilisation en tant que solvant et évolution de la réglementation	22
I.3.5. Utilisation dans l'essence carburant et évolution de la réglementation	23
I.3.6. Sources d'exposition professionnelles	24
I.3.7. Sources d'exposition extra-professionnelles.....	25
I.3.8. Historique des limites d'exposition	26
I.3.9. Matrice « exposition-emploi » dédiée à l'exposition au benzène.....	28
Chapitre II :	31
Toxicologie du benzène.....	31
II.1. Toxicocinétique.....	32
II.1.1. Absorption	32
II.1.1.1. Orale	32
II.1.1.2. Respiratoire.....	32
II.1.1.3. Cutanée	32
II.1.2. Distribution	33
II.1.3. Métabolisme	33
II.1.4. Elimination	38
II.2. Mécanisme d'action toxique.....	40
II.2.1. Historique de la mise en évidence de la toxicité du benzène	40
II.2.2. Nouvelle approche mécanistique (system biology approach).....	41
II.2.3. Mécanisme d'action par génotoxicité indirecte.....	42
II.2.3.1. Génotoxicité indirecte par stress oxydatif	42
II.2.3.2. Génotoxicité indirecte par inhibition de la topoisomérase II.....	46
II.2.3.3. Génotoxicité indirecte par adduits protéiques	47
II.2.3.4. Génotoxicité indirecte par altération épigénétique.....	47

II.2.4. Mécanisme d'action par génotoxicité directe	52
II.2.4.1. Adduits à l'ADN	52
II.2.5. Mécanisme d'action non génotoxique	53
II.2.6. Mécanisme de cancérogenèse.....	54
II.2.6.1. Mécanisme des leucémies induites par le benzène.....	55
II.2.6.2. Mécanisme des lymphomes induits par le benzène.....	56
II.2.7. Mécanismes de la dysfonction de la moelle osseuse	57
II.3. Effets toxiques chroniques de la faible exposition au benzène	59
II.3.1. Effet sur le système hématopoïétique	59
II.3.2. Effet sur le système immunitaire	61
II.3.3. Effets sur le système nerveux	61
II.3.4. Effets sur le système respiratoire	62
II.3.5. Effet cardiovasculaire	62
II.3.6. Cancérogenèse	64
II.3.6.1. Cancers hématologiques	64
II.3.6.2. Cancer du poumon.....	64
II.3.6.3. Cancer colorectal	65
II.3.6.4. Cancer de la tête et du cou.....	65
II.3.7. Système digestif et urinaire	65
II.3.8. Effet sur le système reproductif.....	66
II.3.9. Effets cutanés et allergies	66
II.3.10. Effet musculosquelettique	66
II.3.11. Classification des symptômes.....	66
Chapitre III :.....	68
Surveillance biotoxicologique de l'exposition aux faibles taux de benzène	68

III.1. Implication de la baisse des limites d'exposition professionnelle dans le biomonitoring	69
III.2. Biomarqueurs d'exposition	71
III.2.1. Biomarqueurs d'exposition dans l'air expiré	71
III.2.2. Biomarqueurs d'exposition dans le sang.....	72
III.2.2.1. Benzène sanguin.....	72
III.2.2.2. Adduits aux protéines	72
III.2.2.3. Adduits à l'ADN.....	73
III.2.3. Biomarqueurs d'exposition dans les urines.....	73
III.2.3.1. Benzène urinaire.....	73
III.2.3.2. Phénols urinaires	74
III.2.3.3. L'acide trans,trans-muconique urinaire (t,t-MA)	74
III.2.3.4. Acide S-phényl mercapturique urinaire (S-PMA).....	75
III.2.3.5. Catechol, quinol et benzenetriol dans les urines	76
III.2.4. Interprétation des données des biomarqueurs d'exposition	77
III.3. Biomarqueurs d'effet précoce	78
III.3.1. Biomarqueurs de l'effet hématotoxique	78
III.3.2. Biomarqueurs de modification épigénétique.....	79
III.3.3. Biomarqueurs de l'effet génotoxique	81
III.3.3.1. Tests pour la détection des cassures de l'ADN	81
III.3.3.2. Tests pour la détection des altérations chromosomiques.....	83
III.3.4. Biomarqueurs du stress oxydatif (produits d'oxydation des acides nucléiques et autres)	87
III.3.4.1. Malonyl dialdéhyde (MDA).....	87
III.3.4.2. Glutathion (GSH)	87
III.3.4.3. Produits d'oxydation de la guanine	87
III.3.5. Biomarqueurs de l'effet immunologique et inflammatoire	91

III.3.5.1. Biomarqueurs de l'inflammation	91
III.4.5.2. Biomarqueurs de l'immunosuppression.....	92
III.3.6. Biomarqueurs protéomiques du benzène	93
III.3.7. Biomarqueurs de prédiction de l'altération d'expression des gènes	93
III.4. Biomarqueurs de susceptibilité	94
Partie pratique	99
I. Matériel et méthodes.....	100
I.1. Présentation l'étude.....	100
I.2. Population étudiée.....	100
I.3. Biomarqueurs étudiés.....	102
I.4. Matériel	106
I.4.1. Matériel utilise pour le dosage de la créatinine urinaire	106
I.4.2. Matériel utilise pour le dosage du tt-ma urinaire par HPLC-DAD.....	106
I.4.3. Matériel utilise pour le dosage des métabolites et les produits des bases nucléiques par UPLC-MS/MS.....	107
I.4.4. Matériel utilisé pour l'analyse des données	109
I.5. Démarche méthodologique	109
I.5.1. Concertation avec les médecins du travail et les employeurs.....	109
I.5.2. Consentement éclairé et aspects éthiques	110
I.5.3. Collecte des informations	110
I.5.4. Echantillonnage.....	111
I.5.5. Analyse de la créatinine urinaire.....	112
I.5.6. Analyse t,t-MA urinaire par HPLC-DAD	113
I.5.6.1. Préparation des solutions	113
I.5.6.2. Optimisation de l'extraction en phase solide SPE et des paramètres chromatographiques	114
I.5.6.3. Protocole d'extraction par SPE.....	116

I.5.6.4. Paramètres chromatographiques	116
I.5.7. Analyse simultanée de S-PMA, t,t-MA et S-BMA par UPLC-MS/MS	119
I.5.7.1. Préparation des solutions et prétraitement de l'échantillon	119
I.5.7.2. Paramètres chromatographiques et de masse.....	120
I.5.7.3. Paramètres de validation	123
I.5.8. Analyse simultanée des produits d'oxydation et de méthylation des acides nucléiques et la cotinine par UPLC-MS/MS.....	124
I.5.8.1. Préparation des solutions	124
I.5.8.2. Courbe d'étalonnage et préparation des échantillons	125
I.5.8.3. Paramètres chromatographiques et de spectrométrie de masse	126
I.5.8.4. Différentes transitions et temps de rétention.....	128
I.5.8.5. Paramètres de validation	129
I.5.9. Recueil du bilan hématologique (formule numération sanguine).....	130
I.5.10. Diagramme de flux récapitulatif des paramètres analysés.....	131
I.6. Analyse statistique des données	131
I.7. Critères de jugement	136
I.8. Biais potentiels.....	138
II. Résultats.....	139
II.1. Caractéristiques socio-démographiques	140
II.2. Caractéristiques professionnelles	141
II.2.1. Rythme de travail.....	141
II.2.2. Ancienneté au poste	142
II.2.3. Port des équipements de protection individuelle (EPI)	142
II.2.4. Répartition des pompistes par géolocalisation de la station-service	143
II.3. Données cliniques.....	145
II.4. Bilan biotoxique	148

II.4.1. Créatinine urinaire	148
II.4.1.1. Comparaison entre groupes	148
II.4.1.2. Comparaison entre valeurs AV et AP.....	148
II.4.2. Biomarqueurs d'exposition au benzène.....	150
II.4.2.1. Comparaison entre groupes	150
II.4.2.2. Comparaison entre valeurs AV et AP.....	151
II.4.2.3. Comparaison par rapport aux indicateurs biologiques d'exposition (IBE)	154
II.4.3. Biomarqueurs de l'effet génotoxique par stress oxydatif.....	159
II.4.3.1. Comparaison entre les groupes	159
II.4.3.2. Comparaison entre valeurs AV et AP.....	161
II.4.4. Biomarqueurs de l'effet épigénétique.....	165
II.4.4.1. Comparaison entre les groupes	165
II.4.4.1. Comparaison entre les valeurs en AV et AP	167
II.4.5. Biomarqueurs de l'effet hématologique	169
II.4.5.1. Comparaison entre les groupes	169
II.4.6. Biomarqueur d'exposition à la nicotine (cotinine urinaire).....	173
II.4.6.1. Comparaison entre les groupes	173
II.4.6.2. Comparaison entre valeurs AV et AP.....	174
II.4.6.3. Comparaison entre fumeurs et non-fumeurs.....	175
II.4.6.4. Répartition des sujets de l'étude selon les seuils de cotinine urinaire.....	176
II.4.6.5. Croisement entre statut tabagique déclaré et mesuré.....	177
II.4.7. Biomarqueur de co-exposition au toluène (S-BMA urinaire)	179
II.4.7.1. Comparaison entre les groupes	179
II.4.7.2. Comparaison entre les valeur AV et AP.....	180
II.4.8. Influence de l'âge sur les différents biomarqueurs.....	181
II.4.8.1. Comparaison entre les exposés et non exposés selon les tranches d'âge	181

II.4.8.2. Comparaison selon les tranches d'âge chez le groupe des exposés.....	182
II.4.9. Influence du tabagisme.....	182
II.4.9.1. Influence du tabagisme sur les différents biomarqueurs chez les exposés et non exposés	182
II.4.9.2. Influence du tabagisme sur les différents biomarqueurs chez les exposés et non exposés (tranches de cotinine)	186
II.4.9.3. Comparaison de tous les biomarqueurs entre fumeurs et non-fumeurs dans chaque groupe.....	188
II.4.9.4. Comparaison de tous les biomarqueurs entre les tranches de cotinine chez les exposés	190
II.4.9.5. Influence du tabagisme sur les valeurs AV et AP chez les exposés	192
II.4.9.6. Influence du tabagisme sur le dépassement des IBE	193
II.4.10. Influence des facteurs professionnels	194
II.4.10.1. Influence de l'ancienneté au travail chez les exposés	194
II.4.10.2. Influence du rythme de travail chez les exposés	194
II.4.10.3. Influence de la géolocalisation des pompes à essence chez les pompistes	196
II.4.11. Comparaison des biomarqueurs chez les sujets exposés selon la présentation de symptômes.....	198
II.5. Données descriptives d'un groupe homogène d'exposition (GHE).....	200
II.6. Synthèse des résultats	204
II.6.1. Synthèse des résultats des biomarqueurs d'exposition.....	204
II.6.2. Synthèse des comparaisons entre groupe exposé et groupe non exposé pour tous les biomarqueurs.....	205
II.6.3. Synthèse des comparaisons entre valeurs AV et AP chez les sujets exposés pour tous les biomarqueurs	207
II.6.4. Synthèse des différences statistiquement significative entre pompistes et mécaniciens	209
II.7. Analyse des corrélations	212

II.7.1. Corrélations significatives chez les exposés.....	213
II.7.2. Corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les fumeurs et les vrais non-fumeurs exposés	217
II.7.3. Corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les fumeurs et non-fumeurs non- exposés.....	219
II.7.4. Corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les pompistes et les mécaniciens	220
II.7.5. Corrélations entre nombre de symptômes et biomarqueurs chez les exposés.....	221
II.7.6. Corrélations entre nombre d'heures de travail et biomarqueurs chez les exposés	221
II.8. Analyse des régressions multiples (analyse multivariée)	222
II.8.1. Les biomarqueurs d'exposition en tant que variable dépendante	222
II.8.2. Les biomarqueurs d'effet génotoxique par stress oxydatif en tant que variable dépendante	225
II.8.3. Les biomarqueurs d'effet épigénétique en tant que variable dépendante.....	232
II.8.4. Les biomarqueurs d'effet hématologique en tant que variable dépendante	237
II.9. Résultats de l'analyse du t,t-MA par HPLC-DAD et comparaison avec la méthode de référence UPLC-MS/MS.....	240
II.9.1. Critères de la validation analytique de la méthode.....	240
II.9.2. Résultats de l'analyse du t,t-MA chez les sujets de l'étude.....	243
II.9.3. Chromatogrammes.....	244
II.9.4. Vérification de la distribution normale des différences des moyennes de mesure	247
II.9.5. Comparaison des moyennes des différences par le test t sur échantillon unique	247
II.9.6. Diagramme de Bland-Altman.....	248
II.9.7. Comparaison des courbes ROC	250
II.10. Prédiction de l'exposition atmosphérique à partir des valeurs du S-PMA urinaire.....	254
III. Discussion	256
III.1. Rappel du contexte de l'étude et la problématique	256

III.2. Discussion du choix des biomarqueurs	257
III.2.1. Choix des biomarqueurs d'exposition.....	257
III.2.2. Choix des biomarqueurs d'effet génotoxique par stress oxydatif	258
III.2.3. Choix des biomarqueurs d'effet épigénétique.....	259
III.2.4. Choix des biomarqueurs d'effet hématologique	260
III.3. Discussion de la performance de l'analyse par UPLC-MS/MS	261
III.4. Discussion des résultats des biomarqueurs d'exposition	263
III.4.1. Biomarqueurs d'exposition entre exposés et non exposés	263
III.4.1.1. Le point sur le S-PMA	266
III.4.1.2. Le point sur le t,t-MA.....	268
III.4.1.3. Dépassement des IBE.....	270
III.4.1.4. Ratio des concentrations urinaires t,t-MA / S-PMA.....	272
III.4.2. Facteurs influençant les taux des biomarqueurs d'exposition.....	274
III.4.2.1. Intensité de l'expositions au benzène atmosphérique	274
III.4.2.2. Influence de la géolocalisation des pompes à essence	276
III.4.2.3. Influence de la saison sur le benzène atmosphérique.....	278
III.4.2.4. Influence du rythme de travail et de l'ancienneté au poste	279
III.4.2.5. Influence du tabagisme.....	282
III.4.2.6. Influence de la co-exposition au toluène	286
III.4.2.7. Autres facteurs (prise d'alcool et IMC).....	289
III.4.3. Comparaison entre les professions (pompistes et mécaniciens)	290
III.5. Discussion des signes cliniques déclarés	293
III.6. Discussion des biomarqueurs urinaires d'effet génotoxique par stress oxydatif	297
III.6.1. Relation avec les biomarqueurs d'exposition du benzène et du toluène.....	298
III.6.2. Influence du tabagisme sur les biomarqueurs oxydatifs	300
III.6.3. Influence du moment du prélèvement (comparaisons AV ET AP).....	304

III.6.4. Influence de la profession sur les biomarqueurs oxydatifs (comparaison entre pompistes et mécaniciens).....	304
III.6.5. Influence de l'âge, l'ancienneté au travail et le nombre d'heures travaillées	305
III.7. Discussion des biomarqueurs d'effet épigénétique	308
III.7.1. Relation avec les biomarqueurs d'exposition.....	310
III.7.2. Lien avec l'âge et l'ancienneté	310
III.7.3. Lien entre biomarqueurs méthylés	312
III.7.4. Lien avec les biomarqueurs du stress oxydatif.....	312
III.7.5. Influence du tabagisme.....	312
III.7.6. Comparaison entre les valeurs AV et AP	314
III.7.7. Comparaison entre pompistes et mécaniciens et géolocalisation.....	315
III.8. Discussion des biomarqueurs de l'effet hématologique.....	317
III.8.1. Lien avec les biomarqueurs d'exposition et les données clinico-professionnelles	317
III.8.2. Lien avec les biomarqueurs d'effet oxydatif et épigénétique.....	321
III.9. Comparaison entre les deux techniques de dosage du t,t-MA urinaire	322
III.9.1. Technique de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD	322
III.9.2. Analyse du diagramme de BLAND-ALTMAN	324
III.9.3. Comparaison des courbes de ROC	326
III.10. Points forts de l'étude.....	327
III.11. Limites de l'étude et perspectives d'amélioration.....	328
IV. Conclusion	331
Recommandations et perspectives	335
Références bibliographiques	339
Annexes	356
Annexe I: Approbation du comité d'éthique	357
Annexe II: Consentement éclairé des sujets participant à l'étude.....	358
Annexe III: Fiche de renseignements	359
Annexe IV: Résultats de la validation de la méthode de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD	360
Annexe V: Tests post Hoc	375

LISTE DES ABREVIATIONS

- 1-MeGua : 1MéthyGuanine
- 5-MeCyto : 5MéthylCytosine
- 5-MedCyt : 5MéthylCytidine
- 5-MetCyt : 5MéthylCytidine
- 5-OHMeCyto :
5HydroxyMéthylCytosine
- 5OH-MedCyt :
5HydroxyMéthyldésoxyCytidine
- 7-MeGua : 7MéthylGuanine
- 7-MeGuo : 7MéthylGuanosine
- 8-OHdGuo :
8HydroxydésoxyGuanosine
- 8-OxoGua : 8OxoGuanine
- 8-OxoGuo : 8OxoGuanosine
- 8-OxodGuo :
8OxodésoxyGuanosine
- ACGIH: American Conference of
Governmental Industrial Hygienists
- ADN: Acide Désoxyribonucléique
- ADNc: ADN cyclique
- AhR: Récepteur Aryl Hydrocarbone
- AP: Après poste
- API: American Petroleum Institute
- ARN: Acide Ribonucléique
- AV: Avant poste
- AUC: Area Under Curve
- BaP: Benzo [a] pyrène
- BER: Base Excision Repair
- BTEX : Benzène Toluène
Ethylbenzène Xylènes
- BTX: Benzène, Toluène, Xylènes
- CIRC : Centre International de
Recherche sur le Cancer
- CMR : Cancérogène Mutagène
Reprotoxique
- CpG: Ilôt Cytosine phosphate
Guanine
- CPM : cellules progénitrices
myéloïdes
- COV : Composés Organiques
Volatils
- CSF3R: Colony Stimulating Factor
3 Receptor
- Cyt: Cytidine
- Cyto: Cytosine
- CYP: Cytochrome P450
- DDDR: DNA Damage Repair
Response
- dGuo: désoxyguanosine
- DFG:Deutsch Forschungsemeinschaft
- DHU: DihydroUracile
- DMSO: Diméthyl Sulphoxyde
- DNMTs: DNA Méthyl Transférases
- DTNB: 5,5'-dithio-bis(2-
nitrobenzoïque)
- EB: Equivalent de biosurveillance
- ECHA: European Chemical Agency
- EI : Etalon interne
- ER0 : Espèces Réactives de
l'Oxygène
- EX: Exposés
- EU RAC: European Union Risk
Assessment Committee

- EU SCOEL: European Union Scientific Committee on Occupational Exposure Limits
- FISH: hybridation *in situ* par fluorescence
- GB: Globules blancs
- GEE: Glutathione éthyl ester
- GHE: Groupe Homogène d'exposition
- GR: Globules rouges
- GSH: Glutathion
- GST: Glutathion S-transférase
- GSTT1: Glutathion S-transférase thêta 1
- GTP: Guanosine Triphosphate
- Gua: Guanine
- Guo: Guanosine
- HAP: Hydrocarbures aromatiques polycycliques
- HBROEL: Health-Based Recommended Occupational Exposure Limit
- HB: hémoglobine
- Hct: hématocrite
- hOGG1: human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1)
- IBE: Indicateur biologique d'exposition
- IC: Intervalle de confiance
- IFCC: International Federation of Clinical Chemistry
- LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
- LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique
- LAM-T : Leucémie Aiguë Myéloblastique – Type
- LD : Limite de détection
- LTI : limite de tolérance inférieure
- LINE-1: Long Interspersed Nuclear Element-1
- LNH : Lymphome Non-Hodgkinien
- LQ : Limite de quantification
- LTS : Limite de tolérance supérieure
- Lymph : Lymphocytes
- MDA : Dialdéhyde Malonique
- miARN : Micro-ARN
- MNT : Maladies non transmissibles
- Mono : Monocytes
- MPO: Myéloperoxydase
- MPV: Volume plaquettaire moyen
- MRM: Multiple Reaction Monitoring
- NER: Nucleotide Excision Repair
- Neutro: Neutrophiles
- NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health
- NQO1: NADPH Quinone Oxydoreductase 1
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- OPA: Ortho-phtalaldéhyde
- OSHA: Occupational Safety and Health Administration

- PAIgs : Protéines des Agglutinines Immuns
- PBK : Physiologically Based Kinetic
- PBPK: Physiologically Based Pharmacokinetic models
- PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
- Plq : Plaquettes
- pMole : pico mole
- RAC: Committee for Risk Assessment
- ROC : Receiver Operating Characteristic
- SAX : Strong Anion Exchange
- SCGE: Single-Cell Gel Electrophoresis
- SELDI TOF-MS: Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
- SMD-T : Syndrome Myélodysplasique – Type
- SM: Solution mère
- SOD: Superoxyde Dismutase
- SPE: Solid Phase Extraction
- S-PMA: Acide S-Phénylmercapturique
- SV: Standard de validation
- TAPS: TET-Assisted Pyridine-borate Sequencing
- TET: Ten Eleven Translocases
- TREC : Cercles d'Excision de Réarrangement du Récepteur T
- t,t-MA : trans, trans Muconic Acid
- UK : United Kingdom
- UHPLC: Ultra High-Performance Liquid Chromatography
- VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition de certaines essences spéciales [22]	11
Tableau 2: Répartition des professions par niveau d'exposition à au moins un carburant ou un solvant pétrolier (1947-2005) [22].....	14
Tableau 3: Répartition des ambiances de travail et des professions par niveau d'exposition à l'essence carburant [22]	16
Tableau 4: Répartition des ambiances de travail et des professions par niveau d'exposition aux essences spéciales et autres coupes pétrolières non aromatiques [22]	17
Tableau 5: Répartition des ambiances de travail et des professions par intensité d'exposition aux white-spirits et autres coupes aromatiques légères [22].....	18
Tableau 6: Répartition des professions par niveau d'exposition à au moins un carburant ou un solvant pétrolier [22].....	19
Tableau 7: Propriétés physico-chimiques du benzène [22].....	20
Tableau 8: Historique de l'établissement des limites d'exposition professionnelle du benzène par différentes autorités [9]	28
Tableau 9: Répartition des ambiances de travail et des professions par niveau d'exposition au benzène [11]	30
Tableau 10: Pourcentage d'individus dans différentes populations avec le génotype NQO1*2/*2 [128]	96
Tableau 11: Réactifs chimiques utilisés pour l'analyse du t,t-MA urinaire par HPLC-DAD	106
Tableau 12: Réactifs et étalons utilisés pour les dosages urinaires par UPLC-MS/MS.	108
Tableau 13 : Protocole de dosage de la créatinine urinaire	113
Tableau 14: Protocole de préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage du t,t-MA par HPLC-DAD	114
Tableau 15: Mesure du rendement d'extraction.....	115
Tableau 16: Protocole d'extraction en phase solide du t,t-MA urinaire.....	116

Tableau 17: Paramètres chromatographiques de la méthode de dosage du t,t-MA urinaire par HPLC-DAD	116
Tableau 18: Paramètres chromatographiques et de masse de l'analyse des métabolites	120
Tableau 19: Transitions des composés et leurs étalons internes (EI).....	121
Tableau 20: Résultats de validation de la méthode analytique pour t,t-MA, S-PMA et S-BMA.....	124
Tableau 21: Paramètres chromatographiques de l'analyse des bases oxydées et méthylées et la cotinine	126
Tableau 22: Paramètres de spectrométrie de masse de l'analyse des bases oxydées, méthylées et la cotinine	127
Tableau 23: Transitions et temps de rétention pour chaque base, nucléoside et étalon interne.....	128
Tableau 24: Paramètres de validation des différentes bases et nucléosides oxydées et méthylées	129
Tableau 25 : Tableau récapitulatif du choix du test statistique.....	133
Tableau 26 : Caractéristiques socio-démographiques de la population étudiée.....	140
Tableau 27: Répartition des sujets exposés selon le rythme de travail et la profession .	141
Tableau 28: Données de l'ancienneté au poste de la population étudiée	142
Tableau 29: Répartition des pompistes selon la densité du trafic autours de la pompe à essence	144
Tableau 30: Tableau croisé entre tranches d'ancienneté des pompistes et leurs géolocalisations	144
Tableau 31: Répartition des sujets de l'étude selon la présentation des signes cliniques	145
Tableau 32: Fréquences des signes cliniques déclarés par catégorie	147
Tableau 33: Données de la créatinine en AP chez la population étudiée	148

Tableau 34 : Comparaison entre les valeurs AV et AP de la créatinine urinaire chez les sujets exposés	149
Tableau 35 : Données des biomarqueurs d'exposition en AP chez la population étudiée	150
Tableau 36 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs d'exposition chez les sujets exposés.....	152
Tableau 37 : Répartition du ratio t,t-MA / S-PMA selon le seuil de 20	154
Tableau 38 : Comparaison des biomarqueurs d'exposition chez les non exposés avec les valeurs biologiques de la population générale	154
Tableau 39 : Comparaison des biomarqueurs d'exposition chez la population d'étude avec les valeurs biologiques en fin de travail.....	155
Tableau 40: Tableau croisé entre tranches t,t-MA et tranches S-PMA chez les sujets exposés en AV et AP.....	156
Tableau 41 : Données des biomarqueurs de l'effet oxydatif en AP chez la population étudiée.....	159
Tableau 42 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs de l'effet oxydatif chez les sujets exposés	161
Tableau 43 : Données des ratios (bases oxydées/bases libres) chez les exposés et non exposés	163
Tableau 44: Données des biomarqueurs de l'effet épigénétique chez la population d'étude	165
Tableau 45 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs de l'effet épigénétique chez les sujets exposés.....	167
Tableau 46: Données relatives aux biomarqueurs de l'effet hématologique.....	169
Tableau 47: Répartition des paramètres hémobiotiques selon les seuils de normalité chez les exposés et non exposés.....	171
Tableau 48: Données hémobiotiques en fonction des valeurs supérieures et inférieures aux normes chez les sujets d'étude	172
Tableau 49 : Données relatives à la cotinine urinaire chez les sujets de l'étude	173

Tableau 50 : Comparaison entre les valeurs AV et AP de la cotinine urinaire chez les sujets exposés	174
Tableau 51: Données descriptives relatives à la cotinine urinaire ($\mu\text{g/gcréa}$) chez les fumeurs et non-fumeurs.....	175
Tableau 52 : Répartition des sujets de l'étude selon le seuil de la cotinine urinaire	176
Tableau 53: Tableau croisé entre le statut tabagique déclaré et le statut tabagique mesuré (cotinine AP) chez tous les groupes de l'étude	177
Tableau 54: Répartition des exposés et non exposés selon le statut tabagique.....	178
Tableau 55: Données relatives au S-BMA (métabolite du toluène) chez les sujets de l'étude	179
Tableau 56 : Comparaison entre les valeurs AV et AP du S-BMA urinaire chez les sujets exposés	180
Tableau 57: Comparaison entre exposés et non exposés en fonction des tranches d'âge	181
Tableau 58 : Différences significatives entre exposés et non exposés stratifiés selon le statut tabagique déclaré.....	183
Tableau 59: Comparaisons significatives entre exposés et non exposés par rapport aux tranches de cotinine.....	187
Tableau 60: Différences significatives entre les fumeurs et non-fumeurs de chaque groupe	188
Tableau 61: Différences significatives entre tranches de cotinine chez les exposés.....	190
Tableau 62 : Comparaison statistiquement significatives des valeurs (AV et AP) chez les exposés fumeurs et exposés non-fumeurs.....	192
Tableau 63: Tableaux croisés entre IBE des biomarqueurs d'exposition au benzène et statut tabagique	193
Tableau 64: Différences statistiquement significatives entre tranches d'ancienneté chez les exposés	194
Tableau 65: Distribution des biomarqueurs et caractéristiques cliniques selon le rythme de travail chez les sujets exposés	195

Tableau 66: Comparaisons statistiquement significatives chez les pompistes répartis selon de la géolocalisation de leurs pompes à essences	197
Tableau 67: Différences significatives entre sujets exposés Symptomatiques et asymptomatiques	198
Tableau 68: Distribution des biomarqueurs, caractéristiques sociodémographiques et professionnelles selon le statut clinique chez les sujets exposés	199
Tableau 69: Données descriptives du GHE "pompe S"	201
Tableau 69: Données descriptives du GHE "pompe S" (suite)	202
Tableau 71: Tableau récapitulatif des moyennes et écarts types du t,t-MA et S-PMA chez les exposés et non exposés selon les différentes variables	204
Tableau 72: Comparaison entre groupe exposé et non exposé (valeurs AP).....	205
Tableau 73: Comparaison des variables AV et AP chez les sujets exposés	207
Tableau 74 : Différences statistiquement significatives entre pompistes et mécaniciens	209
Tableau 75: Corrélations significatives chez les exposés (variables ayant des différences significatives entre exposés et non exposés)	213
Tableau 76: Corrélations significatives pour les biomarqueurs du bilan hémobiologique chez les exposés	216
Tableau 77: Corrélations concernant les biomarqueurs du benzène et toluène chez les exposés (fumeurs et les vrais non-fumeurs)	217
Tableau 78: Corrélations des biomarqueurs d'effet ayant des différences significatives entre fumeurs et non-fumeurs chez les exposés	218
Tableau 79: Corrélations concernant les biomarqueurs du benzène et toluène chez les non-exposés (fumeurs et les vrais non-fumeurs)	219
Tableau 80: corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les pompistes et les mécaniciens	220
Tableau 81: Corrélations entre nombre de symptômes et biomarqueurs chez les exposés	221
Tableau 82: Corrélations entre nombre d'heures de travail et biomarqueurs chez les exposés	221

Tableau 83: Régressions multiples pour le t,t-MA en tant que variable dépendante.....	222
Tableau 84 : Régressions multiples pour le S-PMA en tant que variable dépendante...	223
Tableau 85: Régression multiples en stepwise pour les biomarqueurs d'effet génotoxique en tant que variable dépendante par stress oxydatif en AV et AP chez les exposés.....	226
Tableau 86: Régressions multiples pour les biomarqueurs d'effet oxydatif en fonction de l'exposition et du statut tabagique.....	229
Tableau 87: Régression multiples pour les biomarqueurs d'effet épigénétique chez les EX	232
Tableau 88: Régressions multiples pour les biomarqueurs d'effet épigénétique en fonction de l'exposition et du statut tabagique.....	234
Tableau 89 : Régressions multiples des paramètres du bilan hémobiologique en tant que variable dépendante chez les exposés et les exposés fumeurs.....	237
Tableau 90: Paramètres de validation de la méthode de dosage du t,t-MA urinaire par HPLC-DAD.....	241
Tableau 91: Coefficients de variation (CV) intra-jour et inter-jours et biais relatifs (BR) des trois standards de validation (SV).....	241
Tableau 92 : Répartition des valeurs ND et NQ des mesures AV et AP chez les exposés	243
Tableau 93: Données descriptives des résultats du t,t-MA par HPLC-DAD et UPLC-MS/MS chez les exposés (technique de référence).....	243
Tableau 94 : Données descriptives des résultats du t,t-MA par HPLC-DAD et UPLC-MS/MS chez les non exposés	244
Tableau 95: Comparaison de moyennes des différences de mesures avec le zéro	247
Tableau 96: Paramètres du diagramme de Bland-Altman pour les mesures du t,t-MA (AV et AP)	248
Tableau 97: Références de l'AUC de la courbe de ROC pour t,t-MA par HPLC-DAD	251
Tableau 98: Références de l'AUC de la courbe de ROC pour t,t-MA par UPLC-MS/MS	253
Tableau 99: Estimation du benzène atmosphérique pour différents groupes étudiés ...	255

Tableau 100 : Taux des biomarqueurs d'expositions rapportées dans des études similaires d'exposition professionnelle aux faibles taux de benzène via le carburant.....	264
Tableau 101 : Niveaux atmosphériques du benzène et toluène rapportés dans les études algériennes.....	276
Tableau 102 : Tableau comparatif des résultats des produits oxydés de la guanine de notre étude et ceux de la littérature chez les fumeurs et non-fumeurs.....	303
Tableau 103 : Valeurs des deux mesure des outliers	325
Tableau 104: Choix du nombre de standards de calibration et de validation en fonction du protocole choisi.....	361
Tableau 105: Calcul des recouvrements de la gamme d'étalonnage du t,t-MA.....	367
Tableau 106: Vérification de l'homogénéité des variances (Test de Cochran)	368
Tableau 107: Calcul des coefficients de variation intra-jour et inter-jours et des biais relatifs.....	370
Tableau 108: Mesure du rendement d'extraction.....	371
Tableau 109: Mesure de l'effet matrice	371
Tableau 110: Calculs pour le profil d'exactitude	372
Tableau 111: Intervalles de confiance de la méthode	373
Tableau 112 : Données de stabilité d'un cycle de congélation	374

Liste des figures

Figure 1: Schéma simplifié du procédé de raffinage du pétrole [20].....	8
Figure 2: Sites possibles pour le métabolisme du benzène [36].....	34
Figure 3: Schéma réactionnel du benzène montrant les voies métaboliques du benzène époxyde [39] (MPO : Myélopéroxydase, NQO1 : NADPH Oxydoréductase).....	36
Figure 4: Voies potentielles de formation du muconaldéhyde [36].....	37
Figure 5: Schéma métabolique simplifié du benzène montrant les voies toxiques [24]...	37
Figure 6: Voies d'élimination du benzène et différents métabolites éliminés [38].....	38
Figure 7: Métabolites mercapturiques et métabolites glucuro et sulfo conjugués du benzène [31]	39
Figure 8: Aperçu de l'approche biologie des systèmes et de ses composants [41]	41
Figure 9 : Oxydation de la guanine en 8-oxoguanine [46]	43
Figure 10: 8-OxoGua en liaison avec l'adénine [48].....	43
Figure 11: Effet mutationnel de l'oxydation de l'ADN avec formation de 8-oxoguanine [45]	44
Figure 12: La 8-oxoG est une lésion pré-mutagène (a) 8-oxoG et G. Les différences sont représentées en rouge. (b) Paires de bases G :C, 8-oxoG :C et 8-oxoG : A. c) Fixation d'une transversion due à la présence de 8-oxoG [49].	44
Figure 13: Réaction de la 2-désoxyguanosine avec des radicaux hydroxyles, des adduits radicaux suivie d'une réduction en 7-hydro-8-hydroxy-2'-désoxyguanosine et de l'oxydation en 8-hydroxy-2'désoxyguanosine (8-OHdG) ou son tautomère 8-oxo-7-hydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG) [50].....	45
Figure 14: Mécanismes d'altérations épigénétiques [54]	48
Figure 15: Régulation épigénétique de l'expression des gènes par miARN [55]	49
Figure 16: Régulation épigénétique de l'expression génique au moyen des histones [55]	50
Figure 17: Régulation épigénétique de l'expression génique par méthylation de la cytosine de l'ADN [55]	51

Figure 18 : Adduit du benzène à l'ADN pBQ-dG [31].....	52
Figure 19: Structure de l'adduit à l'ADN formé par la p-benzoquinone [59]	53
Figure 20: Alkylation de l'ADN par une quinone [35]	53
Figure 21: Types de cellules progénitrices produites dans la moelle osseuse [62]	54
Figure 22: Proposition de mécanisme de cancérogenèse du benzène via l'inflammation chronique et l'immunosuppression [55]	57
Figure 23: Relation entre les modes d'action potentiels du benzène et les évènements clé [26]	58
Figure 24: Systèmes physiologiques et organes susceptibles à l'action du benzène [66] .	59
Figure 25: Applicabilité des biomarqueurs d'exposition selon la baisse des limites d'exposition professionnelle [40]	77
Figure 26: Photomicrographies (A-D à 40X) de différentes morphologies nucléaires observées dans les cellules épithéliales buccales de populations exposées (E) et non exposées (EN) au benzène [13].	85
Figure 27: Les tests utilisés pour la mise en évidence des effets des agents cancérogènes génotoxiques [114]	86
Figure 28: Gène NQO1 et localisation du polymorphisme NQO1*2 [128].....	95
Figure 29: Histopathologie des sternums de souris femelles NQO1 +/+ et NQO1 -/- [129]	97
Figure 30 : place du 5-HydroxyMéthyl désoxyCytidine (5OHMedCyt) dans la régulation de la déméthylation de l'ADN [194].....	104
Figure 31: Métabolisme du toluène montrant la voie de formation du S-BMA [139] ...	105
Figure 32: Pic t,t-MA 3 mg/L dans l'eau	117
Figure 33 : Chromatogramme du point 1 mg/L dans les urines après extraction (spectre du t,t-MA à droite).....	117
Figure 34: : Chromatogramme du point 0,8 mg/L dans les urines après extraction	118
Figure 35: Chromatogramme du point 2 ppm dans les urines après extraction.....	118
Figure 36: Extraction de la transition du S-PMA (tr=7,06 min).....	121

Figure 37: Extraction de la transition de l'étalon interne S-PMA-d2	122
Figure 38: Extraction de la transition du t,t-MA (tr=4,70 min)	122
Figure 39: Extraction de la transition de l'étalon interne du t,t-MA-d4	123
Figure 40: Chromatogramme du niveau 3 de la gamme d'étalonnage d'une urine chargée avec une mixture d'étalons et étalon internes	130
Figure 41: Diagramme de flux récapitulatif des paramètres étudiés et de la méthodologie (BM : Biomarqueur)	131
Figure 42: Répartition des pompistes par station-service N=59 (100%)	143
Figure 43: Fréquences des déclarations cliniques chez tous les exposés symptomatiques (N=58)	146
Figure 44: Fréquences des déclarations cliniques par les mécaniciens symptomatiques (N=14)	146
Figure 45: Fréquences des déclarations cliniques par les pompistes symptomatiques (N=44)	147
Figure 46: Chromatogramme d'extraction de la transition ionique (XIC) du S-PMA chez le sujet 121 en AV	157
Figure 47: Comparaison du AP t,t-MA (µg/g créa) entre les exposés et non exposés (p<0,0001)	158
Figure 48 : Comparaison du AP S-PMA (µg/g créa) entre les exposés et non exposés (p<0,0001)	158
Figure 49: Extraction de la transition de la Gua chez le sujet exposé 121 en AV	164
Figure 50 : Comparaison du AP 8OxodGuo (µg/g créa) entre les exposés et non exposés (p=0,048)	164
Figure 51 : Comparaison du AP 5MeCyto (µg/g créa) entre les exposés et non exposés (p<0,01)	169
Figure 48 : Extraction de la transition de la cotinine et son étalon interne (cotinine-d3) chez le sujet 121 en AV	178
Figure 53 : Comparaison du AP t,t-MA (µg/g créa) chez les fumeurs des exposés et des non exposés (p<0,0001)	184

Figure 54 : Comparaison du AP S-PMA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les fumeurs des exposés et non exposés ($p<0,0001$).....	185
Figure 55 : Comparaison du AP t,t-MA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre exposés et non exposés non-fumeurs ($p<0,0001$).....	185
Figure 56 : Comparaison du AP S-PMA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre exposés et non exposés non-fumeurs ($p<0,0001$).....	186
Figure 57: Comparaison du AP S-PMA entre pompistes et mécaniciens ($<0,0001$).....	210
Figure 58: Comparaison de AV t,t-MA entre pompistes et mécaniciens ($p<0,0001$).....	211
Figure 59 : Comparaison de AP 5OHMeCyto entre pompistes et mécaniciens ($p=0,006$)	211
Figure 60: Comparaison des neutrophiles entre pompistes et mécaniciens ($p=0,004$)...	211
Figure 61: Courbe de régression multiple pour le S-PMA en AP en fonction du t,t-MA et les heures de travail chez les exposés	224
Figure 62: Courbe de régression multiple de S-PMA en AP en fonction du t,t-MA en AP et du nombre d'heures de travail chez les exposés fumeurs	224
Figure 63: Courbe de régression multiple de S-PMA en AP en fonction du t,t-MA en AP et du nombre d'heures de travail chez les exposés non-fumeurs	225
Figure 64: Courbe de régression multiple du 8OxodGuo urinaire en AP en fonction du t,t-MA et la créatinine urinaires en AP chez les exposés.....	227
Figure 65: Courbe de régression multiple du 8OxoGuo urinaire en AP en fonction de l'ancienneté et la créatinine, le S-BMA et la cotinine urinaires en AP chez les exposés	228
Figure 66: Courbe de régression multiple du 8OxodGuo urinaire en AV en fonction du S-PMA et la créatinine urinaires en AV chez les exposés	228
Figure 67: Courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en fonction du t,t-MA chez les non exposés non-fumeurs.....	230
Figure 68: Courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en AP en fonction de la créatinine et l'ancienneté chez les exposés non-fumeurs	231
Figure 69: Courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en AP en fonction du t,t-MA en AP chez les exposés fumeurs	231

Figure 70: Courbe de régression multiple du Cytidine en AP en fonction de la créatinine et cotinine urinaires en AP et ancienneté chez les fumeurs exposés	235
Figure 71: Courbe de régression multiple du 5OHMedCyt en AP en fonction de l'âge et la créatinine urinaire chez les fumeurs non exposés	236
Figure 72: Courbe de régression multiple du 7MeGuo en AP en fonction du t,t-MA chez les fumeurs NE.....	236
Figure 73 : Courbe de régression multiple des GR en fonction du 8OxodGuo en AP chez les exposés.....	238
Figure 74 : Courbe de régression multiple des Neutrophiles en fonction de 7MeGua en AP chez exposés	238
Figure 75 : Courbe de régression multiple des neutrophiles en fonction de la Gua et 8OxodGuo en AP chez les exposés fumeurs	239
Figure 76: Courbe de régression multiple des GB en fonction du 8OxodGuo en AP chez les exposés fumeurs	239
Figure 77: Courbe moyenne des trois jours de validation effectuée dans la matrice.....	240
Figure 78: Profil d'exactitude de la méthode de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD	242
Figure 79: Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°114 AP.....	244
Figure 80: Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°58 AV	245
Figure 81:Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°129 AP	245
Figure 82: Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°133 AP	245
Figure 83: Chromatogramme du sujet NE (AP) n°18.....	246
Figure 84: Chromatogramme du sujet NE n°17 (AP).....	246
Figure 85: Présence d'un pic de t,t-MA chez sujet non-fumeur non exposé et consommant une boisson contenant l'acide sorbique la veille	246
Figure 86: Vérification de la distribution des différences de mesures du t,t-MA entre HPLC-DAD et UPLC-MS/MS	247
Figure 87: Diagramme de Bland-Altman des mesures AV	249
Figure 88: Diagramme de Bland-Altman des mesures AP	250

Figure 89: Courbe ROC des valeurs t,t-MA µg/g créa par HPLC-DAD 251

Figure 90: Courbe ROC des valeurs t,t-MA µg/g créa par UPLC-MS/MS 252

Figure 91: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation selon SFSTP 2006 [202] 360

Figure 92: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°1 Chromato blanc 1..... 362

Figure 93: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°2..... 362

Figure 94: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°3..... 363

Figure 95: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°4..... 363

Figure 96: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°5..... 364

Figure 97: Courbe d'étalonnage effectuée dans l'eau 364

Figure 98: Courbe de calibration de la première série de validation (J1) dans la matrice 365

Figure 99: Courbe de calibration de la deuxième série de validation (J2) dans la matrice 365

Figure 100 : Courbe de calibration de la troisième série de validation (J3) dans la matrice 365

Figure 101: Courbe de calibration moyenne des trois séries dans la matrice 366

Figure 102: Les trois courbes des trois séries de mesures..... 366

Figure 103: Courbe de linéarité du t,t-MA 369

Introduction / Problématique

Le benzène est un composé chimique omniprésent, il est naturellement présent dans le pétrole brut, le gaz naturel et dans une large gamme de produits pétroliers légers, tels que l'essence. En conséquence, il peut être libéré dans divers environnements industriels et de transport, constituant ainsi un risque pour la santé du travailleur [1]. L'exposition professionnelle au benzène demeure particulièrement préoccupante chez les travailleurs des raffineries de pétrole, du secteur du transport et du ravitaillement en carburant tout comme chez les pompistes et les mécaniciens [2].

Du côté de la population générale, l'exposition significative au benzène peut provenir de la fumée de cigarette (active ou passive), ainsi que des moteurs à essence. L'inhalation représente la voie d'exposition la plus courante, bien que le benzène puisse également traverser rapidement la barrière cutanée [3]. Des études épidémiologiques menées par l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA) des États-Unis ont estimé un risque excédentaire de cancers lympho-hématopoïétiques de l'ordre de 1×10^{-6} dans la population générale, associé à une exposition atmosphérique au benzène comprise entre 0,13 et 0,45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ sur l'ensemble de la vie [4,5]. Dans le même sens, les lignes directrices de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) fixent un seuil comparable, avec un risque équivalent pour une exposition à vie à 0,17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de benzène dans l'air [6].

Le benzène peut causer des troubles non cancérogènes tels que l'hématotoxicité, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité donnant lieu à des pathologies professionnelles telles que le benzolisme [7].

Mais en plus il est classé dans le groupe I par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), et ne présente aucun seuil de dose connu [7]. Par conséquent, à des concentrations atmosphériques plus faibles, la part relative de l'exposition cutanée devient significativement plus importante [8].

Les mécanismes sous-jacents à l'effet cancérogène ne sont pas encore complètement connus, il semble agir en déterminant à la fois les effets génotoxiques et les modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN qui peuvent favoriser la progression néoplasique sous l'effet du stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites lors de son métabolisme [7,9].

De toute évidence, les effets néfastes du benzène sur la santé dépendent à la fois du niveau et de la durée de l'exposition ainsi que la co-exposition à d'autres composés organiques volatils (COV) comme le toluène et les xylènes [7], ainsi que des composés polycycliques tels que l'anthracène et le benzo[a]pyrene (BaP) [10]. Ces expositions combinées, fréquentes dans

l'essence carburant, impliquent des interactions métaboliques susceptibles d'altérer l'interprétation des biomarqueurs.

Historiquement, la teneur en benzène dans les carburants était relativement élevée. Cependant, une tendance claire s'est imposée visant à réduire cette teneur jusqu'à environ 1 %, dans une démarche de réduction des risques sanitaires et environnementaux [11].

En Algérie, l'incorporation du Plomb dans les essences a connu une nette régression depuis 2000 jusqu'à son élimination définitive à partir du 15 septembre 2020. La décision de suppression des essences plombées (essence normale et essence super) au niveau de toutes les stations-service du pays a pris effet à partir du mois de juillet 2021 au profit du passage à l'essence unique, et par conséquent augmentation de la teneur en composés aromatiques dont le benzène pour combler l'effet antidétonant et maintenir l'indice d'octane. Selon les responsables des raffineries, la teneur en composés aromatiques de l'essence varie entre 35 % et 40 %, avec une proportion de benzène représentant 2,5 % à 3 % du total des aromatiques.

De plus l'Algérie, ne possède aucune valeur réglementaire pour le benzène. Bien qu'au fil des dernières décennies, les niveaux d'exposition ont nettement diminué. Dans la majorité des pays, les valeurs moyennes d'exposition sur 8 heures (VLEP - 8H) sont stabilisées entre 0,5 et 1 ppm [7], et récemment, plusieurs rapports ont proposé une révision à la baisse des VLEP [12].

Toutefois, des risques sanitaires subsistent même à de faibles niveaux d'exposition professionnelle, en raison du caractère cancérigène et génotoxique avéré chez l'homme.

Les données algériennes sur la pollution atmosphérique au benzène demeurent limitées. Une étude menée en 2013 à Alger a révélé des concentrations élevées atteignant $7,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en milieu urbain et jusqu'à $25,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en bord de route [13]. En milieu professionnel, Djafer et al. ont estimé une concentration atmosphérique de 7,35 ppm dans une cokerie située à Annaba, aujourd'hui hors service [14]. Néanmoins, les données actualisées sur les niveaux d'exposition professionnelle au benzène restent quasi inexistantes, ce qui souligne la nécessité d'un suivi environnemental renforcé.

La part considérable du temps passé en milieu professionnel renforce l'urgence de considérer les risques liés à l'exposition chronique aux cancérigènes comme une priorité en santé publique. Cela justifie la mise en place de stratégies de prévention, de biosurveillance et de régulation spécifiques [15].

La biosurveillance de l'exposition professionnelle implique la détermination quantitative de la concentration du benzène ou de ses métabolites dans des échantillons biologiques. Les limites

d'exposition professionnelle de plus en plus basses imposent des exigences très strictes aux différents biomarqueurs humains [12].

Bien que les travailleurs doivent passer un hémogramme chaque semestre, aucun autre test de surveillance génétique, cellulaire ou métabolique n'est requis ou mentionné dans la législation. La principale préoccupation est que les dommages précoces qui pourraient conduire au cancer ne soient pas détectables par le nombre d'hémogrammes [2].

De nombreuses études ont montré des concentrations accrues de biomarqueurs de stress oxydatif urinaire chez des sujets exposés à des concentrations de benzène inférieures à la valeur limite d'exposition recommandée par l'ACGIH en 2019, à savoir 1,6 mg/m³ (0,5 ppm) [16–18].

Une approche intégrative est donc nécessaire dans les protocoles de biomonitoring pour garantir la fiabilité de l'évaluation de l'exposition au benzène [18]. Ces risques sont multipliés en l'absence de l'usage des équipements individuels de protection [10].

Pour ce faire, de nouveaux biomarqueurs non invasifs et fiables doivent être utilisés dans des études épidémiologiques à grande échelle pour détecter les effets délétères précoces.

Problématique

Dans un contexte algérien marqué par une teneur en benzène atteignant 3 % dans le carburant, l'absence de VLEP réglementaire claire et la rareté des données académiques, quels sont les niveaux d'imprégnation des travailleurs exposés quotidiennement à ce composé ? Et les outils de surveillance actuellement utilisés, principalement l'hémogramme, sont-ils suffisants pour détecter les effets précoces et subcliniques d'un cancérogène sans seuil comme le benzène ?

L'acide trans,trans-muconique (t,t-MA) serait-il adapté à la biosurveillance professionnelle quand l'exposition est basse ou faut-il avoir recours à un biomarqueur plus spécifique ?

Quel est le poids des facteurs confondants tels que le tabagisme, la co-exposition à d'autres solvants et la pollution face à cette faible exposition ?

Dans quelle mesure les pompistes et les mécaniciens présentent-ils des niveaux d'exposition au benzène comparables dans leur environnement professionnel ?

Hypothèse

Une exposition professionnelle chronique à de faibles doses de benzène contenu dans le carburant, par voie respiratoire et cutanée, induit des altérations précoces détectables par des biomarqueurs urinaires d'exposition, de génotoxicité, d'épigénétique et d'hématotoxicité, même en l'absence de dépassement des seuils réglementaires.

Objectifs

Objectif principal

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les niveaux d'exposition professionnelle au benzène par le biais des biomarqueurs d'exposition corrélés aux biomarqueurs d'effets précoces (génomiques et hématologiques) chez des employés exposés au carburant automobile (pompistes et mécaniciens).

Objectifs secondaires

Cette étude vise également à atteindre des objectifs secondaires tels que :

- Evaluer les signes cliniques ressentis dans le cas des faibles expositions au benzène chez les pompistes et mécaniciens ;
- Mesurer l'impact du tabagisme actif et passif sur les biomarqueurs d'exposition et d'effet au moyen du dosage de la cotinine urinaire ;
- Etudier l'impact synergique de la co-exposition au toluène au moyen du dosage de son métabolite spécifique (l'Acide S-Benzyl Mercapturique S-BMA) ;
- Etudier l'impact de la géolocalisation des stations-service (réparties en zone à trafic dense et à trafic faible) sur les niveaux d'exposition des pompistes ;
- Vérifier l'utilité du ratio t,t-MA/S-PMA pour souligner les différences métaboliques car ils sont issus de deux voies métaboliques et afin de différencier les sources non professionnelles du t,t-MA ;
- Prédire l'exposition atmosphérique via les taux du S-PMA urinaire.
- Optimiser et valider une méthode de dosage du t,t-MA urinaire par HPLC-DAD et comparer les résultats avec une méthode de référence (UPLC-MS/MS) à l'aide du diagramme de Bland-Altman.

Revue bibliographique

Chapitre I:

Exposition professionnelle au carburant et au benzène

I.1. Les carburants et les solvants pétroliers en général

I.1.1. Définition

Les carburants et solvants pétroliers regroupent les carburants et solvants organiques produits par raffinage du pétrole.

Ils sont composés d'hydrocarbures non substitués et leur composition varie suivant la température de distillation des coupes pétrolières, ce qui entraîne des teneurs différentes en hydrocarbures lourds et légers. Ils peuvent être uniquement constitués de chaînes linéaires saturées (hexane ou heptane) ou d'une chaîne cyclique (cyclohexane), mais la grande majorité est constituée d'un mélange complexe d'hydrocarbures [19].

Les solvants pétroliers peuvent être répartis en deux classes :

- Les solvants aromatiques composés d'un ou plusieurs cycles benzéniques (benzène, toluène, xylènes, etc.) qui présentent un très bon pouvoir solvant.
- Les solvants pétroliers non aromatiques constitués d'hydrocarbures linéaires (aliphatiques) ou cycliques, au pouvoir solvant plus faible.

I.1.2. Production

Les carburants et solvants pétroliers correspondent à des coupes pétrolières obtenues par distillation du pétrole. Il s'agit de mélanges obtenus par séparations physiques du pétrole brut (craquage, distillation et fractionnement) et caractérisés par des plages de températures de distillation (Figure 1).

Cependant, deux produits pétroliers présentant les mêmes caractéristiques peuvent avoir des compositions différentes selon la provenance du pétrole brut et les étapes de raffinage réalisées.

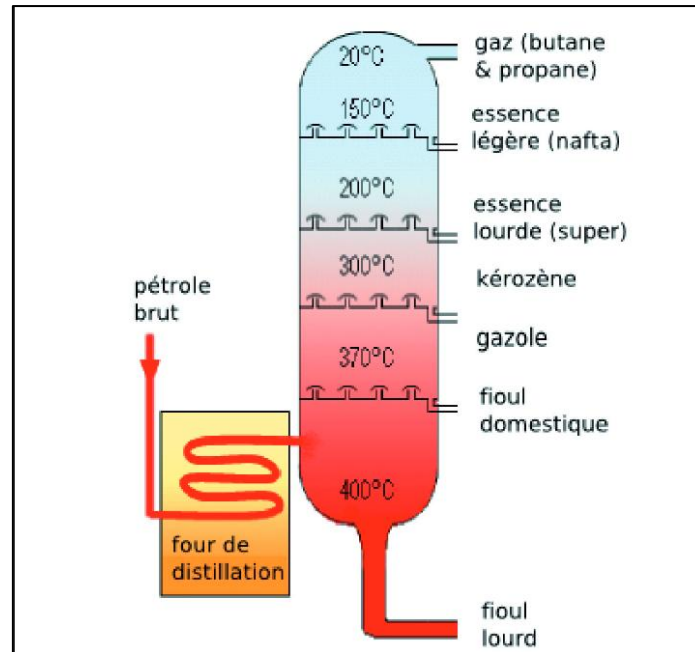


Figure 1: Schéma simplifié du procédé de raffinage du pétrole [20]

L'Algérie en 2022 a produit 63,6 Mt (millions de tonnes) de pétrole, soit 1,47 Mb/j (millions de barils par jour), elle se classe au 16^{ème} rang de pays producteurs de pétrole, le 10^e producteur de gaz naturel et le 7^e exportateur de gaz naturel au monde. Cependant, l'État algérien commence à envisager des solutions alternatives en investissant dans les énergies renouvelables [20]. En 2025, l'Algérie prévoit d'augmenter de 2,5 % sa production d'hydrocarbures, tous types d'extraction confondus [21].

L'Algérie dispose de cinq raffineries de pétrole : la raffinerie de Skikda, d'Alger, d'Arzew, d'Adrar et de Topping Condensat (Skikda).

En mai 2019, l'Algérie annonce son intention de cesser ses importations d'essence et de gasoil. En effet la rénovation de la raffinerie d'Alger, l'augmentation de productivité des raffineries existantes, ainsi que l'acquisition de la raffinerie d'Augusta en Italie, ont permis à la Sonatrach d'atteindre une autosuffisance en produits pétroliers [20].

I.1.3. Utilisations

La grande majorité de ces produits est évidemment utilisée comme carburant, comme solvant et diluant (peintures, colles, etc.) grâce à un pouvoir qui augmente avec leur teneur en aromatiques, ou comme agent de dégraissage (nettoyage de pièces métalliques etc.), mais certains d'entre eux peuvent être aussi utilisés comme intermédiaires de synthèse [19].

Ces catégories sont : le benzène ; les essences spéciales et les autres coupes pétrolières non aromatiques ou faiblement aromatiques ; l'essence carburant ; les white-spirits et les autres coupes aromatiques légères ; le kérosène, le gazole et les fiouls.

Les différentes catégories de carburants et solvants pétroliers sont présentées dans les paragraphes suivants, le benzène a été traité à part.

I.1.4. Catégories de carburants et solvants pétroliers

I.1.4.1. Les essences carburant

L'essence carburant est un mélange de plus de 200 composés. Les composés les plus volatiles et les plus abondants (n-butane, isobutane, n-pentane, isopentane) sont prédominants dans les vapeurs, représentant 60 à 80 % des vapeurs totales, mais seulement environ 25 % du liquide.

L'essence ordinaire est obtenue par distillation et par traitement des coupes légères et moyennes du pétrole, avec en plus un mélange d'hydrocarbures de structures variées (paraffiniques, oléfiniques, naphténiques, aromatiques (~ 4 % de benzène) distillant à moins de 205 °C, auquel est ajouté entre autres un dope antidétonant à base de Plomb.

L'efficacité de la combustion est caractérisée par l'indice d'octane situé entre 89 et 92. Le super est de même nature que l'essence ordinaire, mais obtenu par un procédé de raffinage spécial afin d'améliorer l'indice d'octane qui est de 97 à 99. Sa composition diffère de l'essence par : la teneur en benzène plus élevée (4 à 6 %) due à la diminution du taux de plomb ; la teneur en soufre plus élevée (0,5 %) [22].

Le super sans plomb a totalement supplanté le super avec plomb. Les additifs utilisés sont le MTBE (méthylTertioButylEther), additif le plus employé, et le benzène, ajouté en vue d'améliorer l'indice d'octane. Compte tenu de la forte toxicité de ce dernier, sa teneur est légalement limitée (1 % depuis 2000) [22].

L'essence carburant est utilisée comme carburant des moteurs à explosion (automobiles, outils forestiers, etc.). L'évolution de la réglementation concernant la qualité de l'air et les rejets des gaz d'échappement a entraîné une évolution de l'utilisation vers le super sans plomb pour les véhicules automobiles. L'essence carburant a également pu être utilisée comme agent de nettoyage des pièces et des mains dans la métallurgie, mais surtout dans les garages de mécanique automobile. L'utilisation de l'essence pour le nettoyage des mains a été interdite par le décret n° 86-269 du 13 février 1986, mais les pratiques ont perduré [19,22].

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

L'utilisation de l'essence plombée a un impact négatif sur l'environnement et sur l'écosystème, notamment en raison de la nature dispersive du plomb minéral émis par les véhicules à l'échappement. En Algérie, l'incorporation du plomb dans les essences, au niveau des raffineries, a connu une nette régression depuis 2000 jusqu'à son élimination définitive à partir du 15 septembre 2020 [23].

La décision de suppression des essences plombées (essence normale et essence super) au niveau de toutes les stations-service du pays a pris effet à partir du mois de juillet 2021 au profit du passage à l'essence unique [23].

Cette élimination est l'aboutissement d'un processus entamé depuis 1998 avec l'introduction de l'essence sans plomb sur le marché national des carburants. Depuis, un processus de décontamination du réseau de distribution (élimination des traces du plomb) a été entamé par les distributeurs. L'Algérie a mené depuis les années 1980 une politique de développement du GPL carburant en substitution des carburants traditionnels et notamment les essences, en raison de ses réserves importantes en GPL et pour lutter contre la pollution [23].

I.1.4.2. Les essences spéciales

Ce sont des mélanges d'hydrocarbures paraffiniques et alicycliques qui peuvent contenir un faible pourcentage d'hydrocarbures aromatiques légers. Il s'agit de coupes de pétrole raffinées, distillant à des températures comprises entre 30 et 160 °C (Tableau 1).

La fraction naphta obtenue après distillation du pétrole, subit un hydrotraitement, procédé permettant d'enlever le soufre contenu dans les fractions légères, puis une séparation en différentes petites fractions, dont les essences spéciales.

Elles présentent différentes utilisations :

Nettoyage, dégraissage, solvants d'extraction des graisses végétales ou animales, solvant de nettoyage des machines (imprimerie), préparation, dissolution du caoutchouc, solvant pour la formulation de colles et d'adhésifs [19,22].

Tableau 1: Composition de certaines essences spéciales [22]

	essence A	essence C	essence E	essence F	essence G ¹
Température de distillation	40 à 100 °C	70 à 100 °C	100 à 130 °C	100 à 160 °C	30 à 75 °C
Composition en hydrocarbures					
Hydrocarbures paraffiniques (pentane, méthylpentane, n-hexane, méthylhexane, heptane, etc.)	80 à 90 %	70 à 80 % ²	70 à 75 % (C ₇ et C ₈)	65 à 85 % (C ₇ , C ₈ , C ₉)	90 à 95 %
Hydrocarbures alicycliques (cyclopentanes, méthylcyclopentane, diméthylcyclopentane, etc.)	6 à 15 %	20 à 25 %	20 à 25 % (C ₇ et C ₈)	20 à 25 % (C ₇ , C ₈ , C ₉)	5 à 10 %
Hydrocarbures aromatiques totaux	<1 %	<1 %	<5 %	<14 %	<0,1 %
<small>1 : éther de pétrole 2 : l'essence C contient beaucoup d'hexane (25 %)</small>					

1.1.4.3. Le white spirit et autres coupes légères aromatiques

Les white-spirits sont des coupes pétrolières distillant entre 135 et 220 °C. Ils sont composés en grande majorité d'hydrocarbures paraffiniques de C8 à C12 (teneur comprise entre 40 et 60 %) et cyclo-paraffiniques de C9 à C12 (teneur en général voisine de 30 %) [22].

À l'heure actuelle, les white-spirits ne contiennent en principe que très peu de benzène (moins de 0,05 %), mais ils ont pu en contenir des quantités plus importantes antérieurement [12]. Ils peuvent toutefois renfermer entre 1 et 20 % d'hydrocarbures aromatiques (traces de toluène, xylènes, éthylbenzène, triméthylbenzènes) [22].

Les "autres coupes aromatiques" ou "solvants naphta aromatiques" sont composés en majorité (jusqu'à 90 %) d'hydrocarbures aromatiques comportant entre 8 et 20 carbones font aussi partie de cette catégorie.

Les white-spirits et les coupes aromatiques légères ont à peu près les mêmes utilisations, à savoir : diluant pour les peintures, les vernis et les encres d'imprimerie, dégraissant en métallurgie, préparation d'insecticides et de produits d'entretien (cirages et encaustiques).

1.1.4.4. Le kérosène (pétrole lampant), le gazole et les fiouls

Appelé pétrole lampant car était presque exclusivement utilisé à comme combustible des lampes à pétrole), issu de la distillation atmosphérique du pétrole, est un mélange

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

d'hydrocarbures distillant entre 140 et 300 °C, dont les principaux constituants sont des hydrocarbures de C9 à C16. Le benzène est en général absent de ces coupes [22]. Ce n'est qu'à partir des années 1950 qu'il trouve une importance industrielle, comme carburant des avions à réaction et on parle alors de kérosène.

Le gazole (communément le gasoil) est un mélange d'hydrocarbures plus lourds que ceux de l'essence carburant distillant entre 230 et 260 °C. Sa composition diffère de celle de l'essence ordinaire par : l'absence de benzène ; l'absence de dope antidétonant ; la teneur en soufre plus élevée (maximum 0,50 %) ; la présence facultative d'additifs : peroxyde d'acétone, nitrate d'éthyle et d'isoamyle. utilisé pour l'alimentation des moteurs diesel et des turbines à combustion [22].

Le fioul domestique fait partie des fiouls légers et a une composition très proche du gazole, il est constitué d'hydrocarbures en C9 à C20 [22]. Utilisé en remplacement du charbon pour la production de chaleur dans les installations de combustion et pour l'alimentation des moteurs à combustion interne [19].

I.2. Exposition professionnelle aux carburants et solvants pétroliers

I.2.1. Secteurs d'activité exposés aux carburants et solvants pétroliers

Les principaux secteurs d'activité concernés par l'exposition aux carburants et aux solvants pétroliers sont [22]:

- Les secteurs de la chimie (pétrochimie, fabrication de peintures, de colles, synthèses organiques, etc.) ;
- Les activités nécessitant le dégraissage des métaux ;
- Les activités de transports et de distribution de carburants.

I.2.2. Matrice « emplois-expositions » aux carburants et aux solvants pétroliers

La matrice « emplois-expositions » spécifique de l'exposition aux carburants et aux solvants pétroliers fournit une évaluation de l'exposition respiratoire et cutanée pour tous les emplois sur la période de 1947 à 2005 [22]. Pour les carburants, la matrice prend en compte l'exposition aux produits eux-mêmes et n'intègre pas l'exposition aux produits de combustion et gaz d'échappements qui peut advenir dans le même temps.

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

Les produits pétroliers ont été regroupés dans les catégories suivant leur composition (teneur en hydrocarbures aromatiques), leur utilisation principale (solvant, carburant) ou suivant leur toxicité (benzène).

La matrice présente, pour chaque catégorie de solvants ou carburants, des indices d'exposition pouvant varier par période d'exposition identifiée.

Pour les cinq catégories de carburants et solvants pétroliers, les indices de probabilité et de fréquence d'exposition sont communs et définis ci-après.

La probabilité d'exposition représente la proportion de personnes dans l'emploi donné qui sont exposées au produit.

- 0 : <1 %
- 1 : entre 1 et <10 %
- 2 : entre 10 et <50 %
- 3 : entre 50 et < 90 %
- 4 : >90 %

Lorsque dans un emploi donné, moins de 1 % des personnes sont exposées, l'emploi est considéré comme non exposé et n'est pas présenté dans la matrice.

La fréquence d'exposition représente la proportion du temps de travail pendant laquelle la personne est exposée à la nuisance.

- 0 (nulle) : < 0,5 % du temps de travail
- 1 (occasionnelle) : entre 0,5 et 5 %
- 2 (intermittente) : entre 5 et 30 %
- 3 (fréquente) : entre 30 et 70 %
- 4 (permanente) : supérieure à 70 %

Contrairement aux deux indices précédents, les intensités d'exposition ainsi que les périodes ont été définies de manière différente pour chaque catégorie de carburant ou de solvant.

Pour l'évaluation de l'exposition à un carburant ou solvant pétrolier quel qu'il soit, les indices de fréquence et d'intensité ont été regroupés et exprimés par un niveau moyen d'exposition (Tableau 2).

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

Tableau 2: Répartition des professions par niveau d'exposition à au moins un carburant ou un solvant pétrolier (1947-2005) [22]

Niveau	Profession	Période
1 (faible)	- mécanicien de précision	1970-2005
	- cordonnier réparateur	1970-2005
	- peintre en bâtiment	1986-2005
	- imprimeur	1986-2005
	- chimiste et ingénieur dans les laboratoires	1986-2005
	- poste de production dans l'industrie des préparations solvantées	1986-2005
	- poste de raffinage du pétrole	1989-2005
2 (moyen)	- peintre au pistolet	1947-2005
	- pompiste	1947-2005
	- mécanicien automobile	1947-2005
	- mécanicien de précision	1947-1969
	- cordonnier réparateur	1947-1969
	- peintre en bâtiment	1947-1985
	- imprimeur	1947-1985
	- chimiste et ingénieur dans les laboratoires	1947-1985
	- poste de production dans l'industrie des préparations solvantées	1970-1985
	- poste de raffinage du pétrole	1970-1988
	- poste exposé dans l'industrie du caoutchouc	1970-2005
	- dégraisseur, nettoyeur de textile	1970-2005
- citerniste	1989-2005	
3 (fort)	- imperméabilisateur de textile	1947-1969
	- poste de production de préparations solvantées	1947-1969
	- poste de raffinage du pétrole	1947-1969
	- poste exposé dans l'industrie du caoutchouc	1947-1969
	- dégraisseur, nettoyeur de textile	1947-1969
- citerniste	1947-1988	

I.2.2.1. Matrice dédiée à l'exposition à l'essence carburant

Cette matrice prend en compte l'exposition à toutes les essences carburant (ordinaire, super, super sans plomb, etc.).

Des périodes d'exposition prenant en compte les évolutions technologiques des carburants ont été définies pour l'exposition à l'essence carburant : pour les machines agricoles et les machines de BTP (bâtiments travaux publiques), il a été défini deux périodes, 1947-1969 et 1970-2005 puisque dans les années 1960, ces machines fonctionnaient surtout à l'essence (et un peu au gazole), alors que dans les années 1970, le gazole était largement répandu.

Pour les employés de station-service, deux périodes ont été définies (1947-1979 et 1980-2005) pour l'exposition aux carburants (essence et gazole) pour prendre en compte l'introduction des stations libre-service. En Algérie, les stations libre-service ne sont pas encore introduites, donc cette matrice n'est pas réellement applicable.

Une base de données reprenant les résultats de prélèvements spécifiques de l'essence carburant a été constituée à partir de la littérature.

Ces métrologies ont permis de définir les échelles quantitatives associées aux trois niveaux d'exposition intégrant les spécificités de l'exposition par emploi ainsi que les évolutions technologiques (Tableau 3).

- 1 : entre 1 et 50 ppm faible
- 2 : entre 50 et 150 ppm moyenne
- 3 : >150 ppm forte.

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

Tableau 3: Répartition des ambiances de travail et des professions par niveau d'exposition à l'essence carburant [22]

Intensité	Échelles quantitatives	Ambiance	Professions
1	1 - 50 ppm	- production (vase clos) (1970-2005) - station-service (1947-2005) - garage (1947-2005)	- pompiste (1947-2005)
2	50 - 150 ppm	- production (vase clos) (1947-1969)	- mécanicien de machines thermiques (1947-2005) - mécanicien de véhicules (1947-2005) - poste de production en raffinerie (1970-2005) - citerniste (1989-2005) - chargeur de bateaux-citerne (1989-2005)
3	>150 ppm		- poste de production en raffinerie (1947-1969) - citerniste (1947-1988) - chargeur de bateaux-citerne (1947-1988)

I.2.2.2. Matrice dédiée à l'exposition aux essences spéciales et aux autres coupes pétrolières non aromatiques

Trois niveaux d'exposition semi quantitatifs intégrant les spécificités de l'exposition par emploi ainsi que les évolutions technologiques ont été définis (Tableau 4).

Tableau 4: Répartition des ambiances de travail et des professions par niveau d'exposition aux essences spéciales et autres coupes pétrolières non aromatiques [22]

Intensité	Ambiance	Professions
1 (faible)	- production (vase clos) (1970-2005) - production de mélanges à base de solvants (1986-2005)	- nettoyage en mécanique de précision (1947-2005) - mécanicien d'entretien dans l'imprimerie (1947-2005) - dégraisseur, nettoyeur des textiles pour les particuliers (1947-2005)
2 (moyenne)	- production (vase clos) (1947-1969) - production de mélanges à base de solvants (1947-1985)	- poste de collage en milieu artisanal (1947-2005) - contrôleur, dégraisseur des textiles en milieu industriel (1947-2005) - poste de collage en milieu industriel (1986-2005) - poste de l'industrie du caoutchouc et des colles (1970-2005) - poste de production en raffinerie (1970-2005) - poste de production de préparations solvantées (1970-2005)
3 (forte)		- poste de collage en milieu industriel (1947-1985) - poste d'imperméabilisation des textiles (1947-1969) - poste de l'industrie du caoutchouc et des colles (1947-1969) - poste de production en raffinerie (1947-1969) - poste de production de préparations solvantées (1947-1969)

I.2.2.3. Matrice dédiée à l'exposition aux white-spirits et autres coupes aromatiques légères

Le kérosène et les white-spirits ont été utilisés pour certaines tâches similaires (ex : dégraissage de métaux) à des périodes différentes : le kérosène a été petit à petit abandonné pour laisser place aux white-spirits. Les périodes retenues sont avant 1960 (kérosène très largement utilisé et white-spirits peu), entre 1960 et 1975 (les deux sont utilisés), après 1975 (le kérosène en tant que dégraissant a pratiquement disparu).

Une base de données reprenant les résultats de prélèvements a été constituée à partir de la littérature.

Ces métrologies ont permis de définir une échelle quantitative pour les trois niveaux d'exposition intégrant les spécificités de l'exposition par emploi ainsi que les évolutions technologiques (Tableau 5).

- 1 : entre 1 et 20 ppm faible
- 2 : entre 20 et 50 ppm moyenne
- 3 : > 50 ppm fort

Tableau 5: Répartition des ambiances de travail et des professions par intensité d'exposition aux white-spirits et autres coupes aromatiques légères [22]

Intensité	Échelles quantitatives	Ambiance	Professions
1	1 - 20 ppm	- production en vase clos (1970-2005) - production de mélanges à base de solvants (1986-2005)	- mécanicien d'entretien (1947-2005)
2	20 - 50 ppm	- production en vase clos (1947-1969) - production de mélanges à base de solvants (1947-1985)	- peintre en bâtiment (1947-2005) - peintre industriel (1986-2005) - poste de production en raffinerie (1970-2005) - poste de production des peintures et des préparations solvantées (1986-2005)
3	>50 ppm		- peintre industriel (1947-1985) - poste de production en raffinerie (1947-1969) - poste de production des peintures et des préparations solvantées (1947-1985)

I.2.2.4. Matrice dédiée à l'exposition à au moins un carburant ou un solvant pétrolier

Cette matrice évalue une exposition professionnelle à au moins un carburant ou un solvant pétrolier quel qu'il soit.

Les périodes d'exposition intégrées dans l'évaluation à l'exposition générale à un carburant ou un solvant pétrolier sont définies à partir des périodes d'exposition repérées pour les cinq catégories de solvants pétroliers précédentes.

La probabilité d'exposition à un quelconque carburant ou solvant pétrolier représente la proportion de personnes au sein d'un emploi exposée à au moins l'un des produits pétroliers définis dans les différentes catégories.

L'évaluation a été faite au cas par cas, soit en retenant la probabilité d'exposition la plus élevée qui avait été évaluée pour une catégorie de carburant ou de solvant, soit en additionnant les probabilités des différentes catégories.

Pour un emploi donné, l'évaluation du niveau d'exposition à au moins un carburant ou un solvant pétrolier quel qu'il soit, a été réalisée à partir des intensités et des fréquences attribuées par catégorie.

Trois niveaux d'exposition semi quantitatifs ont été définis comme montré dans le (Tableau 6).

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

Tableau 6: Répartition des professions par niveau d'exposition à au moins un carburant ou un solvant pétrolier [22]

Niveau	Profession	Période
1 (faible)	- mécanicien de précision	1970-2005
	- cordonnier réparateur	1970-2005
	- peintre en bâtiment	1986-2005
	- imprimeur	1986-2005
	- chimiste et ingénieur dans les laboratoires	1986-2005
	- poste de production dans l'industrie des préparations solvantées	1986-2005
	- poste de raffinage du pétrole	1989-2005
2 (moyen)	- peintre au pistolet	1947-2005
	- pompiste	1947-2005
	- mécanicien automobile	1947-2005
	- mécanicien de précision	1947-1969
	- cordonnier réparateur	1947-1969
	- peintre en bâtiment	1947-1985
	- imprimeur	1947-1985
	- chimiste et ingénieur dans les laboratoires	1947-1985
	- poste de production dans l'industrie des préparations solvantées	1970-1985
	- poste de raffinage du pétrole	1970-1988
	- poste exposé dans l'industrie du caoutchouc	1970-2005
	- dégraisseur, nettoyeur de textile	1970-2005
- citemiste	1989-2005	
3 (fort)	- imperméabilisateur de textile	1947-1969
	- poste de production de préparations solvantées	1947-1969
	- poste de raffinage du pétrole	1947-1969
	- poste exposé dans l'industrie du caoutchouc	1947-1969
	- dégraisseur, nettoyeur de textile	1947-1969
	- citemiste	1947-1988

La matrice dédiée à l'exposition au benzène sera développée à part dans le titre suivant.

I.3. Le benzène dans le carburant

I.3.1. Propriétés physico-chimiques

Le benzène (C₆H₆) est un hydrocarbure aromatique. Il existe également des mélanges pour lesquels l'appellation faisait référence au benzène :

- **Les benzols** étaient des mélanges d'hydrocarbures aromatiques, extraits des produits de distillation de la houille ; le benzène en était le constituant de base, avec en proportions variables des homologues de ce dernier ;
- **La benzine** était un produit de distillation du pétrole contenant principalement des hydrocarbures aliphatiques (hexane et heptane) mais qui pouvait contenir du benzène, dans des proportions variables.

Le Tableau 7 regroupe les principales caractéristiques physico-chimiques du benzène.

Tableau 7: Propriétés physico-chimiques du benzène [22]

NOM SUBSTANCE	DÉTAILS	
Benzène	Formule	C ₆ H ₆
	N° CAS	71-43-2
	Etat Physique	Liquide
	Odeur - Limite olfactive	4,68
	Masse molaire	78,11
	Point de fusion	5,5 °C
	Point d'ébullition	80,1 °C
	Densité	0,879
	Densité gaz / vapeur	2,7
	Pression de vapeur	12,6 kPa à 25 °C 15,5 kPa à 30 °C 36,5 kPa à 50 °C
	Indice d'évaporation	3 (oxyde de diéthyle = 1)
	Point d'éclair	-11 °C (coupelle fermée)
	Température d'auto-inflammation	555 °C (538°C à 580°C selon les sources)
	Limites d'explosivité ou d'inflammabilité (en volume % dans l'air)	Limite inférieure : 1,2 % limite supérieure : 8,0 %
	Coefficient de partage n-octanol / eau (log Pow)	2,13

I.3.2. Production

À l'origine, le benzène était produit à partir de la houille, par distillation de goudrons de houille. Il s'agissait en fait d'un produit secondaire de la production de coke pour l'industrie sidérurgique. Cette filière de production s'est peu à peu effacée lorsqu'il a été possible d'obtenir le benzène à partir du pétrole et qu'il a fallu faire face à la demande croissante de production de benzène. En effet, il est un constituant naturel du pétrole. Il est donc principalement obtenu par craquage ou reformage catalytique d'hydrocarbures pétroliers. La distillation de ces mélanges pétroliers permet d'obtenir ce produit pur [22].

La raffinerie de Skikda, l'une des plus grandes raffineries d'Algérie, produit environs 197 300 tonnes de Benzène par an [23].

I.3.3. Utilisations

On distingue deux utilisations principales, suivant la propriété du benzène mise en jeu :

- L'utilisation en tant que solvant ;
- L'utilisation en tant qu'additif dans l'essence carburant.

Dans l'industrie des huiles essentielles, le benzène a également été utilisé pour l'extraction mais dans les années 1990, cette utilisation tendait à disparaître [22].

Aujourd'hui, l'utilisation du benzène est limitée et est réservée aux productions pour lesquelles il n'est pas techniquement possible de le substituer :

- Synthèse chimique de ses dérivés ;
- Utilisation en laboratoire ;
- Composant de l'essence carburant.

La connaissance de la toxicité du benzène a entraîné une évolution de la réglementation à son sujet, aussi bien pour les préparations solvantées à base de benzène que pour l'essence carburant. L'évolution de la réglementation est présentée dans les paragraphes suivants.

I.3.4. Utilisation en tant que solvant et évolution de la réglementation

Très largement utilisé dans le passé comme solvant industriel et dans la formulation de nombreuses préparations solvantées utilisées dans diverses industries (caoutchoucs, plastiques, peintures, laques, linoléum, colles et adhésifs, encres, cires et encaustiques). Compte tenu de la toxicité du benzène, ces utilisations ont été réglementées et progressivement abandonnées à partir des années 1950 [12,22].

- **Mars 1949** : interdiction d'utiliser le benzène et les benzols comme dissolvants, Cependant, cette réglementation permettait des dérogations et dans certains secteurs d'activité, des dissolvants contenant plus de 15 % de benzène étaient encore utilisés car ils ne pouvaient pas techniquement être substitués.
- **1er janvier 1970** : Limitation de la teneur en benzène dans les diluants et dissolvants à 1 % ; interdiction de l'emploi de toutes préparations avec des dissolvants et diluants contenant plus d'1 % de benzène.
- **Novembre 1973** : Convention internationale n° 136 concernant la protection contre les risques d'intoxications dus au benzène. Cette convention demande que la substitution du benzène par tout autre produit moins nocif soit réalisée dans tous les secteurs d'activité, sauf ceux de la production de benzène, la synthèse de certains composés chimiques, les carburants et les travaux d'analyse et de recherche.
- **Février 1986** : Limitation de la teneur dans les diluants et dissolvants à 0,2 % de benzène [22].

En Europe, le benzène est principalement utilisé pour fabriquer du styrène, du phénol, du cyclohexane, de l'aniline, de l'anhydride maléique, des alkylbenzènes et des chlorobenzènes. C'est un intermédiaire dans la production d'antraquinone, d'hydroquinone, d'hexachlorure de benzène, d'acide benzène sulfonique et d'autres produits utilisés dans les médicaments, les colorants, les insecticides et les plastiques.

Aux États-Unis d'Amérique, le benzène est principalement utilisé dans la production d'éthylbenzène, qui représentait 52 % de la demande totale de benzène en 2008 [12]. La majeure partie de l'éthylbenzène est consommée dans la fabrication du styrène, qui est à son tour utilisé dans le polystyrène et divers copolymères de styrène, les latex et les résines.

La deuxième plus grande utilisation (représentant 22 % de la demande) constitue la fabrication de cumène (isopropylbenzène), dont la quasi-totalité est consommée dans la production de phénol [12].

I.3.5. Utilisation dans l'essence carburant et évolution de la réglementation

Le benzène a été utilisé en tant qu'additif dans l'essence carburant depuis longtemps pour augmenter l'indice d'octane, avant que le plomb tétraéthyl présent dans les additifs antidétonants ne le remplace. À la suite des réglementations concernant la teneur en plomb des essences, le benzène a été de nouveau utilisé dans les essences, d'abord avec une teneur maximum autorisée de 5 % (en volume), puis à une teneur maximum de 1 % depuis 2000.

Les dates susceptibles d'engendrer une modification de l'évaluation de l'exposition au benzène ont donc été définies comme suit :

- **1970** : amélioration des conditions de travail dans le secteur de la raffinerie et la production des huiles essentielles ; évolution de la consommation de carburants pour les engins agricoles et du BTP (essence vers gazole) ; prise en compte de la réglementation concernant la teneur en benzène de préparations solvantées (décret de 1969) ;
- **1975** : disparition de l'utilisation du benzène dans les activités non spécifiques (décret de 1973) ;
- **1980** : évolution de la consommation de carburants pour les automobiles et les poids lourds (essence vers gazole) ;
- **1986** : réglementation concernant la teneur en benzène de préparations solvantées (décret de 1986) ;
- **21 janvier 1986** : teneur limite en benzène dans l'essence à 5 %.
- **1989** : diminution de la teneur en benzène dans l'essence.

Directive européenne n° 98/70/CE (entrée en vigueur le 1er janvier 2000) : limitation de la teneur en benzène à 1 % dans l'essence carburant.

En Algérie, la réglementation relative au benzène reste partielle et peu spécifique.

- **Décret des polluants atmosphériques (2006)** : Le décret exécutif n°06-141 fixant les seuils de rejets atmosphériques ne mentionne pas explicitement le benzène parmi les substances réglementées, malgré sa classification internationale comme cancérigène avéré [24].
- **Réglementation dans les carburants** : Contrairement aux normes européennes qui limitent la teneur en benzène à 1 %, la réglementation algérienne autorise jusqu'à 5 % dans les carburants, ce qui augmente le risque d'exposition pour les travailleurs et les populations urbaines.

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

- **Gestion des déchets** : La loi n°01-19 relative à la gestion des déchets, modifiée en 2025, introduit des principes d'économie circulaire et de responsabilité du producteur, mais ne traite pas directement des émissions ou résidus liés au benzène.
- **Biosurveillance** : À ce jour, aucun système national de biosurveillance n'est en place pour le suivi de l'exposition au benzène. Les études restent ponctuelles et académiques, sans intégration dans une stratégie de santé publique ou de prévention professionnelle.
- **Maladie professionnelle** : Le benzène est reconnu comme agent toxique dans le cadre de la législation algérienne sur les maladies professionnelles, notamment à travers le **tableau n°4** annexé à la loi n°83-13 modifiée par l'ordonnance n°96-19. Ce tableau inclut les affections hématologiques graves telles que l'aplasie médullaire et certaines leucémies, causées par une exposition prolongée au benzène. Toutefois, la reconnaissance effective reste limitée en pratique, en raison du manque de sensibilisation, de surveillance biologique systématique, et de déclaration formelle auprès des organismes de sécurité sociale. Ce décalage entre la reconnaissance juridique et la réalité du terrain souligne l'importance d'une meilleure intégration entre réglementation, prévention et suivi médical.

I.3.6. Sources d'exposition professionnelles

L'exposition professionnelle au benzène est définie comme l'exposition par inhalation ou par voie cutanée au travail susceptible de dépasser de manière significative l'exposition non professionnelle due à l'inhalation d'air urbain ou au remplissage des stations-service (exposition à long terme généralement inférieure à 0,01 ppm) [22,25].

L'exposition professionnelle au benzène se produit par inhalation ou absorption cutanée de solvants dans les industries du caoutchouc, de la peinture (y compris les applications de peinture) et de la fabrication de pièces.

Il se produit également dans tout le circuit de fabrication et de distribution du carburant, du raffinage au transport de pétrole brut et de l'essence ainsi que dans les stations-service [22].

Les industries où une exposition potentielle est possible comprennent les services agricoles, la construction (y compris les entrepreneurs en bâtiment et les entrepreneurs spécialisés), les produits alimentaires, la fabrication du tabac, les usines de textiles, le bois d'œuvre et le bois, l'imprimerie et l'édition, les produits chimiques et les produits analogues, la fabrication du caoutchouc, la fabrication du cuir, les transports et les services de santé [25].

I.3.7. Sources d'exposition extra-professionnelles

Les principales sources d'exposition au benzène pour la population générale sont l'air ambiant contenant de la fumée de tabac, les fumées industrielles, l'évaporation du carburant des stations-service et les gaz d'échappement des automobiles et plus faiblement de la consommation d'eau ou d'aliments contaminés.

Le benzène a été mesuré dans l'air extérieur à divers endroits aux États-Unis à des concentrations allant de 0,02 ppb ($0,06 \mu\text{g}/\text{m}^3$) dans une zone rurale à 112 ppb ($356 \mu\text{g}/\text{m}^3$) dans une zone urbaine [25].

L'exposition au benzène est la plus élevée dans les zones à forte circulation de véhicules à moteur et autour des stations-service. D'après une concentration moyenne de benzène de 12,5 ppb ($40 \mu\text{g}/\text{m}^3$) dans l'air et une exposition de 1 heure par jour, l'absorption quotidienne de benzène provenant de la conduite d'un véhicule à moteur est estimée à 40 μg . L'exposition est plus élevée chez les personnes qui passent beaucoup de temps dans des véhicules à moteur dans des zones de circulation encombrée.

Deux études ont été menées à Alger mettant en évidence le trafic routier comme source importante d'émission de benzène. La première en 2006, a révélé qu'aux alentours de la circulation routière, une concentration moyenne de benzène de $27 \mu\text{g}/\text{m}^3$, avec des valeurs supérieures à $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ souvent observées [13].

La seconde, en 2012, à la recherche des BTEX atmosphériques (benzène, toluène, éthylbenzène, o-, m- et p-xylènes) dans la ville d'Alger. Trois campagnes d'échantillonnage ont été réalisées en bordure de route, en tunnel, en milieu urbain et en milieu semi-rural. Les résultats indiquaient que les concentrations moyennes de benzène sur le bord de la route et à l'intérieur du véhicule dépassaient largement la valeur limite de $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (limite en France depuis 2010) [26].

Une étude réalisée à Ouargla en 2015, a révélé des valeurs de benzène atmosphérique variant de 12 à $27 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à l'intérieur et l'extérieur de l'hôpital [27].

La concentration médiane de benzène était de 2,2 ppb ($7 \mu\text{g}/\text{m}^3$) dans 185 foyers sans fumeurs et de 3,3 ppb ($10,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) dans 343 foyers comptant un ou plusieurs fumeurs. Les quantités de benzène mesurées par cigarette variaient de 5,9 à 75 μg dans la fumée principale et de 345 à 653 μg dans la fumée latérale [25].

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

L'exposition résidentielle au benzène peut également se produire à la suite de fuites dans des réservoirs de stockage d'essence souterrains. On a estimé que les concentrations de benzène dans les maisons à la suite de telles expositions variaient de 0 à 42 ppm (1 à 136 mg/m³) [25].

En 2021, une équipe italienne a mené une surveillance du benzène dans l'air intérieur de l'environnement des enfants vivant dans une zone urbaine et une zone à proximité d'une usine pétrochimique en Sardaigne.

Les résultats étaient inférieurs à la limite de l'Union européenne de 5 µg/m³, mais les concentrations de benzène atmosphérique étaient plus élevées dans les échantillons provenant de l'environnement industriel que ceux de la zone urbaine. Les enfants vivant à proximité de l'usine pétrochimique présentaient des valeurs de benzène urinaire significativement plus élevées que ceux de la zone urbaine dans les échantillons du matin et du soir [28].

Une étude tunisienne en 2009, réalisée auprès de 182 sujets sains non exposés professionnellement au benzène, a révélé des taux de t,t-MA urinaire variant entre (0.003 à 0.618 mg/g de créatinine), les taux élevés étaient chez les fumeurs et les tranches d'âge inférieures à 20 ans et supérieures à 40 ans [29].

1.3.8. Historique des limites d'exposition

Le benzène étant cancérigène, différentes approches pour limiter les recommandations ont été appliquées par différentes entités. Certains appliquent une approche fondée sur le risque, en identifiant un niveau de risque acceptable comme base d'une recommandation limite. D'autres ont adopté une approche fondée sur la santé, en identifiant un niveau d'exposition en dessous duquel on pense qu'il existe un potentiel négligeable d'effets nocifs [30].

La fixation des VLEP (Valeurs Limite d'Exposition Professionnelle) au fil du temps reflète la reconnaissance des divers effets toxiques du benzène (Tableau 8).

- L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) a d'abord fixé une valeur limite d'exposition (VLE) de 100 ppm en 1946, qui visait principalement à prévenir la toxicité aiguë, mais cette valeur a été réduite à 50 ppm en tant que moyenne pondérée dans le temps sur 8 heures (VLEP sur 8 h) [12].

- Un an plus tard, en 1948, l'American Petroleum Institute (API) a conclu, sur la base de l'expérience de l'industrie pétrolière, que la VLEP devrait être inférieure à 50 ppm.

La même année, ACGIH a divisé la VLEP à 25 ppm (8 h), une valeur qui a été adoptée par l'API en 1957.

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

- L'ACGIH a maintenu la TLV de 25 ppm, car elle ne causait aucun signe de toxicité aiguë à ce niveau.
- En 1977, elle a été réduite à 10 ppm (8 h).
- En 1997, la VLEP-8H a été abaissée à sa valeur actuelle de 0,5 ppm.
- L'OSHA des États-Unis a fixé une VLEP de 1 ppm avec une VLE de 5 ppm pendant 15 min en 1996.
- En Europe, une tendance similaire a été observée, en particulier après 1997, lorsqu'une VLEP contraignante de 1 ppm (8 h) a été adoptée dans l'UE dans le cadre d'une directive du Conseil qui permettait une mise en œuvre progressive par les différents États membres.
- En Allemagne, la Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) a proposé une VLEP de 25 ppm en 1964, qui a été abaissée à 8 ppm en 1979. En 1991, la VLEP en Allemagne a été abaissée à 5 ppm en 1991, puis à 2,5 ppm en 1994 et en 2003 à sa valeur actuelle de 1 ppm.
- De même, le HSE britannique a adopté une VLEP de 25 ppm en 1967 et l'a abaissée à 5 ppm en 1988, à 3 ppm en 2000 et enfin à 1 ppm en 2003.
- Aux Pays-Bas, la même tendance a été suivie avec des VLEP de 10 ppm, 2,5 ppm et 1 ppm, successivement, jusqu'à ce qu'en 2014, le Conseil de la santé conseille une VLEP de 0,2 ppm qui est entrée en vigueur en 2017 [12,30].

Il existe une différence fondamentale entre cette valeur de 0,2 ppm et toutes les autres valeurs, car il s'agit d'une limite d'exposition professionnelle recommandée pour la santé HBROEL (Health-Based Recommended-OEL), basée sur l'hypothèse que le benzène est une substance génotoxique non stochastique.

Toutes les valeurs précédentes qui ont été fixées étaient en fait des chiffres de risque puisqu'il a été supposé que le benzène fût un génotoxique stochastique (dommages aléatoires et imprévisibles).

Contrairement à ces valeurs, à partir desquelles le risque de cancer supplémentaire attendu au niveau d'exposition pourrait théoriquement être calculé, la valeur HBROEL est considérée comme une valeur sûre en dessous de laquelle aucun risque supplémentaire pour la santé n'est attendu [12].

En 2018, le Comité d'évaluation des risques (CER) de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) a rendu un avis suggérant une VLEP de 0,05 ppm [30].

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

Le RAC (Risk Assessment Committee) conclut également que cette valeur est basée sur un mode d'action seuil et qu'elle peut être considérée comme associée à l'absence de risque résiduel significatif de cancer et qu'elle permettra également d'éviter d'autres effets indésirables [12].

Plus récemment, une VLEP de 0,25 ppm pour le benzène a été proposée à la suite d'un examen systématique utilisant uniquement des données humaines de qualité évaluée sur les effets génotoxiques et hématotoxiques du benzène [3].

Selon le CIRC, le benzène et les particules diesel sont des cancérogènes du groupe 1 pour l'homme, et l'essence a été classée dans le groupe 2A « potentiellement cancérogène pour l'homme » [31].

Le Tableau 8 présente l'évolution des VLEP du benzène dans différents pays

Tableau 8: Historique de l'établissement des limites d'exposition professionnelle du benzène par différentes autorités [12]

Year	OEL (ppm, 8-h TWA)	Authority
1946	100	ACGIH
1947	50	ACGIH
1948	<50	API
1948	25	ACGIH
1957	25	API
1964	25	DFG
1967	25	UK
1973	10	USA OSHA
1977	10	ACGIH
1979	8	DFG
1985	10	Netherlands
1988	5	UK
1991	5	DFG
1994	2.5	DFG
1994	2.3	Netherlands
1996	1.0	USA OSHA
1997	1.0	EU SCOEL
1997	0.5	ACGIH
2000	3	UK
2003	1.0	DFG
2003	1.0	UK
2014	0.2	Netherlands
2018	0.05	EU RAC

OEL: Occupational Exposure Limit TWA: Time Weighted Average API: American Petroleum Institute UK: Unites Kingdom ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft (German Research Foundation) OSHA: Occupational Safety and Health Administration EU SCOEL: Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (Union européenne) EU RAC: Risk Assessment Committee (ECHA – European Chemicals Agency) ppm: partie par million

I.3.9. Matrice « exposition-emploi » dédiée à l'exposition au benzène

La matrice dédiée à l'exposition au benzène prend en compte l'exposition liée au produit pur, mais aussi l'exposition à des mélanges contenant du benzène, comme l'essence carburant.

Chapitre I : Exposition professionnelle au carburant et au benzène

Pour l'exposition au benzène, les périodes prises en compte diffèrent suivant qu'il s'agit de l'exposition au benzène pur, à l'essence carburant ou à d'autres produits contenant du benzène (diluants, peintures, colles, etc.). Ces périodes sont définies par rapport à la teneur en benzène dans ces produits, teneur elle-même liée à la législation [22].

Quant à l'intensité d'exposition représente le niveau moyen d'exposition auquel a pu être soumis le travailleur pendant les tâches exposantes, en fonction de la période, de la nature habituelle de ces tâches et de son environnement de travail.

Une base de données reprenant les résultats de prélèvements a été constituée à partir de la littérature.

Ces métrologies ont permis de définir quatre niveaux d'exposition intégrant les spécificités de l'exposition par emploi ainsi que les évolutions technologiques :

- 1 : entre 0,1 et 1 ppm faible
- 2 : entre 1 et 5 ppm moyenne
- 3 : entre 5 et 15 ppm forte
- 4 : >15 ppm très forte

Pour l'évaluation du niveau d'exposition au benzène, il a été fait une distinction entre (Tableau 9) :

- Les professions exposées au produit pur (production, utilisation en synthèse, transport, etc.) ;
- Les professions exposées du fait de l'utilisation d'essence (teneur en benzène plus élevée que dans les autres compositions) ;
- Les professions exposées du fait de l'utilisation de diluants, peintures, autres, contenant du benzène.

Les critères pris en compte pour définir les niveaux d'exposition au benzène sont :

- La quantité de benzène pur dans le produit exposant ;
- La quantité de produit exposant mis en œuvre ;
- Les tâches réalisées avec le produit exposant.

Tableau 9: Répartition des ambiances de travail et des professions par niveau d'exposition au benzène [11]

Niveau	Échelle quantitative	Utilisation essence carburant	Utilisations de préparations avec du benzène	
		Professions	Ambiance	Professions
1	0,1 - 1 ppm	<ul style="list-style-type: none"> - pompiste (1989-2005) - garagiste (1989-2005) 	<ul style="list-style-type: none"> - ambiance production en vase clos (1970-2005) - ambiance production de tout mélange avec benzène (1970-1985) 	<ul style="list-style-type: none"> - dégraisseur, nettoyeur de textile (1970-1985) - mécanicien d'entretien dans une industrie exposant au benzène (1970-1985) - imprimeur (1970-1985) - peintre au pistolet et autre peintre en construction (1970-1985) - mécanicien de précision (1970-1985) - cordonnier réparateur (1970-1985) - chimiste, ingénieur, technicien dans les laboratoires (1970-1985) - poste de collage du cuir (1970-1985) - poste de production dans l'industrie des préparations solvantées (1970-2005) - poste exposé dans l'industrie du caoutchouc (1970-1985)
2	1 - 5 ppm	<ul style="list-style-type: none"> - garagiste (1947-1988) - pompiste (1947-1988) - citerniste (1989-2005) 	<ul style="list-style-type: none"> - ambiance production en vase clos (1947-1969) - ambiance production de tout mélange avec benzène (1947-1969) 	<ul style="list-style-type: none"> - mécanicien de précision (1947-1969) - cordonnier réparateur (1947-1969) - mécanicien d'entretien dans une industrie exposant au benzène (1947-1969) - peintre au pistolet et autre peintre en construction (1947-1969) - chimiste, ingénieur, technicien dans les laboratoires (1947-1969) - imprimeur (1947-1969) - dégraisseur, nettoyeur de textile (1947-1969)
3	5 - 15 ppm	<ul style="list-style-type: none"> - citerniste (1947-1988) 		<ul style="list-style-type: none"> - imperméabilisateur de textile (1947-1969) - poste de production dans l'industrie des préparations solvantées (1947-1969) - poste de collage du cuir (1947-1969)
4	>15 ppm			<ul style="list-style-type: none"> - poste exposé dans l'industrie du caoutchouc (1947-1969)

Chapitre II :

Toxicologie du benzène

II.1. Toxicocinétique

II.1.1. Absorption

Le benzène est facilement absorbé par les animaux d'essai et les humains par inhalation, par voie orale et par voie cutanée [4].

II.1.1.1. Orale

L'absorption presque complète du benzène administré par voie orale a été démontrée dans des études sur des animaux de laboratoire. 84 à 89 % du C¹⁴ administré pouvait être considéré comme des métabolites, du CO₂ et du benzène inchangé expiré. La présence de nourriture dans l'estomac peut retarder l'absorption et un estomac vide peut l'améliorer. Lorsque les doses orales dépassent la capacité de métabolisme du benzène, des concentrations plus importantes sont alors expirées [4].

II.1.1.2. Respiratoire

L'absorption respiratoire du benzène chez l'homme est d'environ 50 %. La baisse observée de l'absorption avec l'augmentation du temps d'exposition est apparemment due à l'excrétion respiratoire de benzène non métabolisé [4,32].

II.1.1.3. Cutanée

Des études sur des humains et des animaux de laboratoire indiquent que le benzène est rapidement absorbé par la peau à partir des phases liquide et vapeur. Le pourcentage d'absorption des doses appliquées est généralement plus élevé chez les animaux de laboratoire que chez les humains.

L'absorption cutanée est minime par rapport à l'inhalation ou à l'absorption orale ; cela est dû en grande partie au fait que le benzène se volatilise rapidement de la peau [4].

Bien que cela représente des conditions d'exposition réalistes dans la plupart des situations, l'absorption peut être sous-estimée dans les situations où le contact avec la source de benzène est maintenu pendant une période prolongée [32].

Une étude réalisée en 2006, portant sur la pénétration cutanée in vitro du benzène, toluène et des xylènes contenu dans l'essence en utilisant les cellules de diffusion de Franz et la peau abdominale humaine de pleine épaisseur, a trouvé que le benzène présentait le coefficient de perméabilité apparente moyen le plus élevé ($K_p = 43,8 \cdot 10^{-5}$ cm/h) avec un temps de latence de 1 heure. Et a conclu que dans les essences, le risque majeur de perméabilité percutanée

concerne le benzène, et que le pourcentage plus élevé de composés aromatiques présents dans l'essence augmente les valeurs de flux [33].

II.1.2. Distribution

Aucune étude n'a été rapportée concernant la distribution du benzène chez les humains après une exposition orale ou cutanée. Cependant, les données animales disponibles ont fourni des informations utiles. Des données sur les humains et les animaux étaient disponibles à la suite d'une exposition par inhalation [4].

Étant donné que le benzène est lipophile, il a une distribution élevée dans le tissu adipeux et la moelle osseuse et il traverse le placenta humain et est présent dans le sang du cordon ombilical en quantités égales ou supérieures à celles du sang maternel [4].

Le benzène a également été trouvé dans les tissus perfusés comme les reins, les poumons, le foie, le cerveau et la rate [4].

De plus, on s'attend à ce que le benzène se lie facilement aux protéines plasmatiques, et il a été constaté que les métabolites du benzène forment des adduits covalents avec les protéines du sang chez l'homme et la souris et cela n'affecte pas négativement la distribution, bien qu'aucune étude de confirmation n'ait été trouvée [34].

Lors des études sur chiens, la graisse, la moelle osseuse et l'urine contenaient environ 20 fois la concentration de benzène dans le sang ; les niveaux de benzène dans les muscles et les organes étaient de un à trois fois supérieurs à ceux du sang, et les érythrocytes contenaient environ deux fois la quantité de benzène trouvée dans le plasma [4].

II.1.3. Métabolisme

Le métabolisme du benzène est nécessaire à l'expression des effets hématotoxiques et cancérigènes qui lui sont caractéristiques.

Malgré des recherches approfondies, aucun métabolite n'a été identifié comme responsable de tous les effets toxiques du benzène, et le poids des preuves indique une interaction de plusieurs métabolites [25].

À de faibles doses, le benzène serait rapidement métabolisé et son excrétion se produit principalement sous forme de métabolites conjugués ; cependant, à des doses plus élevées, les voies métaboliques deviennent saturées, et l'expiration de benzène non métabolisé est la principale voie d'excrétion [35].

Par conséquent, l'extrapolation à partir des résultats observés à des doses élevées sous-estime les effets toxiques potentiels des faibles doses. Les voies du métabolisme du benzène semblent être qualitativement similaires d'une espèce à l'autre [36]. Des différences quantitatives dans le métabolisme entre les espèces animales sont cependant observées et aucun bon modèle pour le métabolisme humain n'a été établi [4].

L'étape métabolique initiale, qui se déroule dans le foie, le poumon et la moelle osseuse (Figure 2) implique l'oxydation dépendante du cytochrome P450 2E1 (CYP) en époxyde de benzène, qui existe en équilibre avec son tautomère oxepin.

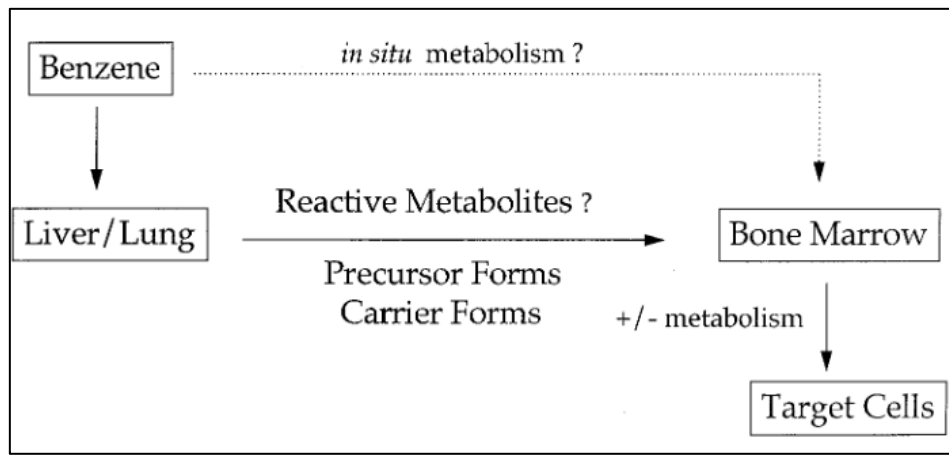


Figure 2: Sites possibles pour le métabolisme du benzène [37]

Ensuite, en fonction du taux d'exposition au benzène, le benzène époxyde suit différentes voies dans les tissus cibles [35,38] :

- Réarrangement spontané non enzymatique en phénol,
- Formation du benzène dihydrodiol sous l'action de l'époxyde hydrolase,
- Hydrolyse en un cadran dihydroélectrique à ouverture de cycle par réaction catalysée par l'ion ferrique pour produire les muconaldéhydes réactifs et l'acide trans,trans-muconique (t,t-MA),
- Et réaction avec le glutathion pour former l'acide S-phényl mercapturique par l'action de la glutathion S-phényl transférase.

Ces métabolites peuvent subir un métabolisme supplémentaire, et sont eux-mêmes inducteurs de l'oxydation par la CYP2E1, du phénol en hydroquinone et ultérieurement en 1,4-benzoquinone ou catéchol par la myéloperoxydase (MPO), déshydrogénation (t,t-MA en catéchol et S-PMA en hydroquinone), ou conjugaison avec du sulfate ou de l'acide glucuronique (phénol en sulfate de phénol) [39].

L'exposition humaine au benzène à des concentrations dans l'air comprises entre 0,1 et 10 ppm entraîne des profils de métabolites urinaires contenant de 70 à 85 % de phénol, de 5 à 10 % d'hydroquinone, d'acide trans,trans-muconique et de catéchol, et moins de 1 % d'acide S-phénylmercapturique [4,25].

Il a été démontré que le benzène est très probablement métabolisé initialement en phénol et en t,t-MA par deux enzymes plutôt qu'une seule enzyme CYP, et que l'enzyme présumée de haute affinité est active principalement à des concentrations de benzène inférieures à 1 ppm [25,35].

Dans l'étude de Rappaport et al. (2010), le pourcentage prévu de benzène métabolisé par l'enzyme présumée de haute affinité à une concentration atmosphérique de 0,001 ppm était de 88 % d'après le t,t-MA urinaire et de 80 % d'après le phénol urinaire. À mesure que les concentrations de benzène augmentaient, les pourcentages respectifs de benzène métabolisé en t,t-MA et en phénol par l'enzyme de haute affinité diminuaient successivement à 66 et 77 % à 0,1 ppm, 20 et 58 % à 1 ppm, et 2,7 et 17 % à 10 ppm. Cela indique que l'enzyme présumée de haute affinité était active principalement en dessous de 1 ppm et favorisait la voie d'ouverture du cycle [35].

Le CYP2E1 est la principale enzyme responsable du métabolisme du benzène chez les mammifères à des niveaux d'exposition plus élevés, la CYP2F1 et la CYP2A13 sont actives à des niveaux d'exposition environnementaux inférieurs à 1 ppm. Ces CYP sont fortement exprimées dans le poumon humain [25].

Le niveau d'exposition détermine quelle voie enzymatique est activée pour la détoxification et l'excrétion du benzène du corps.

L'exposition au benzène induit l'activité du CYP2E1 et donc son propre métabolisme alors que l'administration de toluène, un inhibiteur compétitif du métabolisme, entraîne une diminution de la formation de métabolites du benzène et une réduction de la toxicité. La CYP2E1 métabolise également l'alcool et l'aniline, et peut être induite par ces substrats, et une synergie avec l'alcool a été carrément démontrée [4].

L'administration de phénol à des souris ne provoque pas les effets du benzène, la distribution des enzymes oxydantes du benzène dans le foie pourrait expliquer ce résultat. Les auteurs ont observé que les enzymes conjuguantes des phénols étaient plus concentrées dans la zone périportale du foie, la première région à absorber le phénol administré par voie orale, tandis que les enzymes oxydantes étaient plus concentrées dans la région péricentrale du foie [4,25]. Et

donc une combinaison de phénol et d'hydroquinone est nécessaire pour provoquer une toxicité de la moelle osseuse majorée par la richesse de cette dernière en myéloperoxydase.

Il est généralement admis que le benzène lui-même n'est pas directement responsable des effets toxiques ; cependant, le ou les produits métaboliques responsables des effets non cancérogènes et cancérogènes de l'exposition au benzène n'ont pas été clairement définis [4].

Métabolites toxiques :

L'oxyde de benzène, les benzoquinones, le muconaldéhyde et les époxydes de benzène dihydrodiol sont des électrophiles qui réagissent facilement avec les peptides, les protéines et l'ADN et seraient en cause de l'hématotoxicité et la cancérogenèse liée au benzène [4].

La Figure 3 illustre un schéma récapitulatif du métabolisme du benzène.

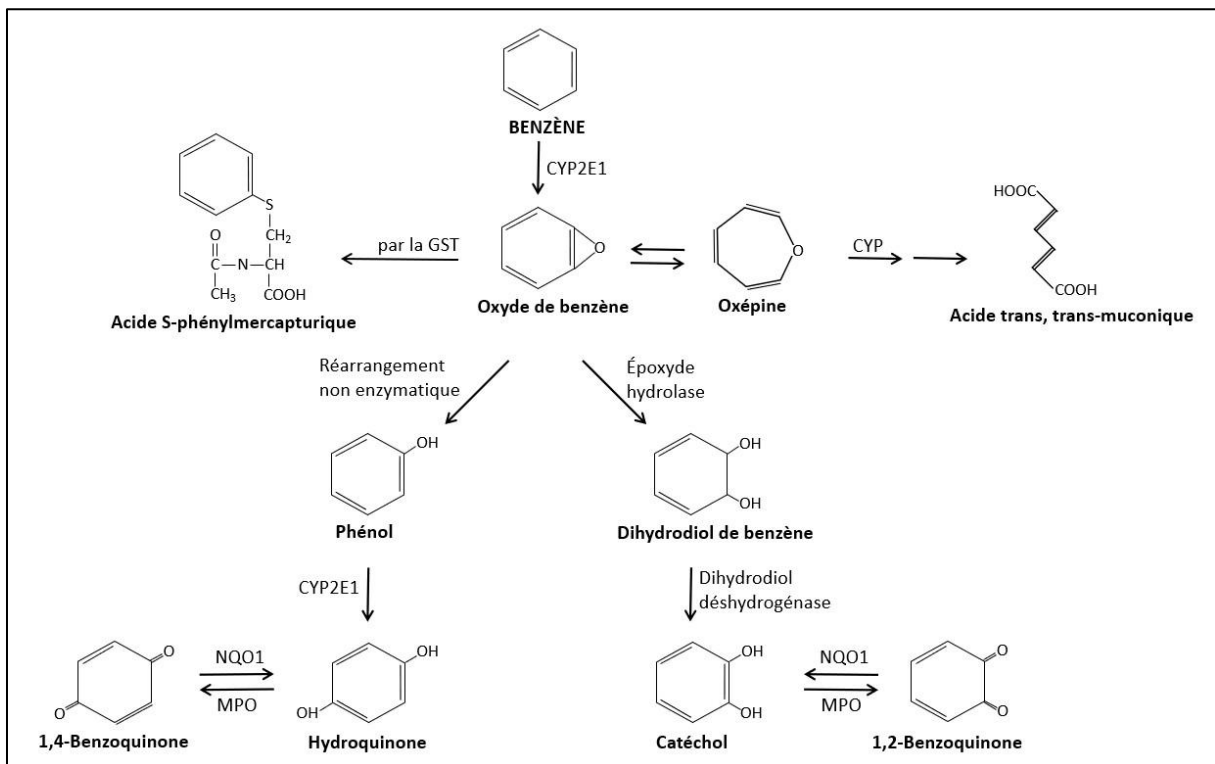


Figure 3: Schéma réactionnel du benzène montrant les voies métaboliques du benzène époxyde [40] (MPO : Myéloperoxydase, NQO1 : NADPH Oxydoréductase)

La Figure 4 montre la voie d'ouverture du cycle benzénique et formation du muconaldéhyde.

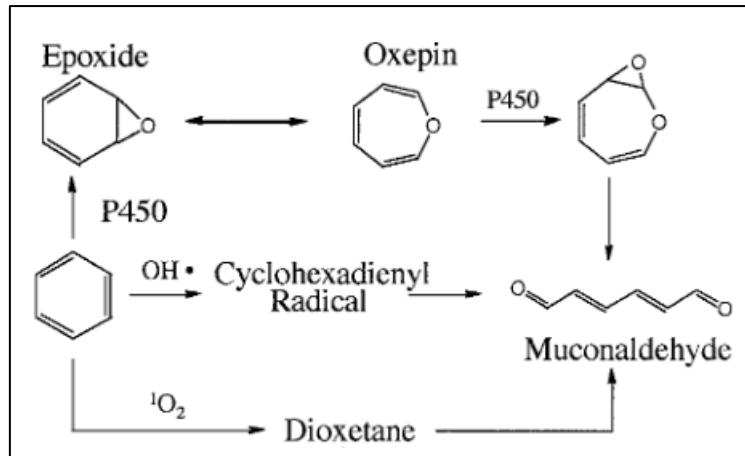


Figure 4: Voies potentielles de formation du muconaldéhyde [37]

La Figure 5 montre les métabolites impliqués dans la toxicité du benzène.

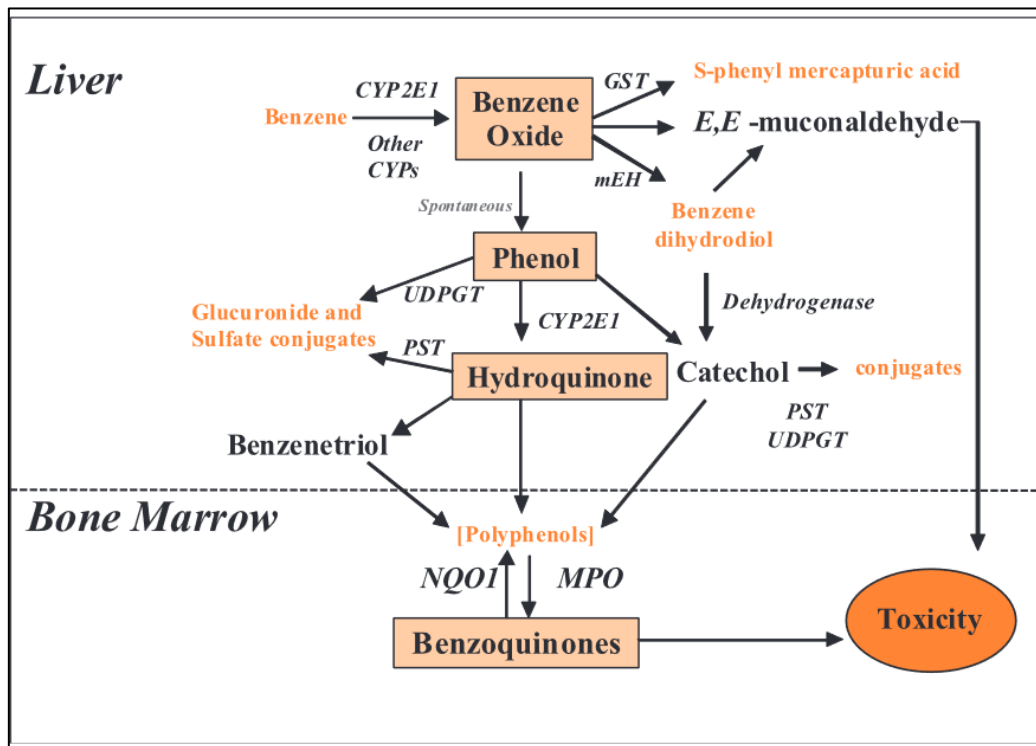


Figure 5: Schéma métabolique simplifié du benzène montrant les voies toxiques [25]

II.1.4. Elimination

Le benzène est principalement excrété dans l'urine sous forme de métabolites, notamment les conjugués du phénol avec les acides glucuronique et sulfurique, et dans l'air expiré, sous forme inchangée.

L'ordre de sécrétion dans l'urine après les heures de travail est sous forme de phénol, de quinol, de t,t-MA, S-PMA, de catéchol et de 1,2,4-benzène-triol, respectivement [37].

La proportion de benzène absorbé excrété par l'expiration est de 8 à 17 %.

L'élimination du benzène aux niveaux d'exposition professionnelle rencontrés à l'heure actuelle suit une cinétique de premier ordre, avec 2 à 3 demi-vie consécutifs correspondant à l'élimination du benzène dans différents compartiments du corps. Les temps demi-vie les plus courts signalés sont d'environ 10 à 15 minutes, les intermédiaires de 40 à 60 minutes et les troisièmes de 16 à 20 h [4,25].

La Figure 6 montre les pourcentages des formes d'élimination du benzène et de ses métabolites.

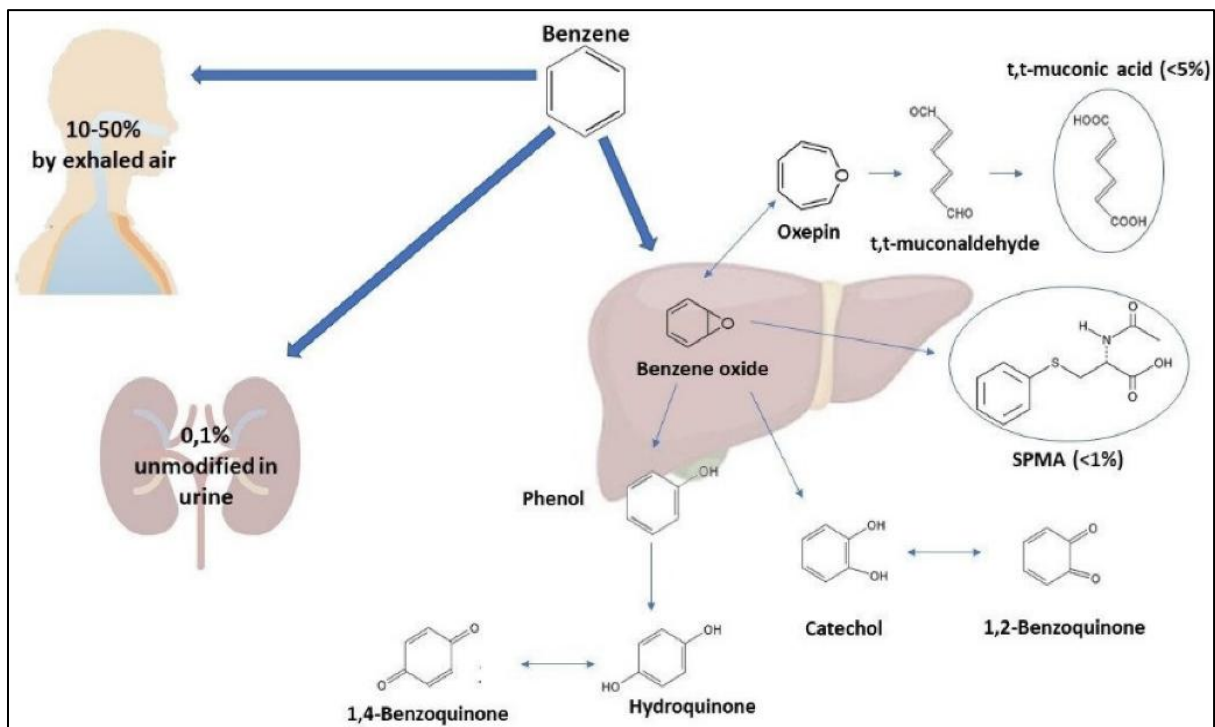


Figure 6: Voies d'élimination du benzène et différents métabolites éliminés [39]

La Figure 7 montre les formes conjuguées des métabolites du benzène.

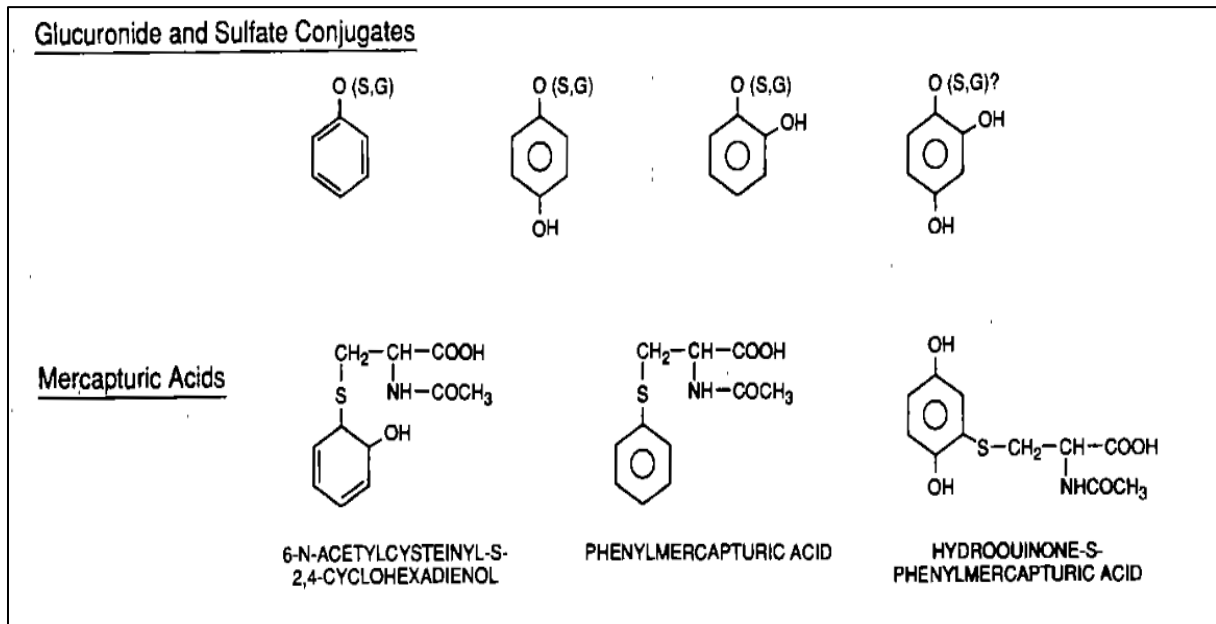


Figure 7: Métabolites mercapturiques et métabolites glucuro et sulfo conjugués du benzène [32]

Plusieurs modèles PBPK (Physiologically-Based Pharmacokinetic) différents ont été développés pour décrire mathématiquement l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des organes cibles du benzène chez l'homme, mais sont limités par la connaissance incomplète des métabolites toxiques et les difficultés à identifier un modèle animal expérimental approprié pour l'homme [39–41].

II.2. Mécanisme d'action toxique

II.2.1. Historique de la mise en évidence de la toxicité du benzène

Il a été classé comme cancérigène pour l'homme (groupe 1) par le CIRC en 1987 et est classé cancérigène de catégorie 1 par la Communauté Européenne depuis 2004 [12,25].

Il a fallu attendre le début des années 1970 pour que l'association entre la leucémie aiguë et le benzène soit suffisamment forte pour déclencher une évaluation de sa cancérigénicité par le CIRC de l'OMS.

Dans sa première monographie sur le benzène, en 1974 le CIRC conclut, à partir des données animales disponibles, que « *les données rapportées ne permettent pas de conclure qu'une activité cancérigène a été démontrée* » et pour les données épidémiologiques, « *il est établi que l'exposition à du benzène commercial ou à des mélanges contenant du benzène peut entraîner des dommages au système hématopoïétique* ». Une relation entre une telle exposition et le développement de la leucémie est suggérée par de nombreux rapports de cas, et cette suggestion est renforcée par une étude cas-témoins réalisée au Japon" [12].

Dans la réévaluation de 1982, le CIRC conclut qu'« *il existe des preuves suffisantes que le benzène est cancérigène pour l'homme* » et la relation entre l'exposition au benzène et le développement de la leucémie myéloïde aiguë (LAM) a été établie dans des études épidémiologiques [12].

Cette conclusion a été confirmée de nouveau dans la réévaluation de 1987.

Lors de ses dernières réévaluations de la cancérigénicité du benzène en 2009 et 2017, le CIRC a conclu qu'il y avait suffisamment de preuves de la cancérigénicité du benzène chez les humains et les animaux [12].

En outre, la conclusion selon laquelle le benzène était cancérigène pour l'homme serait « étayée par des données mécanistiques démontrant que le benzène présente bon nombre des principales caractéristiques des cancérigènes.

En particulier, il existe des preuves solides, y compris chez les humains exposés que le benzène [42] :

- Est métaboliquement activé en métabolites électrophiles ;
- Induit un stress oxydatif et des dommages oxydatifs à l'ADN associés ;
- Est génotoxique, induisant des dommages à l'ADN et des modifications chromosomiques ;
- Est immunosuppresseur ; et provoque une hématotoxicité.

II.2.2. Nouvelle approche mécanistique (system biology approach)

Une approche récente appelée biologie des systèmes (Systems biology) (figure 8), a été proposée pour aider à éclairer les mécanismes sous-jacents à l'hématotoxicité du benzène et aux maladies associées, et à identifier des biomarqueurs robustes de l'exposition, de l'effet précoce, de la susceptibilité et du développement de la maladie et contribuer au domaine de l'évaluation des risques [43]. C'est une méthode interdisciplinaire qui consiste en une approche holistique pour étudier tous les composants et interactions dans le réseau d'ADN (gènes), d'ARN, de protéines et de réactions biochimiques au sein d'une cellule ou d'un organisme.

Par exemple, la comparaison des profils toxicogénomiques, épigénomiques et génomiques associés à différentes expositions à des leucémigènes ou des cancérogènes suspectés, et des maladies (LNH, LAM), pour aider à clarifier le lien entre les produits chimiques, les gènes/protéines, les voies/réseaux et les maladies [43].

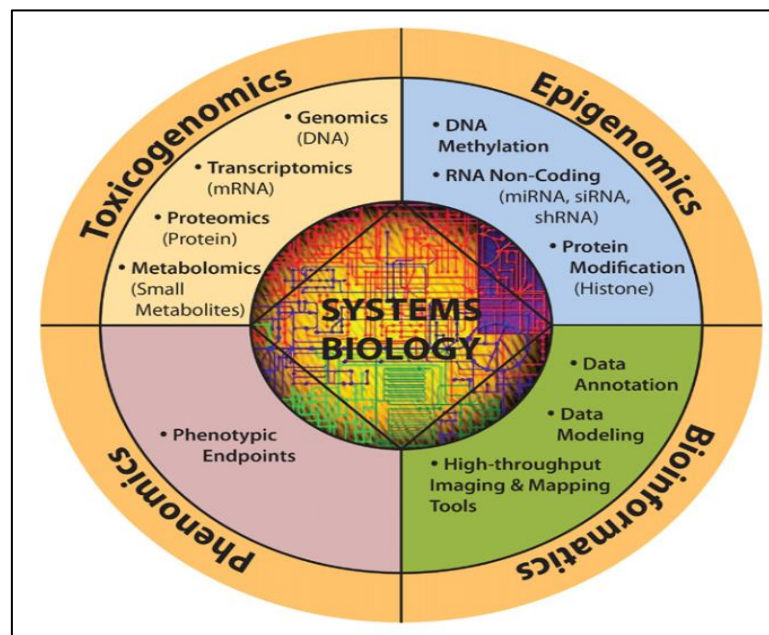


Figure 8: Aperçu de l'approche biologie des systèmes et de ses composants [41]

L'application de cette approche concernant le biomonitoring de l'exposition professionnelle au benzène sera abordée dans la partie biomarqueurs (chapitre III).

II.2.3. Mécanisme d'action par génotoxicité indirecte

Plusieurs modes d'action de la génotoxicité indirecte du benzène ont été postulés (inhibition de la topoisomérase II, formation d'adduits protéiques par des métabolites réactifs, stress oxydatif, réparation de l'ADN sujette aux erreurs et altération épigénétique) [30].

Parmi ceux-ci, seule la formation directe d'adduits par les métabolites réactifs peut être considérée comme un mécanisme sans seuil.

II.2.3.1. Génotoxicité indirecte par stress oxydatif

La moelle osseuse est un tissu particulièrement sensible au stress oxydatif, en partie en raison de sa faible capacité antioxydante intrinsèque. Plusieurs études ont montré que l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), enzyme clé dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), y est relativement réduite notamment la SOD1 (cytoplasmique) et la SOD2 (mitochondriale) [44,45]. Le catéchol et l'hydroquinone peuvent réversiblement former le 1,2-benzoquinone et 1,4-benzoquinone, respectivement, générant des radicaux d'anion superoxyde. Ceux-ci peuvent à leur tour réagir avec de nombreux composants cellulaires, provoquant une série de dysfonctionnements. De multiples études *in vitro* ont fourni des preuves de la génération de stress oxydatif par les métabolites du benzène [30,46].

L'une des formes les mieux décrites de génotoxicité indirecte est la production de dommages à l'ADN par oxydation car cela représente un souci majeur [47].

Les bases guanines sont les sites privilégiés d'oxydation de l'ADN (Figure 9). Ce sont les cibles préférentielles des réactions de transfert d'électron, elles sont également modifiées par les radicaux hydroxyles [47]. La 8-Oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) est le produit d'oxydation le plus abondant, en raison du faible potentiel d'oxydation de la guanine en position C-8 [48].

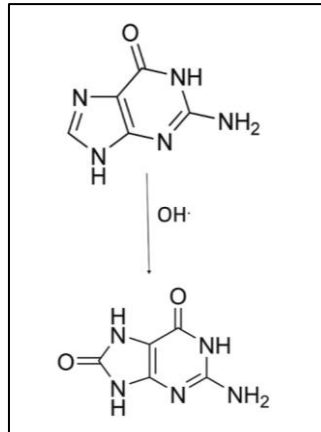


Figure 9 : Oxydation de la guanine en 8-oxoguanine [49]

Dans l'ADN, en conformation anti, la 8-oxoguanine s'apparie avec la cytosine (C) en formant trois liaisons hydrogène et n'entraînant pas d'anomalie ; en revanche, en conformation syn, elle s'apparie avec l'adénine (A) (Figure 10), avec formation de seulement deux liaisons hydrogène et appariement non naturel entre deux bases puriques, entraînant une mutation après deux réplifications, avec, à la deuxième réplification, remplacement de la 8-oxoguanine par une thymine (T) pour respecter l'appariement AT, mais remplaçant GC par AT d'où la mutation ponctuelle qui sont parmi les mutations somatiques les plus fréquentes trouvées dans les cancers humains [50].

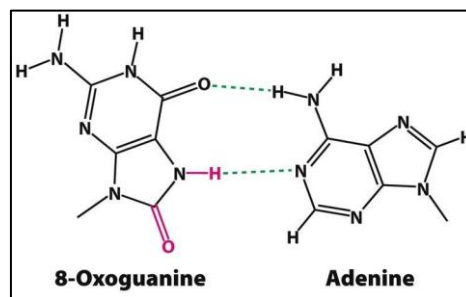


Figure 10: 8-OxoGua en liaison avec l'adénine [51]

La Figure 11 illustre la conséquence mutationnelle de l'oxydation de la guanine en C8.

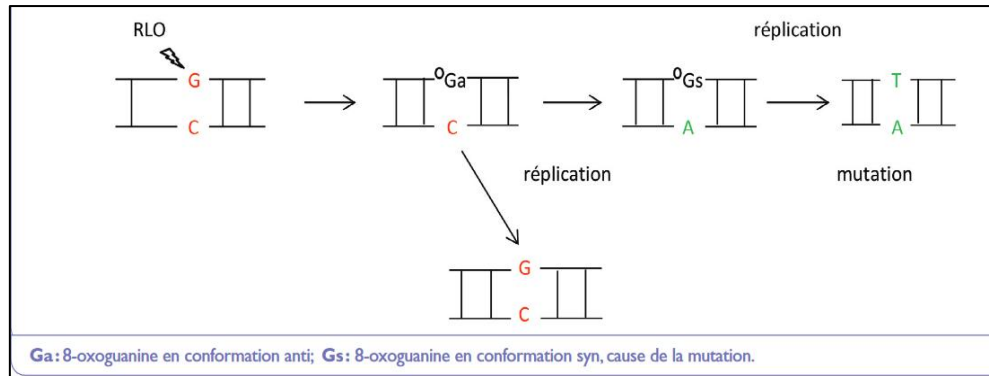


Figure 11: Effet mutational de l'oxydation de l'ADN avec formation de 8-oxoguanine [48]

Les systèmes de réparation de l'ADN par excision de bases (BER, Base Excision Repair) et de nucléotides (NER, Nucleotide Excision Repair) vont éliminer les sites oxydés ; les enzymes d'excision peuvent elles-mêmes être oxydées, perdre leurs fonctions et donc moins bien réparer l'ADN [7].

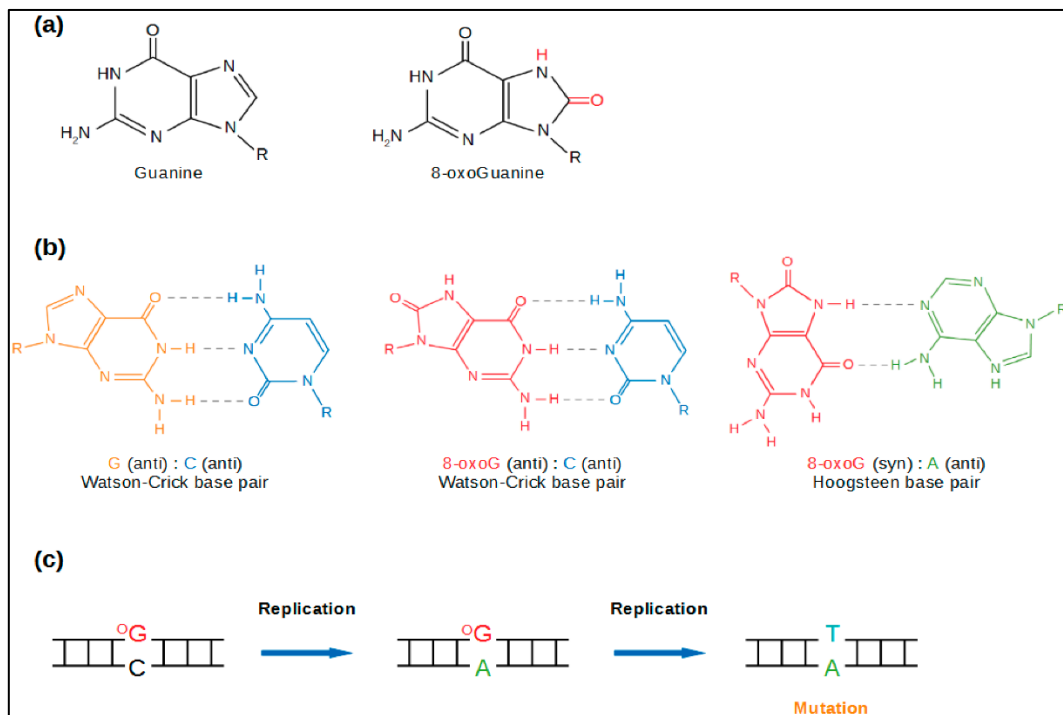


Figure 12: La 8-oxoG est une lésion pré-mutagène (a) 8-oxoG et G. Les différences sont représentées en rouge. (b) Paires de bases G :C, 8-oxoG :C et 8-oxoG : A. c) Fixation d'une transversion due à la présence de 8-oxoG [52].

La prédisposition de la guanine à l'oxydation pourrait aussi refléter une adaptation pour améliorer la plasticité génomique aux changements redox. L'ion superoxyde (O_2^-) serait capable de réparer les sites d'oxydation de l'ADN par transfert électronique, néanmoins cette réaction serait pH-dépendante [47].

La Figure 13 montre la tautomérisation entre la 8-OHdGuo et la 8OxodGuo.

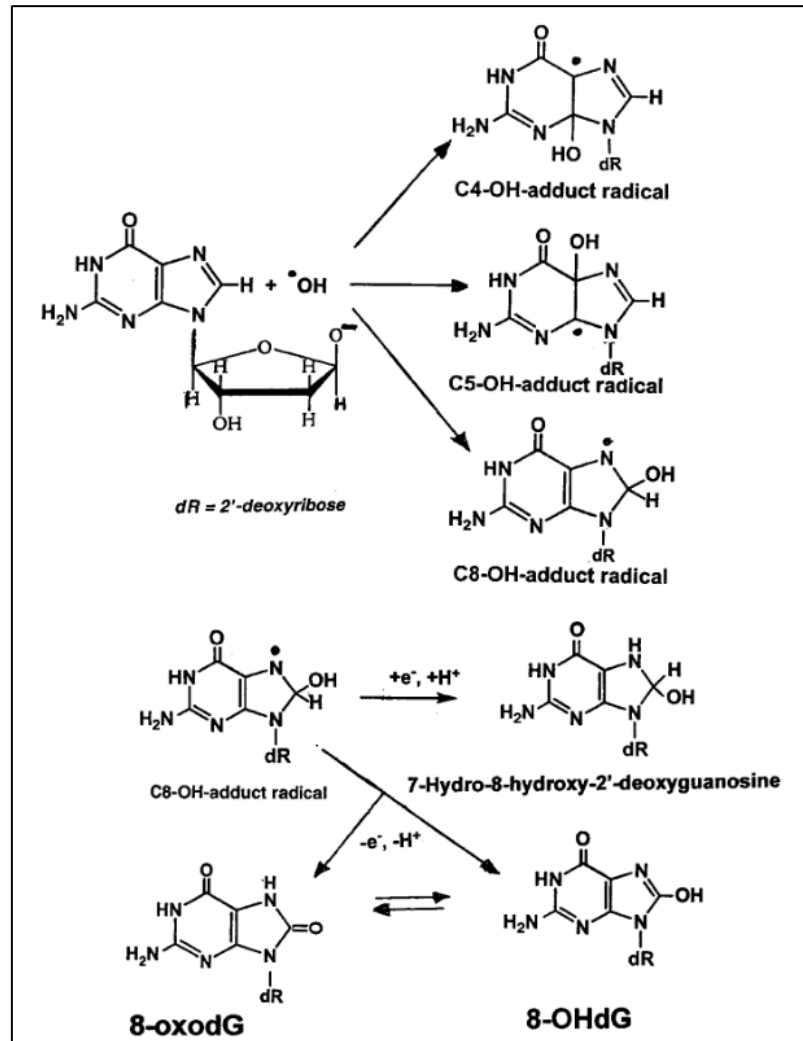


Figure 13: Réaction de la 2-déoxyguanosine avec des radicaux hydroxyles, des adduits radicaux suivie d'une réduction en 7-hydro-8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et de l'oxydation en 8-hydroxy-2'déoxyguanosine (8-OHdG) ou son tautomère 8-oxo-7-hydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodG) [53].

La 5-méthyl-cytosine est aussi un point chaud de mutation ; sa désamination oxydative produit de la thymine, ce qui conduit à un ADN muté (TA au lieu de CG) dans la deuxième génération. Par ailleurs, l'oxydation déméthylante de la 5-méthyl-cytosine est contrôlée par des enzymes de la famille TET (Ten-Eleven Translocation), un système épigénétique contrôlant l'expression

génique. L'oxydation de la 5-méthyl-cytosine, catalysée par les dioxygénases de la famille TET, produit de la 5-hydroxyméthyl-cytosine qui peut poursuivre son oxydation en 5-formyl-cytosine, puis 5-carboxy-cytosine, composés normalement éliminés par le système BER (excision de base) ou modifiées directement par déformylation/décarboxylation [54].

Les produits d'oxydation de l'ADN et de l'ARN sont multiples et pas facilement dosables dans le plasma [55], mais après excision de bases, ces composés peuvent aussi se retrouver dans les urines.

Une partie de la 5-hydroxyméthyl-cytosine reste dans le génome ; elle pourrait protéger les promoteurs de l'hyperméthylation.

II.2.3.2. Génotoxicité indirecte par inhibition de la topoisomérase II

Plusieurs études ont montré que le benzène *in vivo*, et ses métabolites réactifs, l'hydroquinone et la 1,4-benzoquinone *in vitro*, inhibent la fonctionnalité de la topoisomérase II et améliorent le clivage de l'ADN [30].

La topoisomérase II liée à l'ADN, est essentielle au maintien de la structure et de la ségrégation des chromosomes ; elle élimine les nœuds et les enchevêtrements du matériel génétique en faisant passer une double hélice intacte à travers une cassure double brin transitoire qu'elle crée dans un segment séparé de l'ADN. Afin de maintenir l'intégrité génomique pendant son cycle catalytique, la topoisomérase II forme des liaisons covalentes entre les résidus de tyrosyl du site actif et les terminaisons de l'ADN 5' créées par le clivage de la double hélice [30].

Normalement, ces complexes d'ADN clivés de la topoisomérase II covalente (connus sous le nom de complexes clivables) sont des intermédiaires fugaces et sont tolérés par la cellule. Cependant, lorsque la concentration ou la longévité des complexes de clivage augmente de manière significative, des cassures double brin de l'ADN se produisent. Si les cassures double brin induites par la topoisomérase II sont mal réparées, deux chromosomes non apparentés (non homologues) sont fusionnés pour produire des translocations ou des inversions [25].

En conclusion, le benzène, par l'intermédiaire de ses métabolites réactifs de la quinone, peut inhiber la topoisomérase II et probablement provoquer des leucémies avec des translocations et des inversions chromosomiques connues pour être générées par des inhibiteurs de la topoisomérase II.

II.2.3.3. Génotoxicité indirecte par adduits protéiques

Parmi les métabolites du benzène, deux sont particulièrement réactifs : la 1,4-benzoquinone et le muconaldéhyde. Ils sont capables de lier des protéines par addition de Michael et, en vertu de deux sites réactifs, peuvent facilement réticuler les protéines [41].

Les sites nucléophiles de l'ADN ont un potentiel de réactivité plus faible que les acides aminés donc la réactivité de l'ADN implique que la réactivité des protéines est également probable, mais l'inverse n'est pas systématique. La structure carbonyle α , β -insaturée, présente dans la 1,4-benzoquinone et le muconaldéhyde fait d'eux des électrophiles faibles [30].

La réticulation des protéines est l'un des mécanismes les plus plausibles pour les effets clastogènes ou aneugènes, en modifiant l'assemblage des microtubules ou du fuseau de division, la fonctionnalité des centrioles ou du corps polaire, ou la fonction des protéines kinétochores. La réticulation des protéines peut également conduire à un certain degré d'inhibition enzymatique lorsque les réticulations perturbent la conformation ou la fonction des protéines.

Les preuves de la liaison des métabolites du benzène aux protéines sont solides. L'administration du glutathion ou la cystéine semblent réduire ces liaisons.

Étant donné la capacité normale de la cellule à équilibrer les taux de dégradation et de synthèse des protéines, il est plausible qu'il existe un seuil au-dessus duquel la réticulation des protéines provoque une perturbation suffisante pour que des dommages cellulaires se produisent [30].

II.2.3.4. Génotoxicité indirecte par altération épigénétique

L'expression des gènes et finalement des protéines est régulée au niveau épigénétique par des processus tels que la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'expression des miARN (microARN) [56].

L'ensemble des mécanismes épigénétiques est illustré dans la Figure 14.

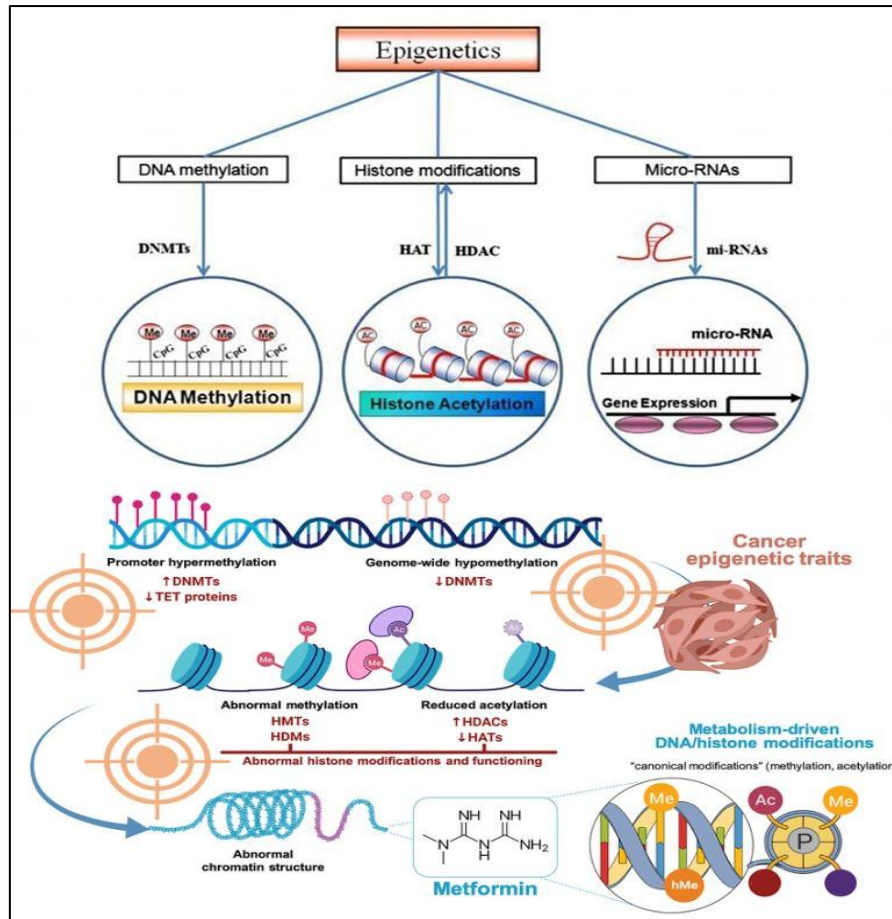


Figure 14: Mécanismes d'altérations épigénétiques [57]

- **Les microARN (miARN)** sont des ARN courts d'environ 22 nucléotides de longueur qui régulent post-transcriptionnellement l'expression des gènes en réduisant au silence l'expression des protéines par clivage et dégradation de la transcription de l'ARNm ou en inhibant la traduction (Figure 15). Un seul miARN peut se lier à plusieurs cibles d'ARNm (plus de 100), tandis que plusieurs miARN peuvent réguler une seule cible d'ARNm [58].
- Des miARN sélectionnés jouent un rôle important dans des cancers spécifiques, agissant dans le processus de contrôle de la transduction du signal, du développement cellulaire, de la différenciation, de la prolifération, de l'apoptose et de la réponse au stress. L'expression de miR-221 s'est avérée élevée dans les lymphocytes des employés des stations-service. Ceci est intéressant car miR-221 a déjà été trouvé avec des niveaux d'expression élevés chez des patients atteints de leucémie, confirmant que miR-221 est un biomarqueur potentiel de la leucémogénèse [56].

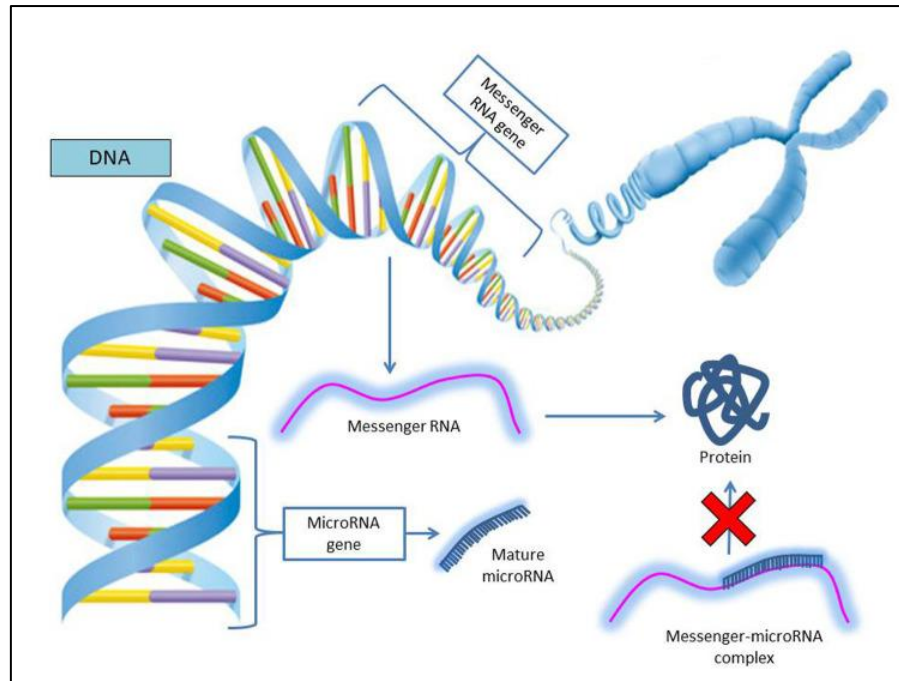


Figure 15: Régulation épigénétique de l'expression des gènes par miARN [58]

- **Modification des histones :** L'ADN humain est compacté en étant enroulé autour d'octamères de protéines d'histones centrales qui forment des nucléosomes qui comprennent 147 paires de bases d'ADN enroulées environ deux fois autour du noyau protéique qui, lui, contient deux copies de chaque histone, H2A, H2B, H3 et H4. L'interaction entre l'ADN et les histones est essentielle à la régulation de la transcription, de la réplication et de la réparation du génome et est régulée par plus de 100 modifications distinctes des histones, telles que la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination et l'acétylation. L'hypothèse du code des histones stipule que la régulation des gènes dépend en partie des modifications des histones qui se produisent principalement sur les queues d'histones. Ces modifications modifient la charge nette de l'histone centrale, modulant l'affinité entre l'ADN (chargé négativement) et l'octamère : l'ajout de charges positives entraînerait une fermeture du nucléosome, tandis que l'ajout de charges négatives entraînerait une ouverture du nucléosome [58] (Figure 16).

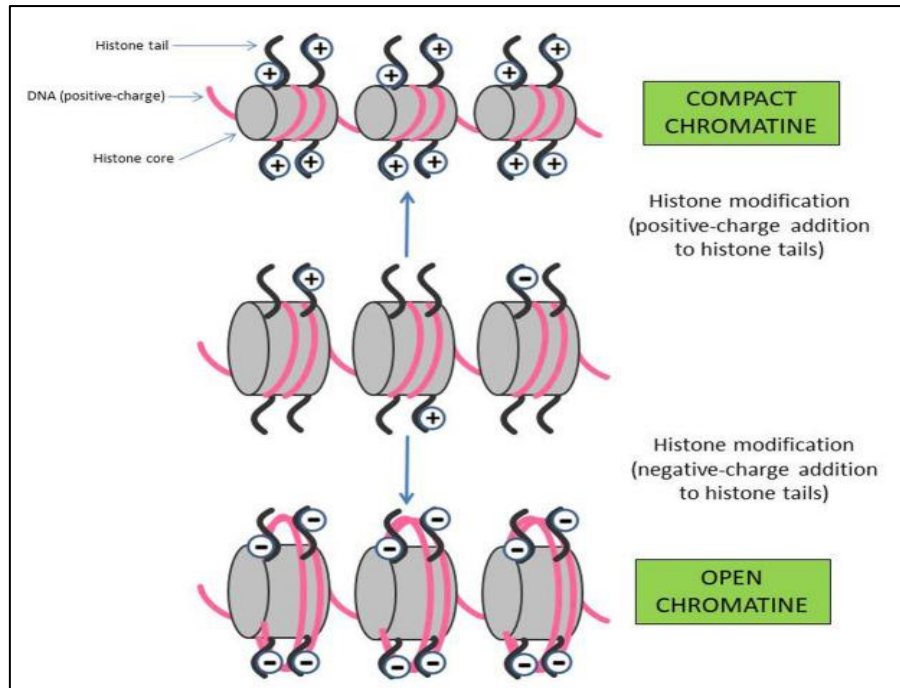


Figure 16: Régulation épigénétique de l'expression génique au moyen des histones [58]

- **Méthylation des bases nucléiques :**

La méthylation de l'ADN implique l'ajout d'un groupe méthyle au cinquième carbone de la base d'ADN de la cytosine, donnant naissance à une 5-méthyl-cytosine. Dans les cellules différenciées, seule la cytosine suivie d'une guanine peut être efficacement méthylée par des enzymes spécifiques, appelées ADN méthyltransférase.

Toutes les méthyltransférases d'ADN connues utilisent la S-adenosylméthionine (SAM) comme donneur de méthyle. La méthylation de l'ADN qui se produit dans les promoteurs de gènes peut modifier directement l'expression des gènes, en inhibant l'accès à l'ADN de la fonction de la machinerie transcriptionnelle. Cette méthylation est souvent appelée « méthylation spécifique au gène ». La méthylation qui a lieu dans des éléments transposables répétitifs (par exemple Alu, LINE-1, HERV, etc.) peut compacter la structure de la chromatine et donc augmenter la résistance de l'ADN aux toxiques [58] (Figure 17).

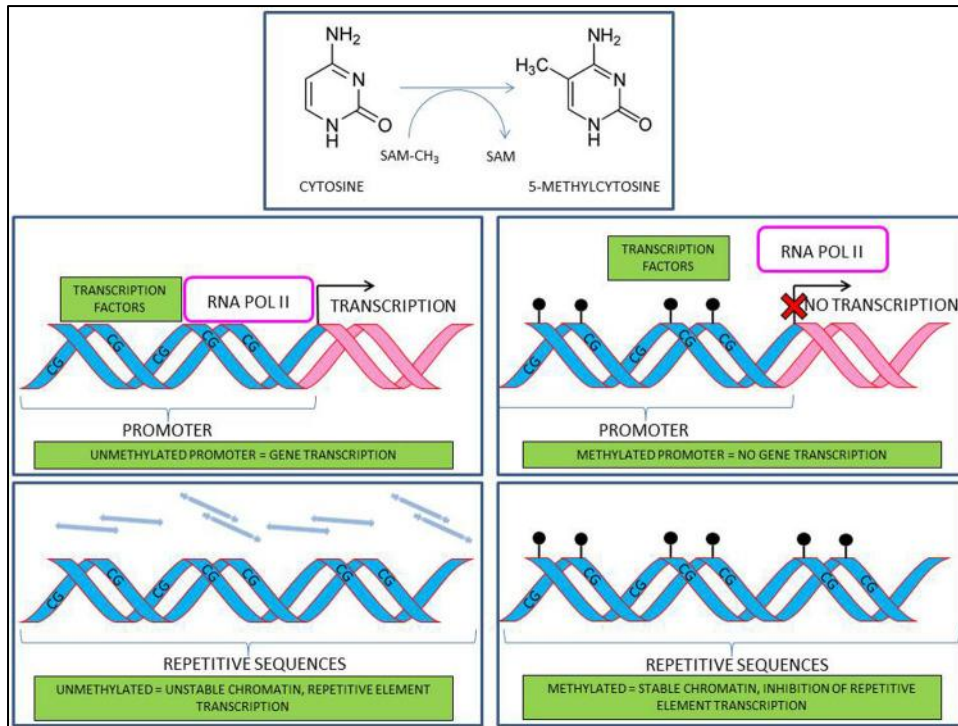


Figure 17: Régulation épigénétique de l'expression génique par méthylation de la cytosine de l'ADN [58]

Une étude pilote a révélé une méthylation altérée induite par le benzène dans de nombreux sites CpG. Une diminution de la méthylation de RUNX3 (AML2), un gène dont l'expression altérée a été associée à des troubles myéloprolifératifs s'est produite à trois sites CpG différents.

Les modifications épigénétiques telles que la méthylation sont partiellement influencées par des polluants environnementaux tels que le benzène. La modification épigénétique est importante dans l'initiation de la cancérogenèse et la progression du cancer [2].

Les gènes cibles sélectionnés pour la mesure de la méthylation sont généralement importants pour le contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN et sont liés au métabolisme de détoxification [2].

Une méthylation accrue de MSH3, un gène essentiel au maintien de l'intégrité du génome, et de Sema3C, une protéine de guidage sécrétée impliquée dans la tumorigenèse, a également été observée. Il semblait y avoir un effet lié au sexe sur la méthylation de plusieurs gènes [43].

L'examen de l'état de méthylation d'un panel de gènes dans l'ADN de cellules TK6 traitées in vitro avec de l'hydroquinone (HQ) a révélé que le gène le plus significativement hyper-méthylé était IL12. La protéine codée par ce gène est l'une des anomalies caryotypiques les plus fréquentes de la LAM [43].

Le locus inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines 2A (CDKN2A) code pour deux protéines suppressives de tumeurs clés (p14 et p16), qui ont été trouvées hyperméthylés dans les cellules sanguines mononucléées chez les travailleurs des stations-service au Brésil [59].

II.2.4. Mécanisme d'action par génotoxicité directe

Il existe des preuves solides que les métabolites du benzène, agissant seuls ou en synergie, produisent de multiples effets génotoxiques au niveau de la cellule souche hématopoïétique pluripotente, entraînant chez l'homme des modifications chromosomiques compatibles avec celles observées dans le cancer hématopoïétique [25].

Le benzène est considéré comme un agent clastogène et aneugène chez l'homme, provoquant de l'aneuploïdie, de la polyploïdie, la formation de micronoyaux dans les lymphocytes périphériques ainsi que des délétions, des translocations et des réarrangements chromosomiques [60].

II.2.4.1. Adduits à l'ADN

L'un des principaux métabolites du benzène qui peut endommager l'ADN, est la p-benzoquinone (pBQ), en formant les adduits de base exocycliques pBQ-dC, pBQ-dA et pBQ-dG qui forment de fortes lésions bloquantes et sont hautement mutagènes en induisant principalement des mutations de délétion (Figures 18 et 19).

La synthèse par translésion se produit normalement en copiant directement le site de la lésion par insertion de base et synthèse d'extension. Lorsque la lésion devient incompatible en accueillant une base opposée à la lésion dans l'ADN, la synthèse de la translésion se produit par un mécanisme de boucle de lésion moins efficace, ce qui permet d'éviter de copier la base endommagée et de conduire à la délétion [36,61].

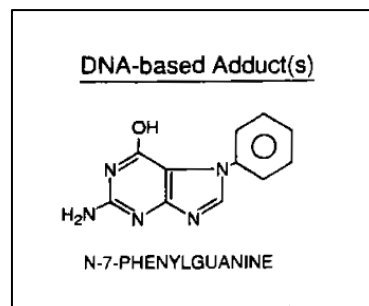


Figure 18 : Adduit du benzène à l'ADN pBQ-dG [32]

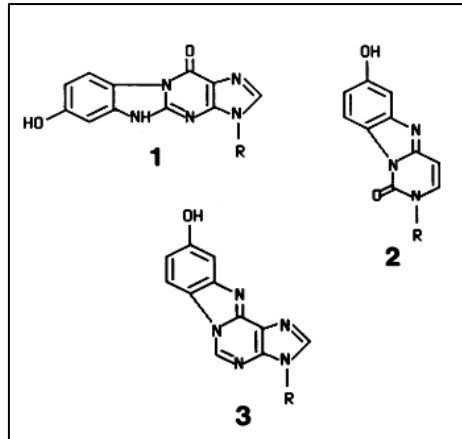


Figure 19: Structure de l'adduit à l'ADN formé par la p-benzoquinone [62]

Les principales voies de réparation de l'ADN telles que la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER) et la réparation par cassures double brin (DSB) sont impliquées dans l'élimination des lésions de l'ADN induites par le benzène, mais formation accrue d'adduits et aussi une mauvaise réparation des cellules progénitrices de la moelle osseuse rend la moelle osseuse vulnérable [63].

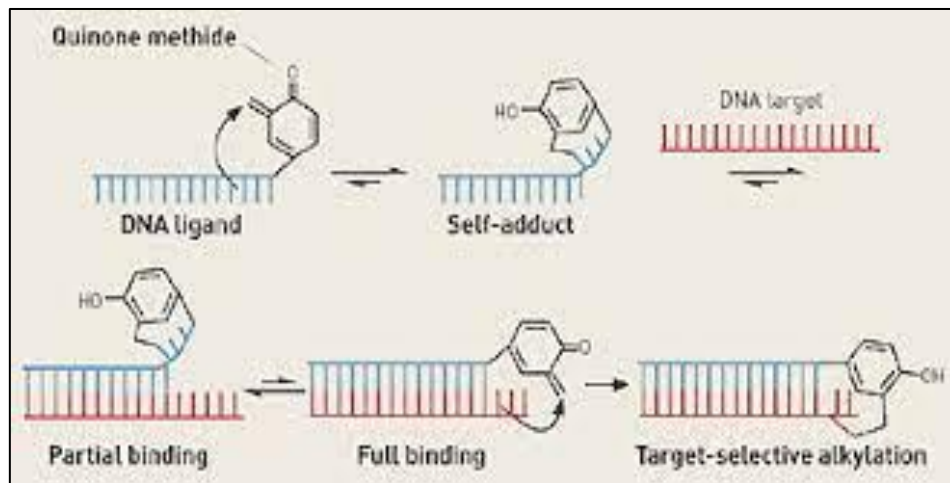


Figure 20: Alkylation de l'ADN par une quinone [36]

II.2.5. Mécanisme d'action non génotoxique

Un rôle pour le récepteur aryl-hydrocarbure (AhR) est également en train d'émerger dans l'hématotoxicité du benzène. AhR est connu principalement comme le médiateur de la toxicité de certains xénobiotiques, il joue un rôle important dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques. On a émis l'hypothèse que l'expression d'AhR est nécessaire au bon maintien de la quiescence dans ces cellules, et que la régulation négative d'AhR

est essentielle pour leur « échappement » à la quiescence et à la prolifération ultérieure. Il a été démontré que les souris AhR-knockout (KO) (AhR^{-/-}) ne présentent aucune hématotoxicité après exposition au benzène [25,30].

L'absence d'AhR élimine les cellules souches hématopoïétiques de leur état quiescent et les rend sensibles aux dommages à l'ADN dus à l'exposition au benzène et à la mort cellulaire ultérieure par apoptose [25].

II.2.6. Mécanisme de cancérogenèse

Le benzène doit être métabolisé pour devenir cancérigène, il y a de nombreuses preuves du rôle de l'étape clé de la formation de benzoquinone à partir de l'hydroquinone via la myéloperoxydase dans la moelle osseuse.

Mais cela est généralement insuffisant en tant qu'événement unique pour expliquer l'induction de la leucémie. La leucémie induite par le benzène commence probablement comme un événement mutagène dans la cellule souche ou la cellule progénitrice et l'instabilité génomique ultérieure permet d'acquérir suffisamment de mutations dans un laps de temps relativement court [25].

Différentes interprétations mécanistiques de la cancérogénicité du benzène ont été suggérées, telles qu'une synergie entre différents métabolites tels que le quinol et le muconaldéhyde, ou une synergie entre les métabolites du benzène et les radicaux hydroxyles qui appauvrissent le glutathion [64].

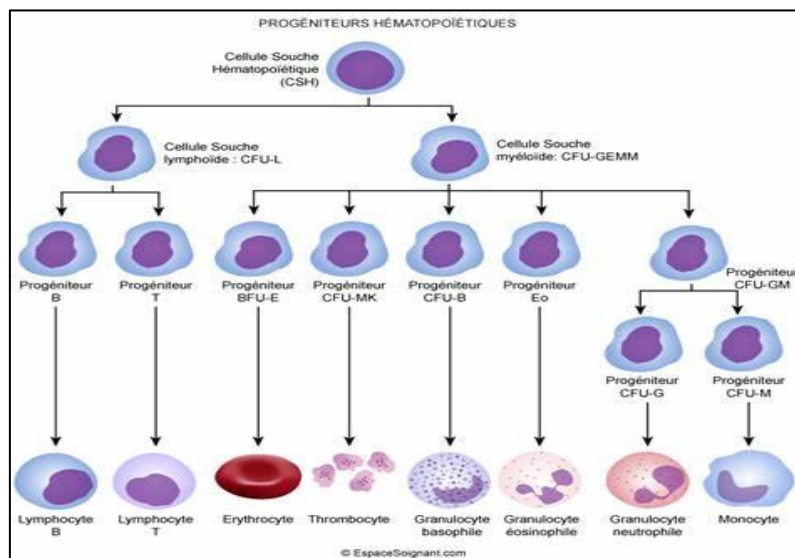


Figure 21: Types de cellules progénitrices produites dans la moelle osseuse [65]

II.2.6.1. Mécanisme des leucémies induites par le benzène

Dans sa monographie du benzène réactualisée, le CIRC détaille les mécanismes d'action génotoxique impliqués pour chaque type de leucémie.

Concernant la **leucémie aiguë myéloïde**, les deux mécanismes d'action majoritaires sont [60]:

- Des cassures au niveau du centromère, provoquant des aberrations chromosomiques dites déséquilibrées (perte de parties de chromosomes sur le bras long (q) ou de la totalité d'un chromosome (5q-/-5 ou 7q-/-7). Ce même type d'aberration est observé après les thérapies par des agents alkylants qui sont des composés génotoxiques directs sans seuil de dose ;
- L'inhibition des topoisomérase II, provoquant des aberrations chromosomiques dites équilibrées par des translocations ou inversions de chromosomes non homologues (t(21q22), t(15 ;17) et inv (16).

On pense généralement que l'exposition professionnelle au benzène provoque des leucémies similaires à diverses formes de LAM-T et de SMD-T (leucémie aiguë myéloïde liée au traitement et syndromes myélodysplasiques lié au traitement) [25,66].

La LAM et le SMD proviennent tous deux de cellules souches CD34+ génétiquement modifiées ou de cellules progénitrices dans la moelle osseuse et sont caractérisés par de nombreux types différents d'aberrations chromosomiques récurrentes.

Au moins trois catégories cytogénétiques de LAM et de SMD sont couramment observées :

- celles avec des aberrations déséquilibrées,
- avec des réarrangements équilibrés,
- et avec un caryotype normal.

Au sein de ces trois catégories cytogénétiques, il existe au moins huit voies génétiques différentes qui mènent au SMD et à la LAM.

Le deuxième type de leucémie causée par le benzène est la leucémie aiguë lymphoïde LAL, forme la plus courante chez l'enfant, la LAM étant moins fréquente à environ 15 % de l'incidence de la LAL.

L'inverse est vrai pour les adultes, où le ratio est inversé, la LAM étant prédominante. Les raisons de cette différence ont été suggérées comme étant des anomalies liées à l'âge dans la lymphopoïèse.

Il existe un lien entre l'exposition au benzène provenant de la pollution de l'air et la leucémie infantile. Ainsi, si le benzène devait induire une mutation oncogénique liée à la leucémie dans les jeunes cellules de la moelle osseuse, il pourrait produire soit une myéloprolifération qui se transformerait en LAM, soit une LAL à cellules B, alors que l'exposition chez un adulte n'aurait qu'une chance très limitée de produire une LAL.

Étant donné que l'action génotoxique des métabolites du benzène sur les cellules précurseurs pluripotentes de la moelle osseuse semble être de moeurs légères, produisant de multiples anomalies génétiques, il semble probable que l'exposition au benzène puisse déclencher à la fois la LAM et la LAL en provoquant les réarrangements chromosomiques et les mutations qui se trouvent sur la voie causale de ces tumeurs malignes [25].

Pour la LAL et la LAM chez l'enfant, il a été démontré que la maladie est généralement initiée in utero, car des translocations leucémiques et d'autres modifications génétiques ont été détectées dans des taches de sang prélevées à la naissance [66].

Ainsi, l'exposition de la mère au benzène pourrait être tout aussi importante que l'exposition de l'enfant dans la production de LAM et de LAL, comme l'ont suggéré plusieurs études épidémiologiques [25].

II.2.6.2. Mécanisme des lymphomes induits par le benzène

Il existe au moins deux mécanismes probables par lesquels l'exposition au benzène pourrait augmenter l'incidence du lymphome :

- En induisant des réarrangements chromosomiques associés au lymphome non hodgkinien (LNH),
- Et par l'immunosuppression conduisant à une diminution de l'immunosurveillance.

L'importance de l'immunosurveillance des lymphocytes T dans la prévention de la néoplasie des lymphocytes B est bien établie et est réalisée par des lymphocytes T cytotoxiques activées [25,38].

Les effets toxiques du benzène sur les lymphocytes T sont bien documentés et il semble y avoir un effet sélectif sur les lymphocytes T CD4+, ce qui entraîne une diminution du rapport CD4+/CD8+ [7,25].

Ce profil immunosuppresseur est semblable à l'apparition précoce du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et, bien qu'il ne soit pas aussi grave, il peut être associé à un risque accru de LNH.

Ainsi, le benzène, comme d'autres leucémogènes, y compris les agents alkylants, les inhibiteurs de la topoisomérase et les rayonnements ionisants, peut provoquer un LNH par une combinaison d'immunosuppression et d'induction de cassures double brin de l'ADN qui conduit à une recombinaison illégitime et à des réarrangements chromosomiques dans les cellules lymphoïdes [25].

II.2.7. Mécanismes de la dysfonction de la moelle osseuse

En résumé, le dysfonctionnement de la moelle osseuse peut commencer par un ou plusieurs métabolites réactifs du benzène, entraînant la formation d'adduits protéiques dans la moelle osseuse, activant une réponse immunitaire.

Le dysfonctionnement global de la moelle osseuse peut alors résulter d'une combinaison de cycles homéostatiques de prolifération après déplétion, d'immunosuppression et d'activation du système immunitaire (inflammation) [30].

Dans la figure suivante, Guo et al. (2021) proposent des mécanismes potentiels de la façon dont l'exposition au benzène peut favoriser la cancérogenèse sur la base des résultats des études examinées dans leur revue systématique [67].

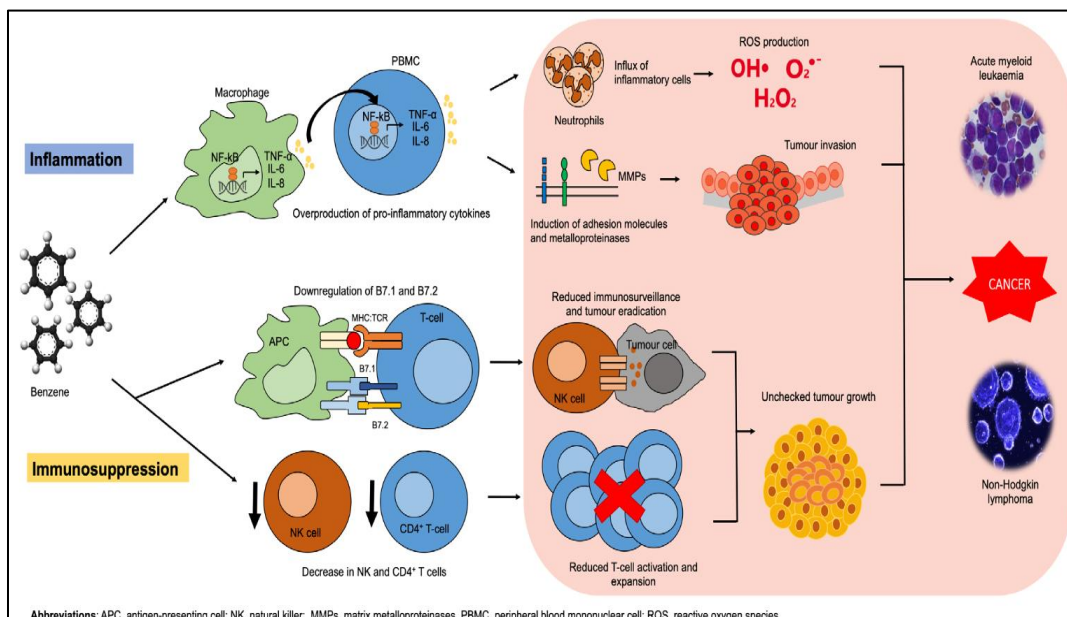


Figure 22: Proposition de mécanisme de cancérogenèse du benzène via l'inflammation chronique et l'immunosuppression [55]

Dans un environnement professionnel où il n'existe pas de mesures appropriées de gestion des risques, en particulier en cas de pics d'exposition élevés et répétés à un agent hématotoxique, il est plausible que des cycles répétés de déplétion de la MO se produisent [68].

Lorsque les cycles de déplétion et de prolifération des cellules souches hématopoïétiques (HSC) se déclenchent pour rétablir l'homéostasie, les cellules les plus prêtes à se diviser, les plus sensibles aux signaux de croissance et/ou capables d'échapper aux inhibiteurs de croissance trouvent des conditions favorables pour leur prolifération. Ces caractéristiques sont également des marqueurs du cancer. Par conséquent, chaque cycle de déplétion et de prolifération peut favoriser la sélection de cellules susceptibles de devenir pré-leucémiques ou des cellules souches leucémiques.

En effet, l'une des hypothèses les plus solides de la cancérogenèse est, que plus il y a de divisions de cellules souches, plus la probabilité de cancer est grande [68]. Le benzène supprime le cycle cellulaire par la surexpression médiée par p53 de p21, un inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines, ce qui entraîne non seulement la suppression de l'hémopoïèse, mais plutôt un changement dynamique de l'hémopoïèse pendant et après l'exposition au benzène [38].

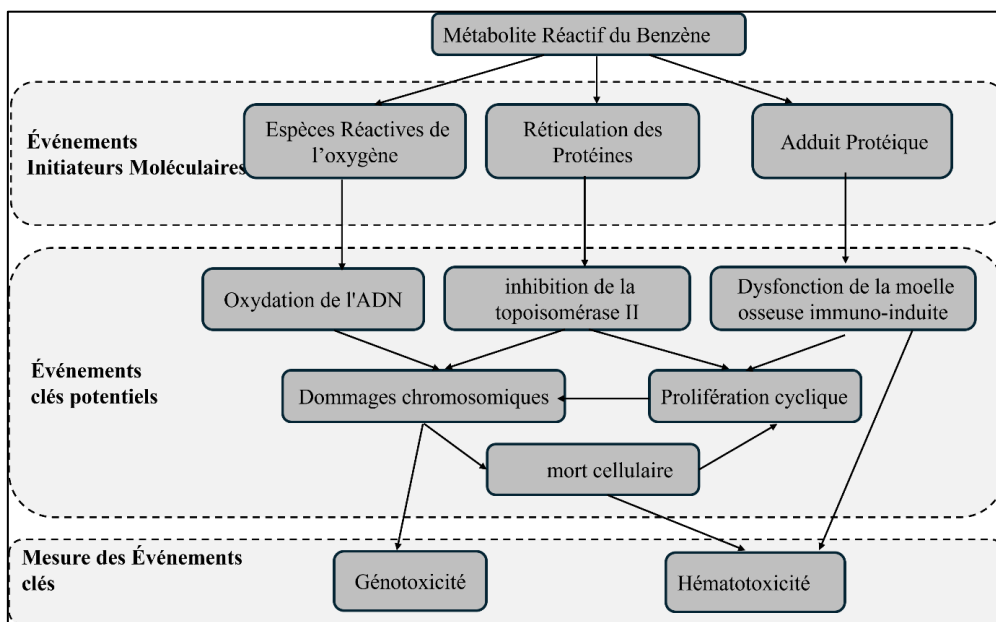


Figure 23: Relation entre les modes d'action potentiels du benzène et les événements clé

[26]

II.3. Effets toxiques chroniques de la faible exposition au benzène

Cette section s'intéresse uniquement aux effets chroniques mentionnés dans la littérature concernant la faible exposition au benzène. Aucun effet aigu n'est mentionné pour les expositions faibles.

La figure 24 récapitule les systèmes physiologiques concernés par la toxicité du benzène.

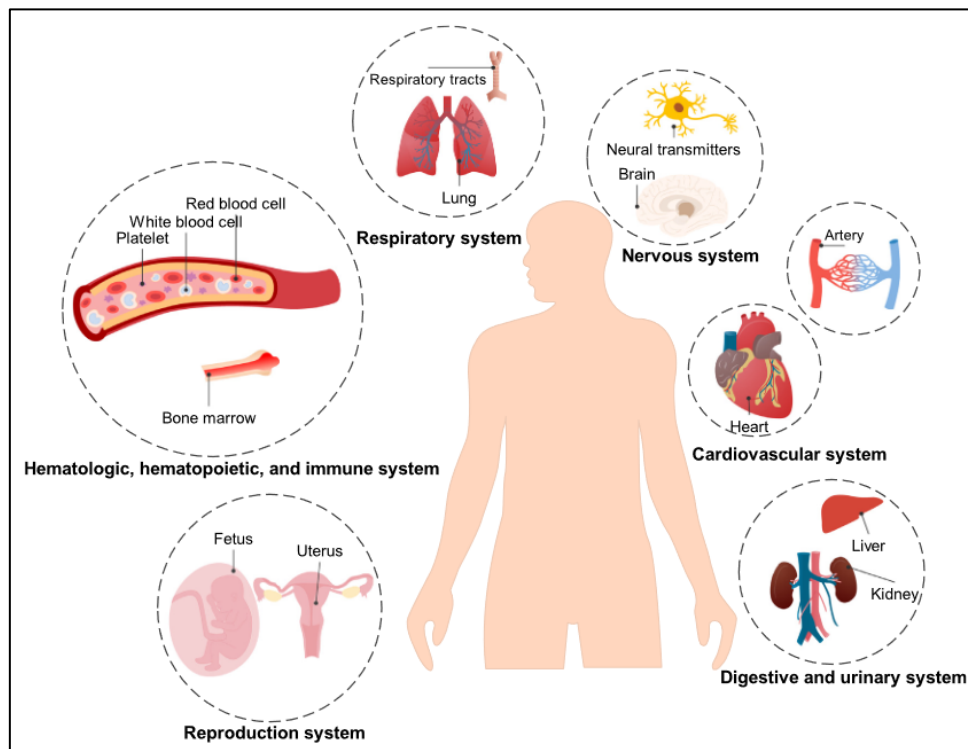


Figure 24: Systèmes physiologiques et organes susceptibles à l'action du benzène [69]

II.3.1. Effet sur le système hématopoïétique

La relation dose-réponse entre l'hématotoxicité du benzène et du benzène atmosphérique est supra-linéaire et la toxicité serait sous-estimée à de faibles expositions si un modèle dose-réponse linéaire est utilisé [70].

Les biomarqueurs précoces de l'exposition à des niveaux relativement faibles de benzène comprennent un nombre réduit d'un ou de plusieurs types de cellules sanguines circulantes [34].

Dans l'étude de Lan et al. 2004 en Chine, les sujets étaient divisés, selon le niveau d'exposition atmosphérique au benzène, en 4 groupes (groupe contrôle (<0,05ppm) et sujets exposés à < 1ppm, 1-10ppm, > 10 ppm) [71].

Le groupe exposé à moins de 1 ppm de benzène (100 sujets) a présenté une baisse dans tous les types des globules blancs ainsi que les plaquettes comparablement au groupe non exposé. Ces

résultats étaient valables même chez le sous-groupe de travailleurs non exposés à des solvants autres que le benzène <1 ppm (facteur confondant exclu).

L'hémoglobine était basse uniquement chez le groupe exposé à > 10 ppm.

Même une exposition à de faibles niveaux (p. ex., < 10 ppm) est associée à un dysfonctionnement de la moelle osseuse et à des altérations du nombre de cellules sanguines, y compris une diminution du nombre de globules blancs, de globules rouges et de plaquettes par rapport aux témoins [69].

Une baisse remarquable des cellules progénitrices supérieure à celles des globules blancs et de granulocytes différenciés, ce qui suggère que les cellules progénitrices précoces sont plus sensibles que les cellules matures aux effets hématotoxiques du benzène [71].

II.3.1.1. Lignée myéloïde

Tous les types de cellules myéloïdes (granulocytes, monocytes, globules rouges et plaquettes) ont été considérablement réduits chez les travailleurs exposés au benzène à des niveaux d'exposition <1 ppm dans l'étude de Bassig et al. 2016 [72].

La réduction de la formation de cellules progénitrices myéloïdes (CPM) (chez les ouvriers exposés au benzène peut refléter des effets biologiques précoces [72].

Les études cinétiques ont révélé que le cycle cellulaire des cellules progénitrices myéloïdes hémopoïétiques (granulocyte-macrophage unité formant colonie [CFU-GM]), plutôt que d'être stimulé, était supprimé par l'exposition au benzène [38].

II.3.1.2. Lignée lymphoïde

Dans une étude en 2016, l'exposition à moins de 1 ppm de benzène a été fortement associée à une baisse de 15% du nombre de GB ($p < 0,001$) chez les travailleurs exposés au benzène.

Des réductions du nombre total de lymphocytes ont été observées à tous les niveaux d'exposition pour les travailleurs exposés au benzène par rapport aux travailleurs non exposés, y compris une baisse de 8 % chez les travailleurs exposés à <1 par mois [72].

En revanche, d'autres n'ont pas détecté une telle diminution significative du nombre de cellules sanguines en appliquant l'approche de comparer les résultats de la FNS avec un intervalle de normes standards chez 387 travailleurs exposés à un taux moyen de benzène sur 8 heures de 0,53 ppm de benzène [34].

La dépression de la fonction de la moelle osseuse se produit en deux stades : l'hyperplasie (augmentation de la synthèse des éléments des cellules sanguines), suivie d'une hypoplasie (diminution de la synthèse).

II.3.2. Effet sur le système immunitaire

L'exposition au benzène a un impact sur le système immunitaire en modifiant les profils de cytokines, ce qui entraîne des altérations de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Par exemple, une diminution significative des niveaux d'interleukine 9 (IL-9), une cytokine cruciale pour réguler les types de cellules hématopoïétiques et favoriser la prolifération cellulaire [73].

L'exposition humaine au benzène à des concentrations atmosphériques allant de 3 à 96 mg/m³ induit une altération des réponses des anticorps et des leucocytes. L'exposition à long terme au benzène a été associée à des changements dans la morphologie de la moelle osseuse d'hypoplasique à hyperplasique, une réduction du nombre de lymphocytes, une macrocytose, une thrombocytopénie, une leucopénie, une pancytopénie et une diminution du nombre de lymphocytes [69].

Dans plusieurs études l'analyse des sous-ensembles lymphocytaires chez des pompistes a révélé une diminution significative des lymphocytes T CD4+, du rapport CD4+/CD8+ et des cellules NK et lymphocytes T mémoire et augmentations des biomarqueurs pro-inflammatoires à faible exposition [67,71,72,74].

L'immunosuppression pourrait contribuer à la susceptibilité face aux agents pathogènes envahissants, tels que *Helicobacter pylori* [75].

II.3.3. Effets sur le système nerveux

L'exposition au benzène et aux composés homologues dépassant les seuils réglementaires peut influencer les fonctions neurologiques du système nerveux central, notamment en affectant la structure cérébrale et les niveaux de neurotransmetteurs, ainsi que la coordination et l'activité locomotrice. Cette exposition peut altérer les fonctions neurocomportementales telles que l'anxiété, l'impulsivité et la dépression, tout en ayant un impact sur l'apprentissage et la mémoire, les systèmes sensoriels et la fonction nerveuse périphérique. Les mécanismes sous-jacents à ces effets comprennent la réduction du nombre de cellules, les modifications des niveaux de dopamine et de sérotonine, la perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire, l'interférence avec le transport axonal et l'accumulation de neurofilaments [69,76]

Les autres effets neurologiques du benzène comprennent les étourdissements, les nausées, les maux de tête et la perte de conscience. L'encéphalopathie aiguë, affectant le système sensoriel et la fonction nerveuse périphérique, peut causer des troubles de la vision, une perte permanente de l'ouïe ou de la vision, des pupilles dilatées et une paresthésie [69]

II.3.4. Effets sur le système respiratoire

Étant donné que l'inhalation représente la principale voie d'exposition au benzène, les poumons sont le principal site des effets. Les preuves épidémiologiques suggèrent que l'inhalation de benzène et de ses homologues peut entraîner des lésions des tissus pulmonaires, une irritation des voies respiratoires, une inflammation thoracique, une diminution de la fonction pulmonaire et contribuer à des affections pulmonaires telles que l'asthme. Plusieurs études indiquent que l'exposition est liée à des risques accrus de cancer du nasopharynx, du larynx et du poumon [69,77,78].

L'irritation aiguë des voies respiratoires est l'un des principaux résultats observés chez les humains et les animaux à la suite d'une exposition au benzène à des concentrations relativement faibles. Il a été indiqué que ces irritations peuvent être médiées, en partie, par l'élévation des prostaglandines induite par le benzène et le toluène dans les cellules épithéliales pulmonaires. Une étude récente en 2024, portant sur des populations résidant à proximité d'une usine chimique à charbon a révélé des taux plus élevés d'inflammation thoracique chez les adultes et une fonction pulmonaire réduite chez les enfants par rapport à une cohorte non exposée appariée [79].

D'autres études ont rapporté une association significative entre l'exposition domestique au benzène indiquée par le S-PMA urinaire, et l'asthme chez les enfants. Le rapport de cotes pour l'asthme serait huit fois plus élevé chez les enfants fortement exposés que chez les enfants faiblement exposés [69,79].

II.3.5. Effet cardiovasculaire

L'exposition à court terme au benzène ambiant a été associée à des arythmies cardiaques, à l'insuffisance cardiaque, l'exposition chronique a été incriminée dans la mortalité par l'infarctus du myocarde (IM) et à la mort coronarienne [80,81].

L'exposition individuelle et mixte au benzène est associée à l'insuffisance cardiaque congestive (ICC). Le benzène exacerbe l'insuffisance cardiaque en activant les cellules endothéliales et en

recrutant des neutrophiles, ce qui indique un mécanisme potentiel de toxicité cardiovasculaire induite par le benzène.

Une étude réalisée en 2017 sur des souris et chez 210 individus à la recherche d'une association entre l'exposition au benzène (dosage du t,t-MA urinaire) et le risque cardiovasculaire.

Chez les souris, l'inhalation du benzène a entraîné une réduction significative des niveaux de cellules antigéniques circulantes (Flk1+/Sca-1+) ainsi qu'une augmentation des niveaux de lipoprotéines de faible densité (LDL) dans le plasma [82].

Les niveaux de t,t-MA étaient plus élevés chez les sujets souffrant de dyslipidémies et associés au risque cardiovasculaire mesuré par le score de Framingham, cette association était indépendante du tabagisme. Le taux de t,t-MA est aussi associé au risque cardiovasculaire en utilisant Framingham score et cette association est indépendante du tabagisme.

L'exposition au benzène est associée à une élévation du risque cardiovasculaire et un déficit en cellules antigéniques circulantes chez les fumeurs et non-fumeurs [54].

L'exposition au benzène est fortement liée à divers cancers hématologiques, impliquer à la fois des cellules lymphoïdes et myéloïdes selon le sous-type.

II.3.6. Cancérogenèse

II.3.6.1. Cancers hématologiques

y compris différents types de leucémie tels que la leucémie myéloblastique aiguë (LMA), la leucémie aiguë non lymphoïde (ANLL), la leucémie lymphoïde aiguë (LAL), la leucémie non lymphoïde chronique (LNC), la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la leucémie myéloïde aiguë, la leucémie érythroïde chronique (LEC) et le lymphome non hodgkinien (LNH), qui englobe un large éventail de cancers du sang provenant du tissu lymphoïde et comprenant plus de 60 Types de cellules [69,72].

Dans une étude récente de Jin et al. 2024, le risque de leucémie dans les populations professionnelles exposées à de faibles niveaux de benzène évalué chez 98 travailleurs d'usines en Chine à l'aide du modèle LMS (Linéarisé à plusieurs étapes) basé sur le S-PMA et le tt-MA urinaires, était corrélé positivement avec l'augmentation de la concentration cumulative dans les quatre groupes d'exposition (< 3, 3 à 5, 5 à 12, ≥ 12 mg/m³/an, respectivement). les risques de leucémie en excès étaient de 4,34, 4,37, 4,44 et $5,52 \times 10^{-4}$, respectivement [83].

Il est suggéré que le risque de leucémie peut survenir à des concentrations cumulatives inférieures à 3 mg/m³ par an [83], et certaines données montrent que le benzène modifie les voies et les gènes liés à la maladie de manière dose-dépendante, avec des effets apparents à des doses aussi faibles que 100 ppb [84].

Les résultats d'une méta analyse réalisée en 2021 ont conclu d'une association statistiquement significative est conclue entre le benzène et le lymphome diffus à grandes cellules B, et entre le lymphome folliculaire et la leucémie à tricho-leucocytes [75].

II.3.6.2. Cancer du poumon

La principale préoccupation est que les dommages précoces aux poumons qui pourraient conduire au cancer ne sont pas détectables par le nombre d'hémogrammes [85].

Une revue systématique italienne réalisée en 2024 a examiné le lien potentiel entre l'exposition au benzène et le risque de cancer du poumon. L'estimation du risque de prévalence du cancer du poumon associée à l'exposition au benzène était de 1,20. Lorsque seules les études ajustées en fonction du tabagisme ont été sélectionnées, le risque de cancer du poumon a augmenté jusqu'à 34 [77].

II.3.6.3. Cancer colorectal

Dans une revue systématique récente en 2024 [86], une seule étude a soutenu l'apparition d'une relation dose-réponse entre l'exposition professionnelle au benzène et le cancer colorectal, tandis que d'autres n'ont trouvé aucune augmentation du risque en fonction de la dose d'exposition ou de la durée de l'emploi. Les résultats évoquent une association positive avec l'incidence.

II.3.6.4. Cancer de la tête et du cou

Une revue systématique récente de Godono et al. 2024, a rapporté une association borderline entre l'exposition professionnelle au benzène et l'incidence des cancers de la nuque et la tête, une augmentation significative du risque global chez les femmes et une augmentation significative du risque de cancers du nez et des sinus [87].

II.3.7. Système digestif et urinaire

Le système cytochrome P-450, en particulier le CYP2E1, est principalement impliqué dans le métabolisme du benzène dans le foie. À la suite d'une exposition environnementale, la plupart des métabolites du benzène sont excrétés dans l'urine dans les 48 heures.

Le foie est confronté à une exposition continue au stress oxydatif en raison de son rôle central dans la détoxification et le métabolisme. Les métabolites du benzène, tels que le trans,trans-muconaldéhyde, peuvent exacerber le stress oxydatif en déclenchant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et en réduisant considérablement les niveaux de glutathion hépatique (GSH) qui joue un rôle crucial dans les défenses antioxydantes cellulaires, protégeant les hépatocytes des dommages oxydatifs causés par les ERO et les radicaux libres. De plus, le GSH facilite les processus de détoxification par l'activité de la GST, aidant à la neutralisation des substances nocives pour l'excrétion ultérieure par la bile ou l'urine [69].

Une étude a conclu d'une augmentation significative des taux d'ALT et d'AST chez des pompistes par rapport au groupe contrôle, indiquant des changements dans la fonction hépatique qui peuvent être dus à l'inflammation [88].

II.3.8. Effet sur le système reproductif

En raison de sa lipophilie et sa capacité à traverser la barrière placentaire, une exposition prénatale élevée au benzène peut avoir un impact sur le développement du fœtus et du nourrisson. Dans une étude sur un nombre restreint de femmes exposées à un mélange de benzène, toluène et xylènes à des concentrations atmosphériques moyennes en benzène de 8,8 ppm [0,90 - 876,47], des modifications des taux de FSH et de métabolites oestrogéniques suggèrent une possible action de ces solvants sur l'axe hypothalamus-hypophysaire [69].

Pendant la grossesse, la concentration en benzène dans le sang du cordon chez le fœtus est au moins égale à celle de la mère exposée au produit. Aucun élément ne permet de conclure à une tératogénicité ou à une foetotoxicité. Quelques études suggèrent une fréquence accrue des avortements chez les femmes exposées au benzène [89].

II.3.9. Effets cutanés et allergies

L'exposition à long terme au benzène provoque des effets dermatologiques qui augmentent l'incidence des maladies de la peau, les maladies allergiques et fongiques étaient les problèmes les plus fréquemment diagnostiqués chez les travailleurs d'une pompe à essence [88].

II.3.10. Effet musculosquelettique

Un cas de myélofibrose a été diagnostiqué chez un pompiste suédois de 46 ans en octobre 1992, le patient a décrit des symptômes de douleurs musculaires croissantes pendant 1 an, de fatigue pendant 3 semaines, de sueurs nocturnes et de perte de poids. Une biopsie de la moelle osseuse a révélé une myélofibrose. La concentration moyenne sur 8H pour les pompistes a été estimée à <0,2 ppm et la norme professionnelle pour le benzène en Suède était de 0,5 ppm [34].

II.3.11. Classification des symptômes

Les symptômes indésirables liés à la toxicité du benzène ont été classés selon les niveaux de gravité des symptômes (non symptomatiques et niveaux de symptômes faibles, modérés, élevés et très élevés) conformément aux résultats précédents de toxicité du benzène [90,91].

Les symptômes ont été classés en cinq niveaux comme suit :

- (1) aucun symptôme avec reconnaissance de l'odorat (non symptomatique) ;
- (2) faible niveau de symptômes, qui sont l'épuisement, les maux de tête, les étourdissements, les yeux rouges/les yeux brûlants/les yeux qui démangent, la congestion nasale, le mal de gorge,

la suffocation, la toux, le nez qui coule, la peau sèche, la peau craquelée, les démangeaisons/éruptions cutanées rouges/cloques, l'anorexie et les palpitations ;

(3) niveau modéré de symptômes : engourdissement, dépression, confusion, vision floue, respiration insuffisante/anormale, douleur thoracique, nausées, vomissements, fatigue inhabituelle, faiblesse musculaire, crampe, scorbut et pétéchie ;

(4) un niveau élevé de symptômes, c'est-à-dire l'anémie/épilepsie, les tremblements, les convulsions et l'inconscience ;

(5) Et un niveau très élevé de symptômes caractérisés par une leucémie (uniquement spécifique au benzène).

Chapitre III :

Surveillance biotoxicologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

III.1. Implication de la baisse des limites d'exposition professionnelle dans le biomonitoring

Les premières limites d'exposition professionnelle au benzène étaient basées sur sa capacité à provoquer une dépression du système nerveux central et étaient similaires aux limites appliquées à d'autres solvants organiques ayant des propriétés narcotiques. Cependant, depuis qu'il a été reconnu que le benzène est un leucémogène humain, les limites d'exposition professionnelle n'ont cessé d'être abaissées [25].

Dans la plupart des pays, les VLEP se situent entre 0,5 et 1 ppm (comme VLEP sur 8 heures) depuis de nombreuses années. Récemment, en 2024, un certain nombre de rapports ont été publiés proposant une limite plus basse pour le benzène [73].

Le Conseil néerlandais de la santé a proposé une VLEP de 0,2 ppm, ce qui est presque identique à la valeur de 0,25 ppm qui a été proposée plus récemment à la suite d'un examen systématique approfondi de toutes les données humaines disponibles [3].

L'ECHA (European Chemical Agency) a proposé une valeur encore plus basse de 0,05 ppm sur la base des données humaines et animales combinées.

De l'avis du RAC (Committee for Risk Assessment), un seuil fondé sur le mode d'action pour les lésions chromosomiques (aneugénicité et clastogénicité) chez les travailleurs peut être utilisé pour établir une VLEP pour la cancérogénicité ; La limite ainsi calculée évitera les expositions qui induisent des lésions chromosomiques chez les travailleurs, est considérée comme n'ayant pas de risque résiduel significatif de cancer et évitera également d'autres effets indésirables [41].

La Commission européenne a examiné la proposition de l'ECHA ainsi qu'une analyse d'impact pour les valeurs proposées et a proposé à son tour au Parlement européen et au Conseil de l'UE d'accepter des valeurs VLEP plus basses pour le benzène dans le cadre d'une approche par étapes.

En 2022, la directive sur les agents cancérigènes et mutagènes (2004/37/CE) a en effet été modifiée de telle sorte que la VLEP existante de 1 ppm sera abaissée à 0,5 ppm à partir du 5 avril 2024, puis à 0,2 ppm à partir du 5 avril 2026 (CE 2022) [41].

Il est techniquement tout à fait possible de déterminer des concentrations de benzène dans l'air de 0,2 ppm et moins. Cependant, avec ces faibles valeurs, l'exposition cutanée devient

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

relativement plus importante et, dans de nombreux milieux de travail, peut l'emporter sur l'exposition par inhalation.

Pour évaluer l'exposition complète au benzène par toutes les voies, y compris cutanée, la biosurveillance humaine est sans aucun doute la meilleure option. Bien qu'une grande variété de techniques de biosurveillance humaine ait été mise au point, aucune d'entre elles n'a été correctement validée pour les valeurs proposées dans la plage de 0,05 à 0,25 ppm [41].

Il semblerait, d'après les données disponibles, que seuls le S-PMA urinaire, le benzène urinaire et le benzène dans le sang puissent être des biomarqueurs utiles pour évaluer l'exposition à ces niveaux. Étant donné que l'urine est l'échantillon privilégié pour la biosurveillance humaine en milieu de travail, la détermination du S-PMA est la meilleure option, car le benzène urinaire semble intrinsèquement moins fiable, ce qui peut être dû à la volatilité du benzène.

Un autre problème concernant la biosurveillance de l'exposition au benzène inférieure à 0,1 ppm est qu'il a été suggéré que le métabolisme du benzène serait non linéaire à ces faibles niveaux d'exposition [84,92]. Cette hypothèse d'un métabolisme oxydatif plus efficace à des concentrations inférieures à 0,1 ppm était fondée sur l'analyse d'une vaste base de données obtenue à partir d'une série d'études chez des travailleurs susceptibles d'être exposés à une large gamme de concentrations de benzène [71,93].

En fin de compte, il est fortement nécessaire de valider davantage le S-PMA urinaire en tant que biomarqueur de l'exposition au benzène à ces faibles concentrations (0,01 à 0,25 ppm) afin de permettre une vérification fiable de la conformité de l'exposition au benzène aux VLEP récemment proposées en suivant ces conditions [41] :

- Impliquer une main-d'œuvre importante (au moins quelques dizaines de personnes),
- Sans risque significatif d'exposition cutanée ;
- Pendant un certain nombre de jours consécutifs ;
- Des échantillons d'urine avant et après le quart de travail pour déterminer la S-PMA au moyen d'une méthode validée ;
- Les biomarqueurs humains devraient être couplées aux concentrations atmosphériques correspondantes et évaluées statistiquement.

III.2. Biomarqueurs d'exposition

L'exposition au benzène est régulièrement évaluée par surveillance biologique depuis les années 1960. Au fil du temps, un grand nombre d'approches ont été développées et appliquées. Théoriquement, le benzène lui-même peut être déterminé comme un biomarqueur dans l'air expiré, le sang ou l'urine et, alternativement, l'un de ses métabolites peut être mesuré comme un biomarqueur dans l'urine [12].

III.2.1. Biomarqueurs d'exposition dans l'air expiré

Le benzène est un composé très volatil et, lors de l'inhalation, environ la moitié de la quantité inhalée sera retenue. Le benzène absorbé, par quelque voie, sera partiellement expiré.

Étant donné que les techniques d'analyse utilisées pour détecter le benzène dans l'haleine expirée sont très sensibles, le benzène expiré peut être mesuré de manière fiable après de faibles niveaux d'exposition au benzène.

Les concentrations de benzène dans l'air expiré étaient généralement très bien corrélées avec les concentrations sanguines de benzène, comme prévu, mais aussi avec les concentrations urinaires de benzène, la méthodologie était également suffisamment sensible pour faire la différence entre les fumeurs et les non-fumeurs [94].

Plusieurs facteurs limitent l'utilisation de ce biomarqueur comme tel, en l'occurrence, l'absence de corrélation cohérente entre les concentrations de benzène dans l'air et dans l'air expiré, ce qui peut être dû principalement aux difficultés d'échantillonnage ainsi qu'aux contaminations et à l'absence de normalisation.

Un autre facteur peut être la très courte demi-vie apparente du benzène expiré et, en effet, les mesures du benzène dans les mesures de l'air alvéolaire après le poste étaient raisonnablement corrélées avec les mesures de la VLME sur 4 heures, mais pas sur les mesures de la VLME sur 8 h. Par conséquent, aucune valeur limite biologique officielle n'a été proposée pour le benzène dans l'air expiré [12].

III.2.2. Biomarqueurs d'exposition dans le sang

III.2.2.1. Benzène sanguin

De bonnes corrélations ont généralement été trouvées entre les concentrations dans l'air ambiant et les concentrations de benzène dans le sang. Une raison possible de la variation entre les études peut être que la demi-vie biologique du benzène dans le sang est de l'ordre de quelques minutes et, par conséquent, les expositions transitoires peuvent facilement passer inaperçues.

Divers modèles cinétiques physiologiques ont été mis au point pour le benzène chez l'humain et ont permis d'établir des valeurs équivalentes de surveillance biologique pour le benzène, ce qui peut être utile pour l'interprétation des résultats de la biosurveillance.

Autant il y a des valeurs d'imprégnation de la population générale estimées à 0,08 µg/L chez les non-fumeurs et 0,6 µg/L chez les fumeurs [95], néanmoins, le benzène dans le sang n'est pas largement utilisé comme biomarqueur de l'exposition au benzène, car le prélèvement sanguin est une méthode invasive, ce qui soulève divers problèmes éthiques et médicaux [96] et les valeurs EKA pour le benzène dans le sang ont été abandonnées à partir de 2013 [12].

Un biomarqueur d'exposition peut être, le toxique même, ses métabolites ou sa liaison à une molécule cible, outre la mesure du benzène lui-même, le sang a également été étudié comme échantillon pour l'analyse des adduits protéiques des métabolites du benzène.

III.2.2.2. Adduits aux protéines

Le principal métabolite oxydatif est l'oxyde de benzène, qui est très réactif et peut se lier aux résidus de cystéine sulfhydryle et aux résidus de valine N-terminaux dans les protéines analysés par à l'aide de la spectrométrie de masse à dilution isotopique et GC-MS respectivement.

La S-phénylcystéine a effectivement pu être détectée à la fois dans l'hémoglobine et l'albumine des personnes exposées à une moyenne de 23 cm³/m³ et chez des animaux de laboratoire. L'oxyde de benzène est instable et se réorganise rapidement en phénol qui peut être oxydé en 1,2- et 1,4-benzoquinone qui peut également se lier aux résidus de cystéine dans l'hémoglobine et l'albumine chez l'humain [12].

Il s'est toutefois avéré que les niveaux d'adduits n'étaient pas bien corrélés avec les niveaux d'exposition dans l'air. Cela peut être dû à leur instabilité et est probablement aussi influencé par les concentrations relativement élevées de phénol et d'hydroquinones dans l'alimentation chez l'homme.

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

À l'heure actuelle, il semble que ces méthodes ne soient pas applicables à la surveillance biologique de routine en raison de la méthodologie sophistiquée qu'elle implique et de sa sensibilité limitée [32].

III.2.2.3. Adduits à l'ADN

Les adduits à l'ADN peuvent être considérés comme biomarqueurs d'exposition, car ils répondent à leur définition dans le sens de « liaison du toxique ou métabolite à la cible ».

Les matrices biologiques utilisées comme source d'ADN sont souvent le sang, les cellules buccales, les cellules retrouvées dans l'urine. Aujourd'hui, une bonne corrélation a pu être établie entre la présence d'adduits et l'exposition à des cancérogènes comme le benzène, même si des précautions d'usage dans l'analyse sont nécessaires (recherche de facteurs confondants, capacité métabolique individuelle, polymorphisme [36,61].

Les cellules contenant une activité peroxydase, comme les neutrophiles, seraient le type de cellule approprié pour chercher les adduits à l'ADN, plutôt que les lymphocytes, qui ne contiennent pas d'activité peroxydase [62] (Voir partie biomarqueurs de génotoxicité).

III.2.3. Biomarqueurs d'exposition dans les urines

Étant donné que la collecte de l'urine est non invasive et relativement facile à réaliser, l'urine est dans la plupart des cas l'échantillon de choix pour la biosurveillance humaine et plusieurs méthodes ont été développées pour les biomarqueurs urinaires de l'exposition au benzène.

III.2.3.1. Benzène urinaire

Le benzène urinaire, comme dans le sang, relativement facile à mesurer d'un point de vue bio-analytique, mais présente un avantage sur ce dernier car les concentrations dans l'urine reflètent essentiellement l'exposition depuis le dernier vide, par conséquent, il reflète mieux les expositions (transitoires) au benzène pendant la journée de travail que le benzène dans le sang.

Néanmoins, le benzène urinaire présente les mêmes inconvénients que les autres biomarqueurs qui mesurent directement le benzène : la volatilité inhérente du benzène le rend sujet à l'évaporation et il existe un risque de contamination par le benzène sur le lieu de travail pendant la collecte.

Plusieurs études ont trouvé des corrélations raisonnablement bonnes entre le benzène urinaire et le benzène dans l'air supérieur à 0,2 ppm (0,65 mg/m³) [41]. Les données disponibles sont limitées pour les expositions inférieures à 0,2 ppm [16,97].

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Cependant, entre les études, les corrélations différaient d'un ordre de grandeur et rendaient impossible l'obtention d'une valeur biologique de référence fiable.

Il existe des valeurs EKA de 0,48 et 0,83 mg/L correspondant à 0,1 et 0,2 mg/m³ (sur 8 h) de benzène (c.-à-d. 0,03 et 0,06 ppm) [98]. Et une valeur d'imprégnation de la population générale de 300 ng/L [41].

Les valeurs calculées varient selon que la corrélation entre le benzène urinaire et le tt-MA ou entre le benzène urinaire et le S-PMA est utilisée, ainsi que selon l'application ou non d'une correction de la créatinine.

III.2.3.2. Phénols urinaires

Les phénols urinaires ont longtemps pu être déterminés par des méthodes colorimétriques, et le phénol urinaire total a été le premier biomarqueur urinaire de l'exposition au benzène, introduit dans les années 1950. Des méthodes chromatographiques ont été mises au point et introduites en milieu de travail comme mesure de contrôle dès 1963 [41].

Même si les personnes non exposées peuvent présenter des concentrations de fond importantes de phénol urinaire. Ce contexte est dû à l'apport alimentaire de phénols et est intrinsèquement très variable et généralement inférieur à 10 mg/L, mais jamais supérieur à 20 mg/L.

Sur la base d'une VLE de 10 ppm, l'ACGIH a proposé un indice d'exposition biologique (IBE) de 50 mg/g de créatinine dans les échantillons d'urine prélevés à la fin du poste.

Cependant, lorsque les VLEP sont inférieures à environ 1 ppm, le phénol n'est plus fiable en tant que biomarqueur de l'exposition.

III.2.3.3. L'acide trans,trans-muconique urinaire (t,t-MA)

Le t,t-MA est un métabolite relativement mineur du benzène, représentant environ 5 % de la dose absorbée. Relativement facile à mesurer, il a rapidement gagné en popularité en tant que biomarqueur de l'exposition au benzène.

Il a été constaté que les concentrations urinaires de t,t-MA dans les échantillons prélevés en fin de quart de travail correspondaient bien aux concentrations de benzène dans l'air (sous forme de VLEP sur 8 h) et qu'une valeur limite biologique de 2 mg/L ou de 1,7 mg/g de créatinine correspondait à une exposition à 1 ppm (VLEP sur 8 h) de benzène [41].

Cependant, il a également été constaté qu'à des concentrations de benzène inférieures à 0,5 ppm, le t,t-MA perd sa spécificité car certains ingrédients alimentaires, tels que l'acide sorbique qui

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

est utilisé comme conservateur, peuvent être métabolisés en t,t-MA, ce qui le rend moins approprié comme biomarqueur à des niveaux de benzène plus faibles [99].

De plus, sa demi-vie relativement courte d'environ 5 h le rend moins adapté pour détecter des expositions intermittentes que les métabolites à vie plus longue comme le S-PMA [12].

Dans la population générale, le 95^{ème} percentile pour le t,t-MA urinaire chez des non-fumeurs est d'environ 150 µg /g de créatinine [95], mais des valeurs urinaires aussi élevées que 700 µg/g de créatinine ont été signalées après une exposition alimentaire à l'acide sorbique [12].

Par conséquent, il n'est pas surprenant que les études menées pour évaluer la corrélation entre le t,t-MA urinaire et les faibles concentrations de benzène dans l'air (<0,3 ppm) ne montrent pas de corrélation claire [12], bien que de bonnes corrélations entre le t,t-MA et le S-PMA soient trouvées pour une large gamme de concentrations de benzène atmosphérique, moins de 0,1 ppm à bien au-dessus de 1 ppm.

III.2.3.4. Acide S-phényl mercapturique urinaire (S-PMA)

C'est un métabolite mineur du benzène, représentant 0,11 % de la dose absorbée et a été introduit comme biomarqueur urinaire de l'exposition au benzène au début des années 1990 [12]. La méthodologie analytique originale pour sa détermination (méthylation suivie de GC-MS) était assez compliquée et un certain nombre de méthodes ELISA ont été mises au point [100].

Par conséquent, la méthodologie a été améliorée par l'introduction du S-PMA perdeutéié (d5-S-PMA) comme étalon interne en chromatographie liquide à spectrométrie de masse en tandem, ce qui a augmenté la précision et permis la quantification jusqu'à environ 0,3 mg/m³ (0,1 ppm, VLEP sur 8 h).

En 1995, l'ACGIH a proposé un IBE pour le S-PMA urinaire de 45 µg/g de créatinine, correspondant à la VLE de 1 ppm [12]. Ensuite l'IBE a été abaissé à 25 µg/g de créatinine lorsque la VLEP a été abaissée à 0,5 ppm.

Malgré le fait que les niveaux de biomarqueurs pour les VLEP proposées de 0,25 ppm et moins n'ont pas été correctement validés, l'ECHA a publié une valeur de 2 µg/g de créatinine pour le S-PMA correspondant à la VLEP proposée de 0,05 ppm [101].

Lorsque l'exposition au benzène est < 0,5 ppm, le tabagisme est le facteur de confusion principal pour le benzène et le S-PMA urinaires, ils sont directement corrélés au nombre de cigarettes fumées et au délai écoulé depuis la dernière cigarette [41].

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Le S-PMA a été appliqué dans plusieurs études comme biomarqueur de l'exposition à de faibles niveaux de benzène [18,28,100,102].

La DFG a établi une corrélation entre l'exposition à de faibles concentrations de benzène et le S-PMA urinaire, d'après les études de Manini et al. 2008, Carrieri et al. 2010, Angelini et al. 2011 et Mansi et al. 2012 [16,18,41,103].

Pour les concentrations plus élevées de benzène dans l'air ($0,5 \text{ mg/m}^3$), la DFG a utilisé l'étude de Van Sittert et al. (1993) [41].

Il s'agit de la première étude qui a validé la corrélation entre les concentrations de benzène en suspension dans l'air et le S-PMA urinaire en combinant les données de 12 études menées dans 6 pays auprès de 333 travailleurs et de 48 témoins. Une bonne corrélation entre le benzène en suspension dans l'air et le S-PMA urinaire a été trouvée et cette corrélation a été appliquée par la DFG pour calculer leurs valeurs EKA.

La nouvelle droite de régression pour le S-PMA par rapport au benzène en suspension dans l'air est donnée par la formule suivante [41]:

$$\text{[Benzène atmosphérique] (mg/m}^3\text{, VLEP 8-h)} = 0,0758 \times \text{[S-PMA] urinaire (}\mu\text{g/g créatinine)} - 0,317 \text{ (r = 0,968).}$$

À l'aide de la « nouvelle » droite de régression, qui n'est pas validée pour une concentration dans l'air inférieure à $0,3 \text{ mg/m}^3$ ($0,1 \text{ ppm}$, VLEP sur 8 h), on calcule des valeurs de 5,5 et $6,8 \mu\text{g/g}$ de créatinine. Ces valeurs semblent relativement élevées au vu des résultats des études portant sur de faibles concentrations dans l'air [41].

La conclusion générale est qu'il est fortement nécessaire d'évaluer de manière fiable les corrélations entre les faibles concentrations de benzène dans l'air et le S-PMA urinaire.

III.2.3.5. Catechol, quinol et benzenetriol dans les urines

Le catéchol et le quinol ont été observés dans l'urine de personnes exposées et non exposées, et l'analyse des deux n'a pas permis d'identifier les personnes exposées à des concentrations de benzène inférieures à $10 \text{ cm}^3/\text{m}^3$. Le benzénétriol urinaire représentait environ 0,5 % de la quantité de benzène inhalée ; L'exposition simultanée au toluène a fortement diminué cette proportion. Jusqu'à présent, les données sont trop maigres pour l'application systématique de l'analyse du benzénétriol dans l'urine dans la surveillance biologique du benzène [32].

III.2.4. Interprétation des données des biomarqueurs d'exposition

L'interprétation des données de biosurveillance humaine est souvent moins simple que ne le suggère une simple comparaison avec une valeur limite.

En fonction du biomarqueur utilisé, une série de facteurs doivent être pris en compte. La spécificité et la sensibilité sont des facteurs importants, en particulier à de faibles niveaux d'exposition ambiante. En ce qui concerne la spécificité, comme indiqué, plusieurs des biomarqueurs ont des niveaux de fond confondants, ce qui les rend peu fiables pour confirmer une exposition en dessous de certains niveaux.

L'exception serait le benzène lui-même, mesuré dans le sang ou l'urine.

À l'aide de modèles PBK (Physiologically Based Kinetic models), il est possible de calculer l'équivalent de biosurveillance (EB, c'est-à-dire la concentration d'une substance chimique ou de son métabolite dans un milieu biologique qui est conforme à une recommandation d'exposition existante fondée sur la santé. Pour le benzène, les valeurs EB ont été calculées pour le benzène sanguin et urinaire [41]. Cependant, ces valeurs EB supposent une concentration d'exposition stable et continue et ne refléteraient pas une exposition transitoire ou intermittente.

La figure 21 illustre l'applicabilité de plusieurs biomarqueurs à différentes concentrations dans l'air. Le phénol urinaire et le tt-MA sont tous deux limités en tant que biomarqueurs de l'exposition au benzène en raison du bruit de fond potentiel qui peut être causé par les denrées alimentaires. Pour le S-PMA aucune concentration de fond n'a été observée qui pourrait fausser l'interprétation. Cela fait du S-PMA le biomarqueur de choix pour évaluer l'exposition au benzène.

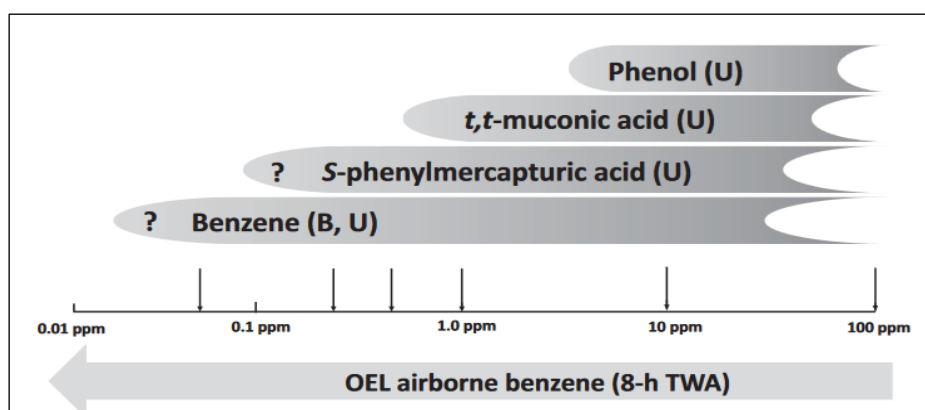


Figure 25: Applicabilité des biomarqueurs d'exposition selon la baisse des limites d'exposition professionnelle [41]

OEL : Occupational Exposure Limits TWA : Time Weighted Average [12]

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Aujourd'hui, le t,t-MA n'est utilisé comme biomarqueur qu'à un niveau d'exposition supérieur à 1 ppm (3,2 mg/m³). Des études comparatives ont montré que la S-PMA convient à des expositions au benzène allant jusqu'à 0,3 ppm (0,96 mg/m³) ou même 0,1 ppm (0,32 mg/m³) [104].

Le S-PMA dans les échantillons ponctuels, prélevés à la fin du quart de travail, peut être interprétée en termes de conformité aux VLEP de 0,25 ppm et plus. En ce qui concerne la conformité, il convient de garder à l'esprit que les VLEP ont été calculées pour refléter les expositions de 8 heures pendant 5 jours par semaine durant la vie active (40 ans).

Par conséquent, le dépassement occasionnel des valeurs VLEP fondées sur la santé n'implique pas nécessairement un risque accru de cancers hématologiques, car ceux-ci sont associés à des expositions cumulatives sur une plus longue période (CIRC 2018) d'où l'intérêt de tracer un profil d'exposition [41].

III.3. Biomarqueurs d'effet précoce

De nombreux biomarqueurs précoces d'altérations génétiques, hématologiques, rénales, hépatiques et immunologiques, causées par de faibles niveaux d'exposition professionnelle au benzène ont été proposés par plusieurs études [7].

III.3.1. Biomarqueurs de l'effet hématotoxique

À des niveaux d'exposition élevés et prolongés (>30 ppm), le benzène peut provoquer des effets hématologiques. Cependant, il existe des preuves contradictoires sur les effets hématologiques potentiels à des concentrations plus faibles [105]. Le fait que l'effet sur certains éléments sanguins soient plus sensibles au benzène reste incertain [106].

Les valeurs de la formule sanguine complète (FSC) peuvent servir d'outil utile pour la surveillance biologique des travailleurs exposés à de faibles concentrations de benzène (< 1 ppm) [71,107,108].

Une fraction des cellules progénitrices hématopoïétiques circule dans la circulation sanguine en équilibre dynamique avec la moelle osseuse et peut être cultivée dans des essais de formation de colonies pour mesurer leur potentiel prolifératif [71], des diminutions dose-dépendantes très significatives de la formation de colonies à partir de cellules progénitrices ont été observées dans l'étude de Lan et al., ce qui suggère que les cellules progénitrices précoces sont plus sensibles que les cellules matures [71].

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Les principaux changements hématologiques de l'intoxication au benzène comprennent la leucocytose persistante, l'hypertrophie corpusculaire moyenne (macrocytose), l'éosinophilie, la diminution du nombre absolu de lymphocytes (lymphopénie ou lymphocytopénie), les changements neutrophiles : pointillés basophiles, hyposegmentation des neutrophiles (pseudo-Pelger), présence de macroplaquettes et leucopénie associée à d'autres cytopénies (thrombocytopénie) [109].

Quand certaines études, à l'instar de Pesatori et al. (2009), Swaen et al. (2010) et Koh et al. (2015) n'ont pas trouvé d'association entre l'exposition faible au benzène et la baisse des paramètres de la FNS [105,110,111], d'autres ont prouvé que les concentrations d'hémoglobine n'ont diminué que chez les travailleurs exposés à des doses de ≥ 10 ppm [71,106].

Plusieurs études ont rapporté une association négative significative des globules blancs, plaquettes, neutrophiles segmentés, les basophiles [110], lymphocytes et des monocytes avec l'exposition à de faibles niveaux de benzène jusqu'à $< 0,25$ ppm chez les travailleurs masculins (policiers, pompistes, motocyclistes) [71,112,113]. Les rapports sur les anomalies hématologiques des travailleurs exposés à de faibles niveaux différaient les uns des autres [107].

Les paramètres les plus sensibles au benzène semblaient être les neutrophiles et le volume plaquettaire moyen (MPV) [106,112] et les lymphocytes [109].

L'exposition au toluène est un facteur de confusion potentiel pour certains effets sanguins périphériques, d'où la nécessité d'examiner les niveaux des deux composés dans l'environnement professionnel. (lymphocytes, neutrophiles et monocytes) [106].

III.3.2. Biomarqueurs de modification épigénétique

Les modifications épigénétiques représentent des biomarqueurs et des empreintes digitales d'exposition plus stables que l'expression modifiée de gènes ou de protéines [43].

III.3.2.1. Méthylation de l'ADN

Les gènes cibles sélectionnés pour la mesure de la méthylation sont généralement importants pour le contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN et sont liés au métabolisme de détoxification. Deux gènes de deux protéines suppressives de tumeurs clés (p14 ARF et p16 INK4A), ont été trouvés hyperméthylés dans les cellules sanguines mononucléées chez les travailleurs des stations-service brésiliennes [56].

Des études ont rapporté que l'hyperméthylation dans le gène p15 et l'hypométhylation à l'échelle du génome évaluée par LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element-1) étaient associées à de

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

très faibles expositions au benzène (~22 ppb), chez des pompistes, bien que les effets correspondants sur la méthylation aient été très faibles [114,115].

Après excision de bases, des composés de méthylation de la cytosine peuvent aussi se retrouver dans les urines.

La méthode classique de séquençage par PCR utilise le bisulfite pour cribler les modifications de l'ADN dont la 5-méthyl-cytosine (5-MC) et la 5-hydroxyméthyl-cytosine (5-HMC) [48].

Des méthodes modernes essaient de se passer du bisulfite qui dégrade la majorité de l'ADN et génère des bibliothèques de séquences très limitées ; on peut citer la méthode TAPS (TET-Assisted Pyridine-borate Sequencing) qui combine l'oxydation par TET des 5-MeCyto et 5OHMeCyto en 5-carboxyl-cytosine avec la réduction en dihydrouracile (DHU) de ce dernier composé par l'association pyridine-borate, sans affecter les cytosines non modifiées, puis une PCR convertit la DHU en thymine, permettant une transition C T [48]. Ils peuvent également être détectés par UPLC-MS/MS [9,116].

Selon Lovreglio et al. (2020), l'exposition professionnelle à de faibles concentrations de benzène semble être liée à l'augmentation urinaire de la 5-méthyl-cytosine qui pourrait être un biomarqueur possible pour évaluer les changements de l'état de méthylation des acides nucléiques [9].

III.3.2.2. miRNA

Dans le cadre d'une étude pilote, des micro-réseaux de miARN humains, contenant des sondes pour 470 miARN humains et 64 miARN viraux humains, ont été utilisés pour analyser l'expression différentielle des miARN dans l'ARN total dans les cellules sanguines périphériques de sept paires appariées témoins-exposées [43].

L'analyse préliminaire a montré une régulation positive de quatre miARN (miR-154* ; miR-487a ; miR-493-3p ; et miR-668) par l'exposition au benzène.

Une régulation à la hausse de l'expression de miR-154*, peut-être par une modification de l'état de méthylation et d'acétylation de la région 14q32, a été rapportée chez des patients atteints de leucémie promyéloïde aiguë portant la translocation t(15 ; 17) [48].

Bien que ces deux études soient relativement petites et que les données soient très préliminaires, les résultats suggèrent d'autres études pour examiner les effets épigénétiques du benzène sur la méthylation du promoteur spécifique du gène et l'expression des miARN [43].

III.3.3. Biomarqueurs de l'effet génotoxique

Ils permettent d'évaluer le danger, et par extension le risque, encourus par les salariés exposés à des substances ou mélanges de substances CMR.

Même si les résultats sont obtenus pour chaque individu, l'analyse de ces résultats doit se faire à l'échelle des groupes d'exposition caractérisés. Une analyse et une restitution pour chaque individu n'apparaissent pas recommandées, en raison de la sensibilité de ces tests aux facteurs confondants, susceptibilités individuelles, mécanismes de cassures et réparations endogènes qui génèrent un « bruit de fond » pouvant conduire à une mauvaise imputation des effets [117].

L'objectif de ces techniques n'est pas de mettre en évidence des cellules cancéreuses, mais de rechercher, dans des cellules normales, des atteintes de l'ADN pouvant conduire à des mutations qui, à long terme, pourraient induire des cancers [117].

III.3.3.1. Tests pour la détection des cassures de l'ADN

- **Test des comètes**

C'est un test très répandu en analyse toxicologique basé sur l'électrophorèse en gel sur cellule unique (SCGE pour Single-Cell Gel Electrophoresis) ; il permet de détecter des cassures dans les brins d'ADN de cellules individuelles, l'adjonction d'un agent alcalin qui permet de détecter également les cassures simple brin et les sites alcali-labiles.

La technique peut être améliorée en utilisant une enzyme qui reconnaît un type de dommage à l'ADN, par exemple, un dommage par oxydation des bases de l'ADN, l'exemple d'une glycosidase associée à la formamidopyrimidine [48].

Les fragments clivés de l'ADN donnent la queue de la comète, l'ADN intact restant sous une forme compacte [117].

Le test nécessite l'obtention de cellules nucléées ou de leurs noyaux intacts. On l'utilise principalement en biosurveillance humaine à partir de prélèvements sanguins (lymphocytes), de cellules buccales ou de sperme. Mais les cellules sanguines restent le matériel de choix dans ce type d'étude car elles donnent l'avantage d'être traitées immédiatement ou congelées [117]. Moro et al. (2019) l'ont utilisé pour démontrer que l'exposition au benzène a des effets génotoxiques sur des personnels de station d'essence [7].

En général, une lumière tamisée est utilisée pour éviter des dommages supplémentaires à l'ADN. Au total, une centaine de cellules sont examinées au hasard au microscope fluorescent

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

afin de renforcer le traitement statistique, et l'étendue des dommages à l'ADN sont mesurée à l'aide d'une analyse logicielle d'images électroniques. Les dommages à l'ADN sont quantifiés en % d'ADN dans la queue (TI), la longueur de la queue (TL), le moment de la queue (TM) et le nombre de cellules avec la comète [100].

C'est un test rapide, relativement simple à mettre en œuvre et peu coûteux, peut mettre en évidence des relations dose-effet. Il est relativement sensible, mais n'est pas spécifique d'un agent. Cette technique nécessite d'être complétée par la recherche de marqueurs d'exposition et certains facteurs comme le tabac doivent être pris en compte [48,117].

- **Test de phosphorylation de la protéine γ H2AX**

La γ H2AX est une protéine histone, distribuée de façon ubiquitaire sur tout le génome qui participe à la réparation de l'ADN en se liant à proximité des cassures double brin où elle est rapidement phosphorylée. Ainsi, le nombre de foyers de γ H2AX phosphorylés est corrélé au nombre de cassures double brin de l'ADN ; leur comptage permet donc de déterminer le nombre de cassures double brin de l'ADN.

Cette technique consiste à placer les cellules préalablement préparées en présence d'un anticorps spécifiquement dirigé contre la forme phosphorylée de γ H2AX et de le coupler ensuite avec un anticorps secondaire fluorescent afin de pouvoir dénombrer les foyers. Ainsi, l'analyse peut se faire par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux (détection du marquage par passage d'un flux de cellules isolées devant un laser). Dans le cas de la biométrie, un prélèvement sanguin est préférable, même si théoriquement tout type de cellules nucléées peut être utilisé, elle est plus rapide que le test des comètes [48,117].

La technique n'est pas encore pleinement utilisée car en plus de la grande variabilité, la réparation des cassures double brin est un processus cellulaire dynamique et complexe ; en effet la présence de γ H2AX apparaît rapidement (30 min) après l'apparition des cassures, mais une grande partie disparaît presque aussi rapidement, ce qui rend le dénombrement des foyers délicat et incertain compte tenu de l'étroitesse de la fenêtre d'analyse [117].

- **Détection des adduits à l'ADN**

La formation des adduits est visible quelques heures ou quelques jours après l'exposition suivant la nature de la substance et les individus.

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Certains adduits provoquent des modifications des bases de l'ADN dont la « lecture » peut être erronée lors de la réplication de l'ADN pouvant conduire à l'apparition de mutations et au développement de cancers si ces adduits ne sont pas éliminés ou si l'ADN est mal réparé.

La détection de ces adduits peut être faite par des techniques de post-marquage au phosphore 32, d'immunomarquage, mais la technique aujourd'hui privilégiée est celle de la chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS) qui permet de mettre en évidence des adduits à l'ADN spécifiques de substances chimiques et, le cas échéant, une relation dose-effet [117].

Les matrices biologiques utilisées comme source d'ADN sont souvent le sang, les cellules buccales, les cellules retrouvées dans l'urine. Aujourd'hui, une bonne corrélation a pu être établie entre la présence d'adduits et l'exposition à des cancérogènes comme le benzène, même si des précautions d'usage dans l'analyse sont nécessaires (recherche de facteurs confondants, capacité métabolique individuelle, polymorphisme) [117].

III.3.3.2. Tests pour la détection des altérations chromosomiques

- **Tests des micronoyaux**

Les micronoyaux sont des fragments de chromosomes, ou des chromosomes entiers, résultants d'un dysfonctionnement au moment de la division cellulaire qui se retrouvent ensuite dans le cytoplasme. Produits soit par effet clastogène, soit par un effet aneugène en perturbant la ségrégation chromosomique [117].

Les micronoyaux sont recherchés sur des cellules ayant effectué au moins une division. L'augmentation du nombre des cellules anormales parmi les sujets exposés par rapport à une population témoin est le signe d'une exposition à un produit génotoxique, et des relations dose-effet peuvent être mises en évidence le cas échéant [118].

Aujourd'hui, la plupart des études de biométrie sont réalisées à partir de prélèvements sanguins [15,31,74]. Les lymphocytes issus de ces prélèvements sont mis en culture et prolifèrent pendant 2-3 jours, avant d'être bloqués à la fin de leur division par un agent chimique (la cytochalasine B) afin d'obtenir des cellules binucléées. Ces cellules binucléées sont le signe d'une division entamée mais non finie, permettant de conserver d'éventuels micronoyaux.

Le test sur prélèvement de cellules buccales est de plus en plus utilisé car moins invasif que la prise de sang et représentent la cible préférentielle des effets génotoxiques précoces d'un

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

carcinogène comme le rapportent les études de Butt et al. (2017) et Villarini et al. (2021) [10,119].

Aisé à mettre en œuvre et d'une lecture facile, le test des micronoyaux est aujourd'hui la technique la plus souvent utilisée [117].

Ce test nécessite l'utilisation d'un microscope et l'analyse des échantillons est longue car il faut un nombre minimal de cellules à analyser, plus de 3 000 par échantillon à la recherche des cellules micronuclées, binuclées, caryolyse et caryorrhexie [10].

Ce test est sensible même aux faibles expositions au benzène inférieures à 0,6 mg/m³ [120], des corrélations significatives entre les biomarqueurs d'exposition et les taux de micronoyaux ont été rapportées chez des pompistes [15,31,118,120].

Des systèmes de lecture automatisée sont aujourd'hui disponibles : ils permettent d'uniformiser les analyses, mais nécessitent des préparations de très bonne qualité, parfois délicates à obtenir en fonction de la provenance des échantillons [117].

La figure suivante montre différentes morphologies nucléaires observées dans les cellules épithéliales buccales de sujets exposés (E) et non exposés (N) au benzène.

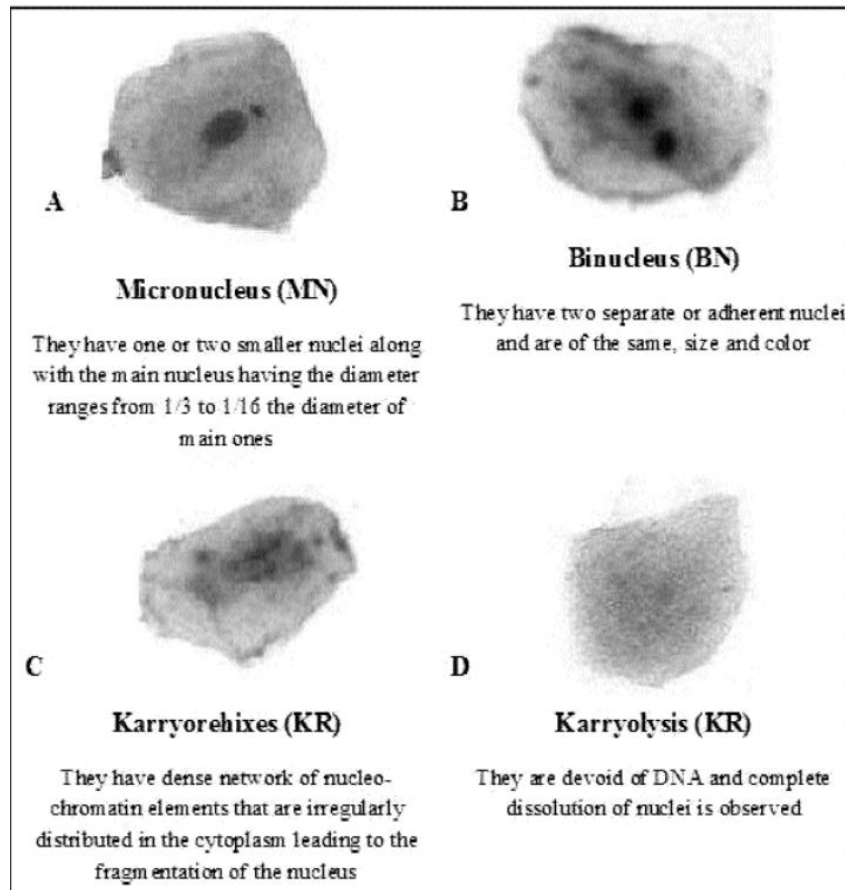


Figure 26: Photomicrographies (A-D à 40X) de différentes morphologies nucléaires observées dans les cellules épithéliales buccales de populations exposées (E) et non exposées (EN) au benzène [10].

- **Aberrations chromosomiques**

La recherche d'aberrations chromosomiques est sans doute l'un des tests de génotoxicité parmi les plus anciens utilisés en biométrie [117].

La technique consiste à rechercher les anomalies au niveau du caryotype. Des modifications du nombre de chromosomes (aneuploïdie) sont recherchées, ainsi que des anomalies de structure des chromosomes (délétions, translocation, inversion...).

Cette technique peut utilement être complétée par de l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), qui permet de déterminer plus précisément les régions et séquences chromosomiques impactées, certaines d'entre elles étant connues pour leur rôle majeur dans le développement de cancers.

Les cellules analysées doivent être au stade métaphase de la division cellulaire. Le plus souvent, les cellules sont cultivées puis bloquées au stade recherché avec de la colchicine. Les cellules

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

doivent donc pouvoir se diviser, c'est pourquoi ce type d'analyse est réalisé sur des lymphocytes issus de prélèvements sanguins [117].

Les anomalies chromosomiques peuvent persister dans les lymphocytes, ce qui permet de mesurer les effets d'expositions antérieures et/ou cumulées.

En revanche, cela ne permet pas de relier directement ces modifications chromosomiques à une exposition récente, il faut comparer avec un groupe de contrôle et étudier les facteurs confondants.

Ce test est lourd et fastidieux, plus de 200 métaphases sont nécessaires pour réaliser une analyse fiable. C'est pourquoi le test des micronoyaux lui est préféré aujourd'hui [117].

Une revue systématique réalisée en 2020 conclut de l'augmentation des fréquences des aberrations chromosomiques chez les sujets exposés au benzène comparés au groupe contrôle [120], par contre une étude italienne chez 19 pompistes et 16 contrôles n'a révélé aucune différence significative pour ce test [100].

Il semble qu'aux niveaux d'exposition actuels, l'analyse des aberrations chromosomiques, qui est une tâche très fastidieuse, ne soit pas applicable à la surveillance biologique de routine de l'exposition au benzène [32].

La figure 27 récapitule les principaux tests utilisés en génotoxicité.

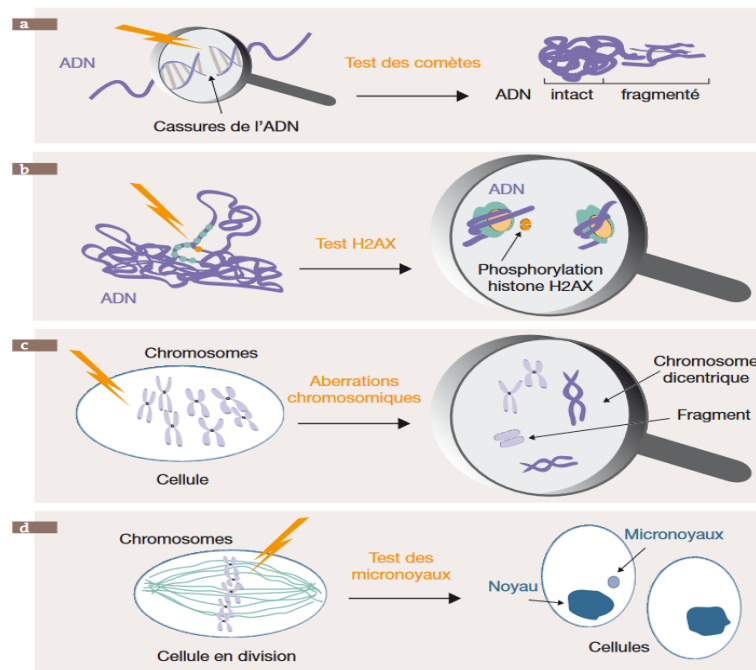


Figure 27: Les tests utilisés pour la mise en évidence des effets des agents cancérigènes génotoxiques [117]

III.3.4. Biomarqueurs du stress oxydatif (produits d'oxydation des acides nucléiques et autres)

Au cours de la biotransformation du benzène, de multiples formes d'espèces réactives sont produites, ce qui pourrait contribuer au développement de dommages oxydatifs et pourrait être à l'origine de dommages aux lipides, aux protéines et aux glucides de l'ADN par le biais de diverses réactions chimiques, entraînant des altérations fonctionnelles dans différents tissus [7].

De plus, l'exposition chronique au benzène compromet la capacité antioxydante, ce qui contribue également au développement de dommages oxydatifs chez les sujets exposés. Une corrélation significative entre la concentration de benzène dans le sang et l'immunosuppression, le stress oxydatif et l'élévation de l'expression de p53 a été trouvée lors de l'étude de Uzma et al. (2010) [121].

III.3.4.1. Malonyl dialdéhyde (MDA)

Plusieurs études ont rapporté que l'exposition au benzène chez des groupes de pompistes (t,t-MA, S-PMA) a été corrélée à une augmentation de la formation globale de MDA au niveau urinaire (malonyl dialdéhyde) [121,122].

III.3.4.2. Glutathion (GSH)

Une tendance à la corrélation négative a été observée entre les dommages à l'ADN et le glutathion GSH ou le S-PMA urinaire chez les travailleurs exposés [100,118].

Le taux de GSH cellulaire dans les lymphocytes a été mesuré par HPLC avec dérivation avec une pré-colonne de l'ortho-phthalaldéhyde (OPA), le Glutathione ethyl ester (GEE) peut être utilisé comme étalon interne et les valeurs sont exprimées en $\mu\text{mol GSH}/10^6$ lymphocytes. [100].

Il peut également être mesuré par spectrophotométrie à 412 nm après hémolyse Triton X-100, et précipité avec 20 % d'acide trichloracétique (p/v). Après centrifugation, une réaction avec le 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) (DTNB). La teneur en GSH est exprimée en mol/mL des érythrocytes [118].

III.3.4.3. Produits d'oxydation de la guanine

L'oxydation de l'ADN peut être quantifiée par la mesure d'un dérivé oxydé de l'un de ses composants [48].

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

La 8-hydroxy-2'désoxyguanosine (8-OHdGuo) ou la 8-oxo-7,8-dihydro-2'désoxyguanosine (8-oxodGuo) sont les lésions nucléotidiques uniques les plus fréquemment observées et étudiées qui pourraient induire des mutations dans la réplication de l'ADN [50,55]. Une fois libérées par les mécanismes de réparation par excision, n'étant pas reconnues par le système réplcatif, vont passer dans la circulation sanguine, et une partie est éliminée dans les urines où c'est possible de les mesurer [48].

L'intérêt porté sur le dosage de la 8-OH-dGuo urinaire n'est plus à démontrer et est maîtrisé depuis les années 90 [64] et son application dans les études d'épidémiologie moléculaire en tant que facteur de risque pour de nombreuses maladies (en particulier le cancer) associées aux mécanismes de stress oxydatif augmente [53] ; en revanche l'utilisation de ce biomarqueur au niveau individuel ne fait pas l'unanimité ; des études en population devront confirmer son emploi pour diagnostiquer ou prédire un cancer, un accident cardiovasculaire ou encore une maladie neurodégénérative [123].

Très stable dans l'urine et ne subit pas une métabolisation supplémentaire, il est non invasif et reflète bien les dommages et réparations liés à l'ADN de toutes les cellules de l'organisme [50,124], sa concentration urinaire pourrait être mesurée sur échantillon, avec normalisation par la créatinine urinaire, des urines de 24 heures ou un échantillon plasmatique en tenant compte du débit de filtration glomérulaire [48].

Les produits d'oxydation de l'ADN et de l'ARN sont multiples et pas facilement dosables dans le plasma.

Malgré le manque d'informations définitives sur l'origine des dérivés de guanine modifiés par oxydation dans l'urine, ce qui entrave probablement la validité des conclusions basées sur leur utilisation, ces analytes ont été proposés comme biomarqueurs présumés idéaux, car ils sont non invasifs, faciles à collecter et à stocker, et stables pendant de longues périodes, et leur mesure est proche de la validation analytique [50,123].

Ils pourraient être considérés comme [123] :

- (i) Des biomarqueurs de la dose efficace (et donc de l'exposition), car ils devraient refléter l'étendue des radicaux hydroxyles qui ont été générés par l'exposition à des agents oxydants et qui ont endommagé les acides nucléiques ou les nucléotides,
- (ii) Et des biomarqueurs de susceptibilité, car ils reflètent l'activité de différents systèmes de réparation.

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Les matrices biologiques, telles que les cellules sanguines la salive, l'urine et les cellules cultivées peuvent être utilisées avec une sensibilité élevée dans la plupart des études portant sur les conséquences génotoxiques du stress oxydatif.

Bien que la guanine oxydée dans l'ADN du sang et des tissus soit un biomarqueur bien reconnu des dommages oxydatifs [53,125].

Plusieurs caractéristiques doivent être étudiées :

- 1) La variabilité inter- et intraindividuelle : une forte variabilité intra et interindividuelle pour tous ces biomarqueurs, en particulier pour le 8-oxoGua [125], peut être réduite en exprimant les résultats en fonction de la créatinine (pmol/ μ molcreat) [123].
- 2) La cinétique de leur excrétion dans des échantillons d'urine chronométrés ou en fonction de la créatinine urinaire ; six spots d'urine sur 24 h ont été analysés par Andreoli et al. et aucune variation significative n'a été observée dans les échantillons prélevés à différents moments au cours de la même journée, on pourrait exclure un rythme circadien [125].
- 3) Et la caractérisation de l'excrétion de fond dans la population générale [124].

L'excrétion urinaire de 8-OHdG résulte de l'équilibre entre la génération de radicaux libres hydroxyles, les activités enzymatiques antioxydantes, l'excision et la réparation de séquences d'ADN endommagées et l'excrétion rénale des bases d'ADN modifiées [124,125].

L'excrétion urinaire peut être influencée par le sexe , la perte de poids , l'indice de masse corporelle, ainsi que les expositions environnementales telles que le tabagisme, la radiothérapie ou la chimiothérapie [53,64].

Pour l'analyse comparative, il faut déterminer le rapport entre les bases oxydées et les bases libres exemple 8-OHdGuo/dGuo. Enfin, cela nécessite une courbe standard couvrant les plages de mesure des bases modifiées et dGuo, ce qui représente un inconvénient majeur de cette approche [55].

Plusieurs études ont démontré une relation dose-effet entre l'exposition au benzène chez des pompistes et les taux urinaires du 8-OxodGuo [15,64], et l'étude de Andreoli et al. (2011) a conclu que le 8-oxoGua est le plus représenté, sa concentration étant environ 10 fois supérieure à celles du 8-oxoGuo et du 8-oxodGuo [123] et présente la plus grande variabilité inter- et intraindividuelle parmi les biomarqueurs urinaires de l'oxydation des acides nucléiques.

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

On peut classer les méthodes de détection de ces biomarqueurs en quatre grandes catégories [48] :

1- Test des comètes

2- L'immuno-analyse

Il existe des immuno-essais performants, spécifiques et sensibles, permettant des dosages dans les fluides biologiques, en particulier les urines et parfois le plasma ; les plus populaires sont ceux qui dosent la 8-OH-dG, parfois adaptés sur des automates avec détection enzymométrique en fluorescence ou chimioluminescence mais ils sont limités à quelques dosages commercialisés et le majeur inconvénient est le manque de précision [48,55].

3- Les méthodes chromatographiques

Elles permettent d'identifier et de doser un grand nombre de métabolites oxydés.

Ils peuvent être dosés par chromatographie liquide hautes performances (CLHP) avec détection électrochimique, fluorescence induite par laser et depuis peu par spectrométrie de masse (SM) en tandem qui constitue la méthode la plus simple et la plus précise (UPLC-MS/MS) [54].

Elle permet aussi de séparer et quantifier les quatre bases normales de l'ADN ainsi que les quatre bases modifiées à partir de la cytosine (5-méthyl, 5-hydroxyméthyl, 5-formyl et 5-carboxyl), ou encore par couplage de la spectrométrie de masse à l'électrophorèse capillaire [123,124,126].

Des nouvelles technologies émergent régulièrement, combinant la liaison spécifique de la 8-OH-dGuo à un aptamère et la lecture d'un signal de liaison par la diffusion de la lumière en résonance (Resonance Light Scattering), formant un senseur spécifique et sans marquage (label free) ; le seuil de quantification est extrêmement bas (inférieur à 50 pmoles/L).

Un autre senseur électrochimique utilise la technique de détection sonochimique pour mesurer le pic d'électro-oxydation de la 8-OH-dGuo (biosenseur label free), L'analyse automatisée d'images d'immunofluorescence utilisant une reconnaissance de formes sophistiquée offre une quantification cellulaire des dommages oxydatifs individuels qui peut être appliquée à plusieurs échantillons [54,55].

Vu les différences inter-laboratoires [50], des études sont réalisées dans le but d'harmoniser les résultats obtenus par les différentes méthodes analytiques disponibles [53,55].

III.3.5. Biomarqueurs de l'effet immunologique et inflammatoire

Les hydrocarbures aromatiques présents dans le carburant sont des agents actifs responsables de la suppression de la réponse immunitaire. Dans l'étude de Moro et al. (2019) [7], selon le modèle de régression linéaire multiple, l'exposition personnelle des pompistes au benzène était la seule variable qui contribuait de manière significative à l'augmentation des niveaux de biomarqueurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α et IFN- γ), ces résultats ont suggéré que les altérations immunologiques et inflammatoires observées pourraient être liées au développement de processus cancérogènes dû à l'exposition au benzène.

Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

III.3.5.1. Biomarqueurs de l'inflammation

- **Biomarqueurs moléculaires (Production de cytokines)**

Plusieurs études font état d'une augmentation du taux sérique de cytokines pro-inflammatoires interleukine (IL)-6, IL-8, facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , interféron (IFN)- γ et IFNB1, ou d'une expression accrue dans leurs gènes correspondants, même à de faibles niveaux d'exposition au benzène [67].

De même, une étude américaine rapporte qu'une exposition au benzène de ~ 1 ppm augmente l'expression de la caspase-1 (une protéine sérique) et de l'IL-1 β , accompagnée d'une élévation de l'IL-1 β sérique.

De plus, une régulation positive de la chimiokine pro-inflammatoire CXCL16 a également été signalée en association avec l'exposition au benzène. L'expression accrue de CXCL16 a été associée à des cancers associés à l'inflammation.

D'autres médiateurs pro-inflammatoires qui ont été observés augmentent en réponse à l'exposition au benzène, notamment la protéine cationique éosinophile et le leucotriène B4 [67].

- **Biomarqueurs cellulaires**

En général, l'inflammation chronique se caractérise par la présence de macrophages, de monocytes et de lymphocytes, qui produisent des cytokines et des enzymes inflammatoires pouvant causer des dommages durables aux cellules.

Ce changement dans la composition des globules blancs (GB) s'accompagne souvent de la prolifération des vaisseaux sanguins et du tissu conjonctif. Deux études ont signalé une augmentation des neutrophiles de bande (immatures) chez les travailleurs exposés au benzène,

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

un phénomène qui accompagne généralement les affections infectieuses et inflammatoires et indique une augmentation de la production de globules blancs par la moelle osseuse [67].

L'exposition au benzène a également été associée à des pourcentages plus élevés de lymphocytes T CD3⁺ producteurs d'IL-4.

III.4.5.2. Biomarqueurs de l'immunosuppression

- **Immunité innée**

Des taux altérés de cellules NK CD56⁺ et une expression anormale de CD16 ont été signalés en réponse à l'exposition au benzène. Une diminution des taux sériques du complément chez les travailleurs exposés au benzène a été rapportée dans deux études [67].

- **Immunité adaptative humorale**

De nombreuses études ont porté sur la production d'immunoglobulines chez des humains exposés au benzène. Deux études ont démontré une réduction des immunoglobulines circulantes, telles que les IgM, les IgA et les IgG. Dans d'autres cas, des niveaux plus élevés d'anticorps ont été détectés tel que les IgG, les anticorps contre la protéine de choc thermique, ainsi que les immunoglobulines associées aux plaquettes (PAIgs) [7,67].

Il existe également des preuves que la fonction et l'activation des cellules B peuvent être affectées négativement par l'exposition au benzène, car une diminution des niveaux de deux marqueurs solubles d'activation des cellules B, sCD27 et sCD30, a été observée dans le sang périphérique de 250 travailleurs d'une usine de chaussures exposés au benzène [72].

- **Immunité adaptative à médiation cellulaire**

Deux études ont également été réalisées sur des cercles d'excision des récepteurs des lymphocytes T (TREC), dont la présence indique la maturité des lymphocytes T.

À l'aide de la PCR en temps réel, une étude a révélé une diminution des TREC dans les cellules mononucléées du sang périphérique chez les travailleurs exposés au benzène [127].

Il a été rapporté que PF4 (également connu sous le nom de CXCL4), un gène responsable de l'activation d'une chimiokine impliquée dans l'agrégation plaquettaire et l'inhibition de l'hématopoïèse et de la fonction des lymphocytes T, est constamment régulé à la baisse (Down Regulation) chez les travailleurs exposés au benzène [92].

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Cette régulation négative a été confirmée au niveau du protéome par l'observation d'une diminution de la protéine PF4 (CXCL4) ainsi que d'une diminution des taux sériques de CXCL7 (CTAPIII) qui est une chimiokine associée aux plaquettes qui stimule l'inflammation [67].

III.3.6. Biomarqueurs protéomiques du benzène

Un autre outil toxicogénomique important, la protéomique, peut être utilisé pour mesurer les altérations du protéome (par exemple, les niveaux de protéines, les modifications post-traductionnelles) associées à l'exposition à des produits chimiques exogènes [43].

Les effets sur le protéome sanguin peuvent refléter des effets sur les sites distaux du corps. Comme pour la transcriptomique, la protéomique peut être utilisée pour découvrir des biomarqueurs de l'exposition et des effets précoces, ainsi que pour améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents à la maladie [43].

L'impact du benzène sur le protéome sérique humain a été examiné chez les travailleurs d'usine exposés et les témoins afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du benzène. Les échantillons de sérum ont été fractionnés et les protéines ont été liées à des puces de spectrométrie de masse à temps de vol (SELDI TOF-MS) par désorption/ionisation laser améliorées en surface.

Trois protéines (4,1, 7,7 et 9,3 kDa) ont été systématiquement régulées à la baisse chez les individus exposés par rapport aux individus témoins et inversement corrélées avec les biomarqueurs d'exposition individuels.

Les protéines 7,7 et 9,3 kDa ont été identifiées comme étant le facteur plaquettaire 4 (PF4), également régulé à la baisse au niveau d'expression génique, et le peptide activateur du tissu conjonctif CTAP-III, respectivement, deux chimiokines CXC dérivées des plaquettes.

Ainsi, des niveaux réduits de protéines PF4 ou CTAP-III sont des biomarqueurs potentiels des effets biologiques précoces du benzène [43].

III.3.7. Biomarqueurs de prédiction de l'altération d'expression des gènes

Il existe des techniques modernes de prédiction de l'exposition à de faibles taux de benzène par l'analyse des molécules d'ARNm existants dans un échantillon à l'aide d'une plateforme de quantification appelé le nCounter sans avoir recours à l'amplification enzymatique et ainsi prédire les altérations des expressions des gènes.

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Schiffman et al. (2018) ont pu valider à l'aide de la plateforme nCounter l'expression modifiée de 27 ARNm chez des individus professionnellement exposés à moins de 1 ppm de benzène et identifié 3 paires de gènes qui prédisent exclusivement l'exposition actuelle au benzène [128].

III.4. Biomarqueurs de susceptibilité

Il faut savoir que les biomarqueurs de susceptibilité, choisis sur des critères de validité scientifique et de pertinence pour la protection des travailleurs, ne doivent pas être utilisés à des fins de dépistage et/ou d'aptitude à tel ou tel emploi.

Ils doivent également bénéficier d'une approbation du comité d'éthique. La restitution des résultats doit être réalisée en exposant le contexte des situations de travail et les résultats d'analyse des atmosphères de travail, même si les résultats sont obtenus pour chaque individu, l'analyse de ces résultats doit se faire à l'échelle des groupes [117].

Ces biomarqueurs devraient servir à réévaluer les valeurs limites d'exposition professionnelle ou à aménager les postes de travail pour protéger l'ensemble des travailleurs en tenant compte des plus sensibles [117].

Les études d'association pangénomique sont un moyen bien établi d'examiner l'association de la susceptibilité génétique, c'est-à-dire des polymorphismes mononucléotidiques, avec la maladie [43].

Les études sur la population humaine confirment un rôle essentiel de la réparation de l'ADN et du maintien génomique dans la susceptibilité, et soutiennent davantage ces effets en tant que résultats phénotypiques induits par le benzène [43,117].

De plus, des variantes génétiques des enzymes métabolisantes responsables de l'activation et de la détoxification du benzène, en particulier la MPO (Myeloperoxydase) et le NQO1 (NADPH Quinone Oxidoreductase 1), la GSTT1 (Glutathion S-transférase), CYP2E1, ont également été associées à une susceptibilité accrue à l'hématotoxicité de celui-ci [43].

Une étude chinoise a analysé 1395 polymorphismes mononucléotidiques dans 411 gènes potentiellement liés à la cancérogenèse chez 250 travailleurs exposés au benzène et 140 témoins non exposés. Deux génotypes ont significativement influencé la baisse des GB chez les travailleurs exposés à moins de 1 ppm de benzène, MPO -463GG (rs2333227) et NQO1 465CT (rs4986998) [71,129,130].

Une autre étude a fourni une preuve que les polymorphismes génétiques de certains gènes de maintien de la stabilité génomique, comme WRN codant pour la protéine du syndrome de

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

Werner et le gène P53, sont impliqués dans la détermination de la susceptibilité génétique à la toxicité du benzène [25,43,130].

- **Polymorphisme génétique de la NADPH Quinone Oxidoreductase-1 (NQO1)**

Le déficit en NQO1 chez l'homme est associé à un risque accru de leucémie, en particulier de leucémie myéloïde aiguë.

Les rôles récemment suggérés pour NQO1 qui pourraient avoir une pertinence pour les mécanismes sous-jacents à la toxicité du benzène comprennent la modulation de l'équilibre redox cellulaire, le piégeage direct du superoxyde, la stabilisation du gène p53 et la stabilisation des microtubules.

Le polymorphisme NQO1*2 est un polymorphisme nucléotidique unique, un changement de C à T à la position 609 de l'ADNc NQO1 (ADN complémentaire) codant pour un changement de proline à sérine à la position 187 de la structure des acides aminés de la protéine [131] (Figure 28).

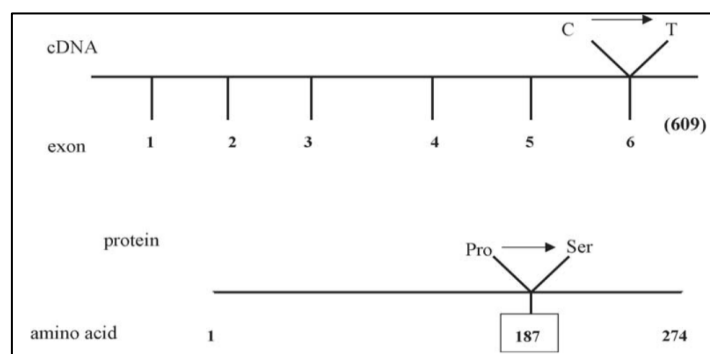


Figure 28: Gène NQO1 et localisation du polymorphisme NQO1*2 [131]

La protéine mutante NQO1*2 est rapidement dégradée par le système protéasomal de l'ubiquitine, ce qui entraîne un manque de protéine NQO1 chez les individus porteurs du génotype NQO1*2/*2 [131].

Le Tableau 10 montre les pourcentages d'individus avec un polymorphisme de NQO1 dans différentes populations.

Tableau 10: Pourcentage d'individus dans différentes populations avec le génotype

NQO1*2/*2 [131]

Population	NQO1 *2/*2 %
Hmong*	34
Chinois	22,4
Coréens	18,8
Amérindiens	17,9
Hispaniques mexicains	15,5
Japonais	12,2
Afro-américains	5,2
Blancs non hispaniques	4,4

* Hmong : groupe ethnique indigène originaire d'Asie du Sud-Est

Le polymorphisme NQO1*2 prédispose à la toxicité du benzène et à diverses formes de leucémies. NQO1 n'est pas présent dans les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse humaine fraîchement isolées, mais est présent dans le stroma de la moelle osseuse humaine et en particulier dans les cellules endothéliales [131].

Des animaux dépourvus de NQO1 présentent une hyperplasie myéloïde et une hématotoxicité accrue induite par le benzène [132].

Des souris NQO1^{-/-} et NQO1^{+/+} mâles et femelles ont été exposées au benzène inhalé (0, 10, 50 et 100 ppm) pendant 2 semaines à raison de 5 jours par semaine et 6 heures par jour, l'histologie de la moelle osseuse a été utilisée pour évaluer l'hématotoxicité et la myélotoxicité (figure 25). Les souris femelles NQO1^{-/-} étaient plus sensibles (6 fois) à la génotoxicité et myélotoxicité induite par le benzène que les souris femelles NQO1^{+/+}.

La figure suivante montre [132] :

- (A) La moelle osseuse d'une souris femelle NQO1^{+/+} (exposée à l'air) représentant une cellularité normale des sternèbres médio-sternales.
- (B) La moelle osseuse d'une souris femelle témoin (exposée à l'air) NQO1^{-/-} montrant une augmentation de la cellularité par rapport à A que l'on croit représenter une hyperplasie myéloïde spontanée associée à un déficit en NQO1.

(C) La moelle hypocellulaire des sternèbres d'une souris NQO1^{-/-} femelle exposée à 100 ppm de benzène pendant 14 jours.

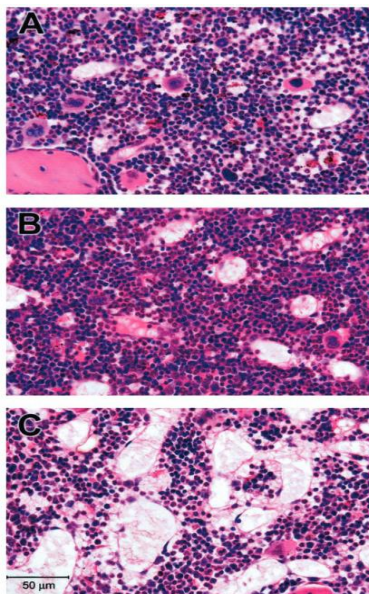


Figure 29: Histopathologie des sternums de souris femelles NQO1 ^{+/+} et NQO1 ^{-/-} [132]

- **Polymorphisme génétique de la Glutathion S-transférase**

La famille des super gènes GST se compose de plusieurs gènes de sous-familles, notamment la glutathion S-transférase mu 1 GSTM1, la glutathion S-transférase Pi GSTP1 et glutathion S-transférase thêta 1 GSTT1.

Dans le génotype GSTP1, une substitution d'un seul nucléotide (A-G) au niveau du nucléotide 313 (Ile/Val) diminue son activité enzymatique. Les délétions homozygotes du gène GSTM1 (génotype nul GSTM1) et du gène GSTT1 (génotype nul GSTT1) entraînent l'absence d'activité enzymatique [103].

Plusieurs études ont investigué l'association du polymorphisme génétique de la GST avec les taux des biomarqueurs d'exposition et d'effet du benzène [16,103,133–135].

L'étude de Carbonari et al. 2014 a examiné l'effet des gènes polymorphes GSTT1, GSTM1, GSTA1, EHPX1, NQO1, CYP2E1, CYP1A et MPO sur les concentrations urinaires et le rapport (R) des métabolites du benzène (t,t-MA et S-PMA) chez 301 travailleurs de raffineries de pétrole [133] Le polymorphisme nul GSTT1 réduit le taux de conjugaison de l'époxyde de benzène avec le GSH. R s'est avéré être un marqueur plus sensible pour ces effets que les niveaux de métabolites seuls.

Chapitre III : Surveillance biologique de l'exposition aux faibles taux de benzène

L'étude de Mansi et al. (2012) a étudié l'influence du polymorphisme génétique de la glutathion (GSTT1), (GSTM1), (GSTP1) et des habitudes tabagiques sur l'excrétion des métabolites. Les résultats ont confirmé l'effet sur l'excrétion urinaire du S-PMA, mais pas le t, t-MA, même à de très faibles niveaux d'exposition au benzène. Les niveaux du S-PMA et les valeurs R des sujets avec un génotype nul GSTT1 étaient significativement inférieurs à ceux des sujets avec un génotype GSTT1 positif [103,135]. Le même effet a été observé pour GSTM1, mais uniquement pour les fumeurs [135].

Lin et al. (2008) a suggéré que la valeur de l'indice d'exposition biologique du S-PMA doit être établie en fonction des niveaux des sujets présentant des génotypes déficients en GSTT1 pour la protection de tous [135].

Il n'y avait pas de consensus parmi les articles examinés sur les polymorphismes spécifiques associés aux résultats indésirables liés à la santé, à l'exception des génotypes NQO1 et GSTT1 nuls [134].

- **Polymorphisme de la Cytochrome P450 et la myéloperoxydase (MPO)**

Une revue systématique publiée en (2021) a rapporté que les travailleurs exposés présentant des polymorphismes génétiques de la CYP1A1 et la CYP2D6 courent un risque plus élevé d'avoir des effets chroniques du benzène et que le nombre de GB était plus faible chez les individus qui possédaient le génotype CT du polymorphisme CYP2E1 par rapport au génotype CC [134].

Le génotype GC du polymorphisme CYP2E1 rs3813867 était associé à un nombre de GB significativement plus faible par rapport au génotype GG.

Les ouvriers avec un génotype variant homozygote pour le CYP2E1 produisaient des niveaux significativement plus faibles de métabolites que les ceux qui avaient l'allèle de la variante de type sauvage et un benzène urinaire plus élevé [93,97].

Peu d'études ont corrélé les polymorphismes des gènes codant pour le MPO et les changements physiologiques humains. Le polymorphisme MPO rs2071409 diminue le nombre de globules blancs (GB) chez les sujets exposés, et affecte peut-être les sous-types de GB, que la population exposée au benzène avec le polymorphisme MPO rs2333227 [134].

Partie pratique

I. Matériel et méthodes

I.1. Présentation l'étude

Nature de l'étude

Il s'agit d'une étude observationnelle, descriptive, menée dans un seul centre, avec une double approche :

- Transversale pour la comparaison inter-groupes
- Longitudinale (pour des mesures répétées dans le temps)

Cette étude comporte également une visée analytique, visant à explorer les relations entre variables biologiques et professionnelles.

Cadre de l'étude

- L'échantillonnage urinaire et sanguin s'est déroulé entre août et octobre 2024.
- Les analyses biologiques ont été réalisées au laboratoire de toxicologie du CHU Ibn Sina (Annaba) et au Laboratoire de toxicologie industrielle de l'université de Parme (Italie).

I.2. Population étudiée

- Après exclusion des non-conformités, 101 sujets masculins professionnellement exposés (EX) au benzène par voie respiratoire et cutanée ont été comparés à 40 sujets non exposés (NE).
- Les sujets exposés sont âgés entre (18 et 70 ans), comprenant 59 (58,41%) pompistes et 42 (41,58%) mécaniciens.
- Les sujets non exposés (N=40) sont principalement des travailleurs des administrations à Annaba, ont été recrutés après la sélection du groupe exposé. Ils sont comparables en termes de sexe, d'âge (23 - 67 ans), de statut tabagique, les comorbidités et le lieu de travail.

Critères d'inclusion

- **Les sujets non exposés** : consentants, de sexe masculin, n'ayant jamais travaillé en tant que pompiste ou mécanicien ou peintre.
- **Les sujets exposés** :
- Sujets consentants au prélèvement biologique.

- De sexe masculin.
- Métier de pompiste ou mécanicien.
- Travaillant dans le secteur public ou privé.
- Âge minimal 18 ans.
- Ancienneté minimale de 6 mois.

Critères de non-inclusion

- Sujets non consentants aux prélèvements biologiques.
- Les gérants, les agents de lavage, caissiers, magasiniers des stations de service n'ont pas été inclus, en se basant sur les données de la littérature qu'ils étaient moins exposés que les pompistes [136].
- Les autres métiers exposant au benzène ex : peintre.
- Ancienneté de moins de 6 mois.
- Sujets de sexe féminin.

Critères d'exclusion

Nous avons été amenés à exclure 8 sujets déjà inclus pour les raisons suivantes :

- Sujets présentant une créatinine urinaire inférieure à 0,3 g/L ou supérieure à 3 g/L (urines trop diluées ou trop concentrées), sinon exigence de refaire le prélèvement (1 pompiste et 3 mécaniciens ont été exclus).
- Sujets ayant fourni un échantillon en avant-poste et perdus de vue pour l'échantillon après poste (4 pompistes ont été exclus).

Sites et conditions d'exposition

- Tous les participants exercent dans la région de Annaba.
- Le choix des stations de service a été selon un échantillonnage non probabiliste selon la convenance, en fonction de leur approbation pour participer à l'étude. Ainsi, sur les treize stations de service visitées, huit ont accepté de participer à l'étude. Elles sont réparties sur différentes communes de la région d'Annaba : (1) El Karma, (1) Sidi Amar, (1) Sidi Salem, (5) Annaba.

Les stations présentent des caractéristiques communes :

- **Type d'activité** : distribution de carburants (essence et diesel), avec présence de pompes manuelles.
- **Configuration** : la majorité des stations sont semi-ouvertes, avec une zone de ravitaillement exposée aux vapeurs de carburant, et un espace fermé pour la caisse et le stockage.
- **Personnel** : chaque station emploie entre 4 et 20 travailleurs, incluant des pompistes, des graisseurs, des agents de lavage, des agents de caisse, magasiniers, vulcanisateurs, etc.
- **Équipements de protection individuelle (EPI)** : l'usage des EPI est rare ou irrégulier, notamment en ce qui concerne les gants et les masques.
- Aucune pompe de prélèvement ou dispositif de mesure atmosphérique n'était disponible sur les lieux de travail.
- **Rythme de travail** : les horaires de travail diffèrent d'une station à une autre, nous avons pu noter différents rythmes de travail :
 - 8H par jour durant 6 jours alternant jour et nuit,
 - 12H par jour durant 2 jours et repos 48H,
 - 24H et repos de 48H,
 - 48H et repos de 48H
 - Et 8H par jour durant 5 jours par semaine.
- De même, les mécaniciens travaillant dans divers garages mécaniques, tous situés dans les communes de Annaba et El Bouni, ont été recrutés soit par l'intermédiaire de leur médecin du travail dans le cadre du suivi périodique, soit par une visite directe au garage dans le cadre de la présente étude. La réparation des voitures se fait soit à l'intérieur du garage soit à l'extérieur. Tous les mécaniciens travaillent 5 jours par semaine.

I.3. Biomarqueurs étudiés

En nous basant sur les recommandations des synthèses d'articles dans les revues systématiques, il a été recommandé de prendre en compte les éléments suivants [5] :

- Sélection de l'indice biologique en fonction du niveau d'exposition par inhalation au benzène,
- Mesure du niveau de l'indice biologique avant et après le travail ;
- Éviter de fumer le jour de l'échantillonnage ;

- Evaluer les taux de cotinine urinaire pour mieux apprécier le statut tabagique ;
- Éviter de manger des aliments contenant de l'acide sorbique et de l'alcool à partir de 48 heures avant l'échantillonnage ;
- Identifier des travailleurs avec un génotype GSTT1 « nul ».

Nous avons choisi de travailler sur les urines du début et fin de poste à la recherche des :

- **Biomarqueurs d'exposition du benzène** : nous avons choisi deux biomarqueurs urinaires spécifiques, issus de deux voies métaboliques différentes, **l'acide trans,trans-muconique (t,t-MA)** et **l'acide S-phényl mercapturique (S-PMA)**.
- **Biomarqueurs urinaires d'effet épigénétique** : un total de 11.
 - Détermination urinaire de nucléosides méthylés à la suite de processus d'excision cellulaire de l'ARN : **5-MéthylCytidine (5-MetCyt)**, **7-MéthylGuanosine (7-MeGuo)**, et de l'ADN : **5-Méthyl-désoxyCytidine (5-MedCyt)**, **5-HydroxyMéthyl-désoxyCytidine (5OH-MedCyt)**.
 - Détermination des bases libres méthylées : **5-méthyl Cytosine (5-MeCyto)**, **5-HydroxyMéthylCytosine (5-OHMeCyto)**, **7-MéthylGuanine (7-MeGua)**, **1-MéthylGuanine (1-MeGua)**.
 - Détermination de la **Cytosine (Cyto)**, **Cytidine (Cyt)** et **désoxyCytidine (dCyt)** libres afin de calculer les rapports.

La Figure 30 montre la voie de déméthylation par les enzymes TET produisant le 5OHMedCyt.

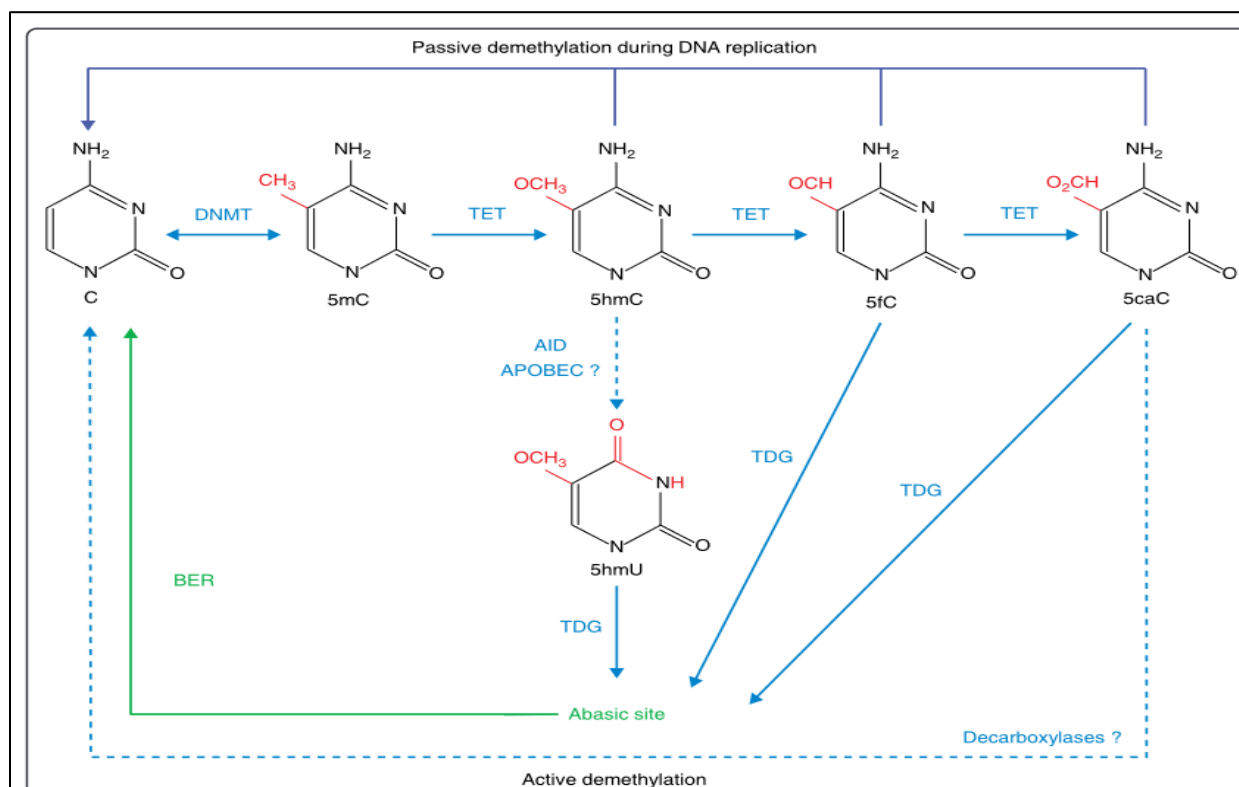


Figure 30 : place du 5-HydroxyMéthyl désoxyCytidine (5OHMedCyt) dans la régulation de la déméthylation de l'ADN [137]

- **Biomarqueurs urinaires des effets génotoxiques précoces du benzène** : considérés comme biomarqueurs d'effet et des biomarqueurs de susceptibilité (car ils reflètent l'activité de différents systèmes de réparation). Un total de 6 biomarqueurs.
- **Nucléosides de l'ADN** : **désoxyGuanosine (dGuo)** et **8-Oxo-désoxyGuanosine (8oxodGuo)**. (biomarqueur des dommages de l'ADN non influencé par l'alimentation et l'apoptose et la durée de conservation de l'échantillon à -20 C° [17]).
- **Nucléosides de l'ARN** : **Guanosine (Guo)** et **8-OxoGuanosine (8oxoGuo)**.
- **Guanine libre et oxydée** : **Guanine (Gua)** et **8-OxoGuanine (8oxoGua)**
- **Biomarqueurs d'effet hématologique** : huit Paramètres de la Formule Numération Sanguine (FNS) : (**globules rouges (GR)**, **globules blancs (GB)**, **hémoglobine (HB)**, **hématocrite (Hct)**, **neutrophiles (Neu)**, **lymphocytes (Lym)**, **monocytes (Mon)**, **plaquettes (Plq)**).
- **Biomarqueurs d'exposition au toluène** : l'Acide S-phénylBenzyl Mercapturique (**S-BMA**) urinaire, un métabolite minoritaire issu de la conjugaison au glutathion pour

estimer le facteur confondant lié à la co-exposition au toluène. La Figure 31 montre la voie de formation du S-BMA dans le métabolisme hépatique du toluène.

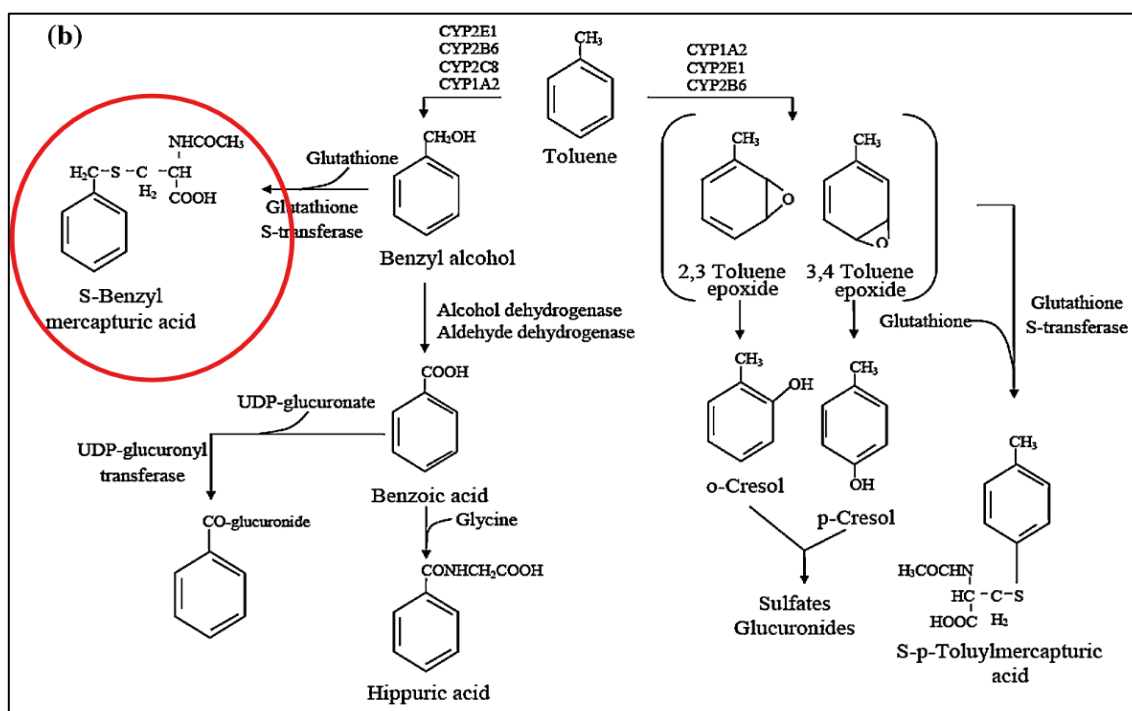


Figure 31: Métabolisme du toluène montrant la voie de formation du S-BMA [138]

- **Biomarqueur d'exposition à la nicotine** : **cotinine** urinaire, métabolite majeur et stable de la nicotine afin d'estimer le facteur confondant lié au tabagisme, qui reflète l'exposition à la nicotine des derniers 36H [115].
- **Biomarqueur de clairance rénale** : Dosage de la **créatinine** urinaire afin d'ajuster les résultats par rapport à la clairance rénale.

I.4. Matériel

I.4.1. Matériel utilise pour le dosage de la créatinine urinaire

- Kit de dosage CYPRESS DIAGNOSTICS[®] conservé entre 2-25C° contenant une solution standard de créatinine aqueux à 2 mg/100mL, réactif 1 (acide picrique 25 mmol/L), réactif 2 (hydroxyde de sodium 0,29 mol/L).
- Spectrophotomètre UV de la marque PRIM[®]
- Matériel général de laboratoire.

I.4.2. Matériel utilise pour le dosage du tt-ma urinaire par HPLC-DAD

I.4.2.1. Réactifs chimiques

Le tableau 11 rassemble les réactifs utilisés pour l'analyse du t,t-MA par HPLC-DAD.

Tableau 11: Réactifs chimiques utilisés pour l'analyse du t,t-MA urinaire par HPLC-DAD

Réactifs	Marque	Pureté
Méthanol qualité HPLC	Fisher chemical	≥ 99,8%
Etalon t,t-MA	Fluka	≥ 97 %
Acide acétique	Panreac	≥ 99,5%

I.4.2.2. Matériel biologique

Un pool d'urine masculine de sujets non-fumeurs a été utilisé pour les essais d'optimisation et de validation de la méthode.

I.4.2.3. Dispositifs

- Cartouche pour extraction en phase solide SPE:
De la marque Thermo Scientific, HyperSep SAX (Strong Anion Exchange), Volume 3 mL, poids du lit 200 mg, porosité 60 Å, composition : Amine quaternaire, surface : 503 m²/g, pH : 7, densité : 0,5 g/cm³.
- Manifold d'extraction sous vide de marque Supelco avec pompe aspirante (SPE Vacuum Manifold).
- Bain Ultrason GENEBRE de la marque ATU.
- Dispositif de filtration des solvants (RESTEK).
- Balance analytique (RADWAG)

- Centrifugeuse (HERAEUS)
- **Autre :** papier pH, verrerie (fioles de différents volumes, béchers, éprouvette, entonnoir), vials à vis (1,5mL), micro-pipettes réglables et fixes (10-100 μ L, 1000 μ L), tubes en verre (15mL), tubes coniques en plastique, filtre membrane en nylon (0,45 μ m de diamètre).

I.4.2.4. Equipement

- Chromatographe en phase liquide à haute performance HPLC, de marque Shimadzu (type *prominence-i* LC-2030C 3D) avec injecteur automatique.
- Détecteur de barrettes de diode (Diode Assay Detection DAD).
- Colonne en phase inverse de marque Shimadzu (shim-pack GIST), type C18, (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m), dotée d'une pré colonne C18 (1 cm x 4,6 mm, 5 μ m).
- Vials à vis de 1,5mL.
- Logiciel d'acquisition des données LabSolutions[®] version 5.87.

I.4.3. Matériel utilise pour le dosage des métabolites et les produits des bases nucléiques par UPLC-MS/MS

I.4.3.1. Réactifs chimiques

Le Tableau 12 rassemble les réactifs utilisés pour le dosage des métabolites et bases oxydées par UPLC-MS/MS.

Tableau 12: Réactifs et étalons utilisés pour les dosages urinaires par UPLC-MS/MS

Réactif	Marque	Pureté
Etalons et étalons internes des métabolites		
t,t-MA, S-PMA, t,t-MA-d4, S-PMA-d2, S-BMA, Cotinine-d3, Cotinine	Sigma-Aldrich (Milan, Italie)	≥98 %
Réactifs chimiques		
Hydroxyde de sodium	Sigma-Aldrich (Milan, Italie)	>99% qualité HPLC
Hydroxyde d'ammonium		
Acide formique		
Peroxyde d'hydrogène		
Méthanol		
Eau de qualité HPLC		
Etalons des bases oxydées et méthylées		
Guanine /8-oxoGuanine/ Guanosine /8-oxoGuanosine/ dGuanosine / 8-oxodGuo / 1-MeGuanine/7-MeGuanine /7-MeGuanosine /Cytosine / 5-MeCytosine / 5-OHMeCytosine Cytidine / 5-MeCytidine / dCytidine et 5-MedCytidine	Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, États-Unis).	≥90 % ≥98 %
Etalons internes des bases oxydées et méthylées		
[¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]Gua [¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]8-oxoGua [¹⁵ N ₅]8-oxodGuo [¹⁵ N ₅]dGuo [¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]Cyto [¹³ C ₅]Cyt 5-MedCyt-d ₃	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, États-Unis).	96–98 %, 96–98 %)
[¹⁵ N ₅]Guo [¹⁵ N ₅]8-oxoGuo	Synthétisé à partir de [¹⁵ N ₅]dGuo Synthétisé à partir de [¹⁵ N ₅]8-oxodGuo	

I.4.3.2. Equipement

- Ultra-High Performance Liquid Chromatography couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem (UPLC-MS/MS)
- Spectromètre de masse API6500+ de SCIEX INSTRUMENTS®.
- Source d'ionisation : IonDrive Turbo V
- Thermo-autosampler et pompe ExionLC (SCIEX)
- Colonne Atlantis dC18 (100×2,0 mm, 3 µm) ; Waters, Milford, MA
- Logiciel d'acquisition des données Analyst® 1.7.0

L'analyse par UPLC-MS/MS de Sciex offre plusieurs avantages, outre une meilleure séparation et un volume d'injection et temps d'analyse réduits, une plage de masse de 5 à 2 000 Da, ce qui le rend adapté à une large gamme de molécules. La **Technologie SelexION+** permet une séparation différentielle des ions pour une meilleure sélectivité. Le **Détecteur IonDrive High Energy Detector+** capture plus d'ions avec une meilleure linéarité et une plage dynamique élargie. Une **commutation de polarité rapide** en seulement 5 millisecondes, ce qui améliore le débit d'analyse.

I.4.4. Matériel utilisé pour l'analyse des données

L'analyse des données a été effectuée à l'aide du programme Statistical Package for Social Sciences IBM® SPSS® Statistics (version 20.0). Le logiciel JASP 0.95.3.0 a été utilisé pour appliquer le test post Hoc de Dunn.

Les diagrammes ont été tracés à l'aide de Excel pour Microsoft 365.

I.5. Démarche méthodologique

I.5.1. Concertation avec les médecins du travail et les employeurs

- Certains médecins de travail chargés du suivi clinique des travailleurs ont été consultés afin d'expliquer l'objectif de l'étude et les modalités de recrutement.
- Le consentement des gérants des pompes à essence et garages mécaniques a été obtenu en premier lieu.
- La restitution des résultats a été faite confidentiellement aux médecins du travail, et aux travailleurs directement s'ils ne sont pas suivis par un médecin du travail.

I.5.2. Consentement éclairé et aspects éthiques

L'étude a été réalisée conformément à la Déclaration d'Helsinki et approuvée par le Comité d'éthique du CHU de Annaba (Annexe I).

Les travailleurs ont été informés verbalement et par écrit en deux langues et ont signé un consentement éclairé (Annexe II) pour la participation à l'étude et l'exploitation anonyme des résultats.

I.5.3. Collecte des informations

Le questionnaire a été validé par une étude préliminaire sur 30 travailleurs aux conditions similaires des sujets de l'étude (employés professionnellement exposés au carburant (agents de maintenance, chauffeurs) et de sexe masculin, des modifications sur la partie des signes cliniques ont été apportées comme suit, et en nous basant sur l'étude de Chaiklieng et al. (2015) [139].

Les réponses ont été renseignées par l'équipe enquêtrice elle-même, en utilisant un dialecte local familier et adapté au niveau de compréhension des participants.

La fiche de renseignements a été divisée en quatre parties (Annexe III).

- **Données sociodémographiques du travailleur :** nom, prénom, âge, numéro de téléphone.
- **Données sur l'état de santé :** Les symptômes indésirables des travailleurs étaient basés sur leurs expériences de symptômes pendant ou après le quart de travail des 6 derniers mois et ont été classés en 5 niveaux :

(1) Sans symptômes, (2) symptômes légers, (3) symptômes modérés, (4) symptômes graves, (5) symptômes chroniques (voir détails en Annexe III).

De plus, il y avait des choix de symptômes à chaque niveau parmi lesquels les travailleurs pouvaient choisir.

- **Informations sur les habitudes :** médicaments en cours, tabagismes, prise d'alcool, prise de fer, aliments pris le jour du prélèvement.

Nous avons considéré comme fumeurs, uniquement les sujets ayant déclaré fumer au moment de l'étude, sans prise en compte des antécédents tabagiques ni le tabac à chiquer.

- **Données sur l'activité professionnelle :** fonction, adresse professionnelle, ancienneté, rythme de travail, solvants utilisés, port des moyens de protection.

Concernant les sujets non exposés, les renseignements ont concerné : la profession, l'âge, l'ancienneté, tabagisme et une éventuelle clinique

I.5.4. Echantillonnage

- **Echantillonnage urinaire :**
- **Nombre total :** 241 échantillons urinaires ont été collectés entre sujets exposés (AV et AP) et sujets non exposés.
- **Période :** l'ensemble des échantillons a été réalisé durant une période chaude, entre juillet et octobre 2024, où la température moyenne à Annaba était de 28°C (avec un maximum de 35°C). Cela est crucial pour l'exposition au benzène, qui est volatile, afin d'assurer l'homogénéité et la comparabilité des résultats.
- **Moment du prélèvement :**

Chez les sujets non exposés, travaillant 5 jours par semaine, uniquement les urines de fin de semaine ont été collectées, en considérant que l'exposition avant-poste et fin de poste est similaire.

Chez les sujets exposés, des échantillons urinaires ont été collectés en deux temps, avant (AV) et après (AP) poste.

Le moment du prélèvement variait en fonction du rythme de travail

- Pour les travailleurs ayant un rythme de 5 jours/ semaine, les prélèvements sont effectués en début de semaine et en fin de semaine ;
- Pour les travailleurs ayant un rythme de 12H, 24H, 48H, les prélèvements étaient effectués avant le début du travail et immédiatement à la fin du travail.
- **Contenant :** les urines sont recueillies dans un pot en polypropylène
- **Acheminement :** dans une glacière et immédiatement transportées au laboratoire de toxicologie. Les échantillons analysés à Parme (Italie) ont été acheminés dans des conditions optimales dans du carboglace.
- **Prétraitement**
 - Les urines sont centrifugées pour éliminer tout dépôt protéique ou autre.
 - Ensuite divisées en 4 aliquotes, un pour l'analyse de la créatinine, un pour l'analyse du t,t-MA par HPLC-DAD, un pour l'analyse des métabolites par UPLC-MS/MS, un pour l'analyse des bases oxydées par UPLC-MS/MS.

- Pour l'analyse du t,t-MA par HPLC-DAD, le pH des urines doit être entre 6 et 7, si elles sont acides, nous ajustons avec du NaOH 6N.
- **Conservation** : conservées à – 20 C° jusqu'à analyse.
- **Précautions** : les travailleurs ont reçu pour consigne de ne pas fumer 2 heures avant l'échantillonnage et ne pas prendre des jus industriels car cela pourrait fausser positivement les résultats à cause du sorbitol contenu dans ces boissons et qui est métabolisé en t,t-MA.
- **Echantillonnage sanguin** :
 - Les travailleurs ayant accepté de faire un prélèvement sanguin dans le but d'effectuer les FNS sont au nombre de 37.
 - Prélèvement sur le lieu du travail, sur tube EDTA, mis dans une glacière et acheminé directement au laboratoire pour analyse immédiate.

I.5.5. Analyse de la créatinine urinaire

La clairance de la créatinine sur 24 heures est une mesure de la fonction rénale. En revanche la créatinine urinaire des échantillons ponctuels d'urine permet de s'adapter correctement aux variations de concentration dues aux différences d'apport hydrique entre les travailleurs.

Elle permet l'appréciation de la concentration (supérieure à 3 g/L) ou de la dilution de l'urine (inférieure à 0,3 g/L), en conséquent, les échantillons avec une valeur de la créatinine supérieure à 3 g/L ou inférieure à 0,3 g/L ont été exclus de l'étude selon les recommandations de l'ACGIH [32].

Les résultats des métabolites et produits d'oxydation des acides et bases nucléiques sont exprimés en µg/g de créatinine.

La créatinine de tous les échantillons d'urine ponctuels a été mesurée par la méthode manuelle de Jaffé.

La mesure de l'absorbance se fait à 510 nm pour le standard et l'échantillon dilué (1/50) en deux temps ; à la 30^{ème} seconde et à la 90^{ème} seconde.

La créatinine est calculée par la formule suivante après conversion de l'unité du standard (du mg/dL au g/L et prise en compte du facteur de dilution (50) :

$$\text{Créatinine Ur (g/L)} = \frac{\Delta \text{Abs Echantillon}}{\Delta \text{Abs Standard}}$$

ΔAbs : différence d'absorbance

Le Tableau 13 présente le protocole de dosage de la créatinine urinaire utilisé.

Tableau 13 : Protocole de dosage de la créatinine urinaire

	Standard (créatinine aqueux 2mg/dl)	Echantillon dilué (1/50)
Standard	100 µL	/
Echantillon	/	100 µL
Solution de travail	1000 µL	1000 µL

I.5.6. Analyse t,t-MA urinaire par HPLC-DAD

Cette méthode a été optimisée et validée au niveau du laboratoire de toxicologie du CHU Ibn Sina à Annaba.

I.5.6.1. Préparation des solutions

- **Phase mobile** : dans une fiole ombrée de 1L, mettre 300mL de méthanol et 10mL d'acide acétique et jauger jusqu'à 1000mL avec de l'eau distillée filtrée, homogénéiser et dégazer au bain ultrason pendant avant chaque utilisation.
- **Solution mère du t,t-MA (SM) (1 g/L)** : peser 10 mg de t,t-MA étalon et dissoudre dans qsp 10mL de méthanol à l'aide d'une fiole ombrée ensuite au bain ultrason pour une dissolution optimale. La solution peut être conservée jusqu'à 6 mois à -20 C°. Deux SM différentes sont préparées, une pour la gamme d'étalonnage et une pour les standards de validation (SV).
- **Solution fille de t,t-MA (SF) (20 ppm)** : dilution de la SM au 1/50 dans l'eau distillée QSP 5 ml. Solution préparée chaque jour. Les SF de la gamme d'étalonnage et des SV sont différentes.
- **Gamme d'étalonnage**

En vue de la présence d'un effet matrice positif, la gamme d'étalonnage a été directement préparée dans la matrice (préalablement testée pour l'absence de pic de t,t-MA).

05 tubes ont été remplis par 2 mL d'urine vierge, ensuite le volume d'urine correspondant à la SF est prélevé, jeté et remplacé par la SF.

Le tableau 14 présente le protocole de préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage du t,t-MA par HPLC-DAD.

Tableau 14: Protocole de préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage du t,t-MA par HPLC-DAD

Concentration	0,3 ppm	0,6 ppm	0,8 ppm	2 ppm	3 ppm
SF 20 mg/L	30 µL	60 µL	80 µL	200 µL	300 µL
Urine vierge	QSP 2mL				

- **Standards de validation (SV)** : des concentrations faible, moyenne et élevée et différentes des points de la gamme d'étalonnage ont été choisies comme SV, à savoir les points, 0,4 ppm, 1 ppm et 2,5 ppm et préparés de la même manière que la gamme d'étalonnage.

I.5.6.2. Optimisation de l'extraction en phase solide SPE et des paramètres chromatographiques

L'optimisation a concerné principalement le pH des urines et la concentration de la solution de lavage par l'acide acétique.

En suivant les protocoles de Shahtaheri et al. (2005) [140] qui indiquent une alcalinisation préalable des urines pour l'usage des cartouches SAX, aucun pic n'a été détecté au pH alcalin. L'analyse du liquide du dépôt a révélé la présence du t,t-MA non fixé.

Le test avec des urines à pH non ajusté (pH entre 6-7) comme le protocole de Geraldino et al. 2020 [141] a conduit à la fixation du t,t-MA sur la résine (vérification par l'analyse du liquide de dépôt).

La centrifugation améliore le rendement (moins de risque d'obturation des pores).

Pour la solution de lavage, plusieurs protocoles [29,141,142] suggèrent l'acide acétique à 1%, pour nous cela a conduit au relargage du t,t-MA par la résine (absence de pic dans le liquide de l'élution et présence du pic de t,t-MA dans le liquide du lavage). Nous avons pensé à un compromis qui assure un bon lavage de la colonne d'extraction sans provoquer le relargage du t,t-MA. Une plus faible concentration d'acide acétique 0,5% a été utilisée avec débit semi rapide a abouti au non-relargage du t,t-MA dans l'étape du lavage.

Pour le solvant de l'élution (acide acétique), nous avons testé les concentrations 20% comme Olmos et al. (2006) [143], et la concentration 10% comme la plupart des études [140–142] et cette dernière a été retenue.

Plusieurs ajustements ont été réalisés pour l'analyse chromatographique (phase mobile, débit et température du four) afin d'améliorer la résolution entre le pic du t,t-MA et les composés urinaires ou pour réduire le temps d'analyse.

Nous avons opté pour une phase mobile préparé dans un seul flacon composé de eau :méthanol :acide acétique comme recommandé dans plusieurs études, mais les proportions proposées par Shahtaheri et al [140] ont été retenues (69 :30 :1).

Un débit de 1,5 ml/min et une température du four à 25C° ont donné un temps de rétention de 13,4 min, l'augmentation de la température à 30C° et l'abaissement du débit à 1ml/min ont conclu à un temps de rétention de 6,4 min et une bonne résolution.

Un volume d'injection de 20µL a donné des signaux faibles, tandis qu'un volume d'injection de 100 µL a donné un meilleur compromis entre signal et forme du pic.

Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de la méthode a aussi été évalué à trois niveaux de concentrations (0,5, 1 et 2 ppm). Des urines vierges (testées au préalable) sont chargées par la quantité correspondante, ensuite extraites. La quantité d'analyte mesurée dans l'extrait, est rapportée à celle donnée par un éluat de blanc matrice chargé après extraction renfermant la même quantité.

Le rendement d'extraction est ensuite calculé selon la formule :

$$R (\%) = \frac{\text{Hauteur du pic avec extraction}}{\text{Hauteur du pic sans extraction}} \times 100$$

Le Tableau 15 présente les calculs du rendement d'extraction sur trois concentrations différentes (0,5, 1 et 2 mg/L).

Tableau 15: Mesure du rendement d'extraction

Niveau (mg/L)	Réponse sans extraction (Hauteur)	Réponse avec extraction Hauteur 1 ^{ère} mesure	R % 1 ^{ère} mesure	Réponse avec extraction Hauteur 2 ^{ème} mesure	R % 2 ^{ème} mesure	Moyenne du rendement %
0,5	38553	37397	97%	38967	101%	99%
1	44 181	43298	98%	45801	103 %	100,5%
2	76 084	73041	96%	75460	99%	97,5%

Les écarts entre les deux mesures restent faibles, témoignant d'une bonne reproductibilité. Le rendement moyen est supérieur à 97 % pour tous les niveaux, ce qui indique une efficacité d'extraction satisfaisante sur l'ensemble des concentrations testées.

I.5.6.3. Protocole d'extraction par SPE

Les conditions finales retenues après optimisation du protocole d'extraction en phase solide sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16: Protocole d'extraction en phase solide du t,t-MA urinaire

1- Conditionnement	1 mL eau distillée
(Débit : 1 goutte /seconde)	1 mL méthanol
2- Dépôt (Débit le plus lent possible)	1 mL d'échantillon
3- Lavage (Débit 1 goutte / seconde)	1 mL acide acétique 0,5 %
4- Elution (Débit plus lent possible)	1mL acide acétique 10 %

I.5.6.4. Paramètres chromatographiques

Les paramètres chromatographiques retenus sont présentés dans le Tableau 17:

Tableau 17: Paramètres chromatographiques de la méthode de dosage du t,t-MA urinaire par HPLC-DAD

Phase mobile	Eau : Méthanol : Acide acétique (69v :30v : 1v)
Température du four	30 C°
Débit	1 mL/min
Longueur d'onde	264 nm
Volume d'injection	100 µl
Mode	Isocratique
Temps d'analyse	10 minutes
Temps de rétention	6,4 min
Gamme d'étalonnage	0,3 - 0,6 – 0,8- 2 – 3 mg/ L
Rendement d'extraction	97-100%

La Figure 32 montre un pic du t,t-MA concentré à 3 mg/L préparé dans l'eau.

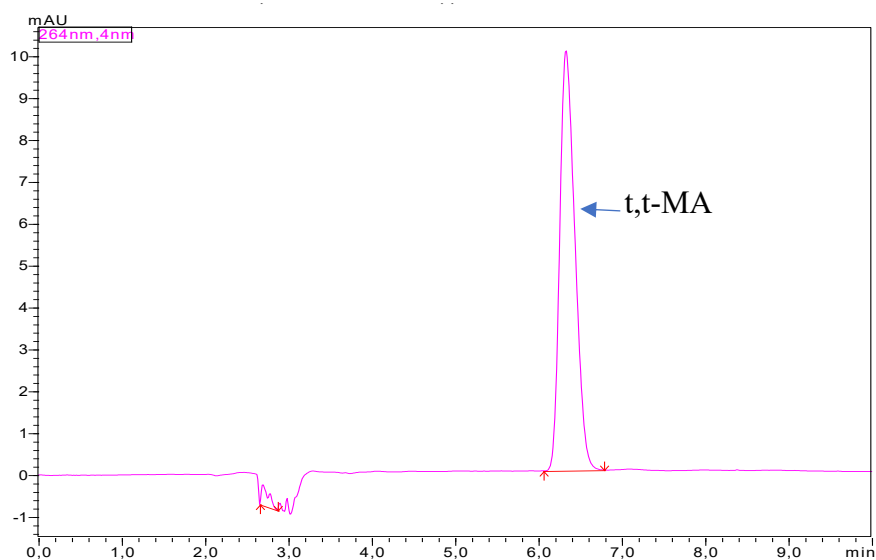


Figure 32: Pic t,t-MA 3 mg/L dans l'eau

La Figure 33 montre un pic du t,t-MA dans la matrice concentré à 1 mg/L et son spectre à 264 nm.

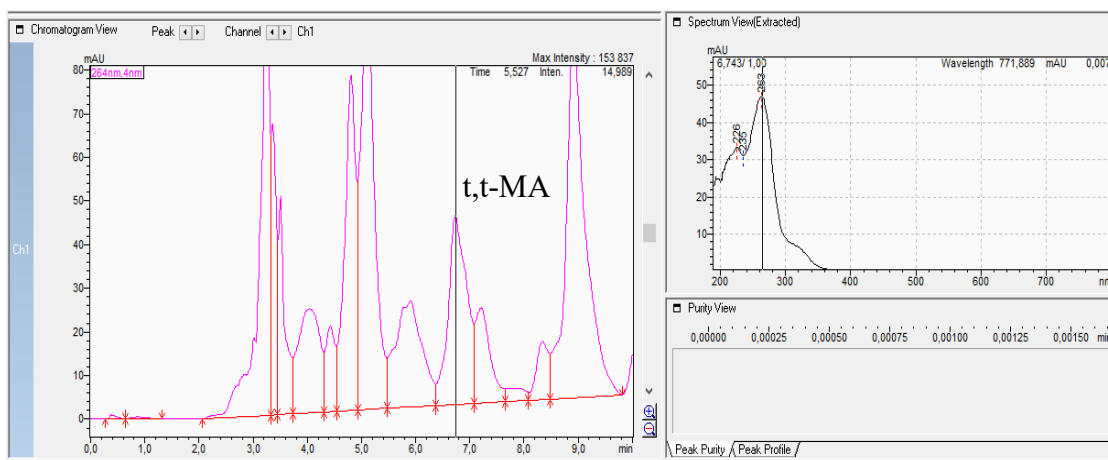


Figure 33 : Chromatogramme du point 1 mg/L dans les urines après extraction (spectre du t,t-MA à droite)

La Figure 34 montre un pic du t,t-MA dans la matrice concentré à 0,8 mg/L.

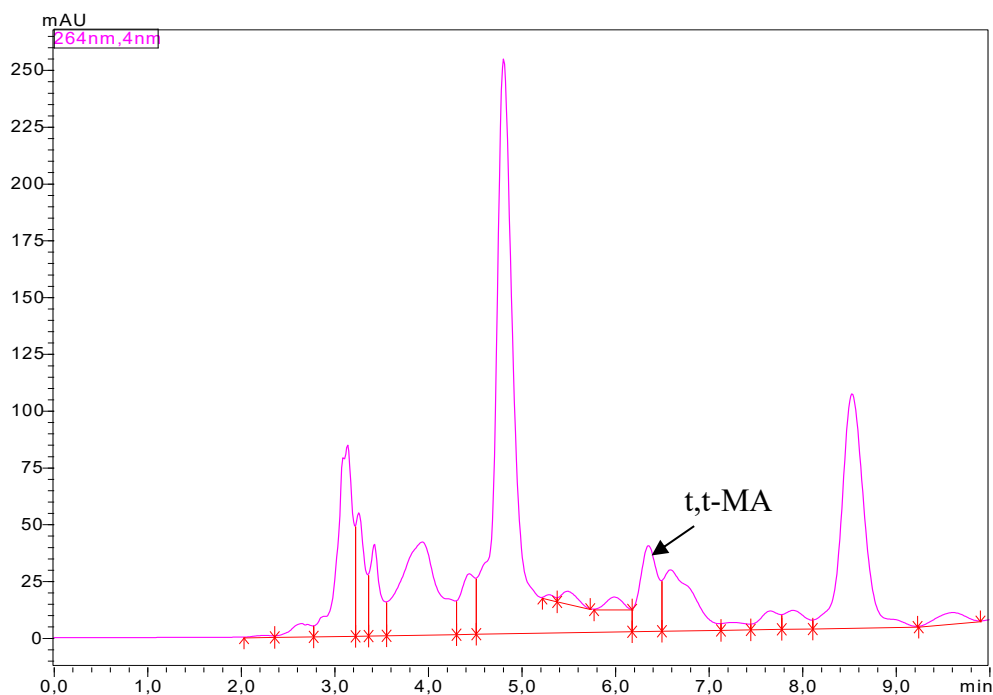


Figure 34: : Chromatogramme du point 0,8 mg/L dans les urines après extraction

La Figure 35 montre un pic du t,t-MA dans la matrice concentré à 2 mg/L.

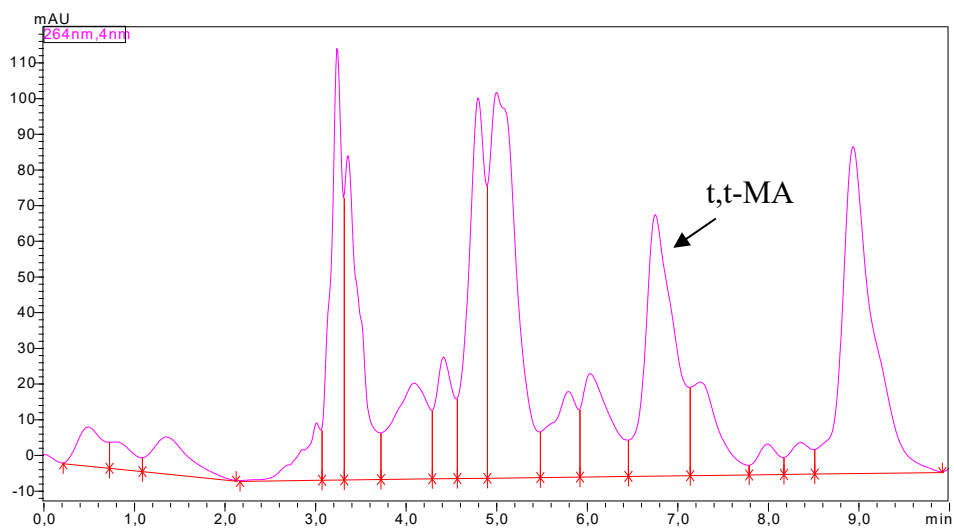


Figure 35: Chromatogramme du point 2 ppm dans les urines après extraction

I.5.7. Analyse simultanée de S-PMA, t,t-MA et S-BMA par UPLC-MS/MS

Cette méthode a été optimisée et validée au niveau du laboratoire de toxicologie industrielle de l'université de Parme - Italie par l'équipe du Pr ANDREOLI R.

I.5.7.1. Préparation des solutions et prétraitement de l'échantillon

- Les concentrations des différentes solutions mère sont les suivantes : t,t-MA (1780 mg/L), S-PMA (25 mg/L), S-BMA (50 mg/L), t,t-MA-d4 (1810 mg/L), S-PMA-d2 (10 mg/L) préparées dans le méthanol.
- Des solutions filles sont préparées dans l'acide formique et des mixtures des étalons aux différentes concentrations de la gamme d'étalonnage sont préparées directement dans les vials pour une QSP de 1mL d'acide formique.
- L'échantillon est juste centrifugé à 10000 g pendant 5 min, ensuite 50µL d'urine filtrée est ajouté à 150µL de mixture aqueuse d'étalons internes est directement analysé.

I.5.7.2. Paramètres chromatographiques et de masse

Le **Tableau 18** regroupe les paramètres chromatographiques et de masse de la méthode d'analyse des métabolites par UPLC-MS/MS.

Tableau 18: Paramètres chromatographiques et de masse de l'analyse des métabolites

Phase mobile	A : Acide formique 10mM (pH=3,75) dans l'ammoniaque B : Méthanol				
Température du four	40 C°				
Débit	0,3 mL/min				
Ionisation	Négative (Electrospray)				
Volume d'injection	1µL				
Mode	Gradient				
Gradient	Temps (min)	% phase mobile			
	1	A : 100%			
	3 - 4	A : 90 % B : 10 %			
	6,5	A : 10 % B : 90 %			
	6,5 – 9,9	A : 10 % B : 90 %			
	10	A : 100%			
	14	A : 100%			
Temps d'analyse	14 min				
Temps de rétention (min)	t_r t,t-MA=4,72 ; t_r S-PMA=7,06 ; t_r S-BMA= 7,96				
Type de scan	MRM				
Température de la source	500 C°				
Paramètres masse	t,t-MA	t,t-MA-d4	S-PMA	S-PMA-d2	S-BMA
Q1 (Da)	141	145	237,9	240	252
Q3 (Da)	97	101	109	109	123
DP	-38	-38	-50	-50	-50
EP	-5	-5	-10	-10	-10
CE	-11	-11	-16	-16	-16
Dwell time (msec)	80	50	80	50	40
CXP	-6	-6	-8	-8	-8

Q1 : Premier Quadripole Q3 : 3^{ème} Quadripole DP :Declustering Potential EP : Entrance Potential CE : Collision Energy Dwell time : temps de séjour CXP : Cell Collision Exit Potential MRM : Multiple Reaction Monitoring

Le Tableau 19 récapitule les transitions des différents métabolites.

Tableau 19: Transitions des composés et leurs étalons internes (EI)

Composé	Transition (m/z)	EI	Transition (m/z)
S-PMA	238→109	S-PMA-d ₂	240→109
<i>t,t</i>-MA	141→97	<i>t,t</i> -MA-d ₄	145→101
S-BMA	252→123	S-PMA-d ₂	

La Figure 36 montre l'extraction de la transition du S-PMA au temps de rétention 7,06 min.

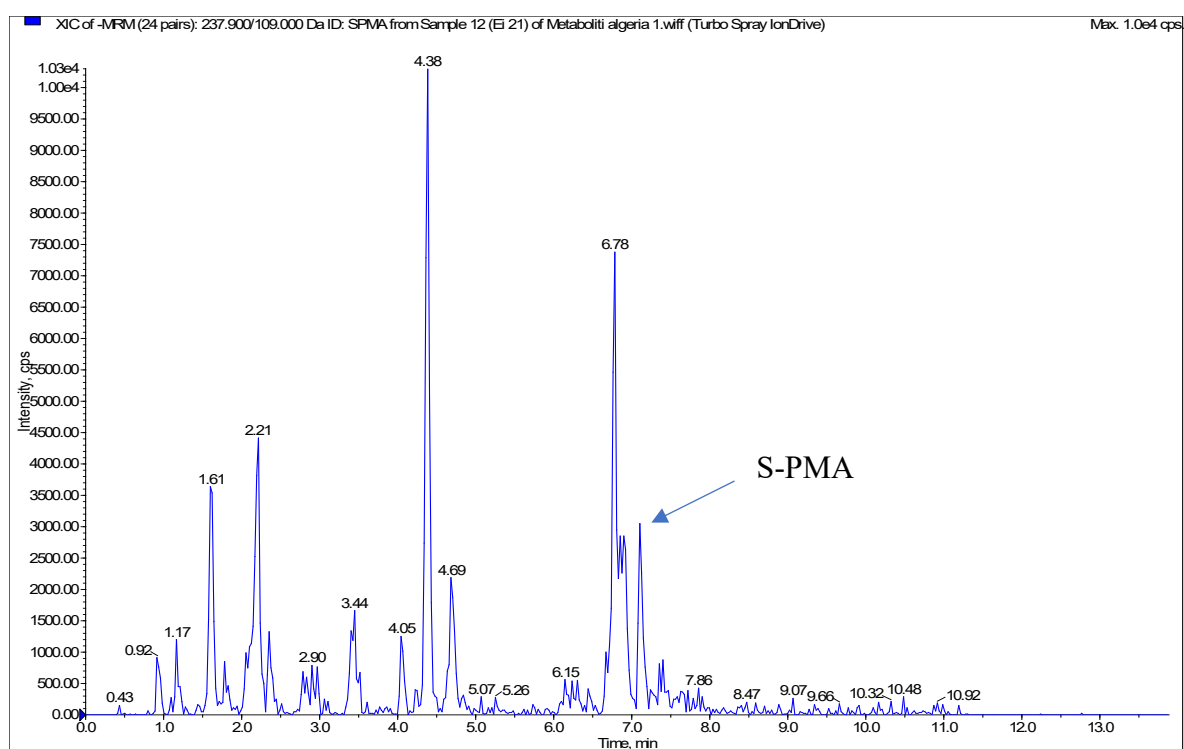


Figure 36: Extraction de la transition du S-PMA (tr=7,06 min)

La figure 37 montre l'extraction de la transition de l'étalon interne S-PMA-d2.

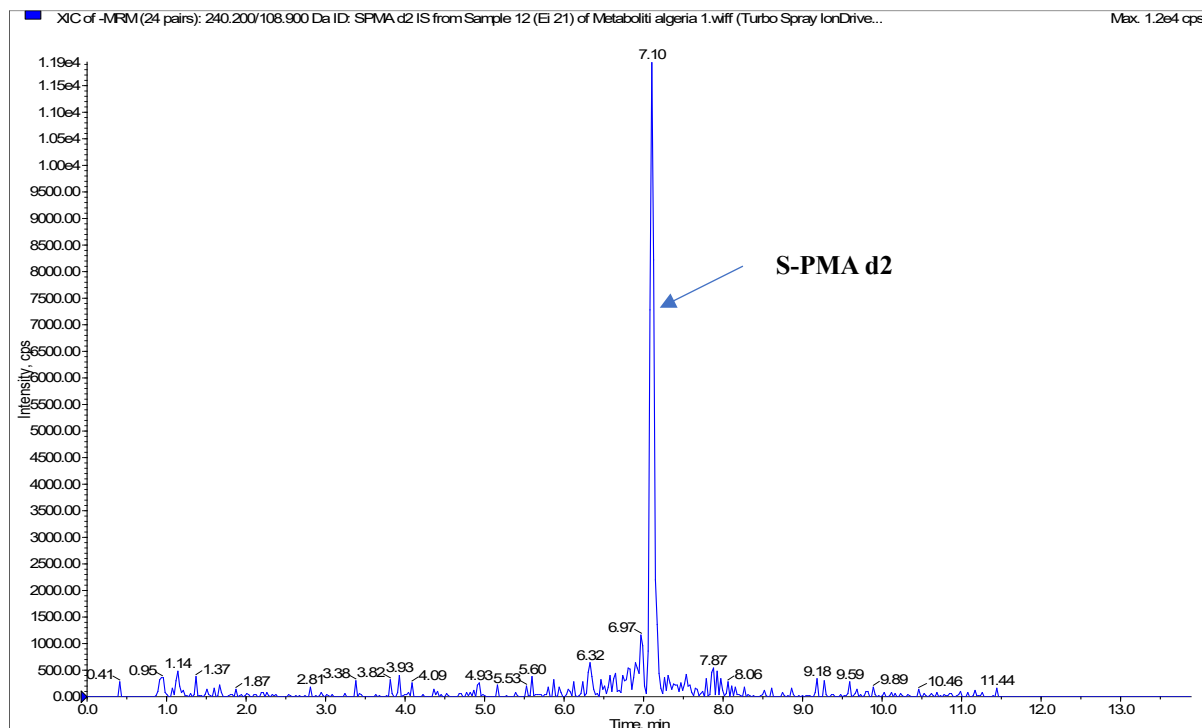


Figure 37: Extraction de la transition de l'étalon interne S-PMA-d2

La figure 38 montre l'extraction de la transition du t,t-MA au temps de rétention 4,7 min.

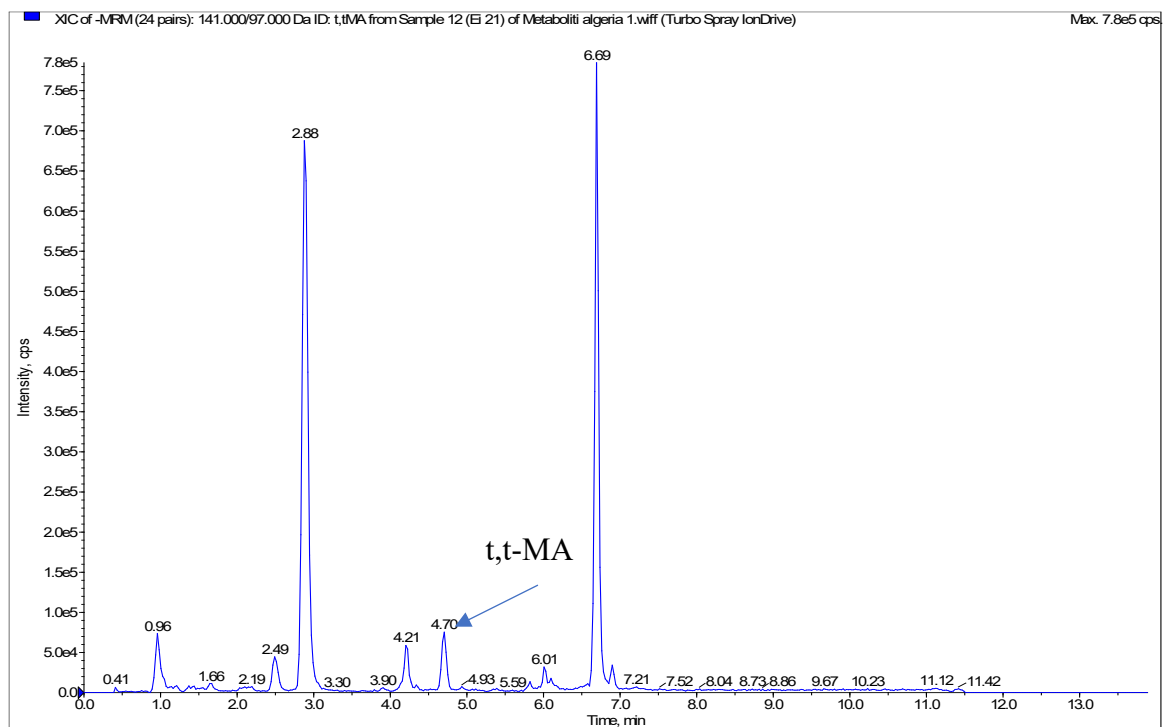


Figure 38: Extraction de la transition du t,t-MA (tr=4,70 min)

La figure 39 montre l'extraction de la transition du t,t-MA-d4.

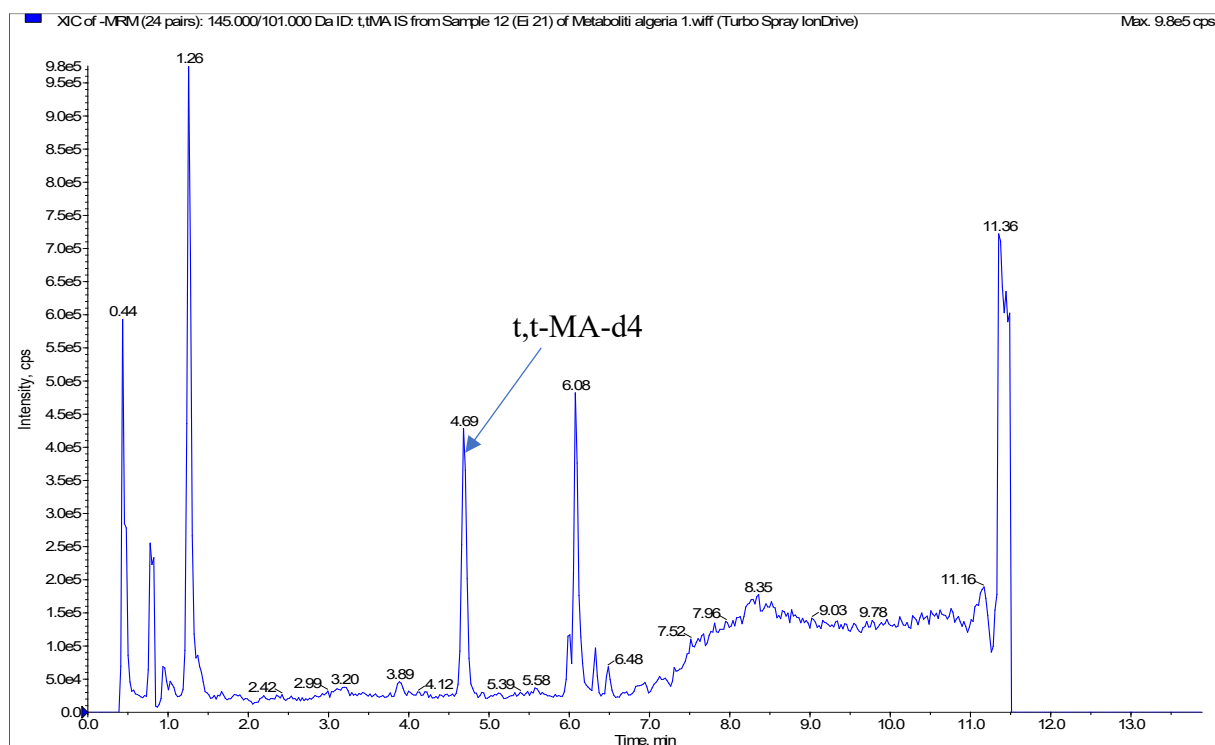


Figure 39: Extraction de la transition de l'étalon interne du t,t-MA-d4

I.5.7.3. Paramètres de validation

Étant donné de l'impossibilité de trouver des urines à 100% vierges, les limites de détection et de quantification ont été calculées dans l'eau.

Les essais de répétabilité (CV% intra-jour) et de fidélité intermédiaire (CV % inter-jours) ont été réalisés sur 6 injections d'échantillons de pool urinaire chargé par la valeur moyenne de la courbe d'étalonnage. La fidélité intermédiaire a été calculée sur 6 jours.

Le tableau 20 regroupe les LD, LQ et CV du t,t-MA, S-PMA et S-BMA.

Tableau 20: Résultats de validation de la méthode analytique pour t,t-MA, S-PMA et S-BMA

Composé	LD	LQ	Intervalle	R ²	CV%	CV%	Exactitude
	(µg/L)	(µg/L)			Intra-jour	inter-jour	
S-PMA	0.05	0.18	1.00-10.0	0,999	6.27	7.12	95.9
t,t-MA	0.80	2.66	200-2000	0,998	3.11	3.19	110
S-BMA	0.03	0.08	10.0-100	0,999	6.27	7.12	98.2

Les courbes d'étalonnage ont été construites par analyse de régression linéaire du rapport entre l'aire de l'analyte et l'EI par rapport à la concentration connue d'analytes injectés.

I.5.8. Analyse simultanée des produits d'oxydation et de méthylation des acides nucléiques et la cotinine par UPLC-MS/MS

I.5.8.1. Préparation des solutions

Selon la méthode de Andreoli et al. 2010 [125].

- Des SM concentrées à 10 mM de la Gua et 8-oxoGua ont été préparées dans du NaOH (126 mM), celle de 8-oxoGuo et 8-oxodGuo dans le DMSO (Diméthyl Sulphoxyde) et la dGuo préparée dans de l'eau distillée. Toutes stockées à -20 C°.
- Les mêmes solvants ont été utilisés pour la préparation des EI.
- Toutes les solutions sont stables durant plus que 6 mois (à l'exception de la 8-oxoGua). En raison de son instabilité, la solution mère de 8-oxoGua a été préparée chaque semaine, stockée à +4°C et sa concentration (0,5-5 µM dans 10 mM NaOH) a été déterminée avec précision par spectrométrie UV ($\lambda_{\max} = 283 \text{ nm}$, $\varepsilon = 8200$) immédiatement avant utilisation.
- Une solution de travail fraîche contenant du Gua (75 µM), du 8-oxoGua (45 µM), du Guo (5 µM), du 8-oxoGuo (2,5 µM), du dGuo (0,8 µM) et du 8-oxodGuo (0,8 µM) a été préparée quotidiennement dans de l'eau. De même pour les solutions des étalons internes.

I.5.8.2. Courbe d'étalonnage et préparation des échantillons

Méthode de Andreoli et al. (2010) [125].

- Les courbes d'étalonnage sur matrice ont été réalisées avec des mixtures d'étalons à cinq niveaux de concentrations.
- Chaque niveau d'étalonnage a été injecté en trois fois. Les courbes d'étalonnage ont été tracées par analyse de régression linéaire des rapports de surface analyte/EI en fonction de la concentration des analytes injectés.
- Étant donné qu'il n'existe pas d'échantillon d'urine « vierge », les limites de détection (LD) et les limites de quantification (LQ) de tous les analytes, à l'exception du 8-oxoGuo, ont été déterminées dans la matrice en additionnant les étalons isotopiques, et ont été calculées à l'aide d'un critère de rapport signal/bruit (S/N) = 3 pour les LD et S/N = 10 pour les LQ. Notons qu'il n'y a pas d'effet matrice pour cette méthode.
- En raison de l'absence de l'étalon interne, la LD et la LQ du 8-oxoGuo ont été déterminées dans l'eau. La précision intra et inter-journalière a été calculée à trois niveaux de concentration (correspondant à la valeur inférieure, supérieure et 10 fois inférieure des plages d'étalonnage) injectés 6 fois le même jour et durant cinq jours différents.
- **Préparation de l'échantillon :**
- L'urine a été décongelée et ajoutée à un volume égal d'une solution aqueuse contenant différentes concentrations d'EI.
- Pour redissoudre un éventuel précipité contenant les analytes, l'échantillon a été maintenu à 37 °C pendant 10 min, puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Cette procédure libère du 8-oxoGua et du 8-oxodGuo du précipité.
- Des échantillons filtrés (0,2 mL) ont été ajoutés avec un volume égal de mélange aqueux EI contenant 160 pmol/mL de [15N5] 8-oxodGuo, 500 pmol/mL de [15N5] Guo comme EI pour le 8-oxoGuo, 4 nmol/mL de [13C1, 15N2]8-oxoGua et 800 pmol/mL de cotinine-d3 puis injectés (2 µl).
- Les concentrations de métabolites urinaires ont été exprimées en fonction de la concentration de créatinine (µg/g créatinine).

I.5.8.3. Paramètres chromatographiques et de spectrométrie de masse

Le tableau 21 regroupe les paramètres chromatographiques de la méthode de l'analyse des bases oxydées et méthylée ainsi que la cotinine.

Tableau 21: Paramètres chromatographiques de l'analyse des bases oxydées et méthylées et la cotinine

Phase mobile	A: 10 mM Acide formique (pH 3,75) B: méthanol	
Température du four	40 C°	
Débit	0,3 mL/ min	
Ionisation	Positive (Electrospray)	
Volume d'injection	2 µL	
Mode	Gradient	
Gradient	Temps (min)	% phase mobile
	6	100% A
	11-12	90% A 10% B
	15 -17	10% A 90% B
	17-20	100% A
Temps d'analyse	20 min	
Type de scan	SRM (Selected Reaction Monitoring)	
Température de la source	450 C°	

Le tableau 22 regroupe les paramètres de spectrométrie de masse de la méthode de l'analyse des bases oxydées et méthylée ainsi que la cotinine.

Tableau 22: Paramètres de spectrométrie de masse de l'analyse des bases oxydées, méthylées et la cotinine

Paramètres masse	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP	CE	Dwell (msec)
Gua	152	135	60	25	30
Gua EI	155	138	40	25	30
8oxoGua	168	140	30	23	30
8oxoGua EI	1711	142	30	23	30
Cyto	111	69	70	25	30
Cyto EI	115	70	70	25	30
5MeCyto	125	83	30	27	30
Cyt	244	112	30	18	30
Cyt EI	249	112	30	18	30
5MeCyt	258	126	30	35	30
dCyt	227,9	112	30	18	30
5MedCyt	242	126	30	35	30
5MedCyt EI	245	129	30	18	30
7MeGua	166	149	30	35	30
1MeGua	166	135	30	35	30
7MeGuo	298	166	30	35	30
5OHMeCyto	141	124	45	15	30
5OHMedCyto	258	142	30	15	30
Guo	284	152	45	18	30
Guo EI	289	157	45	18	30
8oxoGuo	300	168	60	18	30
8oxoGuo EI	305	173	60	18	30
dGuo	268	152	40	18	30
dGuo EI	273	157	40	18	30
8oxodGuo	284	168	60	18	30
8oxodGuo EI	289	173	60	18	30
Cot	177	80	60	30	30
Cot EI	180	101	60	30	30

Q1 : Premier Quadripole Q3 : 3^{ème} Quadripole DP :Declustering Potential CE : Collision Energy Dwell time : temps de séjour

I.5.8.4. Différentes transitions et temps de rétention

Le tableau 23 regroupe les transitions des bases oxydées, méthylées et leurs étalons internes.

Tableau 23: Transitions et temps de rétention pour chaque base, nucléoside et étalon interne

Composé	Transition (<i>m/z</i>)	<i>t_r</i> (min)	ET	Transition (<i>m/z</i>)
Gua	152→135	2,28	[¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]Gua	155→138
8-oxoGua	168→140	2,65	[¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]8-oxoGua	171→142
Guo	284→152	8,06	[¹⁵ N ₅]Guo	289→157
8-oxoGuo	300→168	9,28	[¹⁵ N ₅]8-oxoGuo	305→173
dGuo	268→152	9,88	[¹⁵ N ₅]dGuo	273→157
8-oxodGuo	284→168	11,58	[¹⁵ N ₅]8-oxodGuo	289→173
1-MeGua	166→135	4,87	[¹³ C ₁]Gua	153→111
7-MeGua	166→149	5,49	[¹³ C ₁]Gua	153→111
7-MeGuo	298→166	6,02	[¹⁵ N ₅]Guo	
Cyto	112→69	1,03	[¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]Cyto	115→70
5-MeCyto	126→83	1,48	[¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]Cyto	
5-OHMeCyto	142→124	1,03	[¹³ C ₁ , ¹⁵ N ₂]Cyto	
Cyt	244→112	1,98	[¹³ C ₅]Cyt	249→112
5-MeCyt	258→126	4,09	[¹³ C ₅]Cyt	
dCyt	228→112	2,78	5-MedCyt-d ₃	
5-MedCyt	242→126	6,03	5-MedCyt-d ₃	245→129
5-OHMedCyt	258→142	8,28	5-MedCyt-d ₃	
Cot	177→80	13,6	Cot-d ₃	180→101

I.5.8.5. Paramètres de validation

Étant donné de l'impossibilité de trouver des urines à 100% vierges, les limites de détection et de quantification ont été calculées dans l'eau.

Les essais de répétabilité (CV% intra-jour) et de fidélité intermédiaire (CV % inter-jours) ont été réalisés sur 6 injections d'échantillons de pool urinaire chargé par la valeur moyenne de la courbe d'étalonnage. La fidélité intermédiaire a été calculée sur 6 jours.

Le tableau 24 regroupe les paramètres de validation.

Tableau 24: Paramètres de validation des différentes bases et nucléosides oxydées et méthylées

Composé	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Intervalle (µg/L)	CV% intra- jour	CV% inter- jour	Exactitude %
Gua	0,47	1,56	15-1500	1,91	3,31	97,4
8-oxoGua	0,31	1,02	10-1000	1,31	1,64	94,2
Guo	0,07	0,23	10-1000	1,17	5,63	93,7
8-oxoGuo	0,03	0,11	1-100	1,44	2,30	92,8
dGuo	0,03	0,09	0,20-20	3,00	3,29	99,2
8-oxodGuo	0,04	0,14	0,20-20	2,56	2,28	95,5
1-MeGua	0,02	0,08	5-500	2,00	3,41	87,3
7-MeGua	0,27	0,89	100-10000	1,83	3,11	107
7-MeGuo	0,03	0,10	5-500	3,31	4,23	113
Cyto	0,56	1,87	10-1000	4,44	6,49	95,7
5-MeCyto	0,13	0,45	5-500	3,64	5,29	86,5
5-OHMeCyto	0,16	0,54	1-100	4,13	6,09	93,1
Cyt	0,23	0,76	10-1000	1,77	3,58	90,3
5-MeCyt	0,01	0,05	1-100	1,90	3,45	93,6
dCyt	0,02	0,06	0,20-20	1,56	2,79	91,9
5-MedCyt	0,01	0,04	1-100	1,56	2,79	91,9
5-OHMedCyt	0,01	0,02	0,20-20	1,82	2,86	84,7
Cot	0,003	0,008	10-1000	1,54	5,57	91,9

La figure 40 montre Chromatogramme du niveau 3 de la gamme d'étalonnage d'une urine chargée avec une mixture d'étalons et étalons internes.

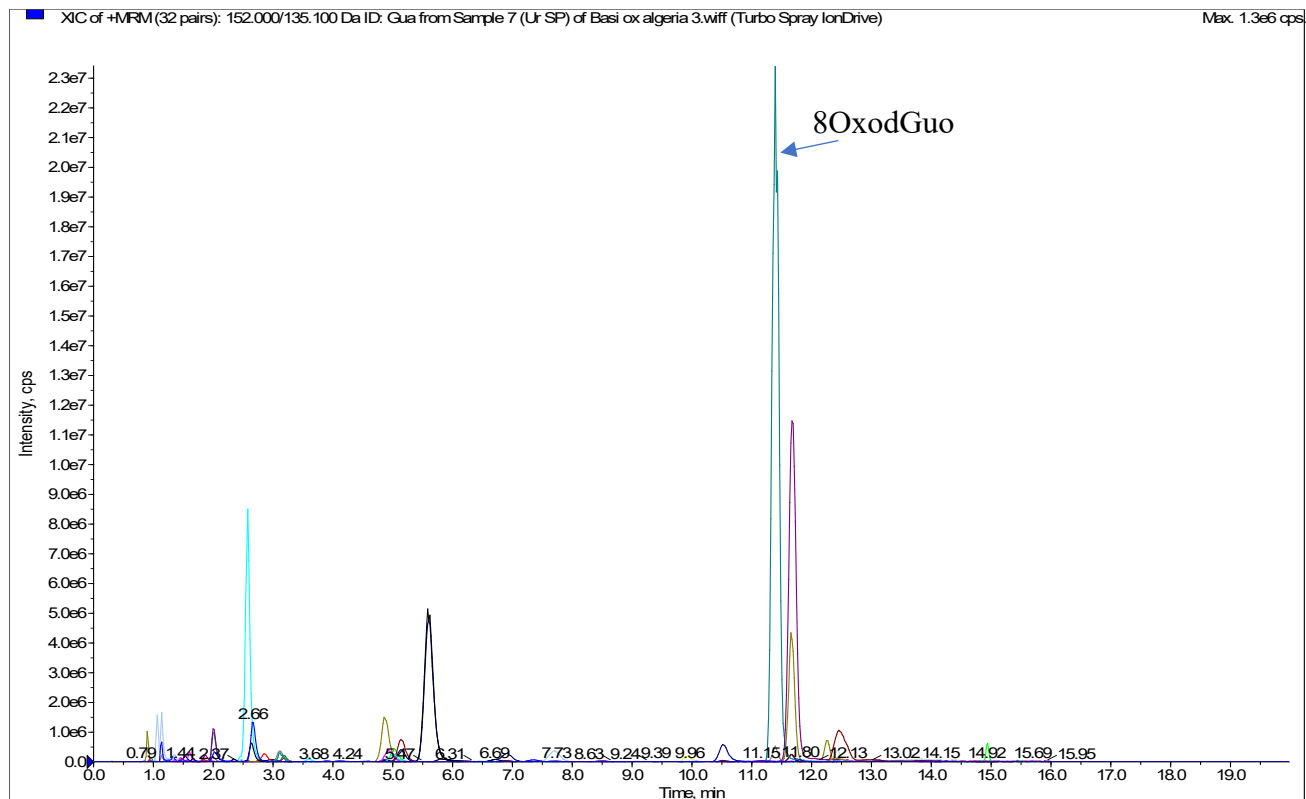


Figure 40: Chromatogramme du niveau 3 de la gamme d'étalonnage d'une urine chargée avec une mixture d'étalons et étalon internes

I.5.9. Recueil du bilan hémobiologique (formule numération sanguine)

Les travailleurs ainsi que les sujets non exposés ont été priés de fournir un bilan FNS récents.

102 bilans sur 141 ont pu être collectés (65 chez les exposés et 37 chez les non exposés).

Nous avons réalisé par nous même 37 bilans de sujets exposés ayant accepté d'être prélevé sur place (pompe à essence).

I.5.10. Diagramme de flux récapitulatif des paramètres analysés

La Figure 41 représente un diagramme détaillé illustrant l'ensemble de la démarche méthodologique ainsi que les biomarqueurs analysés au cours de la présente étude.

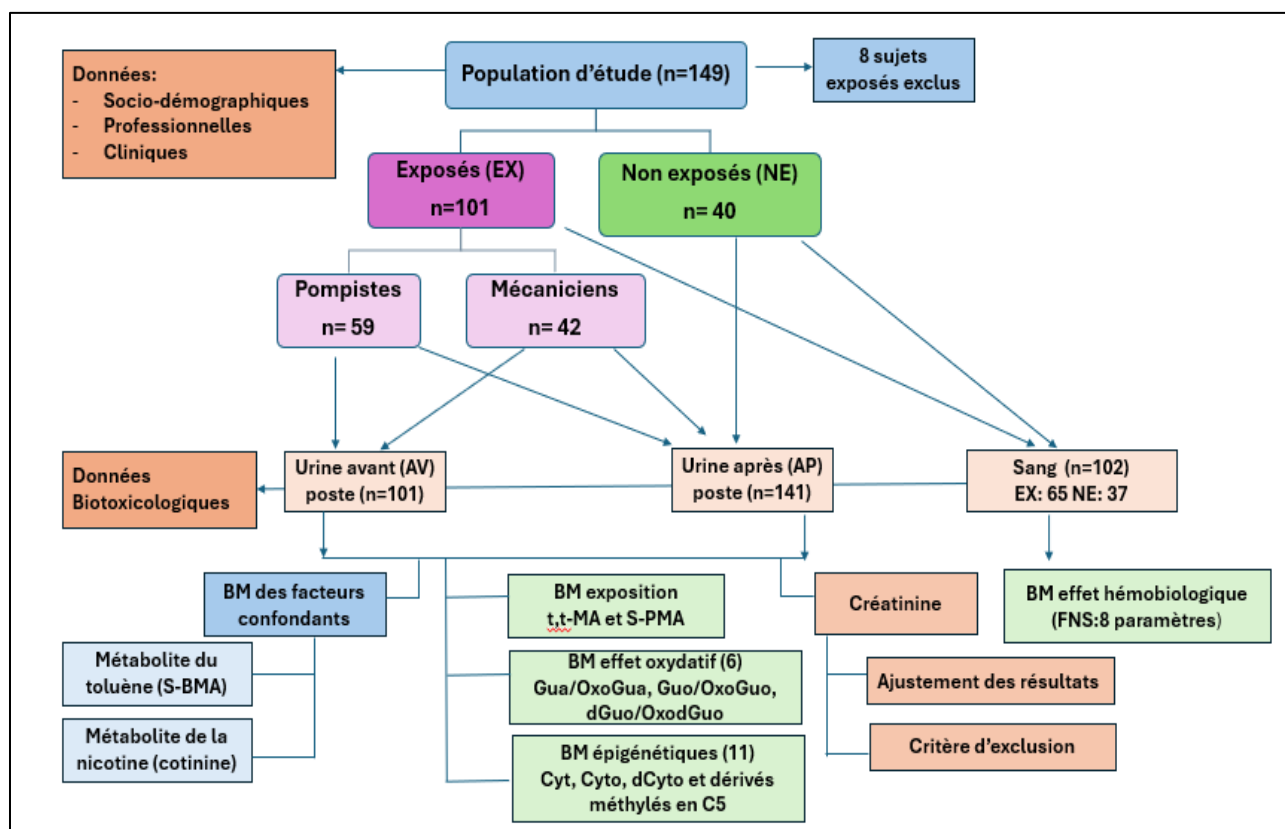


Figure 41: Diagramme de flux récapitulatif des paramètres étudiés et de la méthodologie (BM : Biomarqueur)

I.6. Analyse statistique des données

L'analyse des données a été effectuée à l'aide du programme Statistical Package for Social Sciences IBM® SPSS® Statistics (version 20.0). Le logiciel JASP 0.95.3.0 a été utilisé pour appliquer le test post Hoc de Dunn pour analyse non paramétrique.

Nous avons procédé à une analyse descriptive et analytique.

- Les pourcentages et effectifs ont été calculés pour les variables qualitatives, et les moyennes, écarts types, médianes et quartiles pour les variables quantitatives.
- Afin d'étudier l'association entre différentes variables, et l'influence des variables indépendantes sur les variables dépendantes, des tests de comparaison des proportions ont été utilisés.

1. Vérification de la distribution

Afin de choisir le test approprié selon la distribution, **la vérification de la distribution** des différentes variables dans chaque groupe a été effectuée avec le test de **Kolmogorov-Smirnov** et **Shapiro-Wilk** (le test de Shapiro-Wilk est privilégié en cas de divergence), dont l'**hypothèse nulle** (H_0) stipule que la distribution des données est normale ($p \geq 0,05$), et l'**hypothèse alternative** (H_1) stipule que la distribution des données n'est pas normale ($p < 0,05$).

Si une variable suit une distribution normale dans un groupe et non normale dans l'autre, des tests non paramétriques sont utilisés.

2. Comparaisons et choix du test statistique

Des tests paramétriques et non paramétriques ont été utilisés pour l'analyse des variables normalement et non normalement distribuées, respectivement (Tableau 25).

3. Analyse de corrélations

Les valeurs en $\mu\text{g/L}$ au lieu de $\mu\text{g/g}$ créa ont été utilisées pour les analyses de corrélation et de régression pour éviter toute influence de la créatinine comme co-variable (tests dans Tableau 25).

Interprétation du coefficient de corrélation : $r < 0,3$ (corrélation faible), $0,4 < r < 0,69$ (corrélation modérée), $r > 0,7$ (corrélation forte).

Nous avons procédé par approche globale, analyse des corrélations chez toute la population de l'étude ($N=141$) pour avoir une idée d'ensemble sur les tendances des corrélations. Ensuite nous nous sommes intéressés aux biomarqueurs d'effets qui ont montré des différences significatives dans les comparaisons entre groupes exposés et non exposés.

Tableau 25 : Tableau récapitulatif du choix du test statistique

Variable	Objectif	Groupes comparés	Test statistique	Justification
Quantitative continue	Comparaison des médianes	(Exposés/Non exposés, Fumeurs/ non-fumeurs, pompistes/mécaniciens ...	Test U de Mann- Whitney	Distribution non normale Deux groupes indépendants
		Pompistes/mécaniciens/ non exposés	Test de Kruskal- Wallis Test post Hoc de Dunn	Distribution non normale Plusieurs groupes indépendants
		Valeurs Avant-poste/ valeurs Après poste	Test de Wilcoxon	Distribution non normale Echantillons appariés
		Variable ordinale	Test de Kruskal- Wallis	Distribution non normale
	Comparaison des moyennes	(Exposés/Non exposés, Fumeurs/ non-fumeurs, pompistes/mécaniciens ...	Test t de Student	Distribution normale Variances homogènes Deux groupes indépendants
		Pompistes/mécaniciens/ non exposés	ANOVA Test post Hoc de Tukey	Distribution normale plusieurs groupes indépendants
		Valeurs Avant-poste/ valeurs Après poste	Test t de student	Distribution normale Echantillons appariés
		Comparaison t,t-MA par HPLC-DAD et UPLC- MS/MS	Test t de student	Distribution normale Echantillon unique

Tableau 25 : Tableau récapitulatif du choix du test statistique (suite)

Variable	Objectif	Groupes comparés	Test statistique	Justification
Qualitative dichotomique	Comparaison des effectifs	Deux groupes	Chi² de Pearson Test exact de Fisher	Effectifs >5 Un des Effectifs <5
		Pompistes/mécaniciens/ non exposés	Chi² de Pearson	Plus de deux modalités
Quantitative continue	Corrélation	Deux variables	Spearman Pearson	Distribution non normale Distribution normale
	Analyse multivariée	Une variable dépendante Et plusieurs variable indépendantes	Régression multiple progressive	Identification des déterminants indépendants

La majorité des variables ont une distribution non normale, à l'exception de l'âge et les paramètres du bilan hématologique.

Les comparaisons post-hoc par le test de Dunn et le test de Tukey ont été appliquées uniquement lorsque le test de Kruskal-Wallis ou ANOVA indiquaient une différence globale significative ($p < 0,05$) afin de situer les paires de groupes qui sont concernées par la significativité. Les résultats détaillés des comparaisons par paires, avec correction de Bonferroni et Holm, sont présentés en annexe V.

4. Analyses multivariée

Une régression multiple progressive a été menée afin d'évaluer l'effet combiné de plusieurs variables indépendantes sur la variable dépendante. Cette approche permet de modéliser les relations complexes entre les différents facteurs et de mieux comprendre leur influence relative.

La sélection des variables s'est effectuée selon une approche **stepwise**, permettant d'intégrer progressivement les prédictors significatifs et d'exclure ceux dont l'impact était négligeable.

L'ajustement du modèle a été évalué à l'aide du **coefficient de détermination R² ajusté**, garantissant une estimation fiable tout en minimisant le risque de surajustement.

Les **coefficients standardisés Béta** ont été analysés afin de comparer l'importance relative de chaque prédicteur.

La significativité des effets a été vérifiée via les **tests de Student (t) (significativité $t > 2$)** et les ***p*-values**, avec un seuil fixé à **0,05**.

5. Seuil de signification

Une valeur de *p* inférieure ou égale à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative pour tous les tests. Une valeur de ***p* inférieure à 0,01** a été considérée comme statistiquement très significative, et une valeur de ***p* inférieure à 0,0001** a été considérée comme statistiquement hautement significative.

6. Analyse du t,t-MA par HPLC-DAD

Les données non détectées (ND) inférieures à la LD ont été remplacées par la moitié de la LD (ND=1/2 LD) ; les données non quantifiées (NQ) comprises entre la limite de détection et la limite de quantification ont été remplacées par la moitié de la limite de quantification (NQ=1/2 LQ) pour les résultats du t,t-MA par HPLC-DAD. Selon ce qui est conformément appliqué à conditions que les valeurs non détectées soient inférieures à 15 - 20% [144].

7. Comparaison entre deux méthode

Le diagramme de Bland-Altman a été utilisé pour comparer les résultats du dosage du t,t-MA par HPLC-DAD avec ceux obtenus par la méthode de référence UPLC-MS/MS.

Cette méthode consiste à comparer les moyennes de mesures (abscisse) à leurs différences (ordonnées).

Le désaccord entre les 2 méthodes se calcule par le biais (l'écart moyen entre les deux mesures), estimé par la moyenne et l'écart-type. Les limites de concordance à 95 % sont évaluées par la moyenne +/- 1.96 SD (dans le cas d'une distribution normale).

- Le **biais** est matérialisé par une **ligne horizontale** (Le biais correspond à la moyenne des différences des paires de mesures, que l'on peut obtenir avec un test t apparié. Et l'intervalle de confiance à 95% de cette moyenne des différences correspond à l'intervalle de confiance du biais.). Le biais permet de quantifier l'écart moyen de mesure entre les deux méthodes.
- Les **limites hautes et basses de concordance** (qui délimitent un intervalle de valeurs dans lequel 95% des différences se situent) sont également matérialisées par 2 lignes horizontales. On appelle cette zone, **la zone d'agrément**. (Leur calcul repose sur l'hypothèse d'une distribution normale des différences, de moyenne égale au biais et

d'écart type égal à l'écart type des différences (Sinon, on peut employer une approche non paramétrique du diagramme de Bland-Altman).

- Les points au-delà des limites de concordances sont des outliers. Ils permettent de visualiser un écart plus important qu'attendu en théorie.
- La concordance est acceptée si le biais observé est inférieur au biais maximal acceptable et si la zone d'agrément estimée dans l'échantillon est incluse dans la zone d'agrément maximale acceptable.

Courbes ROC : nous avons tracé une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) pour les valeurs t,t-MA $\mu\text{g/g}$ créa de chacune des méthodes testées (HPLC-DAD et UPLC-MS/MS). L'AUC, ou Area Under the Curve, est l'aire sous la courbe ROC, représente la probabilité qu'un modèle classe correctement un cas positif plus haut qu'un cas négatif choisi au hasard. C'est un espace bidimensionnel délimité par :

L'axe des X : le taux de faux positifs (FPR)

L'axe des Y : le taux de vrais positifs (TPR)

La courbe ROC part du point (0,0) et monte vers (1,1). L'AUC est donc comprise entre 0 et 1.

- **AUC = 1** → modèle parfait (courbe au-dessus de la diagonale)
- **AUC = 0.5** → modèle aléatoire (ligne diagonale)
- **AUC < 0.5** → modèle inversé (classe mal les exemples)

La méthode avec l'AUC la plus élevée est généralement la plus performante.

I.7. Critères de jugement

IBE du t, t-MA :

Population générale : Non-fumeurs : 150 $\mu\text{g/g}$ créa (valeur BAR, DFG, 2016).

Sujets exposés : 500 $\mu\text{g/g}$ créa en fin de poste (correspond à une exposition de 0,5 ppm de benzène moyennée sur 8 heures (valeur BEI ACGIH, 2000).

IBE du S-PMA :

Population générale :

Sujets non-fumeurs (95^{ème} percentile) : 0,3 $\mu\text{g/g}$ de créatinine (valeur Bar, DFG).

0,5 $\mu\text{g/g}$ de créatinine (RAC ECHA).

Population professionnellement exposée :

2 $\mu\text{g/g}$ de créatinine en fin d'exposition ou fin de poste (correspond à une exposition à 0,05 ppm de benzène moyennée sur 8 heures) (valeur européenne).

25 µg/g de créatinine en fin de poste (correspond à une exposition à 0,5 ppm de benzène moyennée sur 8 heures) (valeur BEI ACGIH).

45 µg/g de créatinine en fin de poste (correspond à une exposition à 1 ppm de benzène moyennée sur 8 heures) (valeur Allemande, DFG).

VLB du S-BMA

Population générale : < 22 µg/g de créatinine (95^{ème} percentile) [138].

Travailleurs : valeurs non établies

Références pour les produits d'oxydation des acides nucléiques

Les limites de référence, estimées aux 2,5^{ème} et 97,5^{ème} percentiles, ont été calculées par des méthodes paramétriques, conformément aux recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) [145].

Les plages de référence chez une population non exposée sont : **8OxodGuo (0,198 - 1,189)**, **8OxoGuo (1,735 - 17,123)** et **8OxoGua (0,136 - 0,710)**, estimées comme étant les 5^e à 95^e percentiles des concentrations normalisées (µg/g créatinine) [123].

Normes de l'hémogramme

Les paramètres suivants de la formule numération sanguine ont été traités : hémoglobine, globules rouges, hématocrite, globules blancs, neutrophiles, monocytes, lymphocytes et plaquettes. Les normes décrites dans l'étude de Troussard et al. [146] ont été choisies comme référence.

Hémoglobine (HB) : 13 à 17 G/100mL.

Globules Rouges (GR) : 4,28 à 6,0 T/L.

Globules Blancs (GB) : 4 à 10 G/L.

Plaquettes : 150 à 400 G/L.

Lymphocytes : 1 à 4 G/L.

Hématocrite : 39 à 50 %.

Monocytes : 0,2 à 0,8 G/L

Neutrophiles : 2,0 à 7 G/L

Normes de la créatinine : l'intervalle de [0,3 – 3] g/L a été pris comme référence d'urine normale selon les recommandations de l'ACGIH [32].

Interprétation des taux de la cotinine

Non-fumeur : < 100 µg/g de créatinine (y compris passif) [17]

Fumeur : > 100 µg/g de créatinine

Non-fumeur < 10 µg/L

Fumeur passif : 10-30 µg/L

Fumeur actif : une valeur seuil de 30 µg/L a été proposée pour identifier un fumeur actif [97].

Fumeur régulier > 100 µg/L

I.8. Biais potentiels

Bien que cette recherche apporte des contributions significatives, certains biais doivent être pris en compte.

- **Biais de désirabilité sociale** : La collecte des données par questionnaire peut inciter les participants à fournir des réponses socialement acceptables, notamment concernant les signes cliniques.
- **Biais d'interprétation** : Certaines questions peuvent être comprises différemment selon le niveau d'instruction ou la sensibilité des participants.
- **Biais de coopération** : La réticence à fournir les bilans hématologiques peut limiter la représentativité des données biologiques (28% manquants). Il était difficile pour tous les participants de respecter la consigne d'abstention de fumer avant l'échantillonnage.
- **Biais de confusion** : Certaines comorbidités, telles que le diabète et l'hypertension artérielle (HTA), nécessitent un diagnostic clinique pour mieux estimer les variations des produits du stress oxydatif, lesquels sont fortement influencés par l'IMC et les pathologies associées.

II. Résultats

La présentation des résultats s'articule selon une progression thématique et analytique, visant à explorer les effets de l'exposition professionnelle sur les plans sociodémographique, clinique et biotoxicologique.

Elle débute par l'analyse des critères sociodémographiques, des caractéristiques professionnelles (ancienneté, rythme de travail, géolocalisation), et des signes cliniques, avant d'aborder les biomarqueurs biotoxicologiques, regroupés en six sous-catégories :

- Biomarqueurs d'exposition au benzène
- Biomarqueurs d'effet oxydatif
- Biomarqueurs d'effet épigénétique
- Biomarqueurs d'effet hématologique
- Biomarqueurs d'exposition à la nicotine
- Biomarqueurs d'exposition au toluène

Pour chaque catégorie, les paramètres descriptifs sont présentés (moyenne, écart-type, minimum, maximum, médiane, quartiles), selon les groupes exposés, non exposés, pompistes, et mécaniciens. Les comparaisons statistiques sont réalisées entre groupes (EX/NE, POM/MEC/NE) et entre les valeurs avant-poste (AV) et après poste (AP).

Une seconde partie explore l'influence de variables modulantes telles que l'âge, le statut tabagique, les critères professionnels, et le statut clinique sur les différents biomarqueurs.

La troisième partie est consacrée aux corrélations entre variables biologiques, suivie d'une analyse multivariée par régressions multiples visant à identifier les déterminants indépendants des niveaux d'imprégnation.

Une modélisation est ensuite proposée pour la prédiction des taux de benzène atmosphérique, à partir des concentrations urinaires du S-PMA.

Enfin, les résultats de la validation analytique du t,t-MA par HPLC-DAD sont présentés, avec une comparaison méthodologique avec la technique UPLC-MS/MS, afin d'évaluer la robustesse et la sensibilité des méthodes utilisées.

II.1. Caractéristiques socio-démographiques

Le Tableau 26 regroupe les caractéristiques socio-démographiques de la population étudiée.

Tableau 26 : Caractéristiques socio-démographiques de la population étudiée

	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=40	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Age (ans)						
Moy ± ET	44,57± 8,11	43,39±9,86	46,24±11,09	44,03± 8,13	0,782	0,397
Min - Max	18 - 70	24 - 70	18 - 62	23 - 67		
Q1	38	37	40,75	39,25		
Méd	45	43	46,5	43		
Q3	52	50	54,25	50		
Répartition par tranches d'âge (ans)						
≤ 40	34 (33,7%)	24 (40,7%)	10 (23,8%)	11 (27,5%)	0,403	0,174
41-50	38 (37,6%)	22 (37,3%)	16 (38,1%)	20 (50,0%)		
≥ 51	29 (28,7%)	13 (22,0%)	16 (38,1%)	9 (22,5%)		
Total	101 (100%)	59 (100%)	42 (100%)	40 (100%)		
Statut tabagique						
F	38 (37,6%)	27 (45,8%)	11 (26,2%)	14 (35%)	0,771	0,127
NF	63 (62,4%)	32 (54,2%)	31 (73,8%)	26 (65%)		
Total	101 (100%)	59 (100%)	42 (100%)	40 (100%)		

EX : Exposés **NE** : Non exposés **Pom** : Pompistes **Méc** : Mécaniciens **Min** : Minimum **Max** : Maximum **Méd** : Médiane
Q1 : Premier quartile **Q3** : 3^{ème} quartile **F** : fumeur **NF** : non-fumeur

NB : Tous les participants exposés et non exposés ont déclaré ne pas consommer de l'alcool.

L'âge moyen des participants exposés est de 44,57 ± 8,11 ans, proche de celui des non exposés (44,03 ± 8,13 ans), avec une valeur de p non significative. Lorsque les groupes sont comparés séparément (pompiers, mécaniciens, non exposés), aucune différence significative n'est observée également, bien que les mécaniciens présentent une moyenne légèrement plus élevée (46,24 ± 11,09 ans).

La répartition par tranches d'âge montre une distribution relativement homogène entre les groupes, sans différence statistiquement significative. Les sujets âgés de 41 à 50 ans constituent la tranche la plus représentée dans l'ensemble des groupes.

Concernant le statut tabagique, la proportion de fumeurs est légèrement plus élevée chez les pompistes (45,8 %) comparée aux mécaniciens (26,2 %) et aux non exposés (35 %), mais ces différences ne sont pas significatives ($p > 0,05$).

II.2. Caractéristiques professionnelles

II.2.1. Rythme de travail

Le rythme des sujets non exposés est de 8H/jour pendant 5 jours.

La répartition des sujets exposés selon le rythme de travail est détaillée dans le Tableau 27.

Tableau 27: Répartition des sujets exposés selon le rythme de travail et la profession

Rythme de travail	Nbre d'H travaillées par semaine	Jours de repos	Effectif	(%)	Profession
8H/J pendant 6 jours	48	1/7 jours	5	4,95	Pompiste
12H/J pendant 2 jours	48	2/4 jours	4	3,96	Pompiste
24H un jour sur trois	72	2 /3 jours	44	43,56	Pompiste
48H sur 4 jours	96	2/4 jours	4	3,96	Pompiste
5 jours / semaine	40	2/7 jours	42	41,58	Mécaniciens
5 jours / semaine	40	2/7 jours	2	1,98	Pompiste
Total			101	100	

II.2.2. Ancienneté au poste

Le Tableau 28 présente les données de l'ancienneté au poste de la population étudiée.

Tableau 28: Données de l'ancienneté au poste de la population étudiée

	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=40	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Ancienneté au poste (ans)						
Moy ± ET	12,77±10,41	9,41±7,64	17,49±11,94	16,1± 9,58	<u>0,027</u>	<u><0,0001</u>
Min - Max	0,5-44	0,58-34	0,5-44	3-40		
Q1	3	3	7	8,25		
Méd	11	8	19	14,5		
Q3	19,5	14	25,5	21,75		
Répartition par tranches d'ancienneté au poste (ans)						
≤10	49 (48,5%)	35 (59,32%)	14 (33,33%)	14 (35,0%)	0,273	<u><0,001</u>
10,1-20	34 (33,7%)	21 (35,59%)	13 (30,95%)	15 (37,5%)		
>20,1	18 (17,8%)	3 (5,08%)	15 (35,71%)	11 (27,5%)		
Total	101 (100%)	59 (100%)	42 (100%)	40 (100%)		

EX : Exposés NE : Non exposés Pom : Pompistes Méc : Mécaniciens Min : Minimum Max : Maximum Méd : Médiane
Q1 : Premier quartile Q3 : 3^{ème} quartile

L'ancienneté moyenne au poste est significativement plus faible chez les exposés (12,77 ± 10,41 ans) que chez les non exposés (16,1 ± 9,58 ans), avec une différence statistiquement significative (p = 0,027). Lorsque les groupes sont comparés séparément, les mécaniciens présentent une ancienneté nettement plus élevée (17,49 ± 11,94 ans) que les pompistes (9,41 ± 7,64 ans) et les non exposés, avec une différence hautement très significative (p < 0,0001).

La répartition par tranches d'ancienneté confirme cette tendance : les pompistes sont majoritairement concentrés dans la tranche ≤ 10 ans (59,32 %), tandis que les mécaniciens sont surreprésentés dans la tranche > 20 ans (35,71 %). Cette différence de distribution est significative entre les trois groupes (p < 0,001), mais non significative dans la comparaison globale EX/NE (p = 0,273).

II.2.3. Port des équipements de protection individuelle (EPI)

Le seul EPI déclaré être porté au travail est la combinaison ou tenue de travail spéciale chez 72,72 % (N=72) des travailleurs.

II.2.4. Répartition des pompistes par géolocalisation de la station-service

La figure 42 illustre le pourcentage des pompistes ayant participé à l'étude par station-service (N=59).

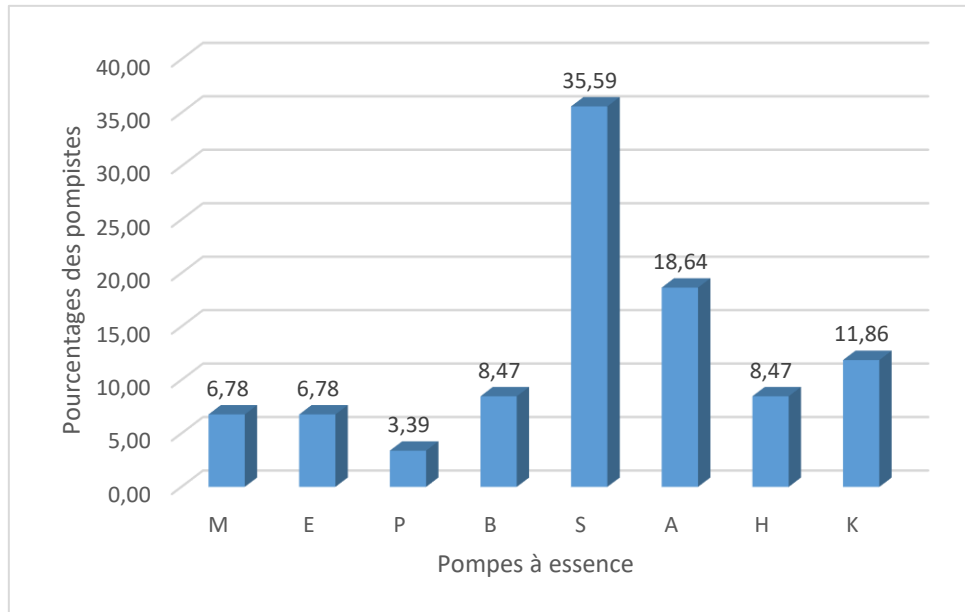


Figure 42: Répartition des pompistes par station-service N=59 (100%)

Les lettres correspondent aux initiales des pompes à essence.

Le tableau 29 présente la répartition des pompes à essence selon la géolocalisation.

Zone à trafic urbain dense (Zone d) : principalement à la commune de Annaba, près du centre-ville et avec une forte urbanisation autours.

Zone à trafic urbain faible (Zone f) : des pompes à essence excentrées de la ville et aérées ou celles des autres communes (El Karma, Sidi Amar, Sidi Salem).

Tableau 29: Répartition des pompistes selon la densité du trafic autour de la pompe à essence

Zone	Nombre des pompes à essence	Effectif pompistes	Pourcentage
Zone d	4	31	52,54 %
Zone f	4	28	47,46%

La répartition des pompistes selon les zones géographiques montre une distribution relativement équilibrée entre les deux zones étudiées. La zone d regroupe 4 stations-service avec un effectif de 31 pompistes, soit 52,54 % de l'ensemble des travailleurs exposés. La zone f, également constituée de 4 stations, compte 28 pompistes, représentant 47,46 % de l'effectif.

Le Tableau 30 montre la répartition des pompistes entre les deux zones en fonction des tranches d'ancienneté au poste.

Tableau 30: Tableau croisé entre tranches d'ancienneté des pompistes et leurs géolocalisations

Tranches d'ancienneté (ans)	Géolocalisation				Total	Valeur <i>p</i>
	Zone f		Zone d			
	N	%	N	%	N	
<10	23	82,1%	12	38,7%	35	<u>0,001</u>
10,1-20	5	17,9%	16	51,6%	21	
>20	0	0	3	9,7%	3	
Total	28	100	31	100	59	

Zone d : trafic dense zone f : trafic faible

La répartition des tranches d'ancienneté au poste varie significativement selon la zone géographique ($p = 0,001$). Dans la zone f, la majorité des pompistes (82,1 %) ont une ancienneté inférieure à 10 ans, tandis que dans la zone d, cette proportion est nettement plus faible (38,7 %). À l'inverse, la **zone d** présente une proportion plus élevée de travailleurs ayant une ancienneté comprise entre 10,1 et 20 ans (51,6 %), ainsi que quelques cas (> 20 ans) absents en **zone f**.

II.3. Données cliniques

La répartition des sujets de l'étude selon la présentation ou non de signes cliniques est présentée dans le Tableau 31.

Tableau 31: Répartition des sujets de l'étude selon la présentation des signes cliniques

	EX	Pom	Méc	NE	Valeur <i>p</i> EX/NE	Valeur <i>p</i> Pom/Méc/NE
Symp	58 (57,42%)	44 (74,57%)	14 (33,33%)	9 (22,5%)	<u>≤0,0001</u>	<u>≤0,0001</u>
Asymp	43 (42,57%)	15 (25,42%)	28 (66,66%)	31 (77,5%)		
Total	101 (100%)	59 (100%)	42 (100%)	40 (100%)		

EX : Exposés NE : Non exposés Pom : Pompistes Méc : Mécaniciens Symp : symptomatique Asymp : asymptomatique

La présence de symptômes est significativement plus fréquente chez les travailleurs exposés (57,42 %) comparés aux non exposés (22,5 %), avec une différence hautement significative ($p < 0,0001$). Lorsque les groupes sont analysés séparément, les pompistes présentent la proportion la plus élevée de sujets symptomatiques (74,57 %), suivis des mécaniciens (33,33 %) et des sujets non exposés (22,5 %), avec une différence également significative entre les trois groupes ($p < 0,0001$).

Le nombre de déclarations varie de 0 à 8 par sujet exposé et de 0 à 1 par sujet non exposé.

La figure 43 illustre les fréquences de chaque déclaration sur un total de 134 (100%) déclarations chez les sujets symptomatiques (n=59).

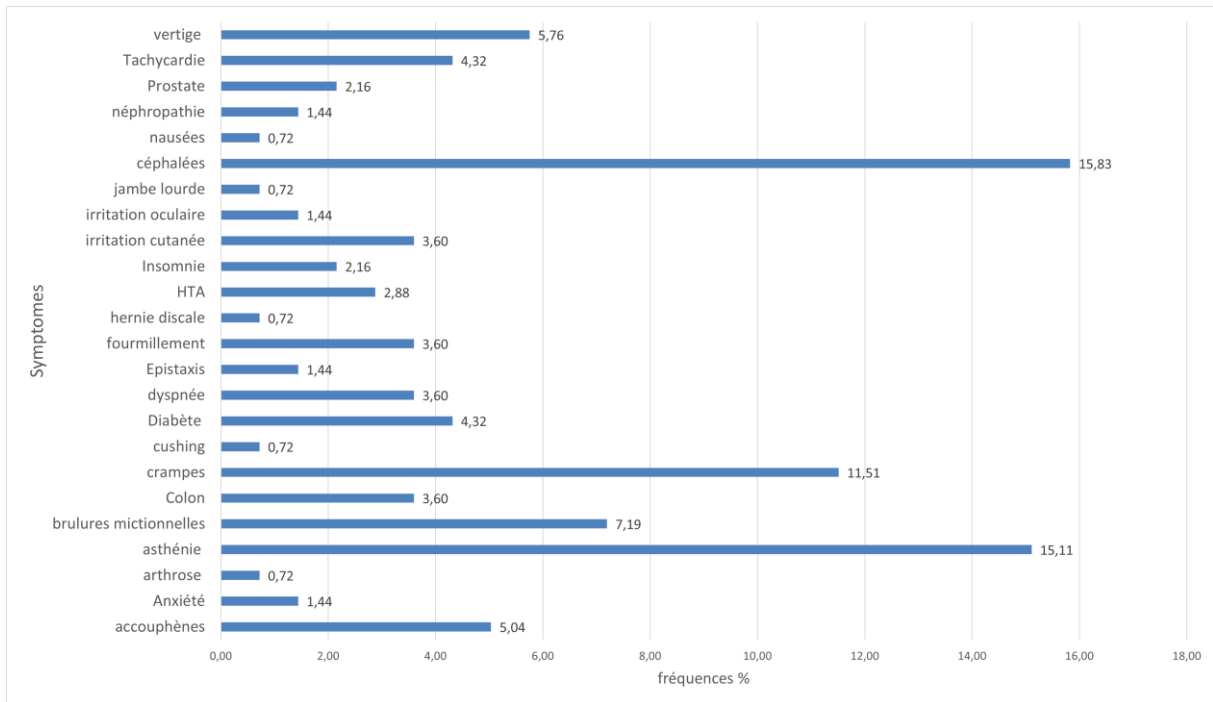


Figure 43: Fréquences des déclarations cliniques chez tous les exposés symptomatiques (N=58)

Les fréquences de chaque symptôme par rapport au nombre total des déclarations pour chaque sous-groupe (27 chez les mécaniciens et 107 chez les pompistes) sont illustrées dans les figures 44 et 45 respectivement.

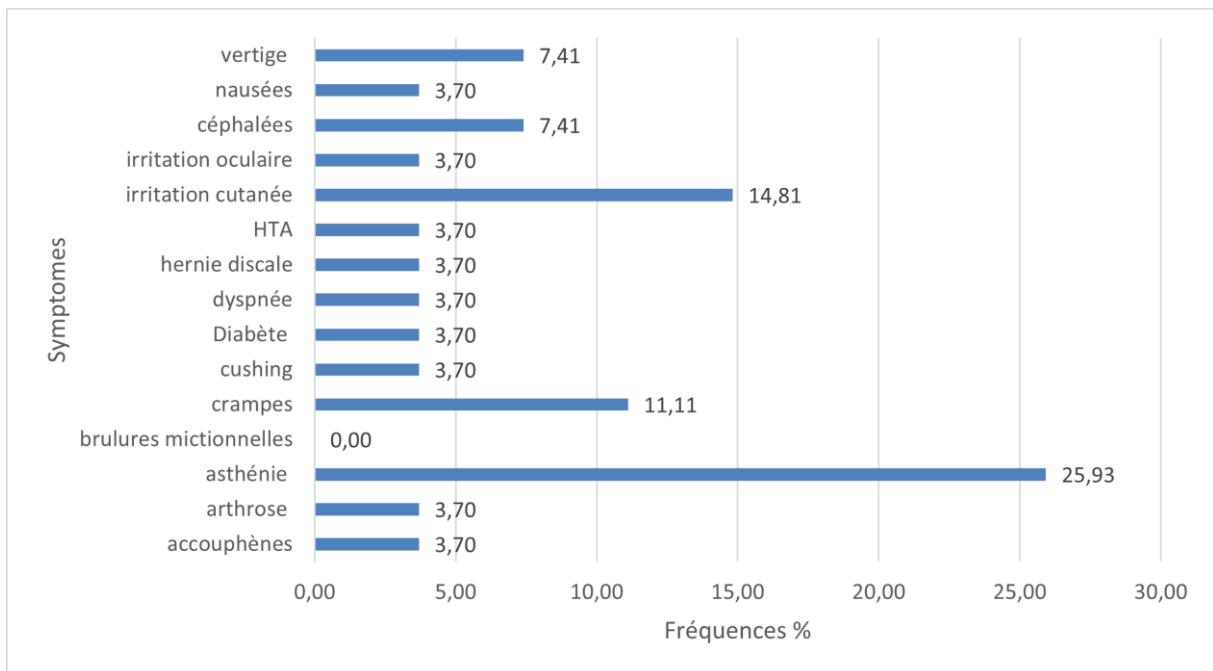


Figure 44: Fréquences des déclarations cliniques par les mécaniciens symptomatiques (N=14)

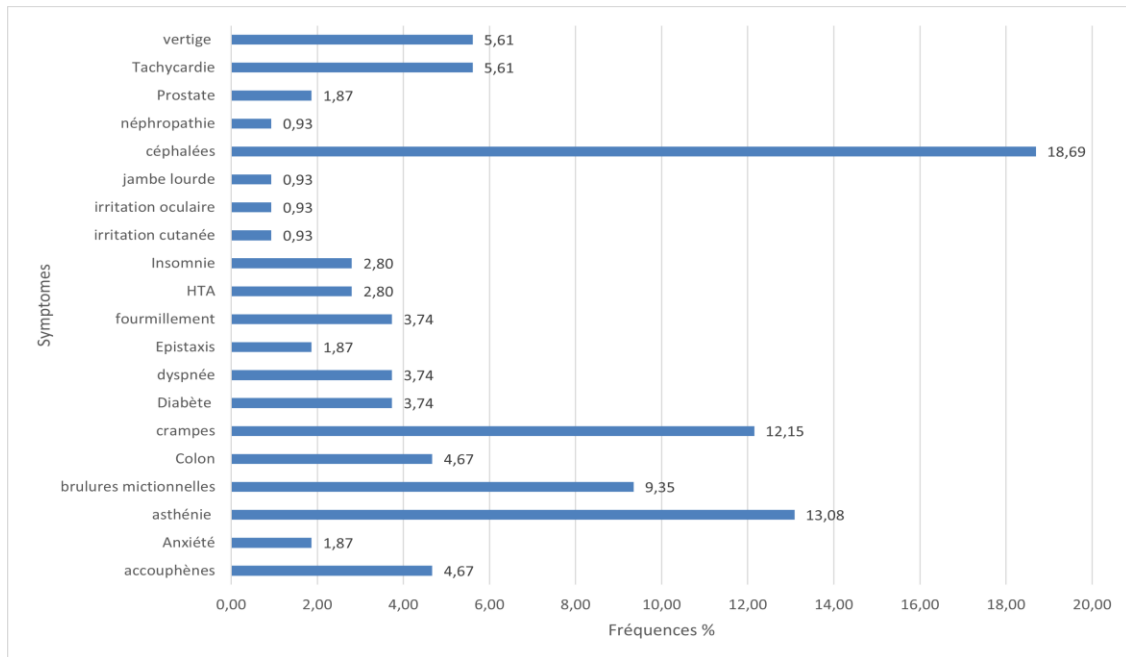


Figure 45: Fréquences des déclarations cliniques par les pompistes symptomatiques (N=44)

Il a été décidé de stratifier les signes cliniques déclarés comme indiqué dans le Tableau 32.

Tableau 32: Fréquences des signes cliniques déclarés par catégorie

Catégorie	Signes déclarés	Total	(%)
Signes neurologiques	Céphalées, vertige, acouphènes, anxiété, insomnie, fourmillements, asthénie	68	48,92
Signes urologiques	Brulures mictionnelles, prostate, néphropathie	15	10,79
Signes cutanéomuqueux	Démangeaison, irritation cutanée, irritation oculaire	7	5,04
Signes musculaires	Crampes	16	11,51
Signes respiratoires	Dyspnée	5	3,60
Signes cardiovasculaires	HTA, tachycardie, jambe lourde	11	7,91
Signes hématologiques	Epistaxis	2	1,44
Signes gastro-intestinaux	Côlon irritable, nausée	6	4,32
Signes métaboliques	Diabète, Cushing	7	5,1
Autres	Arthrose, hernie discale	2	1,45
Total		137	100

II.4. Bilan biotoxologique

II.4.1. Créatinine urinaire

II.4.1.1. Comparaison entre groupes

Le Tableau 33 regroupe les données de la créatinine urinaire en AV et AP chez les sujets de l'étude.

Tableau 33: Données de la créatinine en AP chez la population étudiée

	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=40	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Moy ± ET	1,62 ± 0,81	1,53±0,79	1,68±0,72	1,73 ± 0,75	0,326	0,34
Min - Max	0,3 – 3	0,3 – 3	0,3 – 3	0,41 – 3		
Q1	1,02	0,85	1,08	1,09		
Méd	1,56	1,50	1,59	1,86		
Q3	2,17	2,06	2,3	2,25		

Toutes les valeurs sont en µg/ g créa

EX : Exposés NE : Non exposés Pom : Pompistes Méc : Mécaniciens Min : Minimum Max : Maximum Méd : Médiane
Q1 : Premier quartile Q3 : 3^{ème} quartile

Les valeurs moyennes de la créatinine urinaire mesurée en après poste sont relativement similaires entre les groupes. Les exposés présentent une moyenne de $1,62 \pm 0,81$ g/L, légèrement inférieure à celle des non exposés ($1,73 \pm 0,75$ g/L), sans différence statistiquement significative. La comparaison entre les trois groupes séparés (pompistes, mécaniciens, non exposés) ne révèle pas non plus de différence significative ($p = 0,34$).

II.4.1.2. Comparaison entre valeurs AV et AP

Le Tableau 34 présente la comparaison entre les valeurs AV et AP de la créatinine urinaire chez les sujets exposés.

Tableau 34 : Comparaison entre les valeurs AV et AP de la créatinine urinaire chez les sujets exposés

	Sujets exposés (N=101)					
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p
AV	1,62±1,48	0,3 – 3	0,98	1,48	2,34	0,925
AP	1,62±0,81	0,3 – 3	1,02	1,56	2,17	
	Pompistes (N=59)					
AV	1,74±0,77	0,42-3	1,26	1,72	2,34	0,110
AP	1,53±0,79	0,3 – 3	0,85	1,5	2,06	
	Mécaniciens (N=42)					
AV	1,44±0,85	0,3 – 3	0,82	1,18	2,05	0,08
AP	1,68±0,72	0,3 – 3	1,08	1,59	2,3	

Toutes les valeurs sont en $\mu\text{g/g}$ créa

EX : Exposés NE : Non exposés Pom : Pompistes Méc : Mécaniciens Min : Minimum Max : Maximum Méd : Médiane
Q1 : Premier quartile Q3 : 3^{ème} quartile

La comparaison des valeurs de créatinine urinaire entre les prélèvements avant-poste (AV) et après poste (AP) chez les sujets exposés ne montre pas de différence significative ($p = 0,925$). Cette absence de variation significative est également observée au sein des sous-groupes : pompistes ($p = 0,110$) et mécaniciens ($p = 0,08$). Ces résultats suggèrent une stabilité des niveaux de créatinine urinaire entre les deux moments de prélèvement dans cette population étudiée.

II.4.2. Biomarqueurs d'exposition au benzène

II.4.2.1. Comparaison entre groupes

Le Tableau 35 regroupe les données des biomarqueurs d'exposition en AP des sujets de l'étude.

Tableau 35 : Données des biomarqueurs d'exposition en AP chez la population étudiée

t,t-MA urinaire en AP (analysé par UPLC-MS/MS) µg/g créa						
	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=39*	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Moy ± ET	418,95±405,59	385,91±264,86	465,36±546,09	155,73±142,89	<0,0001	<0,0001
Min-Max	39,2 - 2748,16	39,2 - 1502,41	42,5 - 2748,16	14 - 682,18		
Q1	172,79	210,85	140,58	67,30		
Méd	319,73	332,45	303,73	103,86		
Q3	488,54	473,38	530,13	207,26		
S-PMA urinaire en AP (µg/g créa)						
	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=39*	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Moy ± ET	4,76 ±3,88	5,04 ±5,4	2,26 ±3,08	1,09 ±0,98	<0,0001	<0,0001
Min - Max	0,25 - 29,88	0,35 - 29,88	0,25 - 18,82	0,1 - 3,57		
Q1	1,13	1,64	0,81	0,58		
Méd	2,14	2,73	1,27	0,78		
Q3	4,67	6,93	2,55	1,25		
Ratio AP t,t-MA/S-PMA						
	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=39*	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Moy ± ET	192,50±171,54	142,50±141,09	262,72±186,97	249,5±313,89	0,725	<0,0001
Min - Max	12,63-817,06	23,56-814,41	12,63-817,06	37,12-1453,78		
Q1	64,82	52,40	145,45	79,32		
Méd	146,03	91,54	226,47	134,41		
Q3	258,29	176,71	356,81	244,08		

* : valeur manquante EX : Exposés NE : Non exposés Pom : Pompistes Méc : Mécaniciens Min : Minimum Max : Maximum Méd : Médiane Q1 : Premier quartile Q3 : 3^{ème} quartile

Les concentrations urinaires de t,t-MA en après poste (AP), sont significativement plus élevées chez les sujets exposés (418,95 ± 405,59) que chez les non exposés (155,73 ± 142,89), avec une différence hautement significative (p < 0,0001). Cette tendance est également observée dans la comparaison entre les trois groupes (pompistes, mécaniciens, témoins), où les

mécaniciens présentent les valeurs les plus élevées ($465,36 \pm 546,09$), suivis des pompistes ($385,91 \pm 264,86$), avec une différence significative ($p < 0,0001$), le test de Dunn est significatif pour les comparaisons **NE/Pom** et **NE/Mec** ($p < 0,001$).

Les concentrations de S-PMA urinaire en AP suivent une tendance similaire : les exposés présentent des médianes significativement plus élevées que les non exposés ($1,09 \pm 0,98$), avec ($p < 0,0001$). Le test de Dunn est significatif pour les trois paires de groupes ($p < 0,001$).

En revanche, le ratio t,t-MA/S-PMA ne montre pas de différence significative entre exposés et non exposés ($p > 0,05$), bien qu'une différence significative soit observée entre les trois groupes ($p < 0,0001$), le test post Hoc de Dunn avec correction a affiché uniquement une différence significative entre pompistes et mécaniciens ($p < 0,001$).

II.4.2.2. Comparaison entre valeurs AV et AP

Le Tableau 36 présente la comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs urinaires d'exposition au benzène chez les sujets exposés.

Tableau 36 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs d'exposition chez les sujets exposés

Comparaison des valeurs du t,t-MA						
Sujets exposés (N=101)						
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p
AV	283,36±337,25	34,66-927,84	94,97	161,66	300,87	<0,0001
AP	418,95±405,59	39,2- 48,16	172,79	319,73	488,54	
Pompistes (N=59)						
AV	196,87 260,61	34,66-562,83	76,48	132,79	192,19	<0,0001
AP	385,91±264,86	39,2- 1502,41	210,85	332,45	473,38	
Mécaniciens (N=42)						
AV	404,84±394,27	54,26-927,84	132,84	271,41	574,38	0,544
AP	465,36±546,09	42,5- 48,16	140,58	303,73	530,13	
Comparaison des valeurs du S-PMA						
Sujets exposés (N=101)						
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p
AV	2,21 ±3,81	0,33-28,53	0,73	1,28	2,29	<0,0001
AP	4,76 ±3,88	0,25 - 29,88	1,13	2,14	4,67	
Pompistes (N=59)						
AV	1,83 ±1,48	0,43 - 7,57	0,79	1,28	2,65	<0,0001
AP	5,04 ±5,4	0,35 - 29,88	1,64	2,73	6,93	
Mécaniciens (N=42)						
AV	2,74 ±5,66	0,33 – 28,53	0,60	1,27	1,90	0,453
AP	2,26 ±3,08	0,25– 18,82	0,81	1,27	2,55	

EX : Exposés NE : Non exposés Pom : Pompistes Méc : Mécaniciens Min : Minimum Max : Maximum Méd : Médiane
 Q1 : Premier quartile Q3 : 3^{ème} quartile

Tableau 36 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs d'exposition chez les sujets exposés (suite)

Comparaison du ratio t,t-MA / S-PMA						
Sujets exposés (N=101)						
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur <i>p</i>
AV	223,5±292,53	14,86-1712,52	59,95	117,78	251,25	0,575
AP	192,50±171,54	12,63-817,06	64,82	146,03	258,29	
Pompistes (N=59)						
AV	153,87±210,14	17,78-1157,7	49,87	75,03	165,38	0,216
AP	142,50±141,09	23,56-814,41	52,4	91,54	176,71	
Mécaniciens (N=42)						
AV	321,30±359,83	14,86-1712,5	120,99	202,97	387,23	0,788
AP	262,72±186,97	12,63-817,06	145,45	226,47	356,81	

Chez les sujets exposés, les concentrations urinaires de t,t-MA et de S-PMA sont significativement plus élevées en après poste (AP) qu'en avant-poste (AV), avec des valeurs de $p < 0,0001$. Cette élévation est particulièrement marquée chez les pompistes, tandis qu'elle n'est pas significative chez les mécaniciens ($p = 0,544$ pour t,t-MA ; $p = 0,453$ pour S-PMA). En revanche, le ratio t,t-MA/S-PMA ne montre pas de variation significative entre AV et AP, que ce soit globalement ($p = 0,575$) ou par sous-groupe.

Le tableau 37 montre les valeurs du ratio t,t-MA / S-PMA et leurs effectifs selon une valeur seuil de 20 équivalente au ratio déterminé par les IBE fixées par l'ACGIH pour le t,t-MA et S-PMA respectivement, 500 µg/g créa et 25 µg/g créa (500/25).

Tableau 37 : Répartition du ratio t,t-MA / S-PMA selon le seuil de 20

R	EX		NE	Pompistes		Mécaniciens	
	AV	AP	AP	AV	AP	AV	AP
<20 (%)	3 (3%)	1 (1%)	0 (0%)	2 (3,4%)	0 (0%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)
>20 (%)	98 (97%)	99 (99%)	40 (100%)	57 (96,6%)	59 (100%)	41 (97,6%)	41 (97,6%)

Les résultats montrent trois valeurs uniquement inférieures au seuil de 20.

II.4.2.3. Comparaison par rapport aux indicateurs biologiques d'exposition (IBE)

- Comparaison chez les non exposés par rapport à l'IBE de la population générale

Le Tableau 38 représente la répartition des sujets non exposés selon les seuils des biomarqueurs d'exposition du benzène par rapport aux valeurs biologiques chez la population générale.

Tableau 38 : Comparaison des biomarqueurs d'exposition chez les non exposés avec les valeurs biologiques de la population générale

IBE ACGIH µg/g créa	AP t,t-MA µg/g créa	RAC ECHA µg/g créa	AP S-PMA µg/g créa
≤ 150	27 (69,23%)	≤ 0,5	8 (20,51%)
> 150	12 (30,77%)	> 0,5	31 (79,48%)
Total	39* (100%)	Total	39* (100%)

* : valeur manquante

Chez les sujets non exposés, 30,77 % présentent des concentrations urinaires de t,t-MA en après poste (AP) supérieures à l'indicateur biologique d'exposition (IBE) de l'ACGIH, fixé à 150 µg/g créatinine. Par ailleurs, 79,48 % des non exposés dépassent le seuil de référence du S-PMA établi par l'ECHA (0,5 µg/g créatinine).

Le **Tableau 39** représente la répartition des sujets de l'étude selon les seuils des biomarqueurs d'exposition du benzène fixés pour une exposition en fin de poste.

Tableau 39 : Comparaison des biomarqueurs d'exposition chez la population d'étude avec les valeurs biologiques en fin de travail

	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=39	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
IBE µg/g créa	AV t,t-MA (µg/g créa)					
≤ 500	78 (77,22%)	51 (86,44%)	27 (64,28%)	/	/	0,09 Pom/Méc
> 500	23 (22,77%)	8 (13,55%)	15 (35,71%)	/		
Total	101(100%)	59 (100%)	42 (100%)	/		
IBE µg/g créa	AP t,t-MA (µg/g créa)					
≤ 500	77 (76,23%)	47 (79,66%)	30 (71,42%)	37(94,87%)	0,017	0,038
> 500	24 (23,76%)	12 (20,33%)	12 (28,57%)	2 (5,12%)		
Total	101(100%)	59 (100%)	42 (100%)	39*(100%)		
IBE µg/g créa	AV S-PMA (µg/g créa)					
≤ 25	99 (98,01%)	59 (100%)	40 (95,23%)	/	/	0,180 Pom/méc
> 25	2 (1,99%)	0 (0%)	2 (4,76%)	/		
Total	101 (100%)	59 (100%)	42 (100%)	/		
IBE µg/g créa	AP S-PMA (µg/g créa)					
≤ 25	100 (99,01%)	58 (98,3%)	42 (100%)	39 (100%)	0,516	0,472
> 25	1 (0,99%)	1 (1,7%)	0 (0%)	0 (0%)		
Total	101 (100%)	59 (100%)	42 (100%)	39*(100%)		

* : valeur manquante IBE : Indicateur biologique d'exposition pom : pompiste mec : mécanicien AP : après poste AV : avant-poste EX : exposés NE : non exposés

La majorité des sujets exposés présentent des concentrations de t,t-MA urinaires en (AV) inférieures à la valeur biologique d'exposition (IBE) de 500 µg/g créatinine (77,22 %), avec une tendance à des proportions plus élevées chez les pompistes (86,44 %) que chez les mécaniciens (64,28 %), bien que cette différence ne soit pas significative ($p = 0,09$).

En après poste (AP), la proportion de sujets exposés dépassant l'IBE augmente légèrement (23,76 %), mais reste supérieure à celle observée chez les non exposés (5,12 %), avec une différence significative entre exposés et non exposés ($p = 0,017$), et entre les trois groupes ($p = 0,038$).

Concernant le S-PMA, les concentrations restent largement inférieures à l'IBE de 25 µg/g créatinine, tant en AV qu'en AP, dans l'ensemble des groupes. Seuls un ou deux cas isolés dépassent ce seuil, sans différence significative entre pompistes et mécaniciens ($p = 0,180$ en AV ; $p = 0,472$ en AP).

- **Tableaux croisés entre valeurs seuils de t,t-MA et S-PMA**

Le Tableau 40 présente un croisement entre valeurs seuils du t,t-MA sont en fonction de l'IBE de l'ACGIH (500 µg/g créa) et les valeurs seuils du S-PMA selon la VLB européenne (2 µg/g créa) pour une exposition atmosphérique de 0,05 ppm de benzène.

Tableau 40: Tableau croisé entre tranches t,t-MA et tranches S-PMA chez les sujets exposés en AV et AP

	AV t,t-MA (µg/g créa)			<i>p</i> value
AV S-PMA (µg/g créa)	<500	>500	Total	
<2	58 (74,35%)	15 (65,21%)	73 (72,27%)	0,389
>2	20 (25,64%)	8 (34,78%)	28 (27,72%)	
Total	78 (100%)	23 (100%)	101(100%)	
	AP t,t-MA			<i>p</i> value
AP S-PMA	<500	>500	Total	
<2	44 (57,14%)	4 (16,66%)	48 (47,52%)	<u>0,001</u>
>2	33 (42,85%)	20 (83,33%)	53(52,47%)	
Total	77 (100%)	24 (100%)	101 (100%)	

Les proportions de sujets ayant t,t-MA <500 µg/g créa (78 et 77) et > 500 µg/g créa (23 et 24) entre les mesures en AV et AP sont comparables.

En (AV), 58 (74,35%) ont des valeurs de t,t-MA < 500 µg/g créa et valeurs S-PMA < 2 µg/g créa et donc une exposition inférieure à 0,05 ppm, cette proportion tend légèrement à la baisse pour les valeurs en (AP) avec 57,14%.

15 (65,21%) de sujets exposés ont des valeurs de AV t,t-MA > 500 µg/g créa et au même temps des valeurs de S-PMA < 2 µg / g créa, cette proportion baisse considérablement pour les valeurs AP (16,66%).

La Figure 46 représente un chromatogramme d'extraction de la transition ionique (XIC) du S-PMA chez le sujet 121 en AV.

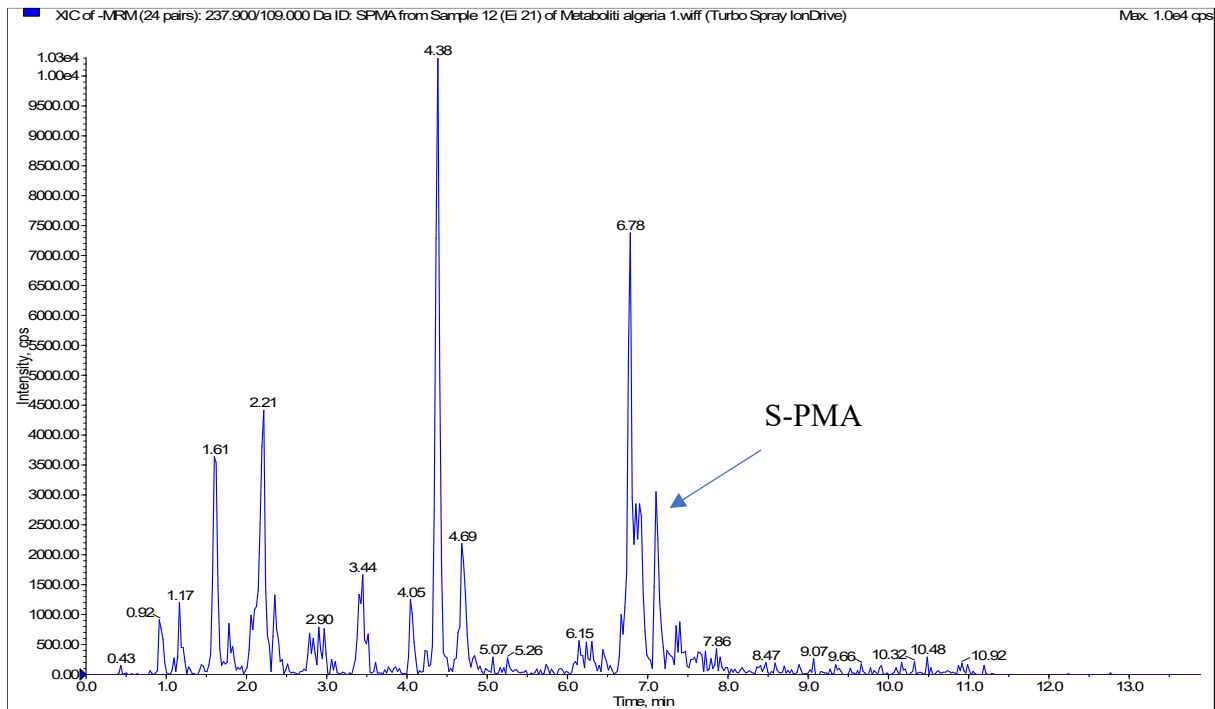


Figure 46: Chromatogramme d'extraction de la transition ionique (XIC) du S-PMA chez le sujet 121 en AV

Les Figure 47Figure 48 illustrent une comparaison du AP t,t-MA et AP S-PMA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les exposés et non exposés.

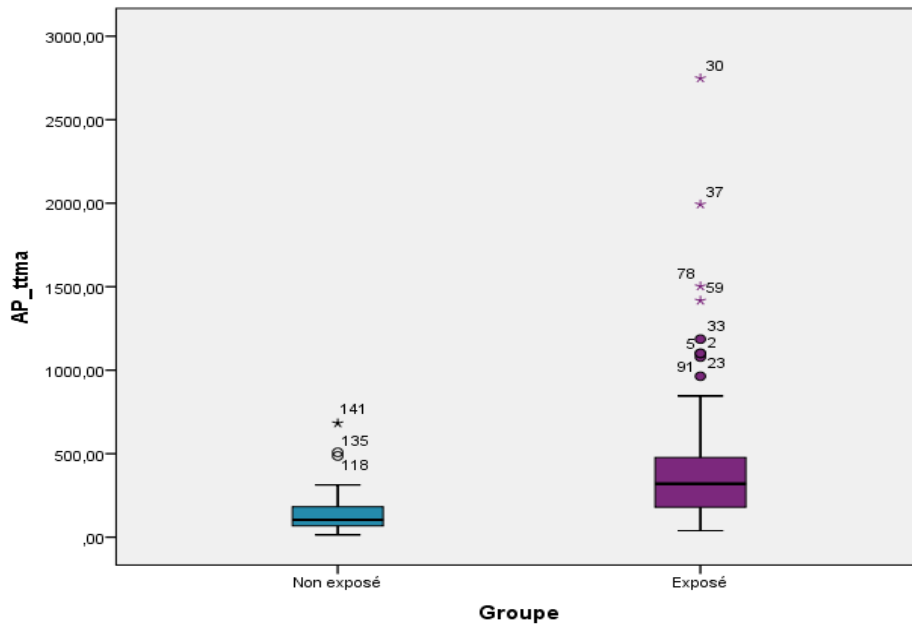


Figure 47: Comparaison du AP t,t-MA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les exposés et non exposés ($p < 0,0001$)

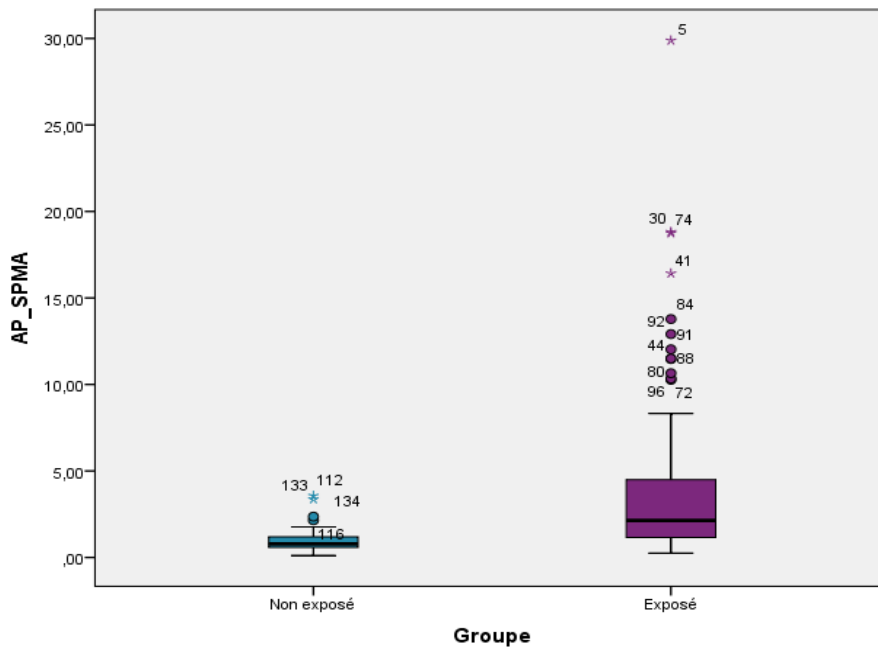


Figure 48 : Comparaison du AP S-PMA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les exposés et non exposés ($p < 0,0001$)

II.4.3. Biomarqueurs de l'effet génotoxique par stress oxydatif

II.4.3.1. Comparaison entre les groupes

Le **Tableau 41** regroupe les données des produits d'oxydation de la guanine chez la population d'étude.

Tableau 41 : Données des biomarqueurs de l'effet oxydatif en AP chez la population étudiée

	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=40	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Guanine						
Moy ± ET	146,83±129,44	141,82±131,8	153,88±127,29	190,12±254,4	0,45	0,5
Min - Max	9,63-553,94	9,63-493,11	12,15-553,94	30,12-1473,46		
Q1	53,64	36,26	56,17	64,82		
Méd	98,53	94,61	100,85	125,32		
Q3	195,94	190,40	217,70	209,83		
8OxoGuanine						
Moy ± ET	19,94±17,25	19,63±15,33	20,36±19,82	21,6±20,23	0,665	0,878
Min - Max	2,6-89,76	2,62-73,57	2,6-89,76	2,05-111,03		
Q1	7,92	7,92	7,88	8,98		
Méd	14,31	15,97	14,18	16,02		
Q3	26,085	25,16	26,85	26,81		
Guanosine						
Moy ± ET	96,88±78,44	94,35±80,72	100,43±75,93	74,81±78,9	<0,01	<u>0,027</u>
Min - Max	18,84-467,67	19,52-467,67	18,84-344,59	5,29-416,64		
Q1	47,305	46,35	51,35	34,11		
Méd	73,16	66,99	76,63	51,13		
Q3	115,96	113,16	126,00	79,71		

pom : pompiste **méc** : mécanicien **EX** : exposés **NE** : non exposés **Q1** : 1^{er} quartile **Q3** : 3^{ème} quartile **méd** : médiane **moy** : moyenne **ET** : écart type

Tableau 41 : Données des biomarqueurs de l'effet oxydatif en AP chez la population étudiée
(suite)

	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=40	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
8OxoGuanosine						
Moy ± ET	3,68±2,31	3,44±1,7	4±2,95	3,52±2,48	0,662	0,839
Min - Max	0,47-15,91	0,47-9,05	0,78-15,91	0,36-14,86		
Q1	2,22	2,23	2,16	2,09		
Méd	3,06	3,00	3,24	3,18		
Q3	5,03	4,86	5,19	4,61		
désoxyGuanosine						
Moy ± ET	2,62±1,91	2,47±1,7	2,82±2,17	1,94±1,69	<u>0,004</u>	<u>0,014</u>
Min - Max	0,32-12,04	0,34-9,65	0,32-12,04	0,17-9,07		
Q1	1,41	1,42	1,40	0,92		
Méd	2,14	2,13	2,23	1,45		
Q3	3,185	3,14	3,39	2,77		
8OxodésoxyGuanosine						
Moy ± ET	2,72±1,43	2,58±1,36	2,91±1,51	2,73±3,72	<u>0,048</u>	0,07
Min - Max	0,59-6,73	0,66-6,71	0,59-6,73	0,38-24,39		
Q1	1,6	1,54	1,73	1,46		
Méd	2,4	2,34	2,79	1,96		
Q3	3,58	3,36	3,88	2,67		

pom : pompiste mec : mécanicien EX : exposés NE : non exposés Q1 : 1^{er} quartile Q3 : 3^{ème} quartile méd : médiane moy : moyenne ET : écart type

Aucune différence significative n'est observée pour la guanine ($p = 0,45$ pour EX/NE ; $p = 0,5$ pour Pom/Méc/NE), ni pour la 8-oxoguanine ($p = 0,665$; $p = 0,878$), ni pour la 8-oxoguanosine ($p = 0,662$; $p = 0,839$), suggérant une distribution relativement homogène de ces marqueurs entre les groupes.

En revanche, la guanosine montre une différence significative entre exposés et non exposés ($p < 0,01$), ainsi qu'entre les sous-groupes professionnels ($p = 0,027$), avec des valeurs plus élevées chez les mécaniciens (test post Hoc de Dunn corrigé significatif entre NE/Mec $p=0,031$).

La désoxyguanosine est également significativement plus élevée chez les exposés ($p = 0,004$) et entre les sous-groupes ($p = 0,014$), test de Dunn significatif entre Pom/NE (0,038) et Mec/NE

($p=0,017$), tandis que la 8-oxodésoxyguanosine montre une différence significative entre exposés et non exposés ($p = 0,048$), mais pas entre les sous-groupes ($p = 0,07$).

II.4.3.2. Comparaison entre valeurs AV et AP

Les données en AP ont été mentionnées dans la comparaison inter-groupes, le Tableau 42 présente les valeurs en AV ainsi que les valeur p de la comparaison entre AV et AP.

Tableau 42 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs de l'effet oxydatif chez les sujets exposés

	Valeur AV chez les Sujets exposés (N=101)					
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p AV et AP
Gua	134,22±132	8,62-894,11	53,4	90,57	160,35	0,296
8OxoGua	51,85±302	1,24-3047,57	8,215	12,45	31,92	0,946
Guo	101,66±96,3	14,35-615,58	49	68,13	112,89	0,922
8OxoGuo	3,68±2,92	0,66-19,86	1,79	2,86	4,6	0,488
dGuo	2,77±3,54	0,29-29,21	1,11	1,9	2,88	0,067
8OxodGuo	2,46±1,33	0,52-9,66	1,58	2,11	3,17	0,107
	Valeur AV chez les pompistes (N=59)					
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p AV et AP
Gua	144,44±142,32	12,36-894,11	55,07	96,63	167,61	0,958
8OxoGua	19,75±18,07	2,45-108,07	7,86	12,39	24,96	0,398
Guo	95,45±84,7	18,09-429,31	48,56	70,05	99,17	0,684
8OxoGuo	3,31±2,16	0,9-9,77	1,58	2,51	4,69	0,430
dGuo	2,31±2,22	0,44-14,16	1,06	1,84	2,48	<u>0,018</u>
8OxodGuo	2,24±0,96	0,52-4,61	1,55	2,05	2,7	0,146

Tableau 42 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs de l'effet oxydatif chez les sujets exposés (suite)

	Valeur AV chez les mécaniciens (N=42)					
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p AV et AP
Gua	119,88±116,12	8,62-582,97	50,06	84,83	154,05	0,108
8OxoGua	96,95±467,43	1,24-3047,57	8,40	13,82	36,26	0,449
Guo	110,39±111,08	14,35-615,58	51,80	64,14	156,49	0,644
8OxoGuo	4,2±3,69	0,66-19,86	2,02	3,17	4,55	0,915
dGuo	3,42±4,78	0,29-29,21	1,20	1,94	3,60	0,832
8OxodGuo	2,78±1,69	0,67-9,66	1,61	2,19	3,48	0,461

pom : pompiste **méc** : mécanicien **EX** : exposés **NE** : non exposés **Q1** : 1^{er} quartile **Q3** : 3^{ème} quartile **méd** : médiane **moy** : moyenne **ET** : écart type **AV** : avant-poste **AP** : après poste

Chez les sujets exposés, la comparaison des concentrations urinaires des biomarqueurs entre les prélèvements (AV) et (AP) ne révèle aucune différence significative pour la majorité des composés étudiés, notamment la guanine, la 8-oxoguanine, la guanosine, la 8-oxoguanosine, et la 8-oxodésoxyguanosine (valeurs de $p > 0,05$).

Une exception est observée pour la désoxyguanosine chez les pompistes, dont les concentrations diminuent significativement en après poste ($p = 0,018$), suggérant une possible mobilisation ou transformation métabolique liée à l'activité professionnelle. Chez les mécaniciens, aucune variation significative n'est observée pour ce marqueur ($p = 0,832$).

Ces résultats indiquent une stabilité globale des marqueurs puriniques et oxydatifs entre les deux temps de prélèvement, à l'exception d'une modulation ponctuelle de la désoxyguanosine chez les pompistes, qui pourrait mériter une exploration complémentaire dans la discussion.

Le Tableau 43 récapitule les données des ratios (bases oxydées/bases libres) chez les exposés et les non exposés.

Tableau 43 : Données des ratios (bases oxydées/bases libres) chez les exposés et non exposés

		Ratio AP 8oxodGuo_dGuo	Ratio AP 8oxoGuo_Guo	Ratio AP 8oxoGua_Gua
EX	Moy±ET	1,46 ±1,35	0,05 ±0,04	0,23 ±0,28
	Min-Max	0,14 – 10,33	0,01- 0,31	0,02 -1,79
	Q1	0,72	0,03	0,08
	Méd	1,07	0,04	0,14
	Q3	1,70	0,07	0,23
NE	Moy±ET	1,66 ±1,24	0,07 ±0,04	0,17 ±0,15
	Min-Max	0,41 – 5,95	0,01- 0,15	0,03 – 0,61
	Q1	0,80	0,04	0,08
	Méd	1,24	0,06	0,11
	Q3	2,18	0,09	0,22
Valeur p (EX/NE)		0,184	<u>0,012</u>	0,39
		Ratio AV 8oxodGuo_dGuo	Ratio AV 8oxoGuo_Guo	Ratio AV 8oxoGua_Gua
EX	Moy±ET	1,47 ±1,15	0,05 ±0,07	0,62 ±3,50
	Min-Max	0,14 – 7,03	0,005 – 0,65	0,01 – 35,07
	Q1	0,71	0,02	0,08
	Méd	1,05	0,04	0,14
	Q3	1,96	0,06	0,28
Valeur p (AV/AP)		0,632	0,370	0,666

La comparaison entre les sujets EX et NE a révélé une différence significative pour le ratio 8-oxoguanosine/guanosine ($p = 0,012$), avec des valeurs légèrement plus faibles chez les exposés. En revanche les comparaison entre valeurs AV et AP n'a révélé aucune différence significative.

La Figure 49 montre un chromatogramme de l'extraction de la transition ionique de la guanine chez un sujet exposé.

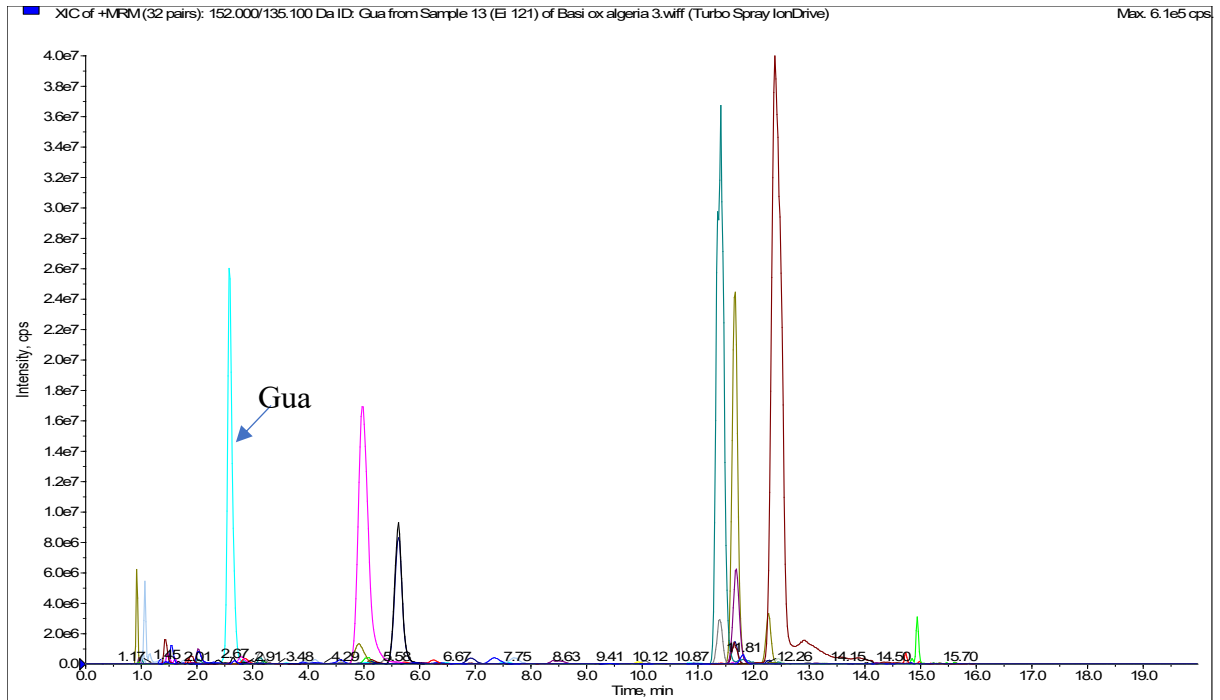


Figure 49: Extraction de la transition de la Gua chez le sujet exposé 121 en AV

La figure 50 illustre une comparaison du AP 8OxodGuo ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les exposés et non exposés.

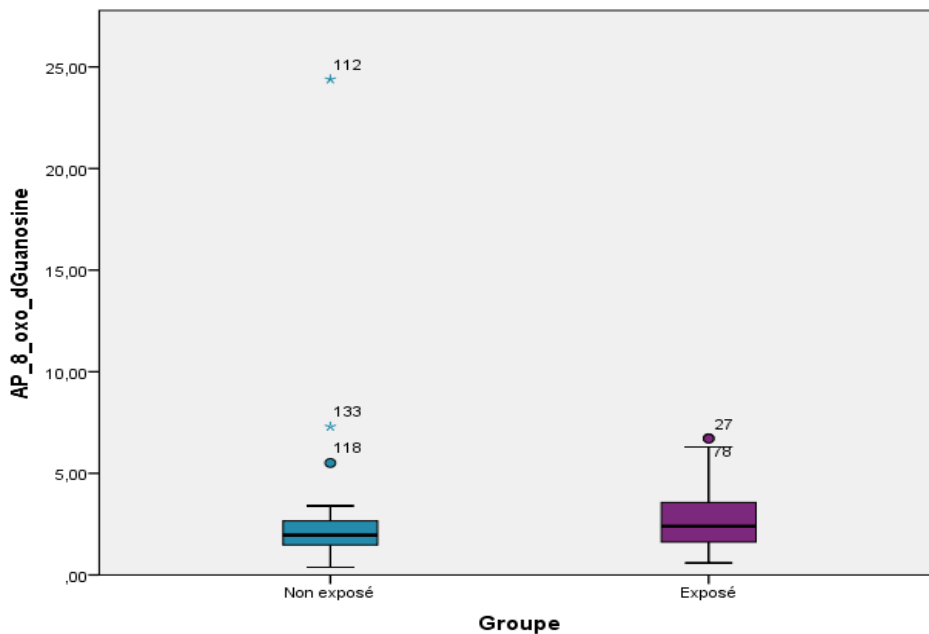


Figure 50 : Comparaison du AP 8OxodGuo ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les exposés et non exposés ($p=0,048$)

II.4.4. Biomarqueurs de l'effet épigénétique

II.4.4.1. Comparaison entre les groupes

Le **Tableau 44** regroupe les données relatives aux biomarqueurs de l'effet épigénétique chez la population d'étude.

Tableau 44: Données des biomarqueurs de l'effet épigénétique chez la population d'étude

Paramètre	NE					EX						P EX/NE
	Moy ±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Moy ±ET	Min	Max	Q1	Méd	Q3	
Cyto	102,3 ± 65,23	28,81- 352,49	63,45	81,87	137,41	157,63 ±178,28	37,18	1603,62	72,36	104,29	190,63	0,015
5MeCyto	24,82 ± 18,27	3,17 - 72,88	11,85	19,56	29,58	36,74 ±29,54	4,95	198,20	16,90	27,68	50,85	0,01
Cyt	234,8 ± 293,86	33,35 - 1834,63	115,24	167,14	251,28	273,64 ±428,26	4,29	4264,16	146,31	197,26	279,90	0,084
5MeCyt	7,38 ± 9,26	0,8 - 47,62	2,57	4,83	6,53	10,84 ±22,38	0,67	217,83	3,47	6,21	10,84	0,035
dCyt	2,31 ± 4,13	0,08 - 25,46	0,63	1,27	1,80	4,77 ±25,59	0,18	258,21	0,92	1,64	2,68	0,052
5MedCyt	2,90 ± 3,25	0,23 - 14,44	0,89	1,62	3,51	4,37 ±7,17	0,10	64,78	1,15	2,45	5,14	0,137
7MeGua	3977,68 ± 4615,3	855 - 30022,12	2045,86	2860,83	4717,79	4008 ±2572,3	744,29	12571,33	2043,0	3307,3	5098,6	0,35
1MeGua	57,31 ± 80,55	9,34 - 505,88	20,18	30,66	63,60	77,62 ±120,16	5,54	847,64	22,54	41,64	84,96	0,354
7MeGuo	27,67 ± 37,46	3,85 - 237,84	11,25	19,16	33,03	29 ±21,06	0,78	177,45	17,22	25,55	36,12	0,04
5OHMeCyto	6,54 ± 6,17	1,06 - 31,16	2,84	4,62	8,38	6,31 ±7,35	0,89	63,43	2,52	4,32	7,30	0,504
5OHMedCyt	1,47 ± 1,49	0,25 - 9,23	0,71	1,03	1,86	1,6 ±1,07	0,20	5,14	0,91	1,34	2,33	0,054

Des différences significatives sont observées pour : La (Cyto) : plus élevée chez les exposés ($p = 0,015$), la (5MeCyto) : également plus élevée chez les exposés ($p = 0,01$), la (5MeCyt) : significativement augmentée chez les exposés ($p = 0,035$) et la (7MeGuo) : légèrement plus élevée chez les exposés ($p = 0,04$). Les autres marqueurs, tels que la (Cyt), la d (dCyt), la (5MedCyt), ainsi que les dérivés méthylés de la guanine (7MeGua, 1MeGua), ne montrent pas de différence significative, bien que certaines tendances soient observées (ex. : $p = 0,052$ pour dCyt ; $p = 0,054$ pour 5OHMedCyt).

Tableau 44: Données des biomarqueurs de l'effet épigénétique chez la population d'étude (suite)

Paramètre	Pom							Méc							P Pom/Mec/ NE
	Moy	ET	Min	Max	Q1	Méd	Q3	Moy	ET	Min	Max	Q1	Méd	Q3	
Cyto	144,50	99,67	43,17	496,61	72,65	105,76	190,84	176,08	250,	37,18	1603,62	72,05	99,81	184,52	0,049
5MeCyto	36,42	25,43	4,95	109,74	18,19	29,01	50,44	37,17	34,8	6,45	198,20	15,97	23,87	52,53	0,029
Cyt	235,53	116,64	26,16	657,66	154,87	212,42	286,10	327,19	650,	4,29	4264,16	112,20	174,40	283,75	0,093
5MeCyt	7,62	5,82	0,67	28,49	3,19	6,05	10,69	15,38	33,7	1,00	217,83	3,72	6,87	12,73	0,077
dCyt	2,42	3,05	0,24	22,10	0,91	1,60	2,67	8,07	39,5	0,18	258,21	0,92	1,66	2,73	0,15
5MedCyt	3,66	3,19	0,13	11,56	1,34	2,55	5,47	5,37	10,4	0,10	64,78	1,00	2,40	4,38	0,317
7MeGua	3793,5	2455,41	744,2	11376,4	1908,25	3204,29	5009,16	4309,23	2729	966,05	12571,33	2209,3	3892,72	5316,46	0,408
1MeGua	58,55	52,52	5,54	244,91	22,04	39,18	102,85	104,40	173,	5,90	847,64	22,79	44,17	75,99	0,534
7MeGuo	29,15	13,16	8,00	79,00	21,13	27,33	36,85	28,79	28,9	0,78	177,45	12,61	22,05	35,37	0,025
5OHMeCyto	6,56	4,86	1,33	22,72	3,45	4,89	8,18	5,95	9,90	0,89	63,43	2,12	3,30	5,99	0,019
5OHMedCyt	1,81	1,17	0,20	5,14	0,91	1,45	2,65	1,51	0,90	0,22	4,59	0,89	1,23	1,97	0,097

Les médianes de (**Cyto**) et de (**5MeCyto**) sont significativement différents entre les trois groupe ($p = 0,049$ et $p = 0,029$ respectivement) le test post Hoc de Dunn a affiché des différences pour la paire Pom/NE avec ($p=0,05$ et $0,026$ respectivement).

Deux autres marqueurs montrent également des différences significatives entre groupes (**7MeGuo**) ($p = 0,025$) (Dunn test Pom/NE $p=0,028$) et (**5OHMeCyto**) ($p = 0,019$) (Dunn test $p=0,018$).

Les autres biomarqueurs ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes, bien que certaines tendances soient observées.

II.4.4.1. Comparaison entre les valeurs en AV et AP

Les données en AP ont été mentionnées dans la comparaison inter-groupes, le Tableau 45 présente les valeurs en AV ainsi que les valeur p de la comparaison entre AV et AP.

Tableau 45 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs de l'effet épigénétique chez les sujets exposés

	Valeur AV chez les Sujets exposés (N=101)							
	Moy	ET	Min	Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p AV et AP
Cyto	149,19	148,85	26,24	1124,99	69,97	100,42	181,33	0,322
5MeCyt	35,86	36,93	3,74	301,63	16,10	24,55	44,65	0,342
Cyt	348,2	969,56	40,5	9629,5	122,97	188,59	284,72	0,843
5MeCyt	18,45	61,51	0,63	593,35	3,98	6,48	13,45	0,016
dCyt	11,63	89,1	0,22	897,3	0,89	1,59	2,99	0,796
5MedCyt	7,35	23,39	0,08	222,59	1,11	2,41	5,16	0,424
7MeGua	3684,39	2523,51	637,53	13518,64	1974,93	2831,31	4953,77	0,164
1MeGua	50,38	49,77	5,46	284,25	18,94	29,90	63,17	0,032
7MeGuo	30,14	30,08	3,61	197,48	14,23	19,85	37,75	0,51
5OHMeCyt	7,42	14,05	0,97	138,51	2,83	4,50	8,12	0,824
5OHMedCyt	2,12	2,02	0,03	13,41	0,95	1,52	2,42	0,117
	Valeur AV chez les pompistes (N=59)							
	Moy	ET	Min	Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p AV et AP
Cyto	122,35	100,91	26,24	628,06	61,44	91,73	157,44	0,067
5MeCyt	32,87	40,95	3,74	301,63	15,37	21,70	36,84	0,12
Cyt	232,36	172,22	41,77	1063,93	126,61	184,81	284,94	0,365
5MeCyt	9,91	10,16	0,63	59,97	4,52	6,88	12,24	0,04
dCyt	2,43	3,41	0,22	22,96	0,83	1,51	2,62	0,284
5MedCyt	4,50	6,26	0,14	40,65	1,27	2,52	5,11	0,78
7MeGua	3340,44	2281,70	909,01	11873,99	1672,82	2596,13	4306,62	0,177
1MeGua	43,57	37,59	6,82	167,22	17,95	28,51	60,18	0,062
7MeGuo	25,06	27,42	3,61	197,48	11,29	17,22	28,89	0,008
5OHMeCyt	5,87	4,86	0,97	25,18	2,67	4,40	7,74	0,133
5OHMedCyt	1,85	1,35	0,32	7,09	1,02	1,60	2,15	0,886

Tableau 45 : Comparaison entre les valeurs AV et AP des biomarqueurs de l'effet épigénétique chez les sujets exposés (suite)

	Valeur AV chez les mécaniciens (N=42)							
	Moy	ET	Min	Max	Q1	Méd	Q3	Valeur p AV et AP
Cyto	186,89	192,72	34,71	1124,99	79,68	127,73	206,39	0,722
5MeCyto	40,06	30,39	6,08	131,81	17,48	31,88	52,14	0,778
Cyt	510,94	1484,73	40,50	9629,50	100,23	196,57	285,13	0,595
5MeCyt	30,46	93,97	1,02	593,35	3,70	6,39	24,37	0,156
dCyt	24,56	138,04	0,27	897,30	0,91	1,86	3,68	0,129
5MedCyt	11,37	35,38	0,08	222,59	0,93	1,98	6,65	0,368
7MeGua	4167,57	2785,29	637,53	13518,64	2240,78	3195,43	5144,46	0,553
1MeGua	59,94	62,32	5,46	284,25	21,67	31,44	70,93	0,274
7MeGuo	37,28	32,48	9,08	156,72	17,61	26,88	44,24	<u>0,05</u>
5OHMeCyto	9,59	20,97	1,14	138,51	2,83	4,77	9,98	<u>0,027</u>
5OHMedCyt	2,51	2,67	0,03	13,41	0,91	1,52	2,93	<u>0,025</u>

Chez l'ensemble des exposés, une baisse significative en est observée uniquement pour la (5MeCyt) entre AV et AP ($p = 0,016$), ainsi que pour la (1MeGua) ($p = 0,032$).

Chez les pompistes, la 5MeCyt reste significativement plus élevée en AV ($p = 0,04$), et la (7MeGuo) montre une augmentation significative ($p = 0,008$).

Chez les mécaniciens, deux marqueurs du processus de déméthylation par les enzymes TET montrent une élévation significative en AP :

- (5OHMeCyto) ($p = 0,027$)
- (5OHMedCyt) ($p = 0,025$)

La Figure 51 illustre une comparaison du AP 5MeCyto ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les exposés et non exposés.

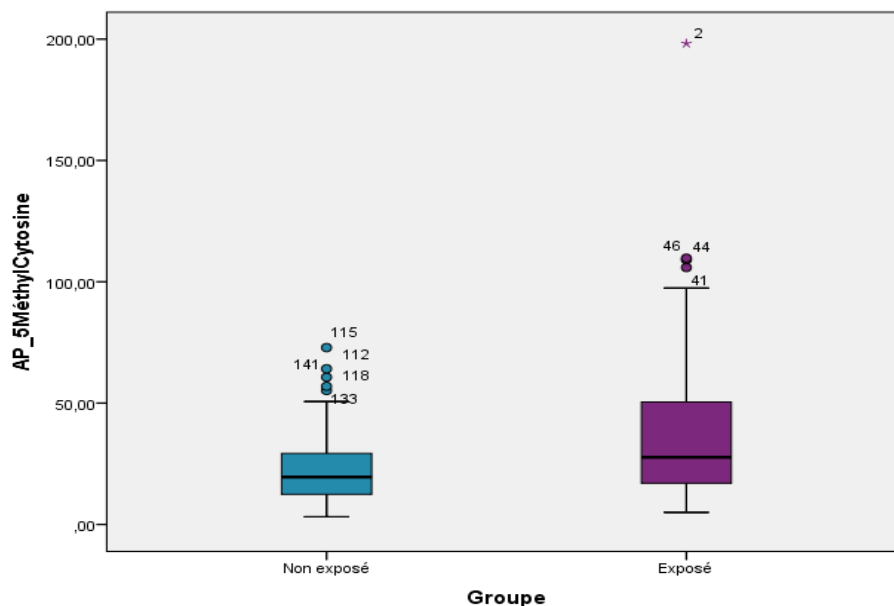


Figure 51 : Comparaison du AP 5MeCyto ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les exposés et non exposés ($p < 0,01$)

II.4.5. Biomarqueurs de l'effet hématologique

II.4.5.1. Comparaison entre les groupes

Le Tableau 46 récapitule les données relatives aux paramètres hématologiques étudiés, **102 bilans** sur 141 ont pu être collectés : **65** chez les exposés dont **36** pompistes et **29** mécaniciens et **37** chez les non exposés.

Tableau 46: Données relatives aux biomarqueurs de l'effet hématologique

Paramètre	EX N=65	Pom N=36	Méc N=29	NE N=37	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Mec/NE
GR	4,68 ± 0,58	4,52 ± 0,59	4,89 ± 0,52	4,85 ± 0,4	0,083	0,006
HB	13,96 ± 1,25	13,58 ± 1,22	14,44 ± 1,13	14,40 ± 1,12	0,139	0,003
Hct	42,14 ± 3,35	41,43 ± 3,49	43,03 ± 3,01	43,22 ± 3,18	0,118	0,044
GB	7,49 ± 2,27	8,16 ± 2,39	6,67 ± 1,83	7,48 ± 1,87	0,976	0,018
Lymph	2,37 ± 0,84	2,46 ± 0,79	2,26 ± 0,9	2,44 ± 0,64	0,665	0,542
Neutro	4,44 ± 1,91	5,01 ± 1,87	3,47 ± 1,6	4,16 ± 1,6	0,488	0,006
Mono	0,5 ± 0,19	0,49 ± 0,2	0,51 ± 0,18	0,47 ± 0,2	0,572	0,745
Plq	256,98 ± 56,94	260,22 ± 54,77	252,95 ± 60,26	248,62 ± 50,69	0,61	0,663

GR : globules rouges (4,28 à 6 T/L) HB : hémoglobine (13 à 17 G/100mL) GB : globules blancs (4 à 10 G/L) Neutro : neutrophiles (2,0 à 7 G/L) Mono : monocytes (0,2 à 0,8 G/L) Plq : plaquettes (150 à 400 G/L) Lymph : lymphocytes (1 à 4 G/L) Hct : Hématocrite (39 à 50 %)

La comparaison des paramètres hématologiques entre les sujets exposés (pompistes et mécaniciens) et non exposés révèle plusieurs différences significatives selon les sous-groupes professionnels, bien que les différences globales entre exposés et non exposés ne soient pas toutes significatives.

- Les **GR**, **HB** et l'**Hct** sont légèrement plus faibles chez les pompistes comparés aux mécaniciens et aux témoins, avec des différences significatives entre les trois groupes ($p = 0,003$ pour GR ; $p = 0,006$ pour HB ; $p = 0,044$ pour Hct), mais non significatives dans la comparaison globale EX/NE.
- Les **GB** sont significativement plus élevés chez les pompistes ($8,16 \pm 2,39$) que chez les mécaniciens ($6,67 \pm 1,83$), avec une différence significative entre les trois groupes ($p = 0,018$), mais non significative entre exposés et non exposés ($p = 0,976$).
- Les neutrophiles suivent une tendance similaire, avec des valeurs plus élevées chez les pompistes ($5,01 \pm 1,87$) et plus faibles chez les mécaniciens ($3,47 \pm 1,6$), différence significative entre les groupes ($p = 0,006$), mais non significative entre EX/NE ($p = 0,488$).
- Les autres paramètres (lymphocytes, monocytes, plaquettes) ne montrent pas de différence significative entre les groupes.

III.4.5.2. Comparaison par rapport aux normes

Le **Tableau 47** présente les paramètres hémobiologiques des sujets exposés et non exposés, comparés aux valeurs de référence usuelles.

Tableau 47: Répartition des paramètres hématologiques selon les seuils de normalité chez les exposés et non exposés

	Modalité	NE (37)	EX (65)	POM	MEC	p value EX/NE	p value Pom/Mec/NE
GR	HN	2 (5,4%)	14 (21,5%)	10 (27,77%)	4 (13,79%)	0,045	0,027
	Normal	35 (94,6%)	51 (78,5%)	26 (72,2%)	25 (78,5%)		
HB	HN	3 (8,1%)	12 (18,5%)	10 (27,77%)	2 (6,89%)	0,245	0,026
	Normal	34 (91,9%)	53 (81,5%)	26 (72,2%)	27 (93,1%)		
Hct	HN	2 (5,4%)	10 (15,38%)	7 (19,44%)	3 (10,34%)	0,765	0,492
	Normal	35 (94,6%)	55 (84,61%)	29 (80,6%)	26 (89,7%)		
GB	HN	2 (5,4%)	10 (15,4%)	7 (19,44%)	3 (10,34%)	0,203	0,168
	Normal	35 (94,6%)	55 (84,6%)	29 (80,6%)	26 (89,7%)		
Lymph	HN	0 (0%)	2 (3,1%)	1 (2,77%)	1 (3,44%)	0,533	0,397
	Normal	37 (100%)	63 (96,9%)	35 (97,2%)	28 (96,6%)		
Neutro	HN	3 (9,37%)	12 (22,22%)	7 (20,58%)	5 (25%)	0,153	0,269
	Normal	29 (90,62%)	42 (77,77%)	27 (79,41%)	15 (75%)		
Mono	HN	3 (9,37%)	4 (7,4%)	3 (8,82%)	1 (0,05%)	1	0,825
	Normal	29 (90,62%)	50 (92,59%)	31 (91,17%)	19 (65,5%)		
Plq	HN	0 (0%)	2 (3,1%)	1 (2,77%)	1 (3,44%)	0,533	0,397
	Normal	37 (100%)	63 (96,9%)	35 (97,2%)	28 (96,6%)		

HN : hors normes GR : globules rouges (4,28 à 6 T/L) HB : hémoglobine (13 à 17 G/100mL) GB : globules blancs (4 à 10 G/L) Neutro : neutrophiles (2,0 à 7 G/L) Mono : monocytes (0,2 à 0,8 G/L) Plq : plaquettes (150 à 400 G/L) Lymph : lymphocytes (1 à 4 G/L) Hct : Hématocrite (39 à 50 %)

L'analyse des fréquences d'anomalies hématologiques révèle des différences significatives pour certains paramètres entre les groupes.

- Les **globules rouges (GR)** présentent une proportion d'anomalies significativement plus élevée chez les exposés (21,5 %) que chez les non exposés (5,4 %) ($p = 0,045$), avec une différence également significative entre les sous-groupes ($p = 0,027$), les pompistes étant les plus touchés (27,77 %).
- Pour l'HB, bien que la différence entre exposés et non exposés ne soit pas significative ($p = 0,245$), une différence significative est observée entre les sous-groupes ($p = 0,026$), avec une fréquence d'anomalies plus élevée chez les pompistes (27,77 %) que chez les mécaniciens (6,89 %).
- Les autres paramètres (hématocrite, globules blancs, lymphocytes, neutrophiles, monocytes, plaquettes) ne montrent pas de différence significative entre exposés et non exposés, ni entre les sous-groupes, bien que certaines tendances soient observées (ex. : neutrophiles anormaux chez 25 % des mécaniciens).

Le Tableau 48 mentionne les détails des paramètres supérieurs et inférieurs aux normes.

Tableau 48: Données hémobiotologiques en fonction des valeurs supérieures et inférieures aux normes chez les sujets d'étude

		EX (N=65)	NE (N=37)	Pompistes (36)	Mécaniciens (29)
GR	Normale	51 (78,5%)	35 (94,6%)	26 (72,2%)	25 (78,5%)
	< Normale	13 (20%)	2 (5,4%)	10 (27,8%)	3 (20%)
	> Normale	1 (1,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,5%)
HB	Normal	53 (81,5%)	34 (91,9%)	26 (72,2%)	27 (93,1%)
	< Normes	12 (18,5%)	3 (8,1%)	10 (27,8%)	2 (6,9%)
	> Normes	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Hct	Normal	55 (84,6%)	33 (88,9%)	29 (80,6%)	26 (89,7%)
	< Normes	10 (15,4%)	4 (11,1%)	7 (19,4%)	3 (10,3%)
	> normes	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
GB	Normal	55 (84,6%)	35 (94,6%)	29 (80,6%)	26 (89,7%)
	< Normes	3 (4,6%)	0 (0%)	1 (2,8%)	2 (6,9%)
	> normes	7 (10,8%)	2 (5,4%)	6 (16,7%)	1 (3,4%)
Lymph	Normal	63 (96,9%)	37 (100%)	35 (97,2%)	28 (96,6%)
	< Normes	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	> normes	2 (3,1%)	0 (0%)	1 (2,8%)	1 (3,4%)

Tableau 48 : Données hématologiques en fonction des valeurs supérieures et inférieures aux normes chez les sujets d'étude (suite)

		EX (N=65)	NE (N=37)	Pompistes (36)	Mécaniciens (29)
Neutro	Normal	42 (64,6%)	29 (78,4%)	27 (75%)	15 (51,7%)
	< Normes	6 (9,2%)	2 (5,4%)	2 (5,6%)	4 (13,8%)
	> normes	17 (26,2%)	6 (16,2%)	7 (19,4%)	10 (34,5%)
Mono	Normal	50 (76,9%)	29 (78,4%)	31 86,1%	19 65,5%
	< Normes	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	> normes	15 (23,1%)	8 (21,6%)	5 (13,9%)	10 (34,5%)
Plq	Normal	63 (96,92%)	37 (100%)	35 (97,2%)	28 (96,6%)
	< Normes	1 (1,54%)	0 (0%)	1 (3,4%)	0 (0%)
	> Normes	1 (1,54%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,5%)

II.4.6. Biomarqueur d'exposition à la nicotine (cotinine urinaire)

II.4.6.1. Comparaison entre les groupes

Le Tableau 49 récapitule les données relatives aux valeurs de la cotinine urinaire chez la population d'étude.

Tableau 49 : Données relatives à la cotinine urinaire chez les sujets de l'étude

$\mu\text{g/g créa}$	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=40	Valeur <i>p</i> EX/NE	Valeur <i>p</i> Pom/Méc/NE
Moy \pm ET	899,61 \pm 1441,93	1168,31 \pm 1437,97	522,16 \pm 1377,01	376,65 \pm 798,89	0,003	<0,0001
Min - Max	0,03-8422,97	0,03-6022,12	0,03-8422,97	0,03-4061,22		
Q1	0,86	2,46	0,413	0,12		
Méd	383,30	728,56	1,910	1,22		
Q3	1198,81	1860,12	592,140	466,78		

Les concentrations de la cotinine urinaire en AP sont significativement plus élevées chez les sujets exposés que chez les non exposés, avec une différence statistiquement significative ($p = 0,003$). Cette tendance est encore plus marquée dans la comparaison entre les trois groupes ($p < 0,0001$), où le test post Hoc de Dunn a affiché une différence entre Pom/NE ($p < 0,001$) et Pom/Méc ($p = 0,02$).

Les médianes et quartiles confirment cette hiérarchie, avec une médiane de 728,56 $\mu\text{g/g créa}$ chez les pompistes contre 1,22 $\mu\text{g/g créa}$ chez les non exposés.

II.4.6.2. Comparaison entre valeurs AV et AP

Le Tableau 50 présente la comparaison entre les valeurs AV et AP de la cotinine urinaire chez les sujets exposés.

Tableau 50 : Comparaison entre les valeurs AV et AP de la cotinine urinaire chez les sujets exposés

	Sujets exposés (N=101)					
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur <i>p</i>
AV	673,72±1097,76	0,01-7204,89	1,00	220,07	990,19	0,053
AP	899,61±1441,93	0,03-8422,97	0,86	383,3	1198,81	
	Pompistes (N=59)					
AV	671,89±834,07	0,1-4332,65	1,7	426,11	1018,34	<0,001
AP	1168,31±1437,97	0,03-6022,12	2,46	728,56	1860,12	
	Mécaniciens (N=42)					
AV	676,29±1398,23	0,01-7204,89	0,56	3,465	647,03	0,152
AP	522,16±1377,01	0,03-8422,97	0,413	1,91	592,14	

Chez l'ensemble des sujets exposés, les concentrations de la cotinine urinaire sont plus élevées en après poste (AP : 899,61 ± 1441,93 µg/g créa) qu'en avant-poste (AV : 673,72 ± 1097,76 µg/g créa), avec une tendance à la significativité ($p = 0,053$).

Cette élévation est particulièrement marquée chez les **pompistes**, pour lesquels la différence entre AV et AP est hautement significative ($p < 0,001$), avec une médiane passant de 426,11 à 728,56 µg/L.

Chez les **mécaniciens**, la différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0,152$).

II.4.6.3. Comparaison entre fumeurs et non-fumeurs

Le Tableau 51 regroupe les données relatives aux taux de la cotinine urinaire chez les fumeurs et non-fumeurs.

Tableau 51: Données descriptives relatives à la cotinine urinaire ($\mu\text{g/g}$ créa) chez les fumeurs et non-fumeurs

	Fumeurs					
$\mu\text{g/g}$ créa	EX N=38	Pom N=27	Méc N=11	NE N=14	Valeur <i>p</i> EX/NE	Valeur <i>p</i> Pom/Méc/NE
Moy \pm ET	1693,26 \pm 1815,8	1802,89 \pm 1596,6	1424,16 \pm 2336,57	947,75 \pm 1129,5	0,063	0,08
Min - Max	1,14 - 8422,97	1,14 - 6022,12	299,77 - 8422,97	25,51 - 4061,22		
Q1	559,18	587,94	537,33	185,08		
Méd	1019,88	1594,71	795,18	554,34		
Q3	2009,86	2297,15	1031,95	1317,65		
	Non-Fumeurs					
$\mu\text{g/g}$ créa	EX N=63	Pom N=32	Méc N=31	NE N=26	Valeur <i>p</i> EX/NE	Valeur <i>p</i> Pom/Méc/NE
Moy \pm ET	420,9 \pm 875,75	632,88 \pm 1041,2	202,09 \pm 606,11	69,12 \pm 226,27	<u>0,001</u>	<u>\leq0,0001</u>
Min - Max	0,03 - 4335,53	0,03- 4335,53	0,03- 2515,8	0,03 - 876,61		
Q1	0,43	0,72	0,27	0,08		
Méd	1,53	3,16	0,84	0,44		
Q3	400,34	1145,13	3,43	1,13		

Med : médiane Moy : moyenne ET : écart type Méc : mécanicien Pom : pompiste EX : exposés NE : non exposé

Chez les fumeurs, les concentrations de cotinine urinaire sont très élevées dans tous les groupes exposés, elles sont supérieures à celles des non exposés mais sans différence significative.

En revanche, chez les non-fumeurs les différences sont hautement significatives entre les différents groupes, avec des valeurs maximales observées chez les pompistes.

II.4.6.4. Répartition des sujets de l'étude selon les seuils de cotinine urinaire

Le Tableau 52 présente la répartition des sujets de l'étude en fonction du statut tabagique dépendant de la cotinine urinaire stratifié en fonction de la cotinine en $\mu\text{g/g}$ de créa et en $\mu\text{g/L}$.

Tableau 52 : Répartition des sujets de l'étude selon le seuil de la cotinine urinaire

Seuils	EX (101)		NE (40)	Pompistes (59)		Mécaniciens (42)	
	AV	AP	AP	AV	AP	AV	AP
Seuils en $\mu\text{g/g}$ créa							
< 100 $\mu\text{g/g}$ créa	48 (47,5%)	47 (46,5%)	24 (60%)	22 (37,3%)	21 (35,6%)	26 (61,9%)	26 (61,9%)
> 100 $\mu\text{g/g}$ créa	53 (52,5%)	54 (53,5%)	16 (40%)	37 (62,7%)	38 (64,4%)	16 (38,1%)	16 (38,1%)
Seuils en $\mu\text{g/L}$							
< 10 $\mu\text{g/L}$	44 (43,6%)	44 (43,6%)	23 (57,5%)	19 (32,2%)	18 (30,5%)	25 (59,5%)	26 (61,9%)
10-30 $\mu\text{g/L}$	1 (1%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	0 (0%)	0 (0%)
30-100 $\mu\text{g/L}$	2 (1,98%)	1 (1%)	2 (5%)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	1 (2,4%)	0 (0%)
> 100 $\mu\text{g/L}$	54 (53,46%)	55 (54,4%)	15 (37,5%)	38 (64,4%)	39 (66,1%)	16 (38,1%)	16 (38,1%)

EX : exposés NE : non exposés <100 $\mu\text{g/g}$ créa : seuil non-fumeur >100 $\mu\text{g/g}$ créa : seuil fumeur.

< 10 $\mu\text{g/L}$: non-fumeur, 10-30 $\mu\text{g/L}$: fumeur passif, 30-100 $\mu\text{g/L}$: fumeur actif, >100 $\mu\text{g/L}$: fumeur régulier.

La répartition des sujets selon le seuil de cotinine urinaire (100 $\mu\text{g/g}$ créatinine), indicatif du statut tabagique, montre une stabilité entre les prélèvements (AV) et (AP). Chez les exposés, la proportion de sujets classés comme fumeurs reste pratiquement identique (52,5 % en AV vs 53,5 % en AP) tout comme chez les pompistes et mécaniciens.

De même, selon les seuils en $\mu\text{g/L}$, la proportion de fumeurs réguliers (>100 $\mu\text{g/L}$) reste stable entre AV et AP dans tous les groupes (exposés : 53,46 % vs 54,4 % ; mécaniciens : 38,1 % vs 38,1 %).

La stratification des sujets selon les seuils de cotinine urinaire en $\mu\text{g/g}$ créatinine et en $\mu\text{g/L}$ révèle une cohérence globale

Le seuil de 100 $\mu\text{g/g}$ créa permet une distinction binaire entre fumeurs et non-fumeurs. Il classe environ 53 % des exposés comme fumeurs contre 40 % des non exposés.

Le seuil en $\mu\text{g/L}$ révèle que plus de 50 % des exposés sont des fumeurs réguliers (>100 $\mu\text{g/L}$), tandis que près de 44 % sont non-fumeurs (<10 $\mu\text{g/L}$), avec très peu de sujets dans les catégories intermédiaires.

II.4.6.5. Croisement entre statut tabagique déclaré et mesuré

Le Tableau 53 présente la répartition des sujets de l'étude selon leurs statuts tabagiques déclarés et mesurés.

Tableau 53: Tableau croisé entre le statut tabagique déclaré et le statut tabagique mesuré (cotinine AP) chez tous les groupes de l'étude

Tous les sujets de l'étude (N=141)					
		Statut déclaré		Total	p value
		Non-Fumeur (89)	Fumeur (52)		
Statut mesuré	Non-Fumeur (Cot<100)	68 (76,4%)	3 (5,8%)	71 (50,4%)	0,0001
	Fumeur (Cot >100)	21 (23,6%)	49 (94,2%)	70 (49,6%)	
Total		89 (100%)	52 (100%)	141 (100%)	
Sujets exposés (N=101)					
		Statut déclaré		Total	p value
		Non-Fumeur (63)	Fumeur (38)		
Statut mesuré	Non-Fumeur (Cot<100)	45 (71,4%)	2 (5,3%)	47 (46,5%)	0,0001
	Fumeur (Cot >100)	18 (28,6%)	36 (94,7%)	54 (53,5%)	
Total		63 (100%)	38 (100%)	101 (100%)	
Sujets non exposés (N=40)					
		Statut déclaré		Total	p value
		Non-Fumeur (26)	Fumeur (14)		
Statut mesuré	Non-Fumeur (Cot<100)	23 (88,5%)	1 (7,1%)	24 (60,0%)	0,0001
	Fumeur (Cot >100)	3 (11,5%)	13 (92,9%)	16 (40,0%)	
Total		26 (100%)	14 (100%)	40 (100%)	
Pompistes (N=59)					
		Statut déclaré		Total	p value
		Non-Fumeur (32)	Fumeur (27)		
Statut mesuré	Non-Fumeur (Cot<100)	19 (59,4%)	2 (7,4%)	21 (35,6%)	0,0001
	Fumeur (Cot >100)	13 (40,6%)	25 (92,6%)	38 (64,4%)	
Total		32 (100%)	27 (100%)	59 (100%)	
Mécaniciens (N=42)					
		Statut déclaré		Total	p value
		Non-Fumeur (31)	Fumeur (11)		
Statut mesuré	Non-Fumeur (Cot<100)	26 (83,9%)	0 (0,0%)	26 (61,9%)	0,0001
	Fumeur (Cot >100)	5 (16,1%)	11 (100,0%)	16 (38,1%)	
Total		31 (100%)	11 (100%)	42 (100%)	

Parmi les fumeurs déclarés, la quasi-totalité présente des concentrations de cotinine >100 µg/g créatinine (94,2 % au total), confirmant la fiabilité du marqueur biologique pour identifier les fumeurs actifs.

En revanche, 23,6 % des non-fumeurs déclarés présentent des concentrations supérieures au seuil. Cette tendance est particulièrement marquée chez les **pompistes**, dont **40,6 % des non-fumeurs déclarés** sont biologiquement classés comme fumeurs, contre **16,1 % chez les mécaniciens** et **11,5 % chez les non exposés**.

Cela peut être du soit à une non-déclaration du tabagisme, soit une exposition au tabac à chiquer.

Pour éviter tout biais lié à la stratification par rapport à la cotinine nous proposons la classification présentée dans le Tableau 54.

Tableau 54: Répartition des exposés et non exposés selon le statut tabagique

	Statut tabagique			Total
	Vrais non-fumeurs	Tabac à chiquer	Vrais fumeurs	
Non exposé	23 (33,8%)	3 (14,3%)	14 (26,92%)	40 (28,36%)
Exposé	45 (66,2%)	18 (85,7%)	38 (73,07%)	101 (71,63%)
Total	68 (100%)	21 (100%)	52 (100%)	141 (100%)

La Figure 52 illustre l'extraction des transitions de la cotinine et son étalon interne chez le sujet exposé 121 en AV.

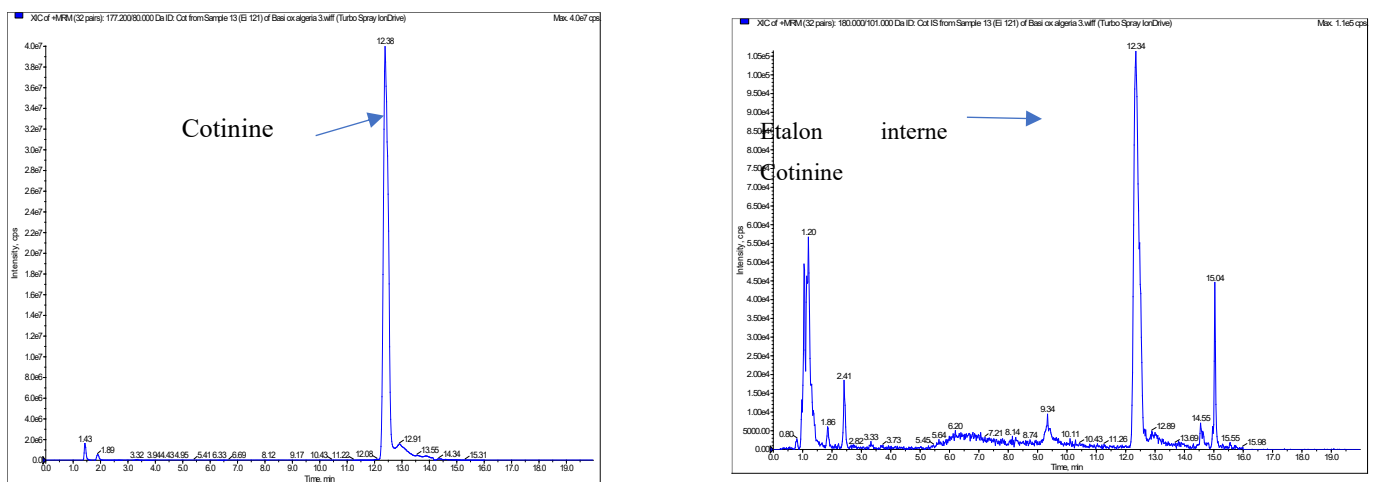


Figure 52 : Extraction de la transition de la cotinine et son étalon interne (cotinine-d3) chez le sujet 121 en AV

II.4.7. Biomarqueur de co-exposition au toluène (S-BMA urinaire)

II.4.7.1. Comparaison entre les groupes

Le Tableau 55 présente les données relatives au S-BMA en AP chez la population d'étude.

Tableau 55: Données relatives au S-BMA (métabolite du toluène) chez les sujets de l'étude

	EX N=101	Pom N=59	Méc N=42	NE N=40	Valeur p EX/NE	Valeur p Pom/Méc/NE
Moy ± ET	1,62 ± 0,81	3,73 ± 2,82	4,30 ± 3,27	3,74 ± 3,65	0,169	0,266
Min - Max	0,72-16,46	0,78-16,46	0,72-16,19	0,31-17,10		
Q1	2,14	2,14	2,11	1,46		
Méd	2,98	2,97	3,34	2,55		
Q3	4,97	4,52	5,34	4,24		

Toutes les valeurs sont en $\mu\text{g/g}$ créa

EX : Exposés NE : Non exposés Pom : Pompistes Méc : Mécaniciens Min : Minimum Max : Maximum Méd : Médiane Q1 : Premier quartile Q3 : 3^{ème} quartile

Les concentrations urinaires de S-BMA ne montrent pas de différence significative entre les sujets exposés (EX) et non exposés (NE) ($p = 0,169$), ni entre les sous-groupes professionnels ($p = 0,266$).

Les moyennes sont relativement proches entre les groupes (EX : $1,62 \pm 0,81 \mu\text{g/g}$ créa ; NE : $3,74 \pm 3,65 \mu\text{g/g}$ créa), avec des médianes légèrement plus élevées chez les mécaniciens ($3,34 \mu\text{g/g}$ créa) que chez les pompistes ($2,97 \mu\text{g/g}$ créa) et les non exposés ($2,55 \mu\text{g/g}$ créa). Les écarts-types élevés et les amplitudes larges (jusqu'à $17,10 \mu\text{g/g}$ créa) traduisent une forte variabilité interindividuelle. Ces résultats suggèrent une absence d'imprégnation spécifique au toluène dans les groupes exposés.

100% des valeurs chez les exposés et non exposés sont inférieures à la VLB fixée à $22 \mu\text{g/g}$ créa chez la population générale.

II.4.7.2. Comparaison entre les valeurs AV et AP

Le Tableau 56 présente la comparaison entre les valeurs AV et AP du SBM-A urinaire chez les sujets exposés.

Tableau 56 : Comparaison entre les valeurs AV et AP du S-BMA urinaire chez les sujets exposés

	Sujets exposés (N=101)					
	Moy±ET	Min-Max	Q1	Méd	Q3	Valeur <i>p</i>
AV	5,34 ±7,48	0,52–51,32	1,82	3,19	5,61	0,797
AP	1,62 ± 0,81	0,72-16,46	2,14	2,98	4,97	
	Pompistes (N=59)					
AV	4,77 ±6,45	0,52-35,32	1,56	2,67	4,9	0,895
AP	3,73 ±2,82	0,78-16,46	2,14	2,97	4,52	
	Mécaniciens (N=42)					
AV	6,15 ±8,76	1,36-51,32	2,58	3,4	6,63	0,595
AP	4,30 ±3,27	0,72-16,19	2,11	3,34	5,34	

Toutes les valeurs sont en µg/g créa

pom : pompiste mec : mécanicien EX : exposés NE : non exposés Q1 : 1^{er} quartile Q3 : 3^{ème} quartile méd : médiane moy : moyenne ET : écart type AV : avant-poste AP : après poste

La comparaison des concentrations urinaires de S-BMA entre les prélèvements avant-poste et après poste chez les sujets exposés ne révèle aucune différence significative ($p = 0,797$), que ce soit pour l'ensemble des exposés ou pour les sous-groupes professionnels (pompistes : $p = 0,895$; mécaniciens : $p = 0,595$).

Chez les exposés, la moyenne en AV ($5,34 \pm 7,48$ µg/g créa) est plus élevée que celle en AP ($1,62 \pm 0,81$ µg/g créa), mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Les médianes et quartiles restent proches entre les deux temps de prélèvement, ce qui suggère une stabilité des concentrations de S-BMA au cours du quart de travail.

II.4.8. Influence de l'âge sur les différents biomarqueurs

II.4.8.1. Comparaison entre les exposés et non exposés selon les tranches d'âge

Le Tableau 57 résume les données significatives par tranche d'âge entre les EX et NE.

Tableau 57: Comparaison entre exposés et non exposés en fonction des tranches d'âge

Variable (AP) µg/gcréa	Groupe	≤ 40 ans (EX=34 NE=11)				41-50 ans (EX=38 NE=20)				≥ 51 ans (EX=29 NE=9)			
		Q1	Méd	Q3	<i>p</i>	Q1	Méd	Q3	<i>p</i>	Q1	Méd	Q3	<i>p</i>
t,t-MA	NE	63,08	76,69	233,63	<u>0,011</u>	71,07	114,27	249,43	<u>0,0001</u>	73,86	93,46	143,67	<u>0,0001</u>
	EX	139,70	303,73	458,82		205,20	337,11	485,37		138,63	305,18	561,89	
S-PMA	NE	0,57	0,79	0,99	<u>0,006</u>	0,38	0,70	1,10	<u>0,0001</u>	0,73	1,33	1,96	0,107
	EX	0,94	1,76	3,47		1,08	2,86	7,77		1,23	1,78	3,33	
Cotinine	NE	0,11	13,25	248,53	0,558	0,18	0,63	154,58	<u>0,0001</u>	0,07	319,34	642,51	0,457
	EX	0,55	3,37	1296,52		2,75	698,06	1427,93		0,65	30,46	1008,02	
dGuo	NE	0,86	1,34	2,41	<u>0,033</u>	0,89	1,47	3,04	0,310	0,80	1,46	1,76	<u>0,019</u>
	EX	1,43	2,31	3,23		1,30	1,97	2,83		1,52	2,21	3,17	
Guo	NE	30,81	40,80	72,45	0,084	35,35	54,48	92,65	0,413	34,24	50,47	74,14	<u>0,035</u>
	EX	45,12	71,68	124,32		42,93	62,44	100,23		53,33	77,08	142,34	
8OxodGuo	NE	1,83	2,47	4,70	0,593	2,03	3,06	4,55	0,259	1,51	1,96	2,31	<u>0,035</u>
	EX	1,98	2,79	4,64		2,34	2,83	4,44		1,76	2,72	3,93	
7MeGuo	NE	12,20	19,60	29,42	0,948	10,30	19,86	35,89	0,155	7,33	14,21	26,36	<u>0,049</u>
	EX	16,32	25,31	30,37		19,58	27,67	37,66		16,53	24,25	37,06	
dCyt	NE	0,64	0,98	1,55	0,289	0,82	1,50	2,18	0,793	0,53	0,65	1,60	<u>0,012</u>
	EX	0,92	1,64	2,47		0,89	1,54	2,91		1,00	1,90	3,13	
5OHMe dCyt	NE	1,14	1,70	2,65	0,354	0,73	1,01	1,48	0,079	0,40	0,45	0,93	<u>0,009</u>
	EX	0,88	1,52	2,58		0,96	1,32	1,99		0,85	1,30	2,37	

L'analyse des biomarqueurs urinaires en après-poste (AP) selon trois tranches d'âge (≤ 40 ans, 41–50 ans, ≥ 51 ans) révèle plusieurs différences significatives entre les sujets exposés (EX) et non exposés (NE) :

- Les métabolites du benzène, **t,t-MA** et **S-PMA**, sont systématiquement plus élevés chez les exposés dans toutes les tranches d'âge, avec des différences hautement significatives ($< 0,0001$).
- La **cotinine urinaire**, bien que très variable, montre une différence significative uniquement dans la tranche 41–50 ans ($p < 0,0001$), avec des valeurs beaucoup plus élevées chez les exposés.
- Les marqueurs de stress oxydatif et de méthylation (**dGuo**, **Guo**, **8-oxodGuo**, **7MeGuo**, **dCyt**, **5OHMedCyt**) présentent plusieurs différences significatives entre exposés et non exposés, notamment dans la tranche extrême (≥ 51 ans), avec des p-values allant de 0,009 à 0,035.

II.4.8.2. Comparaison selon les tranches d'âge chez le groupe des exposés

La comparaison entre variables d'intérêt chez les sujets exposés en fonction des tranches d'âge n'a révélé que des différences statistiquement significatives pour l'âge et l'ancienneté ($p < 0,0001$).

II.4.9. Influence du tabagisme

II.4.9.1. Influence du tabagisme sur les différents biomarqueurs chez les exposés et non exposés

Le **Tableau 58** récapitule les différences significatives entre sujets exposés et non exposés stratifiés selon le statut tabagique déclaré (valeurs AP).

Tableau 58 : Différences significatives entre exposés et non exposés stratifiés selon le statut tabagique déclaré

Fumeurs (N=52)					Non-fumeurs (N=89)						
Variable		NE N=14	Pom N=27	Mec N=11	p	Variable		NE (N=26)	Pom N=32	Mec N=31	P
t,t- MA	Q1	73,07	296,88	151,54	0,0001	t,t-MA	Q1	59,79	132,54	122,29	0,001
	Méd	101,86	440,75	306,21			Méd	103,86	273,77	301,24	
	Q3	246,10	512,57	777,88			Q3	149,40	408,28	517,25	
S- PMA	Q1	0,82	2,54	1,32	0,0001	S-PMA	Q1	0,36	1,26	0,75	0,0001
	Méd	1,25	5,04	2,82			Méd	0,67	1,87	1,10	
	Q3	1,96	11,50	3,10			Q3	0,85	4,07	2,16	
						Anc	Q1	10,0	2,3	7,0	0,001
					Méd		14,0	5,5	18,0		
					Q3		20,0	12,8	30,0		
						Cot	Q1	0,08	0,72	0,27	0,0001
					Méd		0,42	3,16	0,84		
					Q3		1,02	1145,13	3,43		
						dGuo*	Q1	0,84	1,24	1,66	0,05
					Méd		1,34	1,78	2,14		
					Q3		2,31	2,29	3,38		
						8OxodGuo*	Q1	1,38	1,34	1,91	0,003
					Méd		1,87	2,04	2,86		
					Q3		2,70	2,71	3,95		
						7MeGua*	Q1	1790,19	1685,62	2729,50	0,004
					Méd		2947,67	2954,20	4115,49		
					Q3		4198,76	3453,14	5468,63		
						1MeGua	Q1	16,71	21,08	29,64	0,029
					Méd		27,30	29,81	46,63		
					Q3		74,12	56,31	93,83		

Anc : ancienneté cot : cotinine NE : non exposés EX : exposés Q1 : premier quartile Q3 : 3^{ème} quartile Méd : médiane *: ANOVA Pom : pompiste Mec : mécanicien

Concernant la comparaison du bilan hémodiologique chez les non-fumeurs dont les effectifs sont : NE (N=24), Pom (N=20) et Mec (N= 22), les différences sont statistiquement significatives pour les variables suivantes (ANOVA) :

HB p= 0,028 tukey test: Pom/NE (p=0,042)

GR p= 0,007 tukey test: NE/Pom (p=0,012) Pom/Mec (p=0,018)

Hct $p=0,029$ tukey test: NE/Pom ($p=0,023$)

La comparaison entre fumeurs a révélé une différence significative entre les trois groupes pour le t,t-MA, le test post Hoc de Dunn a révélé une différence entre la paire Pom/NE ($p=0,002$) et la paire Mec/NE ($p=0,05$). Concernant le S-PMA l'analyse post HOC a affiché une valeur de ($p=0,017$) pour la paire Pom/Méc et ($p=0,002$) pour la paire Pom/NE.

La comparaison entre non-fumeurs a révélé plus de différences significatives entre les groupes.

Selon les analyses en post Hoc de Dunn, pour t,t-MA elle concerne la paire Mec/NE ($p=0,006$), pour le S-PMA la paire Pom/NE ($p=0,005$). Pour l'ancienneté, ($p=0,005$) entre NE/Pom et ($p=0,002$) entre Pom/Mec. Pour la cotinine entre Pom/NE ($p=0,013$) et Mec/Pom ($p=0,043$). Concernant la dGuo la différence concerne uniquement la paire Mec/NE ($p=0,05$) et pour la 8OxodGuo elle concerne la paire Mec/NE et la paire Pom/Mec dont pour les deux ($p=0,0009$).

Pour le 7MeGua et 1MeGua la différence concerne les paire NE/Mec ($p=0,024$ et $0,029$) et Pom/Mec ($p=0,006$ et $0,026$) respectivement.

Les Figure 53 et 54 illustrent une comparaison du t,t-MA et S-PMA entre fumeurs exposés et non exposés

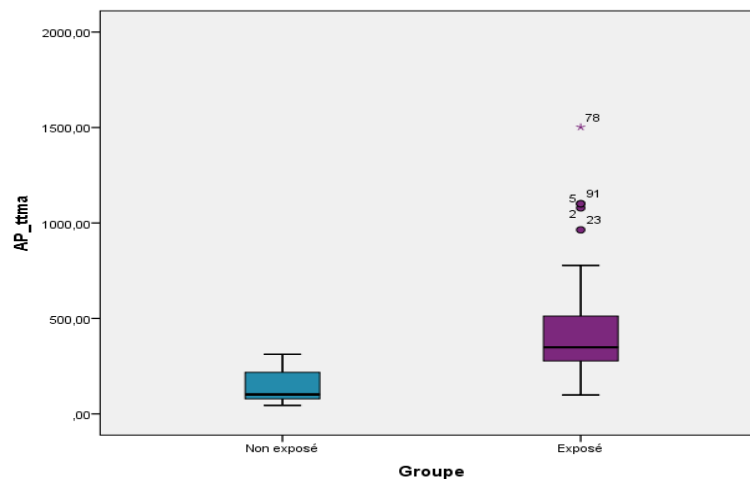


Figure 53 : Comparaison du AP t,t-MA ($\mu\text{g/g créa}$) chez les fumeurs des exposés et des non exposés ($p<0,0001$)

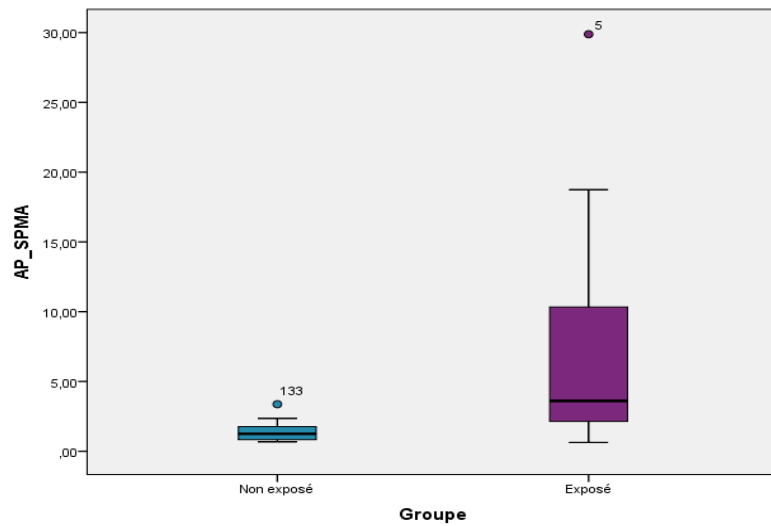


Figure 54 : Comparaison du AP S-PMA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre les fumeurs des exposés et non exposés ($p < 0,0001$)

Les Figure 55 illustrent une comparaison du t,t-MA et SPMA entre non-fumeurs des exposés et non exposés

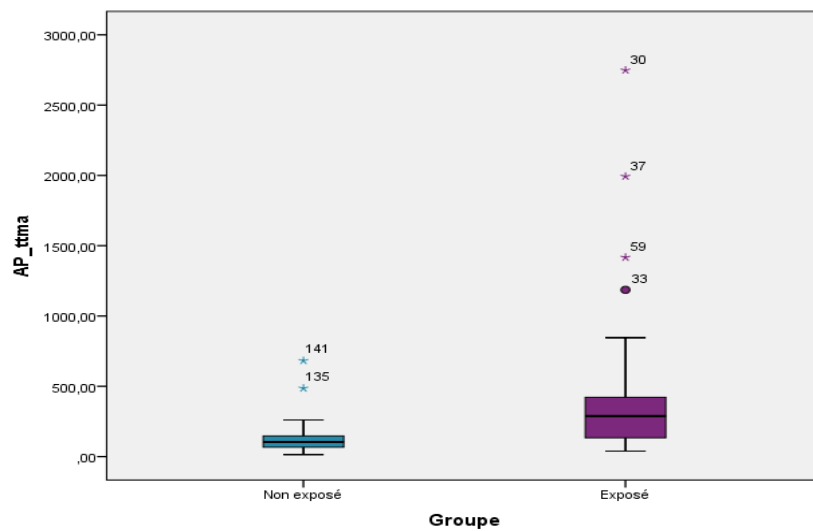


Figure 55 : Comparaison du AP t,t-MA ($\mu\text{g/g}$ créa) entre exposés et non exposés non-fumeurs ($p < 0,0001$)

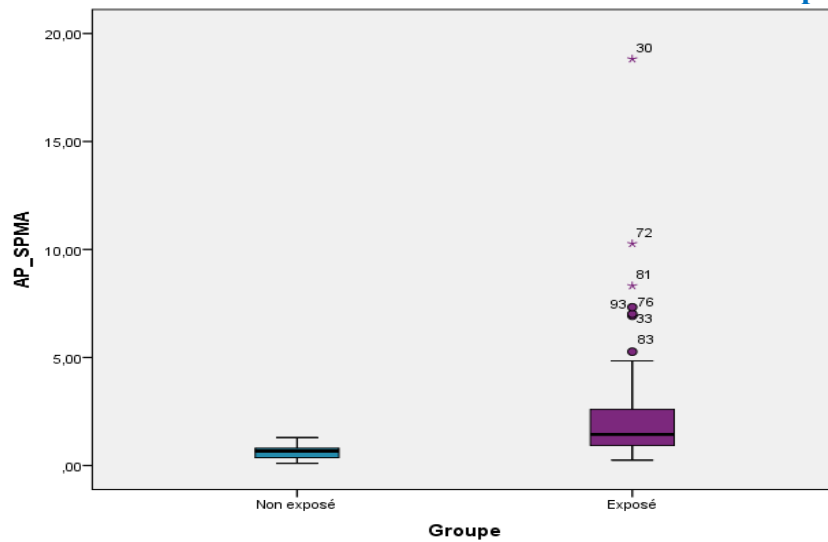


Figure 56 : Comparaison du AP S-PMA (µg/g créa) entre exposés et non exposés non-fumeurs (p<0,0001)

II.4.9.2. Influence du tabagisme sur les différents biomarqueurs chez les exposés et non exposés (tranches de cotinine)

Nous avons décidé de ne pas effectuer la comparaison pour la 2^{ème} tranche qui correspond au tabac à chiquer (Cot >100 et NF) contenant 18 exposés et 3 non exposés, par soucis d'effectifs insuffisants. Le Tableau 59 regroupe les comparaisons significatives entre exposés et non exposés selon les seuils de cotinine.

Tableau 59: Comparaisons significatives entre exposés et non exposés par rapport aux tranches de cotinine

Groupe	Variable Valeurs AP	Vrais non-fumeurs (Cot < 100 +NF) EX=45 NE=23				Variable Valeurs AP	Vrais fumeurs (Cot>100 +F) EX=36 NE=13			
		Q1	Méd	Q3	p		Q1	Méd	Q3	p
NE	t,t-MA	53,11	108,76	152,03	<u>0,0001</u>	t,t-MA	70,19	97,6	260,3	<u>0,0001</u>
EX		128,22	305,18	446,75			264,42	350,8	586,5	
NE	S-PMA	0,35	0,63	0,78	<u>0,0001</u>	S-PMA	0,84	1,29	2,06	<u>0,0001</u>
EX		0,90	1,51	2,58			2,34	3,90	10,57	
NE	Cotinine	0,08	0,22	0,64	<u>0,005</u>	dCyt	0,63	1,26	1,54	<u>0,028</u>
EX		0,27	0,79	1,91			1,42	2,13	3,64	
NE	dGuo	0,76	1,32	2,07	<u>0,014</u>	GB	5,91	6,81	8,92	<u>0,044</u>
EX		1,41	1,97	3,16			7,32	8,60	9,83	
NE	Guo	1,26	1,77	2,66	<u>0,005</u>	Mono	0,31	0,36	0,48	<u>0,031</u>
EX		1,63	2,51	3,56			0,37	0,50	0,72	
NE	8OxodGuo	1,26	1,77	2,66	<u>0,029</u>	Plq	202	222	257	<u>0,031</u>
EX		1,62	2,51	3,56			225,5	256	288,5	
NE	Cyto	2,15	4,72	5,89	<u>0,014</u>	Ratio 5OHMeCyto/ Cyto	0,05	0,07	0,11	<u>0,007</u>
EX		4,55	6,82	11,66			0,02	0,04	0,06	
NE	5MeCyt	0,70	1,00	1,40	<u>0,005</u>					
EX		0,89	1,36	2,18						
NE	5OHMedCyt	17,00	25,86	38,55	<u>0,048</u>					
EX		21,93	34,68	57,58						
NE	Ratio 7MeGua/Gua	53,11	108,76	152,03	<u>0,030</u>					
EX		128,22	305,18	446,75						

Toutes les valeurs sont en µg/g créa

Chez les vrais non-fumeurs, les concentrations des métabolites du benzène (t,t-MA, S-PMA) sont significativement plus élevées chez les exposés ($p = 0,0001$), confirmant une imprégnation professionnelle en l'absence de tabagisme. Des différences significatives sont également observées pour plusieurs marqueurs biologiques :

Stress oxydatif : dGuo ($p = 0,014$), 8OxodGuo ($p = 0,029$)

Méthylation : 5MeCyt ($p = 0,005$), 5OHMeCyt ($p = 0,048$), Ratio 7MeGua/Gua ($p = 0,030$)

Altération cytosine : Cyto ($p = 0,014$)

Ces résultats suggèrent que l'exposition professionnelle seule est capable d'induire des perturbations biologiques détectables, même chez les non-fumeurs.

Chez les vrais fumeurs, les concentrations de t,t-MA, S-PMA, et dCyt sont également significativement plus élevées chez les exposés ($p \leq 0,028$), traduisant un effet cumulatif de l'exposition professionnelle et du tabac. Des altérations sont également observées dans les paramètres hématologiques (GB, Mono, Plq) et dans le ratio de méthylation 5OHMeCyto/Cyto ($p = 0,007$).

II.4.9.3. Comparaison de tous les biomarqueurs entre fumeurs et non-fumeurs dans chaque groupe

Le Tableau 60 représente des comparaisons intra-groupe d'exposition entre fumeurs et non-fumeurs.

Tableau 60: Différences significatives entre les fumeurs et non-fumeurs de chaque groupe

Exposés				Non exposés					
Variable	NF (N=63)	F (N=38)	<i>p</i>	Variable	NF (N=26)	F (N=14)	<i>p</i>		
AP t,t-MA	Q1	131,49	271,48	<u>0,014</u>	AP S-PMA	Q1	0,36	0,83	<u>0,0001</u>
	Méd	288,14	348,95			Méd	0,67	1,29	
	Q3	425,96	537,23			Q3	0,94	2,20	
AV S-PMA	Q1	0,55	1,32	<u>0,0001</u>	AP cotinine	Q1	0,08	185,08	<u>0,0001</u>
	Méd	0,99	2,42			Méd	0,44	554,34	
	Q3	1,48	3,93			Q3	1,13	1317,65	
AP S-PMA	Q1	0,92	2,14	<u>0,0001</u>	AP 5OHMeCyto	Q1	2,72	3,83	<u>0,033</u>
	Méd	1,44	3,61			Méd	3,67	6,49	
	Q3	2,60	10,42			Q3	6,32	8,91	
Ratio AV t,t-MA/S-PMA	Q1	85,08	44,55	<u>0,008</u>	Ratio AP 7MeGuo/Guo	Q1	0,31	0,15	<u>0,048</u>
	Méd	154,14	73,81			Méd	0,46	0,23	
	Q3	292,04	165,62			Q3	0,65	0,53	
Ratio AP t,t-MA/S-PMA	Q1	81,99	45,72	<u>0,005</u>					
	Méd	166,10	104,36						
	Q3	306,30	193,80						

F : Fumeur NF : Non-fumeur

Tableau 60: Différences significatives entre les fumeurs et non-fumeurs de chaque groupe

Exposés				Non exposés				
Var		NF (N=63)	F (N=38)	<i>p</i>	Var	NF (N=26)	F (N=14)	<i>p</i>
AV S-BMA	Q1	2,32	1,46	<u>0,04</u>				
	Méd	3,42	2,49					
	Q3	6,73	4,68					
AV Cotinine	Q1	0,50	496,89	<u>0,0001</u>				
	Méd	1,74	910,95					
	Q3	251,64	1543,32					
AP Cotinine	Q1	0,43	559,18	<u>0,0001</u>				
	Méd	1,53	1019,88					
	Q3	400,34	2009,86					
AP 5MeCytosine	Q1	15,38	21,99	<u>0,036</u>				
	Méd	24,28	33,99					
	Q3	41,54	57,19					
AP dCytidine	Q1	0,84	1,40	<u>0,009</u>				
	Méd	1,51	2,13					
	Q3	2,15	3,59					
AP 7MeGuanosine	Q1	17,09	19,83	<u>0,028</u>				
	Méd	23,80	30,13					
	Q3	29,05	40,76					
GB	Q1	5,045	7,29	<u>0,009</u>				
	Méd	7,12	8,6					
	Q3	8,16	9,81					
Lymphocytes	Q1	1,66	2,25	<u>0,003</u>				
	Méd	2,1	2,73					
	Q3	2,56	2,95					
Ratio AP 5MedCyt/dCyt	Q1	0,90	0,63	<u>0,047</u>				
	Méd	1,55	1,21					
	Q3	3,44	1,76					

Cette analyse compare les biomarqueurs urinaires entre fumeurs et non-fumeurs, séparément chez les exposés et les non exposés, afin d'évaluer l'apport spécifique du tabagisme dans un contexte de niveau d'exposition constant.

Les fumeurs exposés présentent des concentrations significativement plus élevées en :

- Métabolites du benzène : t,t-MA ($p = 0,014$), S-PMA ($p = 0,0001$)
- Biomarqueurs de méthylation et de stress oxydatif : 5MeCytosine, dCytidine, 7MeGuanosine ($p = 0,036$)

- Paramètres hématologiques : GB, lymphocytes ($p = 0,009$)
- Ratios biochimiques : t,t-MA/S-PMA ($p = 0,005$), 5MeCyt/dCyt ($p = 0,047$)

Ces résultats indiquent que le tabagisme potentialise les effets biologiques de l'exposition professionnelle, avec des altérations plus marquées chez les fumeurs exposés.

Les fumeurs non exposés présentent également des concentrations significativement plus élevées en :

- S-PMA ($p = 0,0001$), cotinine ($p = 0,0001$)
- 5OHMeCyto ($p = 0,033$), ratio 7MeGuo/Guo ($p = 0,048$)

II.4.9.4. Comparaison de tous les biomarqueurs entre les tranches de cotinine chez les exposés

Le tableau 61 résume les différences significatives entre les différents statuts tabagiques en fonction des tranches de cotinine chez les exposés. **Cot < 100 +NF => vrais non-fumeurs, Cot>100+NF=> tabac à chiquer/ tabagisme passif, ou fausse déclaration, Cot>100 +F=> vrais fumeurs**

Tableau 61: Différences significatives entre tranches de cotinine chez les exposés

Variable		Cot< 100 +NF (45)	Cot>100+NF (18)	Cot>100 +F (38)	<i>p</i>
AP S-PMA	Q1	0,9	1,05	2,33	<u>0,0001</u>
	Méd	1,51	1,38	3,9	
	Q3	2,58	3,59	10,57	
AP t,t-MA	Q1	128,22	128,60	264,42	<u>0,033</u>
	Méd	305,18	250,13	350,82	
	Q3	446,74	413,83	586,55	
Ratio AP t,t-MA / S-PMA	Q1	92,73	67,24	42,92	<u>0,0001</u>
	Méd	182,64	137,98	93,26	
	Q3	356,81	256,62,24	189,45	
AP cotinine	Q1	0,26	704,27	607,84	<u>0,0001</u>
	Méd	0,79	1190,8	1083,36	
	Q3	1,91	2237,48	2106,96	
AP 8OxoGuo	Q1	2,71	1,80	2,27	<u>0,007</u>
	Méd	3,40	2,34	3,10	
	Q3	6,52	3,00	5,49	
AP dCyt	Q1	1,07	0,79	1,46	<u>0,002</u>
	Méd	1,64	0,90	2,22	
	Q3	2,35	1,39	3,59	
AP 7MeGuo	Q1	18,52	9,39	25,09	<u>0,03</u>
	Méd	25,36	17,34	31,98	
	Q3	33,25	24,47	44,64	
AV 7MeGua	Q1	2188,91	1899,62	1607,56	<u>0,048</u>
	Méd	2832,83	2231,16	3049,60	
	Q3	4239,44	4884,74	4979,92	

Tableau 61: Différences significatives entre tranches de cotinine chez les exposés (suite)

Variable		Cot< 100 +NF (45)	Cot>100+NF (18)	Cot>100 +F (38)	<i>p</i>
GB	Q1	5,98	4,29	7,34	<u>0,012</u>
	Méd	7,23	6,00	8,81	
	Q3	8,53	7,89	9,82	
Lympho	Q1	1,74	1,20	2,39	<u>0,005</u>
	Méd	2,20	1,80	2,79	
	Q3	2,58	2,65	2,98	
Ratio AV 7MeGua/Gua	Q1	31,79	18,02	20,32	<u>0,026</u>
	Méd	42,25	30,85	24,80	
	Q3	56,71	52,09	38,38	
Ratio AV 5MeCyto/Cyto	Q1	0,18	0,25	0,20	<u>0,012</u>
	Méd	0,24	0,29	0,24	
	Q3	0,31	0,34	0,28	
Ratio AP 5OHMedCyt/dCyt	Q1	0,49	0,80	0,41	<u>0,02</u>
	Méd	0,79	1,04	0,62	
	Q3	1,24	1,82	0,88	

Cot : cotinine NF : Non-fumeur F : fumeur

I

La stratification des sujets exposés selon le statut tabagique objectivé révèle des différences significatives dans plusieurs biomarqueurs, mettant en évidence l'impact du tabac dans un contexte d'exposition professionnelle homogène.

Le ratio t,t-MA/S-PMA diminue significativement avec le statut tabagique ($p = 0,0001$), passant de 182,64 chez les vrais non-fumeurs à 93,26 chez les vrais fumeurs.

Chez les faux non-fumeurs (cotinine > 100 µg/g + déclaration non concordante), les concentrations sont très élevées (médiane : 1190,8 µg/g créa), comparables à celles des vrais fumeurs (médiane : 1083,36 µg/g créa), avec des valeurs extrêmes dépassant 2000 µg/g créa dans les deux groupes.

En revanche, ils montrent des valeurs intermédiaires pour t,t-MA (médiane : 250,13 µg/g) et S-PMA (médiane : 1,38 µg/g), inférieures aux vrais non-fumeurs pour t,t-MA, ce qui renforce l'hypothèse du tabac à chiquer.

II.4.9.5. Influence du tabagisme sur les valeurs AV et AP chez les exposés

Le Tableau 62 récapitule les différences significatives entre valeurs AV et AP chez les exposés stratifiés selon le statut tabagique.

Tableau 62 : Comparaison statistiquement significatives des valeurs (AV et AP) chez les exposés fumeurs et exposés non-fumeurs

Exposés Fumeurs (N=38)				Exposés Non-fumeurs (N=63)					
Variable		AV N=38	AP N=38	<i>p</i>	Variable		AV N=63	AP N=63	<i>p</i>
t,t-MA	Q1	107,83	271,48	0,086	t,t-MA	Q1	80,41	131,49	<u>0,0001</u>
	Méd	167,30	348,95			Méd	136,76	288,14	
	Q3	495,49	537,23			Q3	277,00	425,96	
S-PMA	Q1	1,32	2,14	<u>0,0001</u>	S-PMA	Q1	0,55	0,92	<u>0,0001</u>
	Méd	2,42	3,61			Méd	0,99	1,44	
	Q3	3,93	10,42			Q3	1,48	2,60	
5MeCyt	Q1	15,79	21,99	<u>0,036</u>	5OHMed Cyt	Q1	1,02	0,91	<u>0,02</u>
	Méd	21,56	33,99			Méd	1,58	1,28	
	Q3	40,77	57,19			Q3	2,78	2,07	
Ratio 5MeCyt/Cyt	Q1	0,03	0,02	<u>0,006</u>	Ratio 5MeCyt	Q1	0,02	0,02	<u>0,0001</u>
	Méd	0,04	0,03			Méd	0,04	0,03	
	Q3	0,06	0,05			Q3	0,06	0,05	
Ratio 7MeGuo/Guo	Q1	0,17	0,18	<u>0,001</u>					
	Méd	0,26	0,41						
	Q3	0,45	0,61						
Ratio 5OHMedCyt/ dCyt	Q1	0,64	0,50	<u>0,048</u>					
	Méd	0,85	0,75						
	Q3	1,20	0,98						

Toutes les valeurs en µg/g créa AV : avant-poste AP : après poste

Les concentrations de t,t-MA et S-PMA augmentent significativement entre AV et AP chez les deux groupes.

Les valeurs absolues de t,t-MA et S-PMA sont systématiquement plus élevées chez les fumeurs, tant en AV qu'en AP.

L'écart AV–AP est plus marqué pour S-PMA, ce qui confirme sa sensibilité à l'exposition récente.

II.4.9.6. Influence du tabagisme sur le dépassement des IBE

Le Tableau 63 représente la répartition des valeurs des biomarqueurs d'exposition en fonction des IBE chez les exposés fumeurs et non-fumeurs.

Tableau 63: Tableaux croisés entre IBE des biomarqueurs d'exposition au benzène et statut tabagique

Variable $\mu\text{g/g}$ créa	Modalité	NF (N=63)	F (N=38)	Total	p value
AV t,t-MA	<500	52 (82,5%)	26 (68,4%)	52 (82,5%)	0,101
	>500	11 (17,5%)	12 (31,6%)	11 (17,5%)	
	Total	63 (100%)	38 (100%)	101 (100%)	
AP t,t-MA	<500	50 (79,4%)	27 (71,1%)	77 (76,2%)	0,342
	>500	13 (20,6%)	11 (28,9%)	24 (23,8%)	
	Total	63 (100%)	38 (100%)	101 (100%)	
AV S-PMA	<2	56 (88,9%)	17 (44,7%)	73 (72,3%)	<u>0,0001</u>
	>2	7 (11,1%)	21 (55,3%)	28 (27,7%)	
	Total	63 (100%)	38 (100%)	101 (100%)	
AP S-PMA	<2	40 (63,5%)	8 (21,1%)	48 (47,5%)	<u>0,0001</u>
	>2	23 (36,5%)	30 (78,9%)	53 (52,5%)	
	Total	63 (100%)	38 (100%)	101 (100%)	

F : Fumeur NF : Non-fumeur

Cette analyse compare la proportion de sujets exposés présentant des concentrations élevées en t,t-MA et S-PMA, selon leur statut tabagique (non-fumeurs vs fumeurs), à deux temps de prélèvement : avant-poste (AV) et après poste (AP).

- En AV, 31,6 % des fumeurs exposés présentent des concentrations >500 $\mu\text{g/g}$ créa, contre 17,5 % chez les non-fumeurs exposés ($p = 0,101$).
- En AP, les proportions restent élevées chez les fumeurs (28,9 %) et modérées chez les non-fumeurs (20,6 %), sans différence significative ($p = 0,342$).

Bien que non significatives, ces tendances suggèrent que le tabagisme pourrait contribuer à des niveaux plus élevés de t,t-MA, mais avec une variabilité importante qui atténue la puissance statistique.

Concernant le S-PMA, en AV, 55,3 % des **fumeurs exposés** ont des concentrations >2 µg/g créa, contre seulement 11,1 % chez les **non-fumeurs exposés** ($p < 0,0001$), et donc une exposition supérieure à 0,05 ppm de benzène.

En AP, cette différence s'accroît : 78,9 % des fumeurs dépassent le seuil, contre 36,5 % des non-fumeurs ($p = 0,0001$).

II.4.10. Influence des facteurs professionnels

II.4.10.1. Influence de l'ancienneté au travail chez les exposés

La comparaison de tous les biomarqueurs entre les tranches d'ancienneté chez les sujets exposés n'a révélé de différences significatives que pour les variables âge et ancienneté comme indiqué dans le Tableau 64.

Tableau 64: Différences statistiquement significatives entre tranches d'ancienneté chez les exposés

Var		≤10	10,1-20	>20	<i>p</i>
Age	Q1	33,5	40,0	47,0	0,0001
	Méd	40,8	45,0	50,5	
	Q3	48,8	53,5	57	
Ancienneté	Q1	2,0	3,0	7	0,0001
	Méd	12,8	15,0	19	
	Q3	23,8	31,5	34,3	

II.4.10.2. Influence du rythme de travail chez les exposés

La comparaison entre les différentes variables chez les exposés selon les catégories du rythme de travail par le biais du test de Kruskal-Wallis a conclu aux différences suivantes : AV t,t-MA ($p < 0,0001$), AP S-PMA ($p < 0,0001$), AP Cotinine ($p < 0,001$), AV Cyto ($p = 0,027$), AP 5OHMeCyto ($p = 0,007$), AV 7MeGuo ($p < 0,0001$), neutrophiles ($p = 0,005$), Hémoglobine ($p = 0,003$), hématocrite ($p = 0,038$), Globules rouges ($p = 0,044$).

Le **Tableau 65** représente la distribution des biomarqueurs et caractéristiques cliniques selon le rythme de travail chez les sujets exposés

Tableau 65: Distribution des biomarqueurs et caractéristiques cliniques selon le rythme de travail chez les sujets exposés

Variable	Modalité	Rythme de travail					Total	p
		8H	12H	24H	48H	5jr		
Tranches S-PMA AP	<2	3 (60,0%)	0 (0,0%)	15 (34,1%)	1 (25,0%)	29 (65,9%)	48 (47,5%)	0,004
	>2	2 (40,0%)	4 (100,0%)	29 (65,9%)	3 (75,0%)	15 (34,1%)	53 (52,5%)	
	Total	5 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	101 (100%)	
Tranches t,t-MA AP	< 500	4 (80,0%)	2 (50,0%)	37 (84,1%)	2 (50,0%)	32 (72,7%)	77 (76,2%)	0,337
	> 500	1 (20,0%)	2 (50,0%)	7 (15,9%)	2 (50,0%)	12 (27,3%)	24 (23,8%)	
	Total	5 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	101 (100%)	
Clinique	Asymp	2 (40,0%)	1 (25,0%)	10 (22,7%)	2 (50,0%)	28 (63,6%)	43 (42,6%)	0,003
	Symp	3 (60,0%)	3 (75,0%)	34 (77,3%)	2 (50,0%)	16 (36,4%)	58 (57,4%)	
	Total	5 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	101 (100%)	
Tranches ancienneté	<10	4 (80,0%)	1 (25,0%)	28 (63,6%)	1 (25,0%)	15 (34,1%)	49 (48,5%)	0,001
	10,1-20	1 (20,0%)	1 (25,0%)	15 (34,1%)	3 (75,0%)	14 (31,8%)	34 (33,7%)	
	>20	0 (0,0%)	2 (50,0%)	1 (2,3%)	0 (0,0%)	15 (34,1%)	18 (17,8%)	
	Total	5 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	4 (100%)	44 (100%)	101 (100%)	

Les concentrations de S-PMA après poste (>2 µg/g créa) et synonymes d'exposition supérieure à 0,05 ppm de benzène sont significativement plus fréquentes chez les travailleurs en rythme 12H et 24H (p = 0,004). En revanche, les différences pour t,t-MA après poste ne sont pas significatives (p = 0,337), ce qui pourrait refléter une moindre sensibilité de ce métabolite aux variations de rythme ou une plus grande dispersion interindividuelle.

Sur le plan clinique, les travailleurs en rythme 5 jours présentent une proportion plus élevée d'asymptomatiques (63,6 %), tandis que les rythmes discontinus (12H, 24H) sont associés à une prévalence accrue de symptômes (p = 0,003), suggérant un impact du rythme sur la perception ou l'expression clinique de l'exposition.

L'ancienneté professionnelle varie significativement selon le rythme ($p < 0,001$), avec une surreprésentation des travailleurs >20 ans dans le rythme 5 jours (mécaniciens principalement), et des profils plus jeunes dans les rythmes continus ou fractionnés.

II.4.10.3. Influence de la géolocalisation des pompes à essence chez les pompistes

Le tableau 66 montre les différences statistiquement significatives chez les pompistes répartis selon la zone géographique de la pompe à essence.

Tableau 66: Comparaisons statistiquement significatives chez les pompistes répartis selon de la géolocalisation de leurs pompes à essences

Var		Zone f (N=28)	Zone d (N=31)	<i>p</i>
Ancienneté	Q1	2	8	<u>0,0001</u>
	Méd	3	12	
	Q3	6,75	18	
Nombre Symptômes	Q1	1,00	1,00	<u>0,009</u>
	Méd	1,00	2,00	
	Q3	2,00	5,00	
AP t,t-MA ^b	Q1	137,03	288,14	<u>0,003</u>
	Méd	265,52	417,26	
	Q3	354,15	568,18	
Tranches t,t-MA ^d	<500	21	26	<u>0,023</u>
	>500	10	2	
AP S-PMA ^b	Q1	1,36	1,85	<u>0,017</u>
	Méd	2,2	4,88	
	Q3	3,61	10,34	
Tranches S-PMA	<2	13 (46,42%)	8 (25,8%)	0,099
	>2	15 (53,71%)	23 (94,2%)	
AP Cyto ^b	Q1	88,14	71,83	<u>0,025</u>
	Méd	154,20	96,30	
	Q3	239,56	137,99	
AV 8OxoGuo	Q1	1,81	1,36	<u>0,027</u>
	Méd	3,70	2,19	
	Q3	6,13	3,26	
AP 8OxoGuo ^b	Q1	2,62	1,99	<u>0,014</u>
	Méd	3,54	2,81	
	Q3	5,31	3,22	
AP 8Oxo-Gua ^a	Q1	9,10	7,85	<u>0,028</u>
	Méd	17,79	13,38	
	Q3	39,43	23,67	
AP 7MeGua ^b	Q1	3073,71	1436,02	<u>0,003</u>
	Méd	4547,15	2387,04	
	Q3	8271,82	4222,45	
AV 5MeCyt ^a	Q1	5,56	3,12	<u>0,036</u>
	Méd	8,61	4,87	
	Q3	12,51	11,41	

AP 5MeCyt ^b	Q1	5,01	2,62	<u>0,009</u>
	Méd	8,04	5,06	
	Q3	12,35	6,83	
AV 5OHMedCyt	Q1	1,60	0,73	<u>0,0001</u>
	Méd	1,91	1,22	
	Q3	3,15	1,67	
AP 5OHMedCyt	Q1	1,17	0,82	<u>0,0001</u>
	Méd	2,49	1,14	
	Q3	3,48	1,59	
Ratio AV 8OxoGuo/Guo	Q1	0,03	0,02	<u>0,023</u>
	Méd	0,04	0,03	
	Q3	0,08	0,05	
Ratio AV 7MeGua/Gua	Q1	22,48	14,47	<u>0,035</u>
	Méd	28,40	21,28	
	Q3	41,05	28,99	
Ratio AV 7MeGuo/Guo	Q1	0,19	0,10	<u>0,045</u>
	Méd	0,28	0,22	
	Q3	0,56	0,33	
Ratio AV 5MeCyt/Cyt	Q1	0,04	0,02	<u>0,0001</u>
	Méd	0,05	0,03	
	Q3	0,06	0,04	
Ratio AP 5MeCyt/Cyt	Q1	0,03	0,02	<u>0,001</u>
	Méd	0,03	0,02	
	Q3	0,05	0,03	
Ratio AP 5OHMeCyto/Cyto	Q1	0,02	0,04	<u>0,006</u>
	Méd	0,03	0,05	
	Q3	0,05	0,09	
Ratio AV 5OHMedCyt/dCyt	Q1	0,76	0,59	<u>0,047</u>
	Méd	1,14	0,85	
	Q3	1,74	1,27	
Ratio AP 5OHMedCyt/dCyt	Q1	0,67	0,52	<u>0,015</u>
	Méd	1,09	0,80	
	Q3	1,42	1,01	

Zone f : zone à trafic routier faible et Zone d : zone à trafic routier dense.

La comparaison entre les deux zones d'exercice (zone f vs zone d) révèle des différences significatives dans plusieurs paramètres biologiques, cliniques et professionnels.

- Les travailleurs de zone d présentent une ancienneté plus élevée (médiane : 12 ans vs 3 ans, $p < 0,0001$).
- Le nombre de symptômes est également plus élevé en zone d (médiane : 2 vs 1, $p = 0,009$).
- Les concentrations urinaires de t,t-MA et S-PMA après poste sont significativement plus élevées en zone d ($p = 0,003$ et $p = 0,017$), traduisant une imprégnation au benzène plus importante.
- Les marqueurs de stress oxydatif (8OxoGuo, 8OxoGua), de méthylation (5MeCyt, 5OHMeCyt), et les ratios biochimiques associés montrent des médianes plus élevées en zone f, tant en avant qu'en après poste ($p < 0,05$).

II.4.11. Comparaison des biomarqueurs chez les sujets exposés selon la présentation de symptômes

Le Tableau 67 présente les différences significatives entre sujets symptomatiques et sujets asymptomatiques.

Tableau 67: Différences significatives entre sujets exposés Symptomatiques et asymptomatiques

Variable		Symp (N=58)	Asympt (N=43)	<i>p</i>
Ap S-PMA ^b	Q1	1,38	0,85	<u>0,046</u>
	Méd	2,37	1,46	
	Q3	5,45	3,13	
AP 5MeCyt	Q1	3,37	3,50	<u>0,039</u>
	Méd	5,40	7,35	
	Q3	9,41	17,71	
AP 5OHMeCyto	Q1	3,27	2,24	<u>0,02</u>
	Méd	4,48	3,58	
	Q3	9,08	6,35	

Peu de données ont présenté des différences significatives, les concentrations de S-PMA et le 5OHMeCyto sont significativement plus élevées chez les sujets symptomatiques,

Le tableau 68 présente une répartition des variables selon le statut clinique des sujets exposés.

Tableau 68: Distribution des biomarqueurs, caractéristiques sociodémographiques et professionnelles selon le statut clinique chez les sujets exposés

	Clinique			<i>p</i> value ^c
AP t,t-MA (µg/g créa)	Asymp	Symp	Total	
<500	31 (72,1%)	46 (79,3%)	77 (76,2%)	0,399
>500	12 (27,9%)	12 (20,7%)	24 (23,8%)	
Total	43 (100%)	58 (100%)	101 (100%)	
	Clinique			<i>p</i> value ^c
AP S-PMA (µg/g créa)	Asymp	Symp	Total	
<2	24 (55,8%)	24 (41,4%)	48 (47,5%)	0,151
>2	19 (44,2%)	34 (58,6%)	53 (52,5%)	
Total	43 (100%)	58 (100%)	101 (100%)	
Tranches ancienneté (ans)	Asymp	Symp	Total	
≤10	21 (48,8%)	28 (48,3%)	49 (48,5%)	0,973
10,1 à 20	14 (32,6%)	20 (34,5%)	34 (33,7%)	
> 20,1	8 (18,6%)	10 (17,2%)	18 (17,8%)	
Total	43 (100%)	58 (100%)	101 (100%)	
Tranches d'âge (ans)	Asymp	Symp	Total	<i>p</i> value ^c
≤40	15 (34,9%)	19 (32,8%)	34 (33,7%)	<u>0,033</u>
41 à 50	21 (48,8%)	17 (29,3%)	38 (37,6%)	
> 51	7 (16,3%)	22 (37,9%)	29 (28,7%)	
Total	43 (100%)	58 (100%)	101 (100%)	
Profession	Asymp	Symp	Total	<i>p</i> value
Pompiste	15 (34,9%)	44 (75,9%)	59 (58,4%)	<u>0,0001</u>
Mécanicien	28 (65,1%)	14 (24,1%)	42 (41,6%)	
Total	43 (100%)	58 (100%)	101 (100%)	
Tabagisme	Asymp	Symp	Total	<i>p</i> value
Non-fumeurs	29 (67,45%)	34 (58,6%)	63 (62,4%)	0,366
Fumeurs	14 (32,55%)	24 (41,4%)	38 (37,6%)	
Total	43 (100%)	58 (100%)	101 (100%)	

Les proportions de sujets présentant des concentrations en t,t-MA (>500 µg/g créa) et S-PMA (>2 µg/g créa) sont sans différences significatives ($p = 0,399$ et $p = 0,151$).

L'ancienneté professionnelle ne diffère pas entre les groupes ($p = 0,973$), mais l'âge est significativement plus élevé chez les symptomatiques ($p = 0,033$), avec une surreprésentation des sujets >51 ans (37,9 % vs 16,3 %).

Les pompistes sont majoritairement symptomatiques (75,9 %), tandis que les mécaniciens sont majoritairement asymptomatiques (65,1 % ; $p = 0,0001$).

La proportion de fumeurs est légèrement plus élevée chez les symptomatiques (41,4 % vs 32,55 %), mais sans différence significative ($p = 0,366$).

II.5. Données descriptives d'un groupe homogène d'exposition (GHE)

Justification du choix du GHE type : il s'agit de la « pompe à essence S », située dans une zone à trafic dense, représente le nombre le plus élevé de pompistes (21), les échantillons avant et après poste reflètent un rythme de 24H d'exposition (et 48H de repos), les échantillons sont réalisés sur place par nous-même, 100% des bilans hémobiochimiques ont pu être collectés sur place. Les données de ce GHE sont rassemblées dans le Tableau 69.

Tableau 69: Données descriptives du GHE "pompe S"

Variables qualitatives					
F	11 (52,4%)	NF	10 (47,6%)	Asymp	1 (4,8%)
Cot>100	14 (71,4%)	Cot<100	7 (28,6%)	Sym	20 (95,2%)
Variables quantitatives					
Var	Moy	ET	Var	Moy	ET
Age (ans)	49,19	± 9,47	Anc (ans)	11,52	± 6,22
Métabolites du benzène (µg/g créa)					
AV			AP		
t,t-MA	127,14	± 79,59	476,94	± 334,80	
<500	19 (90,5%)	/	15 (71,4%)		
>500	2 (9,5%)	/	6 (28,6%)		
S-PMA	1,90	± 1,26	5,81	± 4,22	
<2	12 (57,1%)	/	5 (23,8%)		
>2	9 (2,9%)	/	16 (76,2%)		
Ratio	99,96	± 115,45	122,16	± 108,59	
Facteurs confondants (µg/g créa)					
AV			AP		
S-BMA	5,43	± 7,30	3,89	±3,42	
Cot	761,46	± 835,39	1040,42	±1203,36	
Produits d'oxydation des acides nucléiques (µg/g créa)					
AV			AP		
Gua	167,24	±133,91	115,64	±109,44	
8oxoGua	16,84	±12,33	18,80	±15,35	
Guo	98,52	±85,96	71,08	±43,37	
8oxoGuo	2,70	±1,79	3,14	±1,98	
dGuo	2,69	±3,03	2,18	±1,19	
8oxodGuo	2,09	±0,78	2,43	±1,67	

Tableau 6970: Données descriptives du GHE "pompe S" (suite)

Produits de méthylation et bases libres (µg/g créa)					
	AV		AP		
	Moy	ET	Moy	ET	
Cyto	108,12	±60,89	126,47	±74,48	
5MeCyto	24,47	±15,56	32,58	±20,25	
Cyt	267,45	±163,36	230,76	±108,47	
5MeCyt	8,41	±6,16	5,43	±5,08	
dCyt	2,71	±4,86	2,05	±1,55	
5MedCyt	3,78	±4,63	2,77	±3,12	
7MeGua	2967,41	±1863	3093,36	±2039,40	
1MeGua	47,16	±44,14	55,80	±48,02	
7MeGuo	17,93	±11,04	28,46	±12,33	
5OHMeCyto	6,20	±4,49	8,52	±5,44	
5OHMedCyt	1,37	±0,95	1,27	±0,72	
Paramètres hémbiologiques					
GR T/L	4,52	±0,52	HB G/dL	13,59	±1,05
<nor= 7 (33,3%) nor= 13 (91,9%) >nor= 1 (4,8%)			<nor= 6 (28,6%) nor= 14 (66,7%) >nor= 1 (4,8%)		
Hct %	41,82	±3,50	GB G/L	8,60	±2,33
<nor= 5 (23,8%) nor= 15 (71,4%) >nor= 1 (4,8%)			nor= 15 (71,4%) >nor= 6 (28,6%)		
Lymph G/L	2,45	±0,67	Neutro G/L	5,45	±1,78
nor= 20 (95,2%) >nor= 1 (4,8%)			<nor= 1 (4,8%) nor= 15 (71,4%) >nor= 5 (23,8%)		
Mono G/L	0,47	±0,21	Plq G/L	260,60	±48,07
nor= 19 (90,5%) >nor= 2 (9,5%)			nor= 20 (95,2%) >nor= 1 (4,8%)		

Anc : Ancienneté Cot : cotinine GR : globules rouges GB : globules blancs Neutro : neutrophiles Mono : monocytes Plq : plaquettes Lymph : lymphocytes Hct : Hématocrite F : fumeur NF : non-fumeur

Ce groupe homogène de 21 pompistes, majoritairement fumeurs (71,4 % avec cotinine >100 µg/g créa), présente une imprégnation marquée au benzène, avec des concentrations moyennes post-travail élevées en t,t-MA (476,94 µg/g créa) et S-PMA (5,81 µg/g créa), traduisant une exposition active sur 24H. La majorité dépasse les seuils critiques après poste (28,6 % >500 µg/g pour t,t-MA ; 76,2 % >2 µg/g pour S-PMA).

Le profil oxydatif montre une augmentation modérée des produits d'oxydation (8oxoGua, 8oxoGuo, 8oxodGuo), tandis que les marqueurs de méthylation (5MeCyto, 5OHMeCyto) sont également en hausse après poste.

Sur le plan hématologique, les paramètres restent globalement dans les normes, bien que l'on observe une élévation des leucocytes totaux et des neutrophiles chez certains sujets (>norme chez 28,6 % pour GB ; 23,8 % pour neutrophiles).

Enfin, la quasi-totalité des sujets est symptomatique (95,2 %), ce qui renforce la pertinence de ce GHE comme groupe cible pour la biosurveillance, avec un recueil complet des bilans sur site.

II.6. Synthèse des résultats

II.6.1. Synthèse des résultats des biomarqueurs d'exposition

Le Tableau 71 récapitule les moyennes et écarts types de notre étude chez les exposés et non exposés selon les différentes variables sociodémographiques et professionnelles.

Tableau 71: Tableau récapitulatif des moyennes et écarts types du t,t-MA et S-PMA chez les exposés et non exposés selon les différentes variables

Sous-groupe	Exposés				Non exposés		<i>p</i> value* (médianes AP)	
	t,t-MA		S-PMA		t,t-MA	S-PMA	t,t-MA	S-PMA
Total	AV	AP	AV	AP	AP	AP	AP	AP
		283,36± 337,25	418,95 ± 405,59	2,21±3,82	3,89 ± 4,77	155,73 ±142,89	0,99± 0,76	<0,0001
Age								
≤40 ans	365,29 ±394,25	366,03± 275,81	1,4± 1,35	3,62± 5,59	154,37±143,93	0,8± 0,29	<u>0,011</u>	<u>0,006</u>
41-50 ans	293,73± 376,17	469,78± 511	2,81± 4,11	5,05± 5,12	158,15±150,66	0,8± 0,7	<0,0001	<0,0001
≥ 51 ans	173,7± 123,61	414± 381,95	2,36± 5,11	2,66± 2,46	112,94± 70,59	1,31± 0,68	<0,0001	0,107
Tabagisme								
F	369,88± 396,26	469,99± 317,6	3,82± 5,77	6,23± 6,14	151,56± 99,06	1,58± 0,95	<0,0001	<0,0001
NF	231,16± 287,03	388,16± 450,08	1,24± 1,02	2,47± 2,96	157,81± 162,2	0,65± 0,33	<0,0001	<0,0001
Cot<100	267,56± 363,03	393,78± 449,66	1,23± 1,09	2,37± 3,01	152,24±150,71	0,62± 0,3	<0,0001	<0,0001
Cot >100	297,65± 314,91	440,85± 365,84	3,1± 5,02	5,20± 5,58	161,31± 134,31	1,58± 0,91	<0,0001	<0,0001
Ancienneté								
≤10 ans	277,07± 298,44	391,56±336,86	2,31± 4,12	3,89± 5,10	169,0177,16±	0,78± 0,29	<0,001	<0,0001
11-20	296,82± 424,71	460,57± 514,32	1,73± 1,34	4,27± 4,96	139,7± 119,03	0,71± 0,52	<0,0001	<0,0001
≥ 21	275,02±258,58	414,88±357,93	2,84± 5,76	3,13± 3,39	127,19± 83,28	1,41± 0,89	<0,0001	<0,0001

Anc : Ancienneté AV : Avant-poste AP : Après poste cot : cotinine F : fumeur NF : non-fumeur *p** : comparaison entre les médianes des exposés et non exposés des valeurs AP (test U de MannWhitney)

II.6.2. Synthèse des comparaisons entre groupe exposé et groupe non exposé pour tous les biomarqueurs

Le **Tableau 72** présente les comparaisons entre sujets exposés et non exposés.

Tableau 72: Comparaison entre groupe exposé et non exposé (valeurs AP)

Variable		EX (101)	NE (40)	<i>p</i>
Age	Moy	44,57	44,03	0,787
	ET	10,428	11,028	
Ancienneté	Q1	5	10,00	0,027
	Méd	12	15,00	
	Q3	20	25,25	
Tabagisme	NF	63 (62%)	26 (65%)	0,771
	F	38 (38%)	14 (35%)	
Créatinine	Moy	1,60	1,74	0,330
	ET	0,76	0,75	
t,t-MA	Q1	184,69	67,39	0,0001
	Méd	321,20	97,66	
	Q3	482,81	170,21	
T,t-MA <500>	<500	77 76,23%	37 92,5%	0,032
	>500	24 23,76%	3 7,5%	
S-PMA	Q1	1,02	0,62	0,0001
	Méd	2,05	0,79	
	Q3	5,35	1,30	
Ratio T,t-MA /S-PMA	Q1	66,85	77,53	0,725
	Méd	133,90	107,93	
	Q3	237,79	193,32	
S-BMA	Q1	2,10	1,37	0,169
	Méd	3,14	2,85	
	Q3	5,34	4,28	
Cotinine	Q1	0,86	0,19	0,003
	Méd	401,67	1,22	
	Q3	1156,49	427,59	

Tranches cotinine	<100	47	24	0,149
	>100	54	16	
Gua	Q1	52,99	43,99	0,450
	Méd	96,47	125,32	
	Q3	195,91	209,12	
8oxoGua	Q1	7,92	10,72	0,667
	Méd	14,45	15,53	
	Q3	25,89	25,70	
Ratio 8oxoGua/Gua	Q1	0,09	0,09	0,390
	Méd	0,16	0,13	
	Q3	0,23	0,23	
Guo	Q1	44,87	34,14	0,01
	Méd	70,14	49,49	
	Q3	109,82	76,91	
8oxoGuo	Q1	2,43	2,07	0,662
	Méd	3,19	3,18	
	Q3	5,49	4,61	
Ratio 8oxoGuo/Guo	Q1	0,03	0,04	0,012
	Méd	0,05	0,06	
	Q3	0,06	0,09	
dGuo	Q1	1,42	0,84	0,004
	Méd	2,14	1,45	
	Q3	3,20	2,41	
8oxodGuo	Q1	1,52	1,44	0,048
	Méd	2,4	1,96	
	Q3	3,39	2,61	
Ratio 8oxodGuo/dGuo	Q1	0,70	0,80	0,184
	Méd	1,07	1,24	
	Q3	1,69	2,18	
Cyto	Q1	77,33	63,71	0,015
	Méd	104,29	81,87	
	Q3	171,82	127,29	

Tableau 72 : Comparaison entre groupe exposé et non exposé (valeurs AP) (suite)

Variable		EX (101)	NE 40)	<i>p</i>
5MeCyt	Q1	16,90	11,85	0,01
	Méd	27,39	19,55	
	Q3	50,84	29,58	
Ratio 5MeCyt/Cyt	Q1	0,20	0,15	0,667
	Méd	0,26	0,24	
	Q3	0,31	0,31	
Cyt	Q1	154,10	113,11	0,084
	Méd	196,27	137,33	
	Q3	264,62	207,59	
5MeCyt	Q1	3,37	2,59	0,035
	Méd	6,02	4,65	
	Q3	11,36	6,03	
Ratio 5MeCyt/Cyt	Q1	0,02	0,02	0,245
	Méd	0,03	0,03	
	Q3	0,05	0,04	
dCyt	Q1	0,89	0,62	0,052
	Méd	1,81	1,19	
	Q3	2,66	1,79	
5MedCyt	Q1	1,12	0,87	0,137
	Méd	2,39	1,60	
	Q3	5,91	3,00	
Ratio 5MedCyt/dC yt	Q1	0,73	0,77	0,905
	Méd	1,53	1,28	
	Q3	3,07	2,10	
7MeGua	Q1	1998,10	1869,1	0,350
	Méd	3309,69	2635,5	
	Q3	5211,58	3930,4	
Ratio 7MeGua/Gua	Q1	22,87	15,07	0,015
	Méd	33,08	25,40	
	Q3	48,15	44,10	
1MeGua	Q1	21,74	16,01	0,354
	Méd	36,67	28,84	
	Q3	71,20	61,73	
Ratio 1MeGua/Gua	Q1	0,28	0,18	0,019
	Méd	0,41	0,30	
	Q3	0,56	0,42	
7MeGuo	Q1	19,58	9,22	0,04

	Méd	26,66	19,86	
	Q3	38,32	30,92	
Ratio 7MeGuo/Guo	Q1	0,21	0,16	0,470
	Méd	0,38	0,39	
	Q3	0,60	0,62	
5OHMeCyt	Q1	2,44	2,87	0,504
	Méd	4,27	4,81	
	Q3	8,08	7,38	
Ratio 5OHMeCyt/ Cyt	Q1	0,02	0,04	0,001
	Méd	0,04	0,06	
	Q3	0,06	0,08	
5OHMedCyt	Q1	0,91	0,57	0,054
	Méd	1,41	1,01	
	Q3	2,04	1,63	
Ratio 5OHMedCyt/ dCyt	Q1	0,54	0,62	0,368
	Méd	0,84	0,85	
	Q3	1,14	1,52	
GR	Moy	4,68	4,85	0,103
	ET	0,58	0,40	
HB	Moy	13,96	14,40	0,075
	ET	1,25	1,12	
Hct	Q1	40,13	41,83	0,140
	Méd	41,95	42,75	
	Q3	44,73	44,40	
GB	Moy	7,49	7,48	0,974
	ET	2,27	1,87	
Lymph	Q1	1,95	2,05	0,301
	Méd	2,47	2,62	
	Q3	2,90	2,94	
Mono	Q1	0,35	0,34	0,486
	Méd	0,46	0,43	
	Q3	0,62	0,58	
Neutro	Moy	4,44	4,16	0,469
	ET	1,91	1,60	
Plq	Q1	225,00	221,50	0,318
	Méd	257,00	247,50	
	Q3	281,50	297,50	

II.6.3. Synthèse des comparaisons entre valeurs AV et AP chez les sujets exposés pour tous les biomarqueurs

Nous rappelons que la comparaison s'est faite chez les exposés car ils ont des valeurs AV et AP, les sujets NE n'ont pas de valeurs AV. Le Tableau 73 rassemble les comparaisons de toutes les valeurs AV et AP chez le groupe exposé.

Tableau 73: Comparaison des variables AV et AP chez les sujets exposés

Variable		AV	AP	<i>p</i>
t,t-MA	Q1	94,97	172,79	<u>0,0001</u>
	Méd	161,66	319,73	
	Q3	300,87	488,54	
S-PMA	Q1	0,73	1,14	<u>0,0001</u>
	Méd	1,28	2,14	
	Q3	2,29	4,67	
Ratio T,t-MA /S- PMA	Q1	59,95	64,82	0,575
	Méd	117,78	146,03	
	Q3	251,25	258,29	
S-BMA	Q1	1,83	2,14	0,797
	Méd	3,19	2,98	
	Q3	5,61	4,97	
Cotinine	Q1	1,00	,86	0,053
	Méd	220,07	383,30	
	Q3	990,19	1198,81	
Gua	Q1	53,40	53,64	0,296
	Méd	90,57	98,53	
	Q3	160,35	195,94	
8oxoGua	Q1	8,22	7,92	0,946
	Méd	12,45	14,31	
	Q3	31,92	26,09	
Ratio 8oxoGua/Gua	Q1	0,08	0,08	0,666
	Méd	0,14	0,14	
	Q3	0,28	0,23	
Guo	Q1	49,00	47,31	0,922
	Méd	68,13	73,16	
	Q3	112,89	115,96	
8oxoGuo	Q1	1,79	2,22	0,488

	Méd	2,86	3,06	
	Q3	4,60	5,03	
Ratio	Q1	0,02	0,03	0,370
	Méd	0,04	0,04	
8oxoGuo/Guo	Q3	0,06	0,07	0,067
	Q1	1,11	1,41	
dGuo	Méd	1,90	2,14	0,107
	Q3	2,88	3,19	
8oxodGuo	Q1	1,58	1,60	0,107
	Méd	2,11	2,40	
	Q3	3,17	3,58	
Ratio 8oxodGuo/d Guo^b	Q1	0,71	0,72	0,632
	Méd	1,05	1,07	
	Q3	1,96	1,7	
Cyto	Q1	69,97	72,36	0,322
	Méd	100,42	104,29	
	Q3	181,33	190,63	
5MeCyto	Q1	16,10	16,90	0,342
	Méd	24,55	27,68	
	Q3	44,65	50,85	
Ratio 5MeCyto/Cyt o	Q1	0,19	0,20	0,734
	Méd	0,25	0,26	
	Q3	0,31	0,32	
Cyt	Q1	122,97	146,31	0,843
	Méd	188,59	197,26	
	Q3	284,72	279,90	
5MeCyt	Q1	3,98	3,47	<u>0,016</u>
	Méd	6,48	6,21	
	Q3	13,45	10,84	

Tableau 73 : Comparaison des valeurs AV et AP chez les sujets exposés (suite)

Variable		AV	AP	<i>p</i>
Ratio 5MeCyt/Cyt	Q1	0,02	0,02	<u>0,0001</u>
	Méd	0,04	0,03	
	Q3	0,06	0,05	
dCyt	Q1	,89	,92	0,796
	Méd	1,59	1,64	
	Q3	2,99	2,68	
5MedCyt	Q1	1,11	1,15	0,424
	Méd	2,41	2,45	
	Q3	5,16	5,14	
Ratio 5MedCyt/dC yt	Q1	,92	,82	0,950
	Méd	1,55	1,48	
	Q3	2,58	2,87	
7MeGua	Q1	1974,93	2043,05	0,164
	Méd	2831,31	3307,37	
	Q3	4953,77	5098,60	
Ratio 7MeGua/Gua	Q1	21,13	22,40	0,961
	Méd	28,80	30,15	
	Q3	50,33	47,55	
1MeGua	Q1	18,94	22,54	<u>0,032</u>
	Méd	29,90	41,64	
	Q3	63,17	84,96	
Ratio 1MeGua/Gua	Q1	0,24	0,26	0,112
	Méd	0,34	0,38	
	Q3	0,53	0,56	
7MeGuo	Q1	14,23	17,22	0,510
	Méd	19,85	25,55	
	Q3	37,75	36,12	
Ratio 7MeGuo/Guo	Q1	0,19	0,17	0,126
	Méd	0,28	0,34	
	Q3	0,51	0,58	
5OHMeCyto	Q1	2,83	2,52	0,824
	Méd	4,50	4,32	
	Q3	8,12	7,30	
Ratio 5OHMeCyto/ Cyto	Q1	0,03	0,02	0,112
	Méd	0,04	0,04	
	Q3	0,07	0,06	
5OHMedCyt	Q1	0,95	0,91	0,117

	Méd	1,52	1,34	
	Q3	2,42	2,33	
Ratio 5OHMedCyt/ dCyt	Q1	0,62	0,53	0,05
	Méd	0,94	0,82	
	Q3	1,39	1,27	

La comparaison effectuée uniquement chez le sous-groupe des pompistes en AV et AP a révélé des différences identiques aux groupe des exposés pour les variables (t,t-MA et S-PMA ($p < 0,0001$) et 5MeCyt ($p = 0,04$) mais en plus, pour les deux variable 7MeGuo ($p = 0,008$) et dGuo ($p = 0,018$).

II.6.4. Synthèse des différences statistiquement significative entre pompistes et mécaniciens

Le Tableau 74 récapitule les différences statistiquement significatives de tous les biomarqueurs entre les groupes des pompistes et mécaniciens.

Tableau 74 : Différences statistiquement significatives entre pompistes et mécaniciens

Variable		Pom (59)	Méc (42)	<i>p</i>
Ancienneté	Q1	3,75	13,50	<u>0,001</u>
	Méd	8,50	20,50	
	Q3	13,25	31,75	
AV t,t-MA	Q1	79,43	129,89	<u>0,0001</u>
	Méd	137,9 1	224,54	
	Q3	229,8 8	522,18	
AP S-PMA	Q1	1,74	0,74	<u>0,0001</u>
	Méd	3,48	1,06	
	Q3	6,96	1,99	
Ratio AV T,t-MA /S- PMA	Q1	47,05	129,22	<u>0,0001</u>
	Méd	72,33	234,02	
	Q3	168,7 6	405,26	
Ratio AP T,t-MA /S- PMA	Q1	52,59	163,42	<u>0,0001</u>
	Méd	87,39	226,47	
	Q3	155,0 1	386,27	
AP Cotinine	Q1	2,13	0,29	<u>0,001</u>
	Méd	648,4 5	1,91	
	Q3	1616, 75	741,82	

AV Cyto	Q1	72,21	78,69	<u>0,014</u>
	Méd	96,31	105,16	
	Q3	171,3 4	179,38	
AV 7MeGuo	Q1	10,65	16,77	<u>0,004</u>
	Méd	17,23	31,76	
	Q3	26,95	51,84	
AP 5OHMeCyto	Q1	3,61	1,66	<u>0,006</u>
	Méd	5,28	2,53	
	Q3	10,83	4,29	
Ratio AV 7MeGua/Gua	Q1	17,95	32,82	<u>0,0001</u>
	Méd	25,75	46,50	
	Q3	41,91	70,04	
Ratio AV 1MeGua/Gua	Q1	0,21	0,32	<u>0,004</u>
	Méd	0,30	0,45	
	Q3	0,47	0,60	
Ratio AV 7MeGuo/Guo	Q1	0,12	0,34	<u>0,014</u>
	Méd	0,20	0,47	
	Q3	0,36	0,70	
Ratio AP 5MeCyt/Cyt	Q1	0,02	0,03	<u>0,008</u>
	Méd	0,03	0,05	
	Q3	0,03	0,07	

Tableau 74 : (suite)

Variable		Pom (59)	Méc (42)	<i>p</i>
Ratio AP 5OHMeCyto/ Cyto	Q1	0,03	0,02	0,005
	Méd	0,05	0,03	
	Q3	0,09	0,04	
HB	Q1	12,70	13,50	0,004
	Méd	13,75	14,60	
	Q3	14,37	15,30	
GR	Q1	4,18	4,5	0,017
	Méd	4,54	4,92	
	Q3	4,88	5,19	
Hct	Q1	39,25	40,90	0,044
	Méd	41,60	42,90	

GB	Q3	43,98	45,95	0,012
	Q1	6,74	5,53	
	Méd	8,23	7,24	
Neutro	Q1	3,72	2,29	0,004
	Méd	4,92	3,70	
	Q3	6,41	4,57	

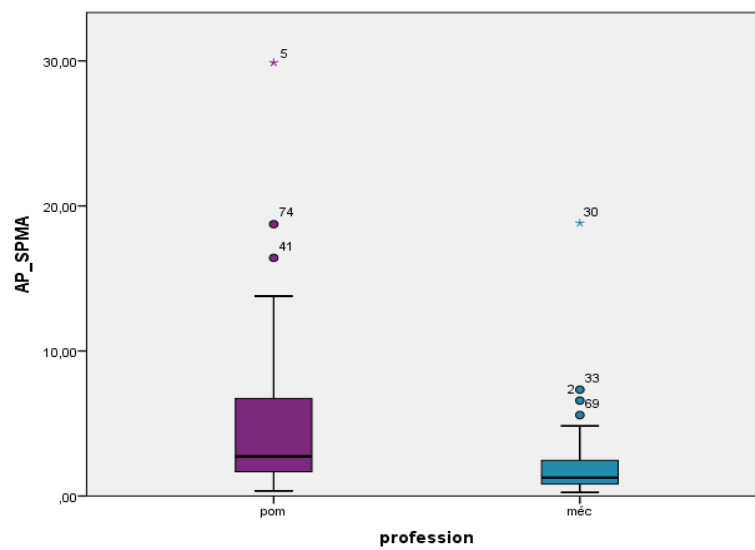


Figure 57: Comparaison du AP S-PMA entre pompistes et mécaniciens (<0,0001)

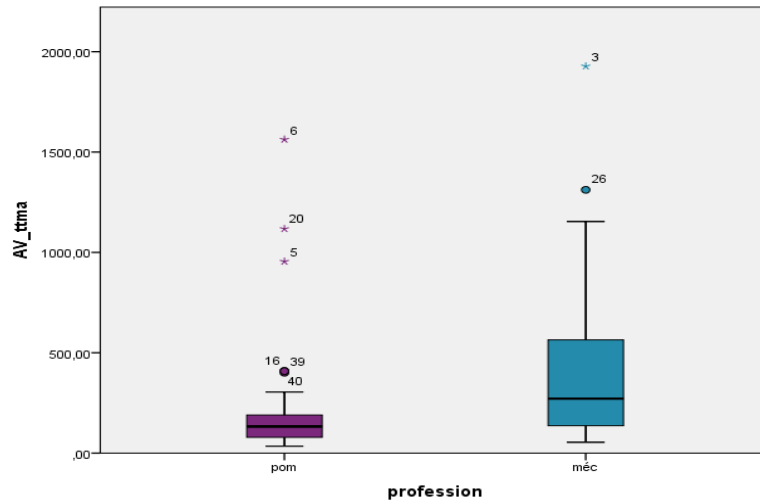


Figure 58: Comparaison de AV t,t-MA entre pompistes et mécaniciens ($p < 0,0001$)

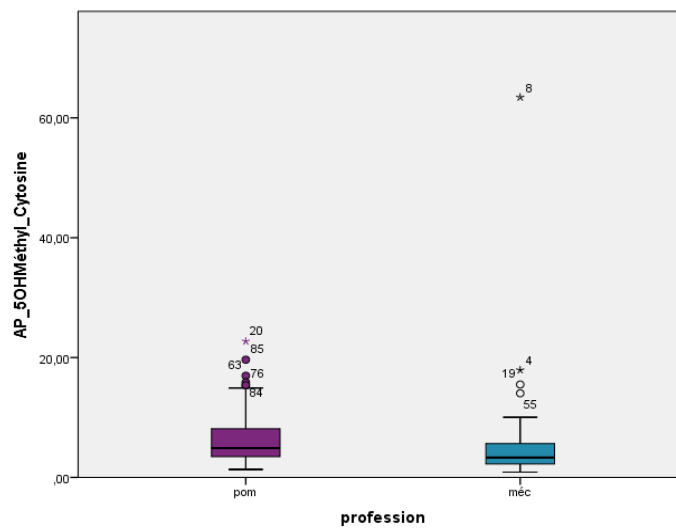


Figure 59 : Comparaison de AP 5OHMeCyto entre pompistes et mécaniciens ($p = 0,006$)

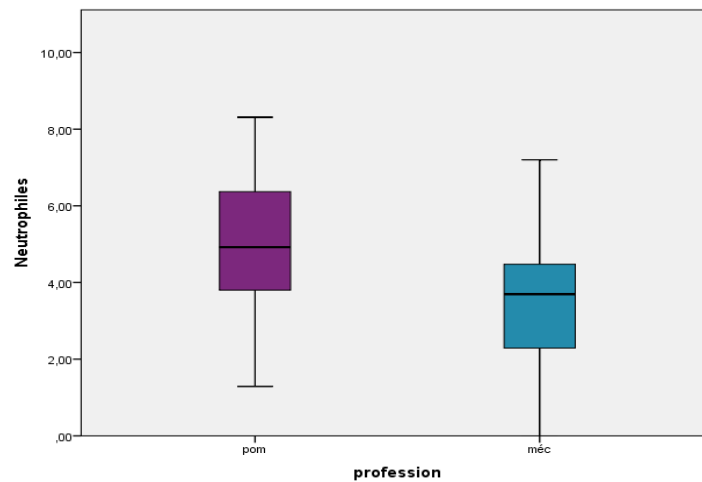


Figure 60: Comparaison des neutrophiles entre pompistes et mécaniciens ($p = 0,004$)

II.7. Analyse des corrélations

Nous rappelons que nous avons effectué l'analyse de corrélation avec les valeurs des biomarqueurs urinaires en $\mu\text{g/L}$, pour éliminer toute influence de la créatinine urinaire.

Les coefficients de corrélation (r) correspondent au coefficient de Spearman car les distributions des variables dans les différents groupes sont non normales.

L'analyse des corrélations est présentée comme suit :

Vu le grand nombre de corrélations significatives, nous avons sélectionné uniquement les corrélations des variables qui ont présenté une différence statistiquement significative lors de la comparaison entre les groupes.

- Corrélations des variables significatives entre sujets exposés et non exposés
- Les corrélations des paramètres hématologiques chez les exposés
- Les corrélations significatives entre les sous-groupes des pompistes et mécaniciens
- Les corrélations significatives entre fumeurs et non-fumeurs des sujets exposés et les sujets non exposés
- Les corrélations avec la variable nombre d'heures travaillées d'affilée
- Les corrélations avec la variable nombre de symptômes

II.7.1. Corrélations significatives chez les exposés

Tableau 75: Corrélations significatives chez les exposés (variables ayant des différences significatives entre exposés et non exposés)

Variable	Variables indépendantes												
AV t,t-MA	Var	r	p	var	r	p	AV S-PMA	Var	R	p	Var	r	p
	Age	-0,252	0,011	AV_5MeCyt	0,369	<0,0001		Ancienneté	0,174	0,039	AV créatinine	<u>0,462</u>	<0,0001
	Nbre Heures/jr	-0,217	0,03	AV_dCyt	0,386	<0,0001		AV_t,t-MA	<u>0,437</u>	<0,0001	AV_5MeCyto	<u>0,676</u>	<0,0001
	AV_S-PMA	<u>0,437</u>	<0,0001	AV_5MedCyt	0,336	<0,001		AV_S-BMA	<u>0,691</u>	<0,0001	AV_Cyt	<u>0,717</u>	<0,0001
	AP_t,t-MA	0,250	0,012	AV_7MeGua	0,383	<0,0001		AV_cotinine	<u>0,474</u>	<0,0001	AV_5MeCyt	<u>0,720</u>	<0,0001
	AV_S-BMA	0,351	<0,0001	AV_7MeGuo	<u>0,535</u>	<0,0001		AV_Gua	<u>0,740</u>	<0,0001	AV_dCyt	<u>0,689</u>	<0,0001
	AV_Guo	0,261	0,008	AV_5OHMed	0,398	<0,0001		AV_8OxoGua	<u>0,620</u>	<0,0001	AV_5MedCyt	<u>0,689</u>	<0,0001
	AV_dGuo	0,301	0,002	AV Créatinine	0,453	<0,0001		AV_Guo	<u>0,707</u>	<0,0001	AV_7MeGua	<u>0,727</u>	<0,0001
	AV8OxodGuo	<u>0,510</u>	<0,0001	GR	0,299	0,016		AV_8OxoGuo	<u>0,697</u>	<0,0001	AV_1MeGua	<u>0,657</u>	<0,0001
	AV_Cyto	0,369	<0,0001	Mono	0,280	0,04		AV_dGuo	<u>0,714</u>	<0,0001	AV_7MeGuo	<u>0,681</u>	<0,0001
	AV_Cyt	0,289	0,003					AV_8OxodGuo	<u>0,445</u>	<0,0001	AV_5OHMeCyt	<u>0,597</u>	<0,0001
	AV_5MeCyto	0,207	0,038					AV_Cyto	<u>0,665</u>	<0,0001	AV_5OHMedC	<u>0,722</u>	<0,0001
								Lympho	0,218	0,028	Nbre Heures/J	0,334	0,001
	Anc	Var	r	p	var	r		p	AP S-BMA	Var	R	p	Var
AP_8OxoGuo		0,241	0,015	Age	0,486	<0,0001	AP_t,t-MA	<u>0,416</u>		<0,0001	AP_5MeCyt	0,387	<0,0001
AV5OHMedCyt		-0,207	0,038	Nbre_sympt	0,288	0,028	AV_S-BMA	<u>0,539</u>		<0,0001	AP_dCyt	0,288	0,003
HB		0,336	0,006				AP_Guo	0,311		0,002	AP_5MedCyt	0,331	<0,0001
Hct	0,323	0,009				AP_8OxoGuo	0,372	<0,0001		AP_7MeGua	0,299	0,002	
Var	r	p	Var	r	p	AP_dGuo	0,217	0,030		AP_7MeGuo	0,285	0,004	
AV_t,t-MA	0,250	0,012	AP_Cyt	0,430	<0,0001	AP8OxodGuo	<u>0,407</u>	<0,0001		AP5OHMeCyto	0,265	0,007	
AV_S-PMA	0,244	0,014	AP_5MeCyt	0,320	0,001	AP_Cyto	0,331	0,001		AP5OHMedCyt	0,350	<0,0001	
AP_S-PMA	0,560	<0,0001	AP_dCyt	0,341	<0,0001	AP_5MeCyto	0,287	0,004	AP_Cyt	0,399	<0,0001		
AP_S-BMA	0,416	<0,0001	AP_5MedCyt	0,328	0,001								
AP_Guo	0,383	<0,0001	AP_7MeGua	0,219	0,028	Suite AP t,t-MA	AP_5MeCyto	0,372	<0,0001				
AP_8OxoGuo	0,278	0,005	AP_7MeGuo	0,442	<0,0001		Nbre_sympt	0,296	0,024				
AP_dGuo	0,541	<0,0001	AP5OHMedC	0,266	0,007								
AP_8OxodGuo	0,444	<0,0001	Plaquettes	0,249	0,046								

Tableau 75: Corrélations significatives chez les exposés (variables ayant des différences significatives entre exposés et non exposés) (suite)

AP S-PMA	AV_S-PMA	0,642	<0,0001	Plaquettes	0,330	0,007	AP 8OxodGu o	AP_t,t-MA	0,444	<0,0001	AP_dCyt	0,401	<0,0001
	AP_t,t-MA	0,560	<0,0001	Nbre Heures/Jr	0,322	0,001		AP_S-PMA	0,202	0,043	AP_5MedCyt	0,431	<0,0001
	AP8OxodGuo	0,202	0,043	Nbre_symp	0,278	0,035		AP_S-BMA	0,407	<0,0001	AP_7MeGua	0,480	<0,0001
AP cotinine	AV_S-PMA	0,424	<0,0001	AV_Gua	0,240	0,016	AP dGuo	AV_8OxodGuo	0,427	<0,0001	AP_1MeGua	0,253	0,011
	AP_S-PMA	0,241	0,015	AP_8OxoGuo	-0,238	0,016		AP_Gua	0,218	0,028	AP_7MeGuo	0,343	<0,0001
	AV_cotinine	0,908	<0,0001	Nbre Heures/Jr	0,354	<0,0001		AP_Guo	0,559	<0,0001	AP_5OHMedC	0,537	<0,0001
AP Guo	AP_t,t-MA	0,383	<0,0001	AP_5MeCyt	0,505	<0,0001		AP_8OxoGuo	0,597	<0,0001	HB	0,300	0,015
	AP_S-BMA	0,311	0,002	AP_dCyt	0,414	<0,0001		AP_dGuo	0,440	<0,0001	GR	0,260	0,036
	AP_8OxoGua	0,309	0,002	AP_5MedCyt	0,352	<0,0001		AP_Cyto	0,354	<0,0001	Hct	0,304	0,014
	AP_8OxoGuo	0,403	<0,0001	AP_7MeGua	0,301	0,002		AP_Cyt	0,463	<0,0001	Neutro	-0,270	0,048
	AP_dGuo	0,659	<0,0001	AP_7MeGuo	0,341	<0,0001		AP_5MeCyt	0,510	<0,0001			
	AP_8OxodGuo	0,559	<0,0001	AP_5OHMed	0,310	0,002		AP_t,t-MA	0,541	<0,0001	AP_Cyt	0,308	0,002
	AP_Cyto	0,252	0,011	HB	0,267	0,032		AP_S-BMA	0,217	0,030	AP_5MeCyt	0,277	0,005
	AP_Cyt	0,472	<0,0001				AP_8OxoGua	0,220	0,027	AP_dCyt	0,318	0,001	
						AP_Guo	0,659	<0,0001	AP_7MeGua	0,342	<0,0001		
						AP_8OxoGuo	0,293	0,003	AP_1MeGua	0,242	0,015		
						AP_8OxodGuo	0,440	<0,0001	AP_7MeGuo	0,414	<0,0001		

Tableau 75 : Corrélations significatives chez les exposés (variables ayant des différences significatives entre exposés et non exposés) (suite)

dépendante	Variables indépendantes (suite)												
AP Cyto	Var	r	p	var	r	p	AP dCyt	Var	r	p	Var	r	p
	AP_t,t-MA	0,340	<0,0001	AP_5MeCyt	0,228	0,022		AP_t,t-MA	0,341	<0,0001	AP_5MeCyto	0,302	0,002
	AP_S-BMA	0,331	0,001	AP_dCyt	0,242	0,015		AP_S-BMA	0,288	0,003	AP_Cyt	0,637	<0,0001
	AP_Guo	0,252	0,011	AP_5MedCyt	0,207	0,037		AP_Guo	0,414	<0,0001	AP_5MeCyt	0,672	<0,0001
	AP_8OxoGuo	0,256	0,010	AP_7MeGua	0,274	0,006		AP_8OxoGuo	0,298	0,003	AP_5MedCyt	0,688	<0,0001
	AP_8OxodGuo	0,354	<0,0001	GR	0,306	0,013		AP_dGuo	0,318	0,001	AP_7MeGuo	0,398	<0,0001
	AV_Cyto	0,462	<0,0001	Mono	0,325	0,016		AP_8OxodGu	0,401	<0,0001	AP_5OHMed	0,539	<0,0001
	AP_5MeCyto	0,598	<0,0001					AV_dCyt	0,369	<0,0001	Lympho	0,274	0,027
AP 5MeCyto	Var	r	p	Var	r	p	AP 5MedCy t	AV_5MedCyt	0,373	<0,0001	Nbre_symp	0,358	0,006
	AP_t,t-MA	0,372	<0,0001	AP_Cyt	0,279	0,005		AP_t,t-MA	0,328	0,001	AP_Cyto	0,207	0,037
	AP_S-BMA	0,287	0,004	AP_5MeCyt	0,260	0,009		AP_S-BMA	0,331	0,001	AP_5MeCyto	0,322	0,001
	AV_Cyto	0,228	0,022	AP_dCyt	0,302	0,002		AP_Guo	0,352	<0,0001	AP_Cyt	0,707	<0,0001
	AV_5MeCyto	0,401	<0,0001	AP_5MedCyt	0,322	0,001		AP_8OxoGuo	0,366	<0,0001	AP_5MeCyt	0,871	<0,0001
	AV_Cyt	0,269	0,007	AP_7MeGua	0,211	0,034		AP_8OxodGu	0,431	<0,0001	AP_dCyt	0,688	<0,0001
	AV_5MeCyt	0,259	0,009	AP_7MeGuo	0,224	0,025		AV_5MeCyt	0,517	<0,0001	AP_7MeGuo	0,520	<0,0001
	AV_5MedCyt	0,265	0,007	Neutrophiles	-0,276	0,044		AV_dCyt	0,416	<0,0001	AP_5OHMed	0,772	<0,0001
AP_Cyto	0,598	<0,0001	Nbre_symp	0,261	0,048	AV_5MedCyt	0,641	<0,0001	Neutro	-0,343	0,011		
AP 7MeGuo	AP_t,t-MA	0,442	<0,0001	AP_5MeCyto	0,224	0,025							
	AP_S-BMA	0,285	0,004	AP_Cyt	0,491	<0,0001							
	AP_Guo	0,341	<0,0001	AP_5MeCyt	0,494	<0,0001							
	AP_8OxoGuo	0,388	<0,0001	AP_dCyt	0,398	<0,0001							
	AP_dGuo	0,414	<0,0001	AP_5MedCyt	0,520	<0,0001							
	AP_8OxodGuo	0,343	<0,0001	AP_5OHMedC	0,434	<0,0001							
	AV_7MeGuo	0,450	<0,0001										

Le tableau 76 regroupe les corrélations significatives des paramètres de la FNS (aucune corrélation n'est significative chez groupe NE).

Tableau 76: Corrélations significatives pour les biomarqueurs du bilan hémobiologique chez les exposés

Dépendante	Variables indépendantes (65)												
	Var	r	p	var	r	p		Var	r	p	Var	r	p
HB	AP_Guo	0,267	0,032	Hct	0,836	<0,0001	Hct	AP_8OxodGuo	0,304	0,014	Ancienneté	0,323	0,009
	AP_8OxoGuo	0,247	0,047	Ancienneté	0,336	0,006		HB	0,836	0,000	Nbre	0,426	0,008
	AP_8OxodGuo	0,300	0,015	Nbre Heures/Jr	-0,427	<0,0001		GR	0,659	0,000			
	GR	<u>0,580</u>	<0,0001	Nbre_sympt	0,343	0,035		Lympho	0,267	0,032			
GR	Var	r	p	Var	r	p	GB	Var	r	p	Var	r	P
	AV_t,t-MA	0,299	0,016	HB	0,580	<0,0001		AV_Guo	0,275	0,027	Lymph	0,561	<0,0001
	AP_8OxodGuo	0,260	0,036	Hct	0,659	<0,0001		AV_5OHMeCyt	0,345	0,005	Neutro	0,873	<0,0001
	AV_Cyto	0,308	0,013	Mono	0,277	0,042		AP_7MeGua	-0,282	0,023	Mono	0,577	<0,0001
	AV_5MeCyt	0,255	0,041	Nbre Heures/Jr	-0,261	0,036		AP_1MeGua	-0,271	0,029	Plq	0,456	<0,0001
	AV_dCyt	0,287	0,021	Nbre_sympt	0,535	0,001							
	AP_Cyto	0,306	0,013	AV_5MedCyt	0,270	0,030		AP_Gua	-0,326	0,016	GB	0,873	<0,0001
Lympho	AV_S-PMA	0,316	0,010	AV_7MeGua	0,259	0,037	Neut r	AP_8OxodGuo	-0,270	0,048	Mono	0,309	0,023
	AV_S-BMA	0,310	0,012	AP_dCyt	0,274	0,027		AV_5OHMeCyt	0,307	0,024	Plq	0,332	0,014
	AV_Gua	0,245	0,049	Hct	0,267	0,032		AP_5MeCyt	-0,276	0,044	Nbre H/Jr	0,303	0,026
	AV_Guo	0,288	0,020	GB	0,561	<0,0001		AP_5MeCyt	-0,288	0,035			
	AV_8OxodGuo	0,307	0,013	Mono	0,490	<0,0001		AP_5MedCyt	-0,343	0,011			
	AP_Gua	0,296	0,017	Plq	0,320	0,009		AP_7MeGua	-0,375	0,005			
	AV_dCyt	0,245	0,050	AV_5MedCyt	0,270	0,030							
	Mono	AV_t,t-MA	0,280	0,040	GB	0,577		<0,0001	Plq	AP_t,t-MA_	0,249	0,046	Lymph
AV_Cyto		0,315	0,021	Lympho	0,490	<0,0001	AP_S-PMA	0,330		0,007	Neutro	0,332	0,014
AP_Cyto		0,325	0,016	Neutro	0,309	0,023	AP_1MeGua	-0,295		0,017	Mono	0,408	0,002
GR		0,277	0,042	Plq	0,408	0,002	GB	0,456		<0,0001			

II.7.2. Corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les fumeurs et les vrais non-fumeurs exposés

Tableau 77: Corrélations concernant les biomarqueurs du benzène et toluène chez les exposés (fumeurs et les vrais non-fumeurs)

	Fumeurs (37) (Fumeurs +cot>100)						Vrais (Non-fumeurs+ cot<100) (45)					
	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
AP t,t-MA	AP_S-PMA	0,565	<0,0001	AP_Cyt	0,634	<0,0001	AP_S-PMA	0,474	0,001	AP_5MeCyt	0,333	0,025
	AP_S-BMA	0,592	<0,0001	AP_5MeCyt	0,434	0,007	AP_S-BMA	0,410	0,005	AP_dCyt	0,349	0,019
	AP_Guo	0,587	<0,0001	AP_dCyt	0,438	0,006	AP_Guo	0,342	0,022	AP_5MedCyt	0,376	0,011
	AP_8OxoGuo	0,598	<0,0001	AP_5MedCyt	0,406	0,011	AP_dGuo	0,538	<0,0001	AP_7MeGuo	0,411	0,005
	AP_dGuo	0,575	<0,0001	AP_7MeGuo	0,580	<0,0001	AP_8OxodGuo	0,314	0,036	AP_créatinine	0,402	0,006
	AP_8OxodGuo	0,648	<0,0001	AP_5OHMedCyto	0,467	0,003	AP_Cyto	0,362	0,015			
	AP_Cyto	0,415	0,010	AP_créatinine	0,714	<0,0001	AP_5MeCyt	0,371	0,012			
	AP_5MeCyt	0,411	0,010				AP_Cyt	0,416	0,004			
AP S-PMA	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
	AP_t,t-MA	0,565	<0,0001	AP_créatinine	0,376	0,020	AP_t,t-MA	0,474	0,001	/	/	/
	AP_8OxodGuo	0,346	0,033	/	/	/	/	/	/	/	/	/
AP S-BMA	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
	AP_t,t-MA	0,592	<0,0001	AP_5MeCyt	0,408	0,011	AP_t,t-MA	0,410	0,005	AP_7MeGua	0,349	0,019
	AP_Guo	0,579	<0,0001	AP_dCyt	0,455	0,004	AP_8OxoGuo	0,359	0,016	AP_7MeGuo	0,383	0,009
	AP_8OxoGuo	0,403	0,012	AP_5MedCyt	0,424	0,008	AP_8OxodGuo	0,339	0,023	AP_5OHMedCyto	0,338	0,023
	AP_dGuo	0,495	0,002	AP_7MeGuo	0,371	0,022	AP_Cyto	0,297	0,048	AP_créatinine	0,474	0,001
	AP_8OxodGuo	0,477	0,002	AP_5OHMeCyto	0,390	0,016	AP_Cyt	0,370	0,012	Monocytes	0,529	0,008
	AP_Cyto	0,344	0,035	AP_5OHMedCyto	0,421	0,009	AP_5MeCyt	0,425	0,004			
AP_Cyt	0,627	<0,0001	AP_créatinine	0,617	<0,0001	AP_5MedCyt	0,327	0,029				

Les biomarqueurs d'effet qui ont des différences significatives entre exposés fumeurs et exposés non-fumeurs sont : **5MeCyt, dCyt, 7MeGuo, GB, Lymphe**

Leurs corrélations sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 78: Corrélations des biomarqueurs d'effet ayant des différences significatives entre fumeurs et non-fumeurs chez les exposés

	Fumeurs (37)						Vrais (Non-fumeurs+ cot<100) (45)					
	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
AP 5MeCyt	AP_t,t-MA	0,411	0,010	AP_dCyt	0,390	0,015	AP_t,t-MA	0,371	0,012			
	AP_Guo	0,345	0,034	AP_5MedCyt	0,466	0,003	AP_Cyto	0,488	0,001			
	AP_8OxoGuo	0,388	0,016	AP_7MeGua	0,482	0,002	AP_1MeGua	0,323	0,030			
	AP_8OxodGuo	0,535	0,001	AP_7MeGuo	0,340	0,037						
	AP_Cyto	0,651	<0,0001	AP_5OHMedCyt	0,467	0,003						
	AP_Cyt	0,497	0,002	AP_créatinine	0,391	0,015						
	AP_5MeCyt	0,446	0,005	Neutrophiles	-0,497	0,019						
AP 7MeGuo	var	r	p	var	r	p	var	r	p	var	r	p
	AP_t,t-MA	0,580	<0,0001	AP_5MeCyt	0,340	0,037	AP_t,t-MA	0,411	0,005	AP_dCyt	0,513	<0,0001
	AP_S-BMA	0,371	0,022	AP_Cyt	0,352	0,030	AP_S-BMA	0,383	0,009	AP_5MedCyt	0,672	<0,0001
	AP_Guo	0,366	0,024	AP_5MedCyt	0,361	0,026	AP_8OxoGuo	0,300	0,045	AP_5OHMedCyt	0,508	<0,0001
	AP_8OxoGuo	0,439	0,006	AP_5OHMedCyt	0,385	0,017	AP_dGuo	0,347	0,019	AP_créatinine	0,495	0,001
	AP_dGuo	0,574	<0,0001	AP_créatinine	0,479	0,002	AP_8OxodGuo	0,364	0,014			
	AP_8OxodGuo	0,403	0,012	Ancienneté	0,512	0,001	AP_Cyt	0,499	<0,0001			
AP_Cyto	0,415	0,009				AP_5MeCyt	0,609	<0,0001				
AP dCyt	AP_t,t-MA	0,438	0,006	AP_Cyt	0,713	<0,0001	AP_t,t-MA	0,349	0,019	AP_5OHMedCyt	0,513	<0,0001
	AP_S-BMA	0,455	0,004	AP_5MeCyt	0,731	<0,0001	AP_cotinine	-0,342	0,021	AP_créatinine	0,383	0,009
	AP_8OxoGua	0,362	0,026	AP_5MedCyt	0,750	<0,0001	AP_Guo	0,443	0,002	GR	0,394	0,034
	AP_Guo	0,574	<0,0001	AP_7MeGua	0,465	0,003	AP_dGuo	0,354	0,017			
	AP_8OxoGuo	0,489	0,002	AP_5OHMeCyt	0,333	0,041	AP_8OxodGuo	0,439	0,003			
	AP_dGuo	0,487	0,002	AP_5OHMedCyt	0,661	<0,0001	AP_Cyt	0,697	<0,0001			
	AP_8OxodGuo	0,586	<0,0001	AP_créatinine	0,410	0,011	AP_5MeCyt	0,687	<0,0001			
	AP_Cyto	0,579	<0,0001	Neutro	-0,432	0,045	AP_5MedCyt	0,707	<0,0001			
AP_5MeCyt	0,390	0,015				AP_7MeGuo	0,513	<0,0001				
GB F=23 NF=29	AP_8OxodGuo	-0,591	0,003	Lympho	0,538	0,008	Neutro	0,855	<0,0001			
	AP_5MeCyt	-0,449	0,032	Neutro	0,851	<0,0001	Mono	0,477	0,018			
	AP_5MedCyt	-0,438	0,037	Mono	0,644	0,001						
	AP_7MeGua	-0,463	0,026	Plq	0,688	<0,0001						
AP_5OHMedCyt	-0,471	0,023										

II.7.3. Corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les fumeurs et non-fumeurs non- exposés

Tableau 79: Corrélations concernant les biomarqueurs du benzène et toluène chez les non-exposés (fumeurs et les vrais non-fumeurs)

	Fumeurs (13)						Vrais (Non-fumeurs et cot<100) (23)					
	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
AP t,t-MA	AP_S-BMA	0,835	<0,0001	/	/	/	AP_Guo	0,641	0,001	AP_dCyt	0,503	0,014
	AP_Gua	-0,736	0,004	/	/	/	AP_8OxoGuo	0,527	0,010	AP_5MedCyt	0,513	0,012
	AP_Cyt	0,588	0,035	/	/	/	AP_dGuo	0,584	0,003	AP_7MeGua	0,726	<0,0001
	AP_5MeCyt	0,599	0,031	/	/	/	AP_8OxodGuo	0,624	0,001	AP_1MeGua	0,526	0,010
	AP_7MeGuo	0,846	<0,0001	/	/	/	AP_Cyt	0,575	0,004	AP_7MeGuo	0,619	0,002
	AP_créatinine	0,553	0,050	/	/	/	AP_5MeCyt	0,509	0,013			
AP S-PMA	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
	AP_8OxoGuo	0,719	0,004	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	AP_créatinine	0,616	0,019	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	Age	0,707	0,005	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	Ancienneté	0,547	0,043	/	/	/	/	/	/	/	/	/
AP S-BMA	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
	AP_t,t-MA	0,835	<0,0001	/	/	/	AP_7MeGuo	0,420	0,046	/	/	/
	AP_8OxoGuo	0,635	0,015	/	/	/	AP_5OHMedCyto	0,571	0,004	/	/	/
	AP_Cyt	0,640	0,014	/	/	/				/	/	/
	AP_dCyt	0,688	0,007	/	/	/				/	/	/
	AP_7MeGuo	0,622	0,018	/	/	/				/	/	/

II.7.4. Corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les pompistes et les mécaniciens

Tableau 80: corrélations des biomarqueurs du benzène et toluène chez les pompistes et les mécaniciens

	Pompistes (59)						Mécaniciens (42)					
	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p
AP t,t-MA	AP_S-PMA	0,596	<0,0001	AP_5MeCyt	0,428	0,001	AP_S-PMA	0,591	<0,0001	AP_créatinine	0,395	0,010
	AP_S-BMA	0,411	0,001	AP_dCyt	0,338	0,009	AP_S-BMA	0,415	0,006			
	AP_Guo	0,413	0,001	AP_5MedCyt	0,384	0,003	AP_Guo	0,310	0,045			
	AP_8OxoGuo	0,393	0,002	AP_7MeGuo	0,696	<0,0001	AP_dGuo	0,531	<0,0001			
	AP_dGuo	0,549	<0,0001	AP_5OHMedCyto	0,281	0,031	AP_8OxodGuo	0,415	0,006			
	AP_8OxodGuo	0,471	<0,0001	AP_créatinine	0,618	0,000	AP_Cyto	0,364	0,018			
	AP_Cyto	0,320	0,014	HB	0,358	0,032	AP_5MeCyto	0,349	0,023			
	AP_5MeCyto	0,400	0,002	GR	0,341	0,042	AP_dCyt	0,345	0,025			
	AP_Cyt	0,591	<0,0001				AP_7MeGua	0,353	0,022			
AP S-PMA	Var	r	p	Var	r	p	Var	r	p	var	r	p
	AP_t,t-MA	0,596	<0,0001	AP_créatinine	0,358	0,005	AP_t,t-MA	0,591	<0,0001			
	AP_8OxodGuo	0,283	0,030	Plq	0,342	0,041	AP_créatinine	0,378	0,014			
	AP_7MeGuo	0,308	0,018									
AP S-BMA	var	r	p	var	r	p	var	r	p	var	r	p
	AP_t,t-MA	0,411	0,001	AP_Cyt	0,460	<0,0001	AP_t,t-MA	0,415	0,006	AP_créatinine	0,366*	0,017
	AP_8OxoGua	0,26	0,041	AP_5MeCyt	0,362	0,005	AP_8OxoGuo	0,309	0,046			
	AP_Guo	0,405	0,001	AP_dCyt	0,32	0,013	AP_8OxodGuo	0,393	0,010			
	AP_8OxoGuo	0,409	0,001	AP_5MedCyt	0,288	0,027	AP_Cyt	0,341	0,027			
	AP_dGuo	0,335	0,009	AP_7MeGuo	0,449	<0,0001	AP_5MeCyt	0,392	0,010			
	AP_8OxodGuo	0,386	0,003	AP_5OHMeCyto	0,322	0,013	AP_5MedCyt	0,411	0,007			
	AP_Cyto	0,363	0,005	AP_5OHMedCyto	0,371	0,004	AP_7MeGua	0,330	0,033			
AP_5MeCyto	0,382	0,003	AP_créatinine	0,510	<0,0001	AP_5OHMedCyto	0,376	0,014				

II.7.5. Corrélations entre nombre de symptômes et biomarqueurs chez les exposés

Le tableau 81 présente les corrélations significatives avec le nombre de symptômes déclarés.

Tableau 81: Corrélations entre nombre de symptômes et biomarqueurs chez les exposés

	Variables					
	Var	r	p	var	r	p
Nbre de symptômes	AV_S-PMA	0,391	0,002	AP_dCyt	0,358	0,006
	AP t,t-MA	0,296	0,024	HB	0,343	0,035
	AP S-PMA	0,278	0,035	GR	0,535	0,001
	AP 5MeCyto	0,261	0,048	Hct	0,426	0,008
	AP Cyt	0,346	0,008	Ancienneté	0,288	0,028

II.7.6. Corrélations entre nombre d'heures de travail et biomarqueurs chez les exposés

Le tableau 82 présente les corrélations significatives avec le nombre d'heures travaillées par jour.

Tableau 82: Corrélations entre nombre d'heures de travail et biomarqueurs chez les exposés

	Variables					
	Var	r	p	var	r	p
Nbre d'heures de travail	AV_t,t-MA	-0,217	0,030	AV_Gua	0,322	0,001
	AV_S-PMA	0,334	0,001	AV_8OxodGuo	0,219	0,028
	AP_S-PMA	0,322	0,001	HB	-0,427	<0,0001
	AV_cotinine	0,327	0,001	GR	-0,261	0,036
	AP_cotinine	0,354	<0,0001	Neutro	0,303	0,026

II.8. Analyse des régressions multiples (analyse multivariée)

II.8.1. Les biomarqueurs d'exposition en tant que variable dépendante

Une régression multiple stepwise (pas à pas) a été réalisée uniquement sur les variables mesurées en AP.

Seuls les modèles significatifs sont présentés dans le tableau, les autres variables ayant été exclues automatiquement par le logiciel.

Les variables indépendantes sélectionnées sont : **Age, ancienneté, nombre d'heures de travail, cotinine urinaire, S-BMA urinaire, créatinine urinaire, S-PMA et t,t-MA (l'un pour l'autre).**

Aucun modèle détecté pour le t,t-MA chez les non exposés non-fumeurs.

Le Tableau 83 regroupe les modèles significatifs de régression multiple pour le t,t-MA en tant que variable dépendante.

Tableau 83: Régressions multiples pour le t,t-MA en tant que variable dépendante

Var dépendante	Modèle	β standardisé	Valeur p de l'association	R ²	<i>p du modèle</i>
Exposés (101)					
AP t,t-MA	AP_S-PMA	0,538	<0,0001	0,246	<0,0001
	nbre_heures	-0,268	0,003		
	AP_créatinine	0,256	0,003		
Exposés fumeurs (38)					
AP t,t-MA	AP_S-PMA	0,451	<0,001	0,463	<0,0001
	AP créatinine	0,426	0,002		
Exposés non-fumeurs (63)					
AP t,t-MA	AP_S-PMA	0,617	<0,0001	0,410	<0,0001
	Nbre Heures	-0,284	0,005		
Non exposés fumeurs (13)					
AP t,t-MA	AP_S-BMA	0,865	<0,0001	0,726	<0,0001

B : Coefficient de régression *p* : significativité R² : Coefficient de détermination

Les modèles les plus explicatifs concernent les non exposés fumeurs et les exposés fumeurs, avec des coefficients de détermination élevés (R^2 ajusté > 0,45). Le S-PMA apparaît comme le prédicteur principal dans la majorité des groupes exposés, tandis que le S-BMA est associé uniquement chez les non exposés fumeurs. Le nombre d'heures travaillées montre une association négative dans plusieurs modèles, notamment chez les exposés et les non-fumeurs exposés. La créatinine urinaire est retenue comme variable contributive dans trois sous-groupes.

Le Tableau 84 regroupe les modèles significatif de régression multiple pour le S-PMA en tant que variable dépendante.

Tableau 84 : Régressions multiples pour le S-PMA en tant que variable dépendante

Var dépendante	Modèle	β standardisé	Valeur p de l'association	R^2	<i>p du modèle</i>
Exposés (101)					
AP S-PMA	AP_S-PMA	0,536	<0,0001	0,420	<0,0001
	nbre_heures	0,423	<0,0001		
Exposés fumeurs (38)					
AP S-PMA	AP_t,t-MA	0,531	<0,001	0,466	<0,0001
	Nbre_heures	0,414	0,002		
Exposés non-fumeurs (63)					
AP S-PMA	AP_t,t-MA	0,645	<0,0001	0,383	<0,0001
	Nbre Heures	0,239	0,023		
Non exposés fumeurs (14)					
AP S-PMA	AP_S-BMA	0,315	0,041	0,165	0,015
	AP cotinine	0,307	0,046		

B : Coefficient de régression *p* : significativité R^2 : Coefficient de détermination

Les modèles les plus explicatifs concernent les exposés fumeurs et les exposés tout court, avec des coefficients de détermination supérieurs à 0,42. Le t,t-MA est retenu comme variable associée dans tous les groupes exposés, avec des coefficients élevés, notamment chez les non-fumeurs exposés ($\beta = 0,645$). Le nombre d'heures travaillées est également sélectionné dans trois sous-groupes, avec des associations positives. Chez les non exposés fumeurs, le modèle est moins explicatif ($R^2 = 0,165$), et les variables associées sont S-BMA et cotinine urinaire, toutes deux significatives.

La Figure 61 illustre une courbe de régression du S-PMA en fonction du t,t-MA et les heures de travail par jour chez les exposés.

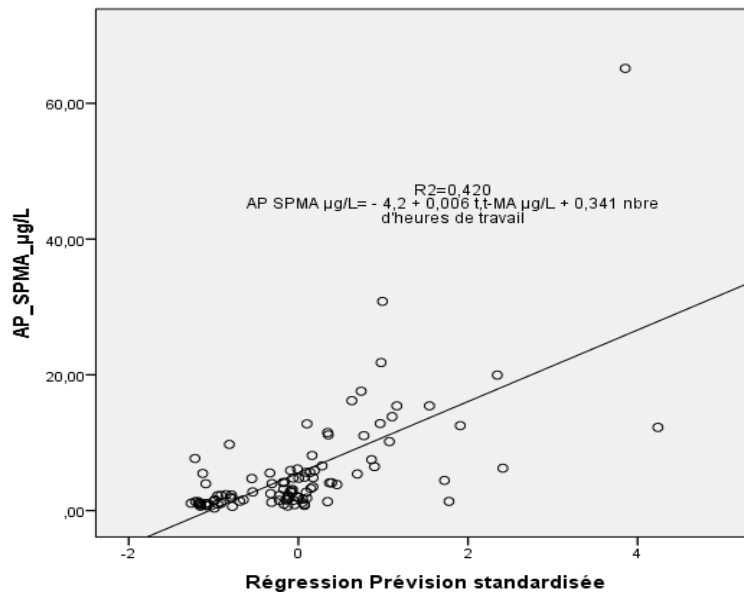


Figure 61: Courbe de régression multiple pour le S-PMA en AP en fonction du t,t-MA et les heures de travail chez les exposés

La Figure 62 illustre une courbe de régression multiple de S-PMA en AP en fonction du t,t-MA en AP et du nombre d'heures de travail chez les exposés fumeurs

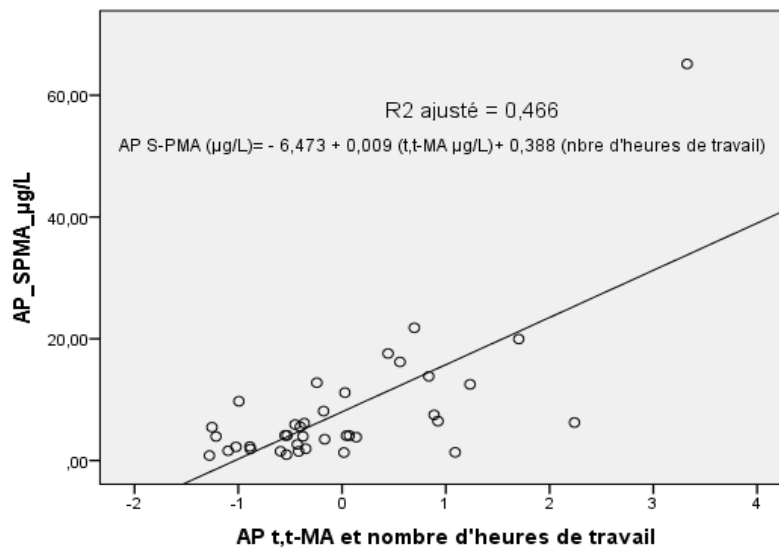


Figure 62: Courbe de régression multiple de S-PMA en AP en fonction du t,t-MA en AP et du nombre d'heures de travail chez les exposés fumeurs

La Figure 63 illustre une courbe de régression multiple de S-PMA en AP en fonction du t,t-MA en AP et du nombre d'heures de travail chez les exposés non-fumeurs

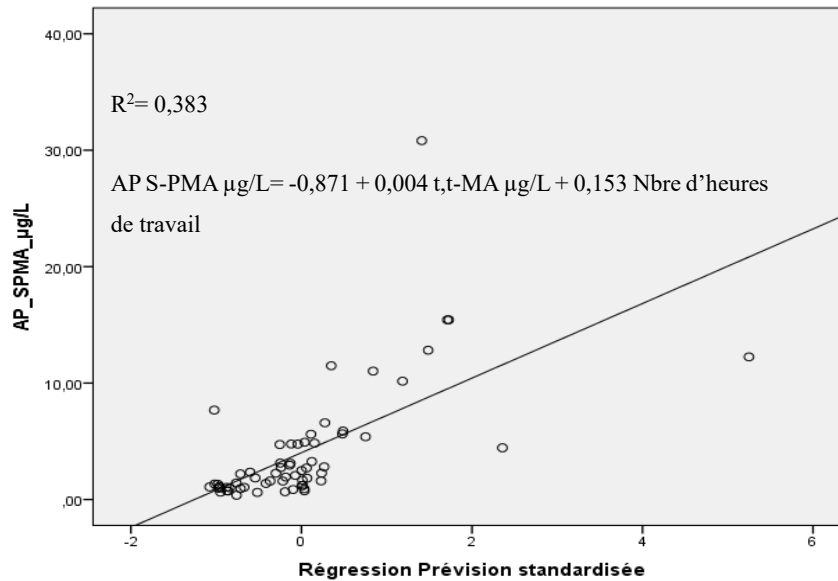


Figure 63: Courbe de régression multiple de S-PMA en AP en fonction du t,t-MA en AP et du nombre d'heures de travail chez les exposés non-fumeurs

II.8.2. Les biomarqueurs d'effet génotoxique par stress oxydatif en tant que variable dépendante

Les variables indépendantes incluses dans l'analyse sont : les biomarqueurs d'exposition (t,t-MA et S-PMA), S-BMA, cotinine, créatinine, âge, ancienneté, nombre d'heures de travail.

Uniquement les modèles significatifs sont rapportés dans le tableau.

RQ : aucun modèle n'a été détecté pour la Gua et la 8OxoGua en AP et pour la 8OxoGua en AV.

Nous avons illustré en courbe de régression les modèles les plus pertinents.

Le Tableau 85 présente les modèles significatifs de régression multiples des biomarqueurs d'oxydation en tant que variable dépendante.

Tableau 85: Régression multiples en stepwise pour les biomarqueurs d'effet génotoxique en tant que variable dépendante par stress oxydatif en AV et AP chez les exposés

Produits de l'ADN						
Variable dépendante µg/L)	Var Indépendante (µg/L)	AP		AV		
		Béta	p	Béta	p	
dGuo	1	Cotinine	/	/	0,212	0,033
			/	/	R ² =0,035, p=0,033	
	2	Créatinine	0,362	<0,0001	/	/
			R ² =0,131, p<0,0001			
8oxodGuo	1	t,t-MA	0,242	0,008	/	/
		Créatinine	0,443	p<0,0001	/	
			R ² =0,330, p<0,0001		/	
	2	S-PMA	/		0,200	0,014
		Créatinine	/		0,559	<0,0001
					R ² =0,367, p<0,0001	
Produits de l'ARN						
Guo	Créatinine	0,337	<0,0001	0,295	0,003	
		R ² =0,104, p<0,001		R ² =0,078 p=0,003		
8OxoGuo	Créatinine	0,325	<0,0001	/	/	
	Ancienneté	0,245	0,005	/	/	
	S-BMA	0,214	0,018	/	/	
	Cotinine	-0,192	0,023	/	/	
		R ² =0,326 p <0,0001				
Bases libres						
Gua	S-BMA	/	/	/	0,386	<0,0001
	t,t-MA	/	/	/	-0,273	0,004
	Cotinine	/	/	/	0,196	0,034
		/		R ² =0,178 p <0,0001		

La majorité des modèles significatifs concernent les produits oxydés de l'ADN et de l'ARN, avec des coefficients de détermination allant de 0,104 à 0,367. La créatinine urinaire est la variable indépendante la plus fréquemment retenue, présente dans presque tous les modèles, avec des coefficients β supérieurs à 0,3. Le t,t-MA et le S-PMA sont associés aux produits oxydés de l'ADN (notamment 8-oxodGuo), tandis que le S-BMA, l'ancienneté, et la cotinine interviennent

principalement dans les modèles liés à l'ARN et aux bases libres. Les modèles pour les bases libres (Gua) sont moins explicatifs ($R^2 = 0,178$), mais intègrent plusieurs variables significatives en phase AV. Les associations sont réparties entre les phases AP et AV, avec une légère prédominance des modèles en phase AP.

La **Figure 64** illustre la courbe de régression multiple du 8OxodGuo urinaire en AP en fonction du t,t-MA et la créatinine urinaires en AP chez les exposés

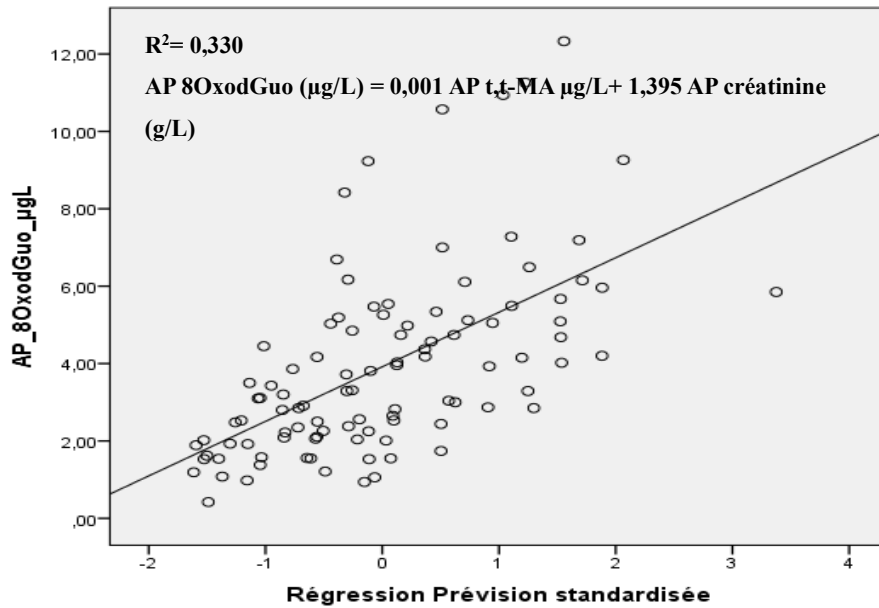


Figure 64: Courbe de régression multiple du 8OxodGuo urinaire en AP en fonction du t,t-MA et la créatinine urinaires en AP chez les exposés

La Figure 65 illustre la courbe de régression multiple du 8OxoGuo urinaire en AP en fonction de l'ancienneté et la créatinine, le S-BMA et la cotinine urinaires en AP chez les exposés

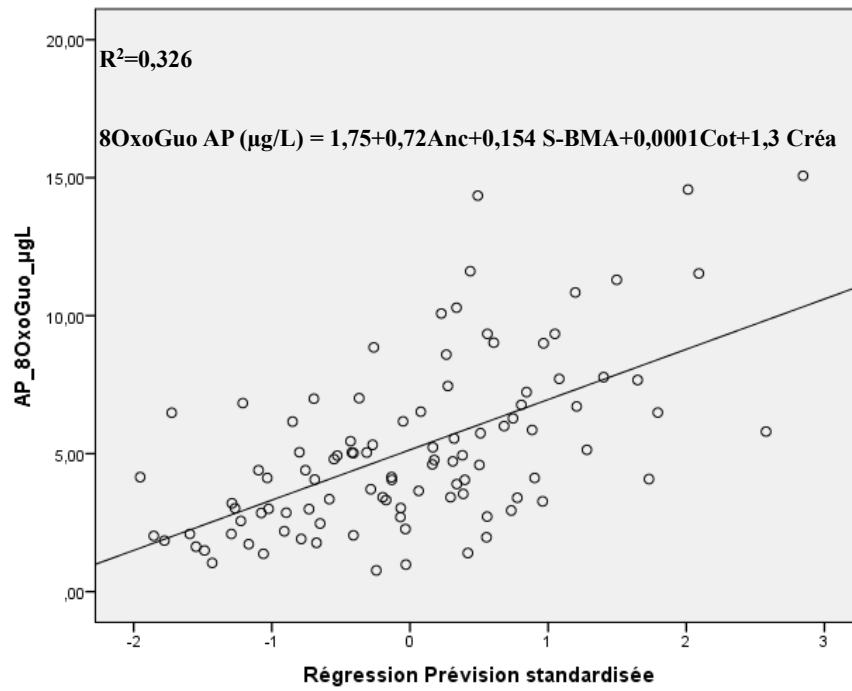


Figure 65: Courbe de régression multiple du 8OxoGuo urinaire en AP en fonction de l'ancienneté et la créatinine, le S-BMA et la cotinine urinaires en AP chez les exposés

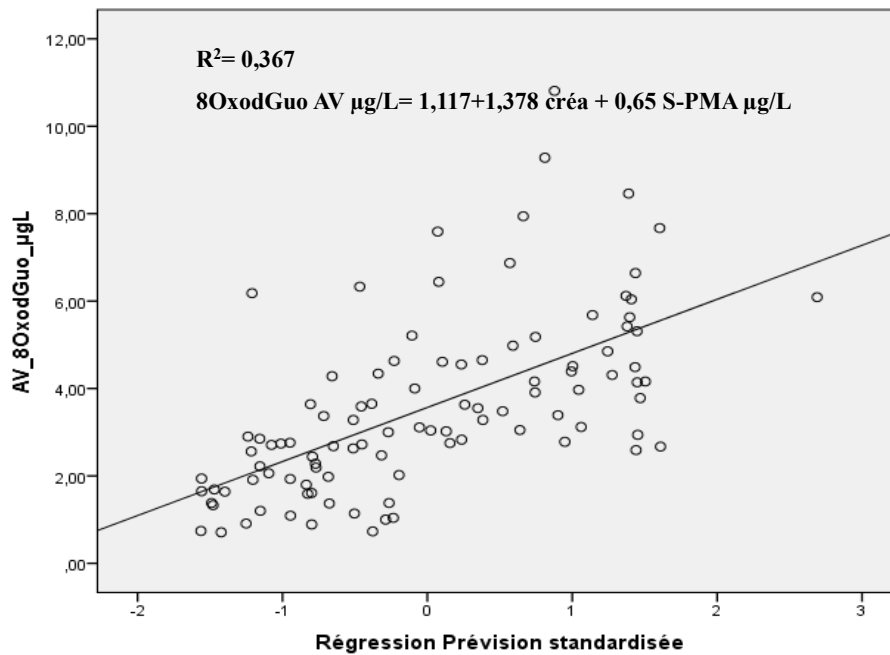


Figure 66: Courbe de régression multiple du 8OxidGuo urinaire en AV en fonction du S-PMA et la créatinine urinaires en AV chez les exposés

Le Tableau 86 regroupe les régressions multiples des biomarqueurs de l'effet oxydatif selon le groupe et le statut tabagique. Nous avons exclu 18 non-fumeurs avec cotinine urinaire > 100 µg/g créa pour ne pas biaiser les résultats.

Tableau 86: Régressions multiples pour les biomarqueurs d'effet oxydatif en fonction de l'exposition et du statut tabagique

Chez les fumeurs (valeurs AP)						
Variable dépendante	Var Indépendante (µg/L)	EX (38)		NE (14)		
		Béta	p	Béta	p	
dGuo	Créatinine	0,466	0,003	/	/	
		R ² =0,195, p=0,003		/		
8oxodGuo	Créatinine	/	/	0,644	p=0,013	
		/		R ² =0,334, p=0,013		
	t,t-MA	0,566	<0,0001	/	/	
		R ² =0,301, p<0,0001		/		
Guo	S-BMA	0,449	0,005	/	/	
		R ² =0,180, p=0,003		/		
8OxoGuo	1	Créatinine	0,549	<0,0001	/	/
			R ² =0,282 p <0,0001		/	
	2	S-BMA	/	/	0,738	0,004
		/		R ² =0,503 p=0,004		
Chez les vrais non-fumeurs (valeurs AP)						
Variable dépendante	Var Indépendante (µg/L)	EX (45)		NE (23)		
		Béta	p	Béta	p	
dGuo	Créatinine	0,363	0,014	/	/	
		R ² =0,112, p=0,014		/		
	t,t-MA	////		0,573	0,004	
				R ² =0,297, p=0,002		
8oxodGuo	Créatinine Ancienneté	0,587	<0,0001	/		
		0,313	0,009	/		
		R ² =0,432, p<0,0001		/		
	t,t-MA			0,505	0,014	
				R ² =0,304, p=0,014		
Guo	Créatinine	0,387	0,009	/	/	
		R ² =0,130, p=0,009		/		
	t,t-MA	/		0,529	0,009	
		/		R ² =0,246, p=0,008		
8OxoGuo	Créatinine	0,424	0,001	/	/	
	Ancienneté	0,421	0,001	/		
			R ² =0,342 p<0,0001			

Les modèles les plus explicatifs sont observés pour 8OxoGuo chez les non exposés fumeurs ($R^2 = 0,503$) et pour 8OxodGuo chez les exposés vrais non-fumeurs ($R^2 = 0,432$).

La créatinine urinaire est la variable la plus fréquemment retenue, présente dans plusieurs modèles chez les exposés.

Le t,t-MA est associé à plusieurs produits oxydés, notamment chez les non exposés vrais non-fumeurs, avec des coefficients β supérieurs à 0,5.

Le S-BMA intervient dans les modèles de Guo et 8OxoGuo, principalement chez les fumeurs. L'ancienneté est sélectionnée uniquement chez les vrais non-fumeurs, dans les modèles de 8oxodGuo et 8OxoGuo.

Les modèles chez les non exposés sont globalement moins nombreux mais présentent des coefficients de détermination parfois élevés.

La Figure 67 illustre la courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en fonction du t,t-MA chez les non exposés non-fumeurs.

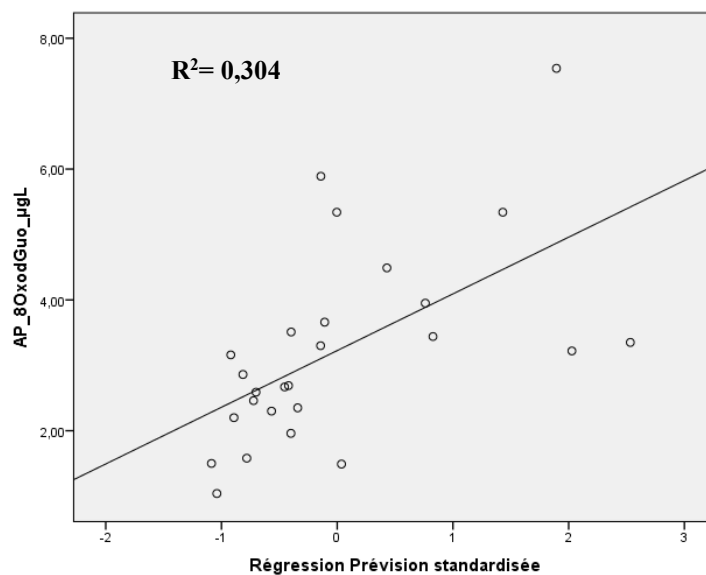


Figure 67: Courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en fonction du t,t-MA chez les non exposés non-fumeurs

La Figure 68 illustre la courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en AP en fonction de la créatinine et l'ancienneté chez les exposés non-fumeurs.

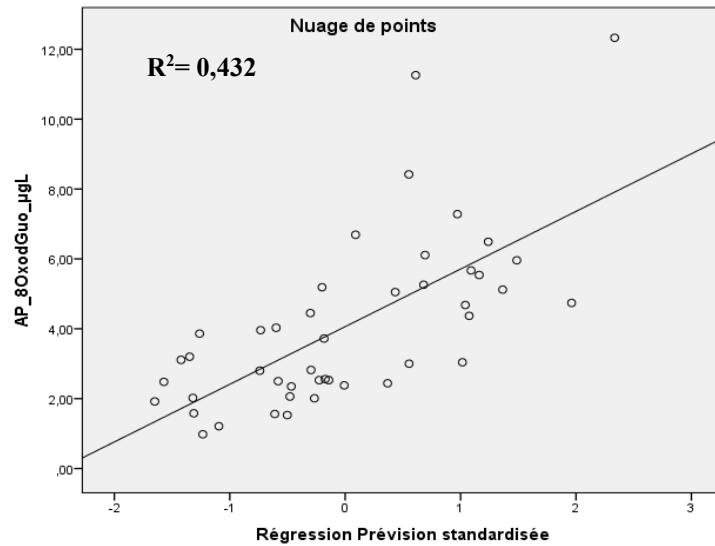


Figure 68: Courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en AP en fonction de la créatinine et l'ancienneté chez les exposés non-fumeurs

La Figure 69 illustre la courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en AP en fonction du t,t-MA en AP chez les exposés fumeurs.

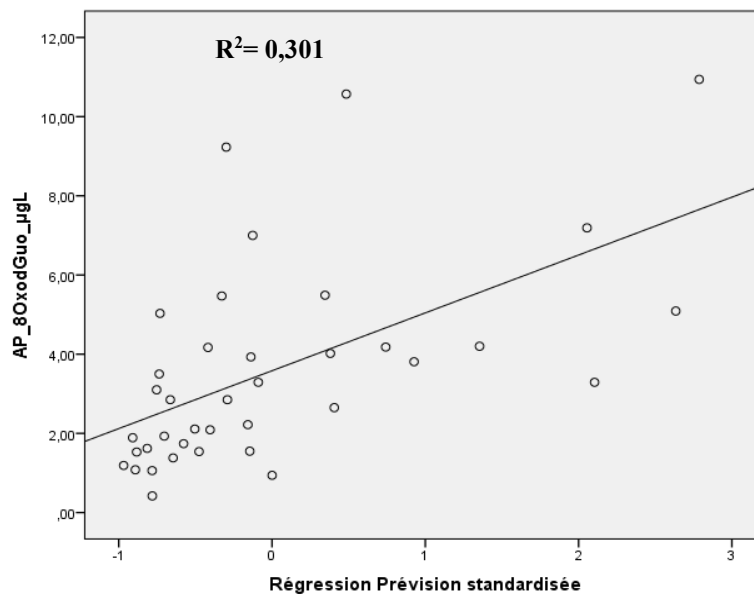


Figure 69: Courbe de régression multiple du du 8OxodGuo en AP en fonction du t,t-MA en AP chez les exposés fumeurs

II.8.3. Les biomarqueurs d'effet épigénétique en tant que variable dépendante

Les variables indépendantes incluses dans l'analyse sont : les biomarqueurs d'exposition (t,t-MA et S-PMA), S-BMA, cotinine, créatinine, âge, ancienneté, nombre d'heures de travail (Tableau 87).

Tableau 87: Régression multiples pour les biomarqueurs d'effet épigénétique chez les EX

Produits de l'ADN						
Variable dépendante(µg/L)	Var Indépendante (µg/L)	AP		AV		
		Béta	p	Béta	p	
5MedCyt	1	Créatinine	0,216	0,03	/	/
			R ² =0,037, p=0,03		/	
	2	t,t-MA	/	/	0,209	0,036
			/		R ² =0,034, p=0,036	
5OHMedCyt	1	Créatinine	0,484	<0,0001	//	
		Ancienneté	-0,191	0,033	//	
			R ² =0,232, p <0,0001		//	
	2	Créatinine	/	/	0,327	<0,0001
		S-BMA	/	/	0,255	0,005
		Ancienneté	/	/	-0,233	0,012
			/		R ² =0,248, p <0,0001	
Produits de l'ARN						
7MeGuo		Créatinine	0,444	<0,0001	/	/
			R ² =0,189, p <0,0001		/	
		t,t-MA	/	/	0,486	<0,0001
			/		R ² =0,228, p <0,0001	
Bases libres						
Cyto	1	Ancienneté	0,198	0,047	/	/
			R ² =0,03 p=0,047		/	
5MeCyto	1	S-BMA	0,237	0,017		
			R ² =0,047, p <0,0001			
	2	t,t-MA	/	/	0,225	0,024
		/		R ² =0,041 p=0,024		
5OHMeCyto		Age	0,243	0,014	//	
			R ² =0,05 p=0,014		//	
1MeGua		t,t-MA	0,572	<0,0001	/	
		S-PMA	-0,246	0,017	/	
		R ² = - 0,231 p<0,0001		/		
7MeGua	1	Créatinine	0,290	0,003	/	
			R ² =0,075 p=0,003		/	
	2	t,t-MA	/	/	0,310	<0,0001
		S-BMA	/	/	0,265	0,005
			/		R ² =0,185 p<0,0001	

Les modèles les plus explicatifs concernent les produits méthylés de l'ADN (5OHMedCyt) et certains dérivés méthylés de l'ARN (7MeGuo), avec des R^2 allant jusqu'à 0,248.

La créatinine urinaire est la variable la plus fréquemment sélectionnée, présente dans presque tous les modèles, en phase AP comme AV.

Le t,t-MA est associé à plusieurs produits, notamment en phase AV, avec des coefficients β supérieurs à 0,3.

Le S-BMA intervient dans les modèles de 5OHMedCyt, 5MeCyto et 7MeGua, principalement en phase AV.

L'ancienneté est retenue dans les modèles de 5OHMedCyt et Cyto, avec des associations négatives ou modérées.

L'âge apparaît uniquement dans le modèle de 5OHMeCyto, avec une contribution modeste. Les modèles en phase AV sont globalement plus diversifiés en termes de variables explicatives, mais les coefficients de détermination restent comparables à ceux de la phase AP.

Le Tableau 88 regroupe les régressions multiples des biomarqueurs de l'effet épigénétique selon le groupe et le statut tabagique. Nous avons exclu 18 non-fumeurs avec cotinine urinaire $> 100 \mu\text{g/g}$ créa pour ne pas biaiser les résultats.

Tableau 88: Régressions multiples pour les biomarqueurs d'effet épigénétique en fonction de l'exposition et du statut tabagique

Chez les fumeurs (valeurs AP)						
Variable		Var	EX (38)		NE (14)	
			Béta	p	Béta	p
dCyt		Créatinine	0,478	0,002	/	/
			R ² =0,207 p=0,002		/	
5MedCyt	2	Créatinine	0,560	<0,0001	/	/
		S-PMA	-0,311	0,040		
		R ² =0,274, p=0,01		/		
5OHMedCyt	1	Créatinine	0,490	0,002	/	/
			R ² =0,219, p=0,002		/	
	2	Age	/	/	-0,828	0,001
		Créatinine			0,539	0,01
		/		R ² =0,674 p<0,001		
Cyt		Créatinine	0,761	<0,0001	/	/
		Cotinine	0,281	0,013	/	/
		Ancienneté	-0,245	0,034	/	/
		R ² =0,577 p<0,0001		/		
5MeCyt		Créatinine	0,540	<0,0001	/	/
		R ² =0,271 p<0,0001		/		
5MeCyto		Créatinine	0,379	0,019	/	/
		R ² =0,120 p=0,019		/		
5OHMeCyto		Age	0,377	0,002	/	/
		R ² =0,118 p =0,002		/		
7MeGuo		Ancienneté	0,447	0,003	/	/
		Créatinine	0,298	0,041	/	/
		R ² =0,325 p<0,0001		/		
Chez les vrais non-fumeurs (valeurs AP)						
Variable dépendante		Var Indépendante	EX (45)		NE (26)	
			Béta	p	Béta	p
5OHMedCyt	1	Créatinine	0,488	0,001	/	/
		Ancienneté	-0,272	0,044	/	/
		R ² =0,255, p<0,0001		/		
	2	t,t-MA	/	/	0,458	0,019
		/		R ² =0,177, p=0,019		
Cyto	1	Age	/	/	0,644	<0,0001
			/		R ² =0,390, p=0,009	
5MeCyto	1	Ancienneté	/	/	0,458	0,016
		t,t-MA	/	/	0,395	0,034

			/		R ² =0,249 p=0,014	
7MeGuo	1	Créatinine	0,511	<0,0001	/	
			R ² =0,243 p<0,0001		/	
	2	t,t-MA	/		0,593	0,001
				/		R ² =0,325 p<0,001

Chez les fumeurs, les modèles sont globalement plus nombreux et plus explicatifs, avec plusieurs R² supérieurs à 0,25, notamment pour Cyt (R² = 0,577), 5MedCyt (R² = 0,274), et 5OHMedCyt (R² = 0,674).

La créatinine urinaire est systématiquement retenue comme variable indépendante, souvent accompagnée de l'âge, la cotinine, l'ancienneté, ou t,t-MA. Les coefficients β sont généralement élevés, et plusieurs modèles combinent deux ou trois variables significatives.

Chez les vrais non-fumeurs, les modèles sont moins nombreux mais restent statistiquement solides, avec des R² allant jusqu'à 0,390 pour Cyto et 0,325 pour 7MeGuo. Les variables associées sont plus ciblées : l'âge, l'ancienneté, t,t-MA, et la créatinine, avec des associations souvent isolées par modèle. Les coefficients β sont également élevés, mais les combinaisons de variables sont plus restreintes.

Les Figure 70, Figure 71, Figure 72 illustrent les modèles les plus pertinents.

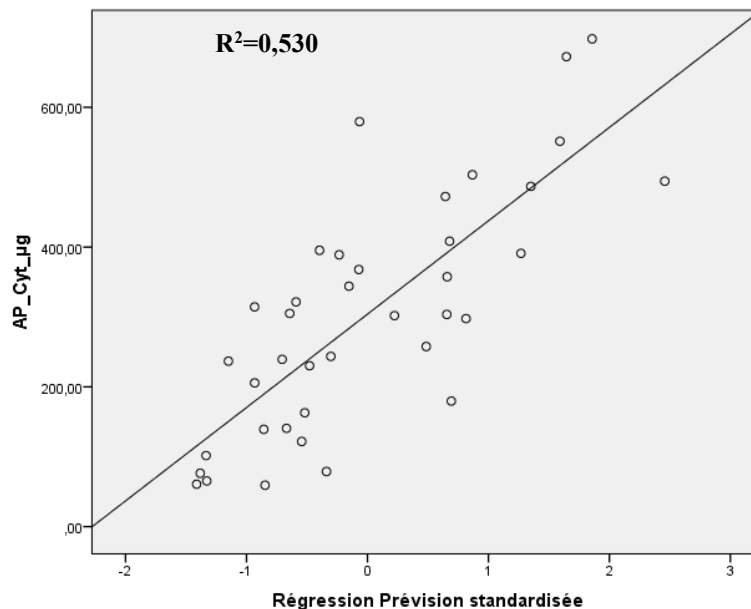


Figure 70: Courbe de régression multiple du Cytidine en AP en fonction de la créatinine et cotinine urinaires en AP et ancienneté chez les fumeurs exposés

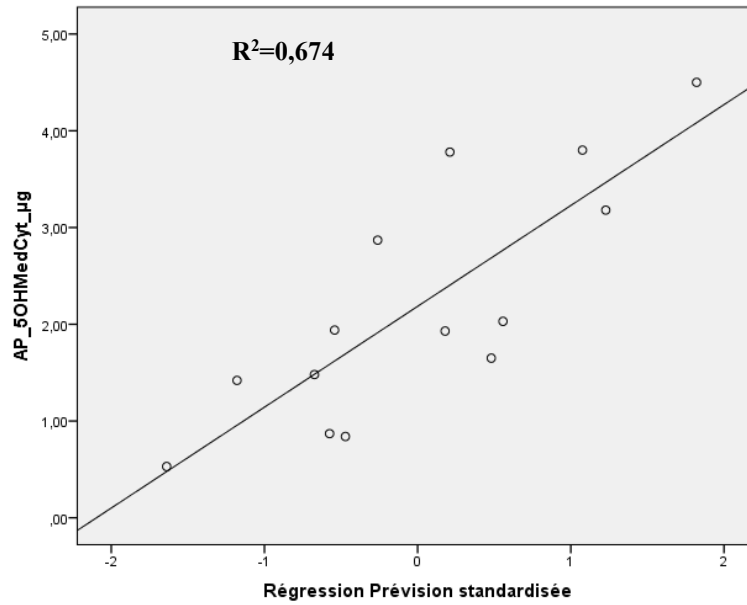


Figure 71: Courbe de régression multiple du 5OHMedCyt en AP en fonction de l'âge et la créatinine urinaire chez les fumeurs non exposés

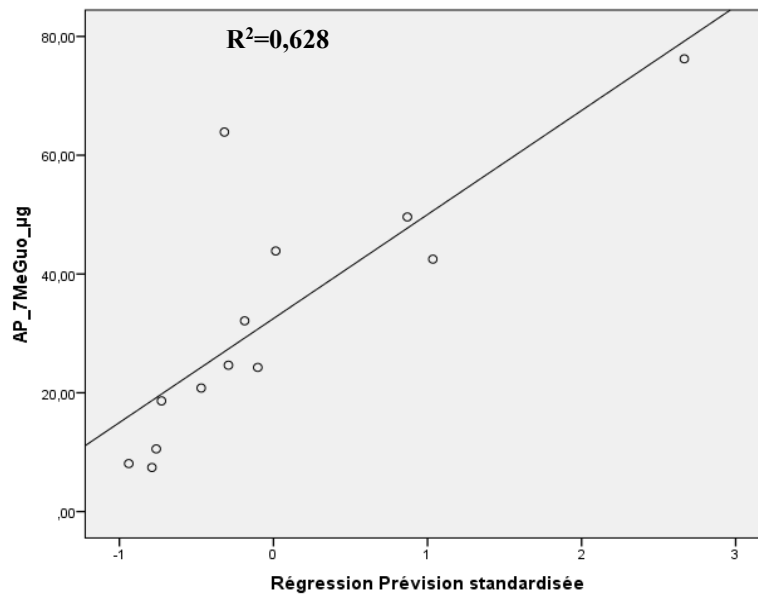


Figure 72: Courbe de régression multiple du 7MeGuo en AP en fonction du t,t-MA chez les fumeurs NE

II.8.4. Les biomarqueurs d'effet hématologique en tant que variable dépendante

Les variables indépendantes incluses sont : âge, ancienneté, nombre d'heures de travail, la cotinine, les biomarqueurs d'exposition et d'effet en après poste.

Aucun modèle de régression multiple n'a été détecté chez les non exposés.

Le Tableau 89 regroupe les modèles significatifs de régressions multiples des paramètres du bilan hémobiochimique en tant que variable dépendante chez les exposés et les exposés fumeurs

Tableau 89 : Régressions multiples des paramètres du bilan hémobiochimique en tant que variable dépendante chez les exposés et les exposés fumeurs

Variable dépendante $\mu\text{g/L}$	Var Indépendante ($\mu\text{g/L}$)	Exposés (N=65)		Exposés fumeurs (N=23)		
		Béta	p	Béta	p	
HB	Ancienneté	0,484	<0,0001	/	/	
	Age	-0,253	0,045	/	/	
		R ² =0,176 p<0,0001		/		
GR	8OxodGuo	0,266	0,032	/	/	
		R ² =0,056 p=0,032		/		
GB	1MeGua	-0,293	0,018	/	/	
		R ² =0,072 p=0,018		/		
	2	8OxodGuo	/	/	-0,590	0,003
/		/		R ² =0,317 p=0,003		
Neutro	1	7MeGua	-0,403	0,003	/	/
			R ² =0,146 p=0,003		/	
	2	Gua	//	/	-0,526	0,003
		8OxodGuo	/	/	-0,437	0,01
/		/		R ² =0,537 p<0,0001		
Lympho	Cotinine	/	/	0,442	0,021	
	5OHMedCyt	/	/	-0,414	0,03	
	/		/		R ² =0,309 p<0,01	

HB : hémoglobine **GR**: Globules rouges **Neutro** : neutrophiles **Lympho**: Lymphocytes

Chez les exposés (N=65), les modèles sont plus nombreux mais globalement moins explicatifs, avec des R² allant de 0,056 à 0,176. Les variables associées sont principalement l'ancienneté, l'âge, 1MeGua, 7MeGua, et 8OxodGuo, avec des coefficients β modérés. Les associations concernent les paramètres hématologiques HB, GR, GB et Neutro.

Chez les exposés fumeurs (N=23), les modèles sont moins nombreux mais plus puissants, avec des R^2 allant jusqu'à 0,537 pour les neutrophiles. Les variables associées incluent 8OxodGuo, Gua, cotinine, et 5OHMedCyt, avec des coefficients β élevés (jusqu'à -0,590). Les associations concernent principalement les GB, Neutro et Lympho, avec des modèles combinés à deux variables dans certains cas.

Les Figure 73, Figure 74, Figure 75 illustrent les modèles les plus pertinents.

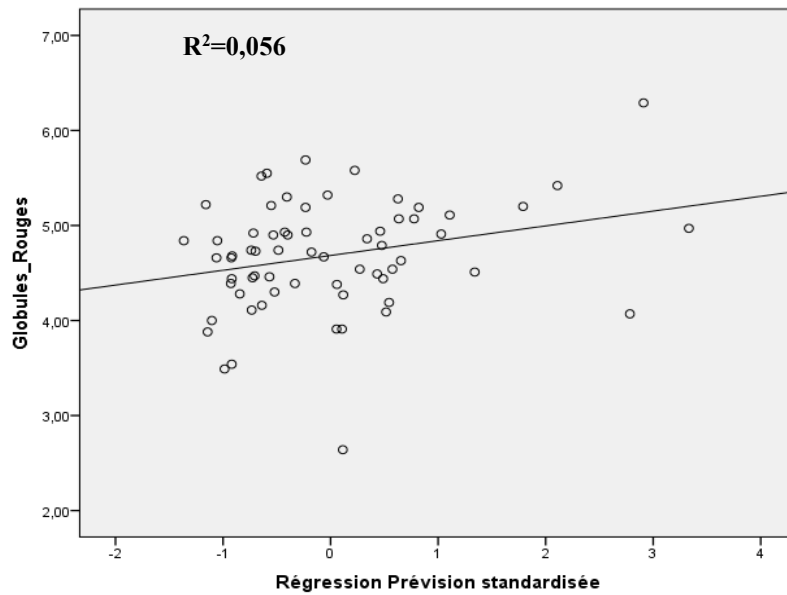


Figure 73 : Courbe de régression multiple des GR en fonction du 8OxodGuo en AP chez les exposés

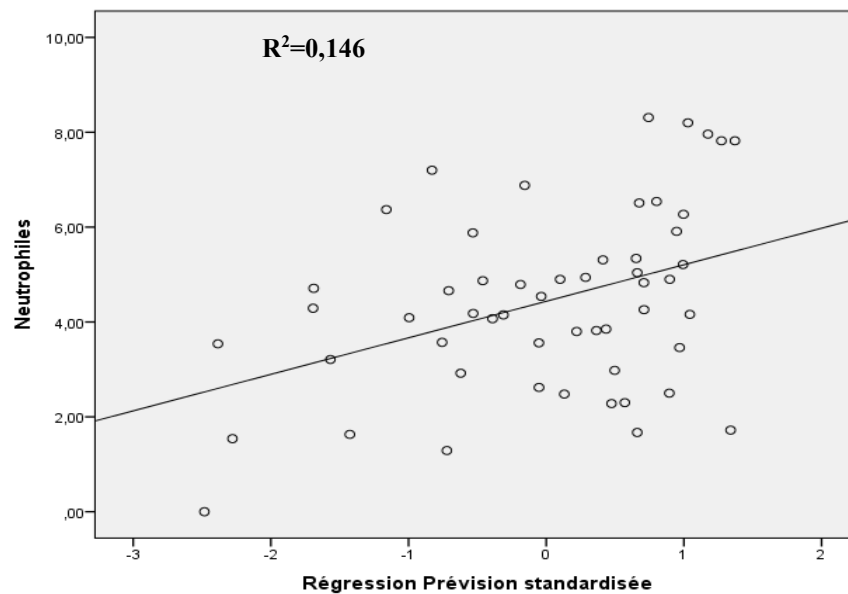


Figure 74 : Courbe de régression multiple des Neutrophiles en fonction de 7MeGua en AP chez exposés

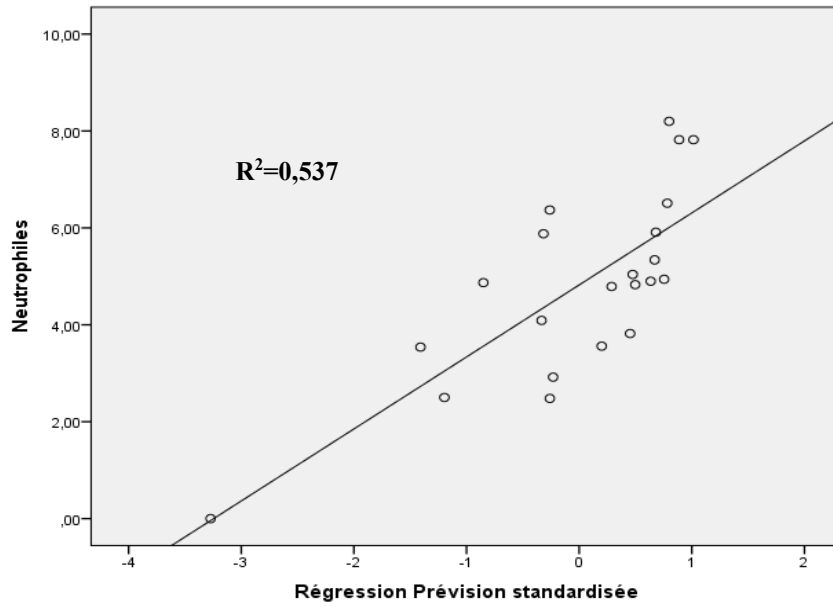


Figure 75 : Courbe de régression multiple des neutrophiles en fonction de la Gua et 8OxodGuo en AP chez les exposés fumeurs

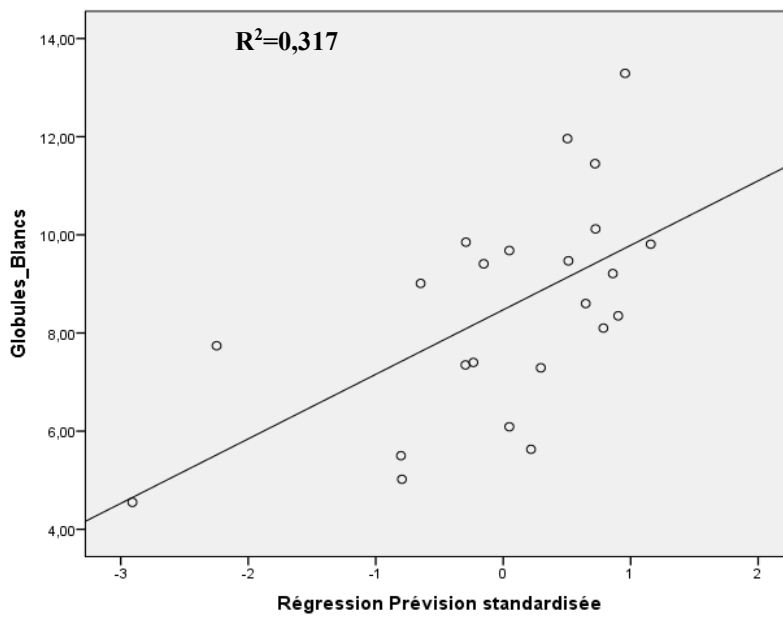


Figure 76: Courbe de régression multiple des GB en fonction du 8OxodGuo en AP chez les exposés fumeurs

II.9. Résultats de l'analyse du t,t-MA par HPLC-DAD et comparaison avec la méthode de référence UPLC-MS/MS

II.9.1. Critères de la validation analytique de la méthode

Nous nous sommes basés sur les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP 2006) pour valider notre méthode.

Identification de la fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

Des étalonnages appariés à la matrice ont été utilisés grâce à la disponibilité d'urines vierges de donneurs de sexe masculin et non-fumeurs préalablement testées (extraction et analyse).

La courbe moyenne des trois jours de validation (Figure 77) effectuée dans la matrice a été tracée avec les valeurs de la hauteur (H) des pics en fonction des concentrations de la gamme d'étalonnage.

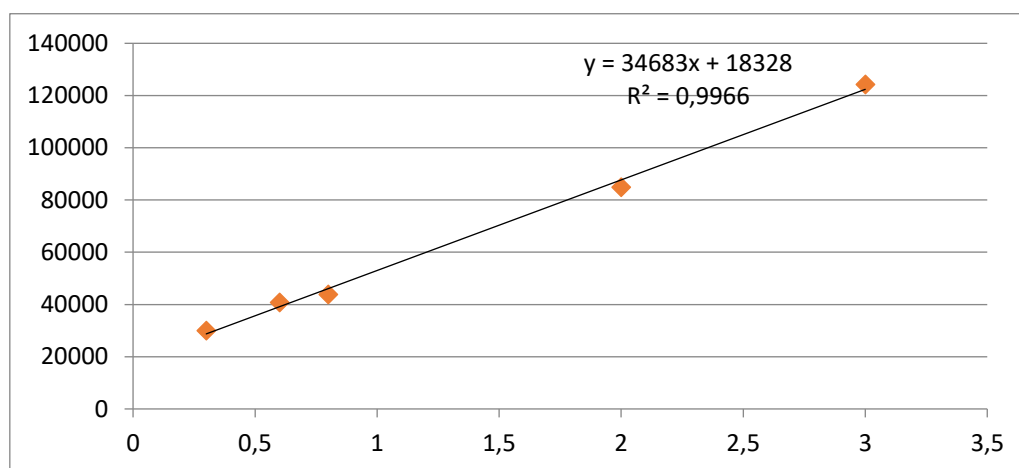


Figure 77: Courbe moyenne des trois jours de validation effectuée dans la matrice

Les paramètres de validation de la méthode sont résumés dans le Tableau 90 (détails en Annexe IV).

Tableau 90: Paramètres de validation de la méthode de dosage du t,t-MA urinaire par HPLC-DAD

Paramètre	Valeur
Intervalle de linéarité	(0,3 – 3) mg/L
Coefficient de détermination R ²	0,996
Formule	y = 34683x + 18328
Homogénéité des variances	Homogènes au risque d'erreur $\alpha = 5\%$
LD	0,09 mg/L
LQ	0,3 mg/L
Niveau de confiance	95%
Intervalle de confiance (pour une concentration intermédiaire de la gamme (1mg/L))	[0,916 - 1,024] mg/L
Fidélité (Coefficient de variation)	0,27 % - 6,8%
Justesse (Biais relatif)	(-14,8) % - (10) %
Rendement d'extraction	97 – 100 %
Effet matrice	116 % - 142%

Les coefficients de variation ainsi que les biais relatifs sont inclus dans les limites d'acceptabilité $\pm 15\%$.

Le Tableau 91 regroupe les coefficients de variation intra et inter jours des trois séries de validations.

Tableau 91: Coefficients de variation (CV) intra-jour et inter-jours et biais relatifs (BR) des trois standards de validation (SV)

Niveau mg/L	CV% intra J1	CV% intra J2	CV% intra J3	Moyenne inter-jour (mg/L)	CV% inter jour	BR % Inter-jour	Limite
0,4	5,25	0,55	6,21	0,39	7,13	-1,36	$\pm 15\%$
1	6,8	6,73	5,93	0,97	6,79	-3,44	$\pm 15\%$
2,5	0,27	5,37	2,29	2,4	6,44	-4,10	$\pm 15\%$

Abréviations : CV : coefficient de variation, BR : Biais relatif

Pour élaborer le profil d'exactitude nous avons combiné sous une forme graphique, un intervalle de tolérance calculé à trois niveaux de concentration (0,4, 1 et 2,5 mg/L) et un intervalle d'acceptabilité ($\pm 15\%$) à un niveau de confiance $B= 80\%$.

L'intervalle de tolérance est un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne au niveau considéré.

Le calcul des limites du profil d'exactitude est détaillé dans l'Annexe IV.

La Figure 78 illustre le profil d'exactitude de la méthode de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD.

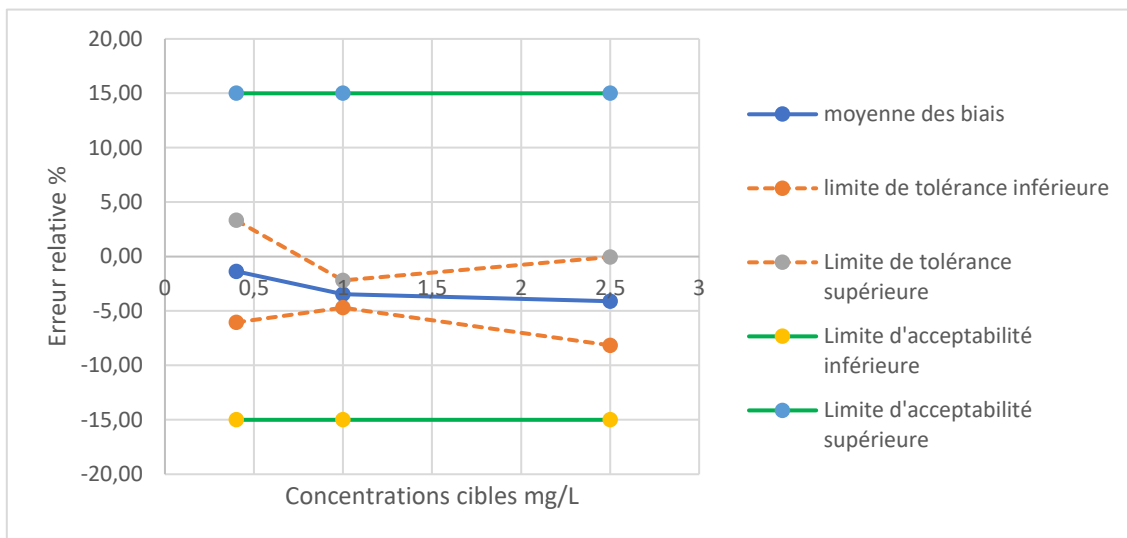


Figure 78: Profil d'exactitude de la méthode de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD

Les biais moyens pour toutes les concentrations analysées (0,4, 1 et 2,5 mg/L) sont **inclus** dans les limites de tolérance calculées. Cela démontre la cohérence et la répétabilité des données.

Les biais moyens respectent également les critères d'acceptabilité fixés, notamment dans la plage de $\pm 15\%$ des valeurs nominales, confirmant ainsi la conformité de la méthode aux exigences réglementaires ou expérimentales.

Les limites de tolérance calculées montrent que la méthode présente une variabilité maîtrisée, avec des écarts-types faibles pour chaque concentration.

Ces observations indiquent que la méthode est fiable pour les concentrations testées et qu'elle peut être utilisée avec confiance pour des analyses similaires.

II.9.2. Résultats de l'analyse du t,t-MA chez les sujets de l'étude

Les valeurs non détectées (ND) ont été remplacées par ($\frac{1}{2}$ LD), et les valeurs détectées et non quantifiées (NQ) ont été remplacées par ($\frac{1}{2}$ LQ) conformément aux recommandations méthodologiques lorsque le taux de données censurées reste inférieur à 15–20 %.

Le Tableau 92 présente les taux des valeurs ND et NQ pour les séries de mesures AV et AP chez les sujets exposés.

Tableau 92 : Répartition des valeurs ND et NQ des mesures AV et AP chez les exposés

	Mesures en AV (N=101)	Mesures en AP (N=101)
Valeurs ND	15 (14,85%)	11 (10,89%)
Valeurs NQ	16 (15,84%)	9 (8,91%)

Le Tableau 93 récapitule les données descriptives des résultats du t,t-MA urinaire chez les exposés par HPLC-DAD.

Tableau 93: Données descriptives des résultats du t,t-MA par HPLC-DAD et UPLC-MS/MS chez les exposés (technique de référence)

	HPLC-DAD (EX)		UPLC-MS/MS (EX)	
	AV	AP	AV	AP
Moyenne ($\mu\text{g/L}$)	400	607	432,35	654,41
Ecart-type	413	622	598,64	740,01
Médiane	300	400	225,73	374,13
Min ($\mu\text{g/L}$)	NQ	NQ	27,63	54,39
Max ($\mu\text{g/L}$)	2220	4500	3660	5042,55
LD	90 $\mu\text{g/L}$		0,80 $\mu\text{g/L}$	
LQ	300 $\mu\text{g/L}$		2,66 $\mu\text{g/L}$	
Intervalle de mesure	0,3-3 mg/L		0,2-2 mg/L	
Intervalle de confiance (95%)	319,45-480,55	485,69-728,31	315,6-549,10	510,09-798,73
Moyenne $\mu\text{g/g}$ créa	269	431	283,35	418,95
Ecart type $\mu\text{g/g}$ créa	271,41	394,68	337,25	405,59
Médiane $\mu\text{g/g}$ créa	203	337	161,66	319,73
Min- max $\mu\text{g/g}$ créa	ND-1833	ND-2266	34,66-1927,84	39,2- 2748

Le Tableau 94 présente données descriptives des résultats du t,t-MA par HPLC-DAD et UPLC-MS/MS chez les non exposés.

Tableau 94 : Données descriptives des résultats du t,t-MA par HPLC-DAD et UPLC-MS/MS chez les non exposés

	HPLC-DAD	UPLC-MS/MS		HPLC-DAD	UPLC-MS/MS
µg/L	NE-AP	NE-AP	µg/g créa	NE-AP	NE-AP
Moyenne	168,69	244,24	Moyenne	95	155,73
Ecart-type	187,02	198,23	Ecart-type	116,92	182,89
Min	ND	29,91	Min	13	14
Max	770	885	Max	589	682,18
IC (95%)	109,98-227,43	181,98-306,5	IC (95%)	58,28-131,72	98,28-213,18

II.9.3. Chromatogrammes

Les figures suivantes illustrent des chromatogrammes de quelques sujets exposés et non exposés, ainsi qu'un cas de pic probablement issu du sorbitol.

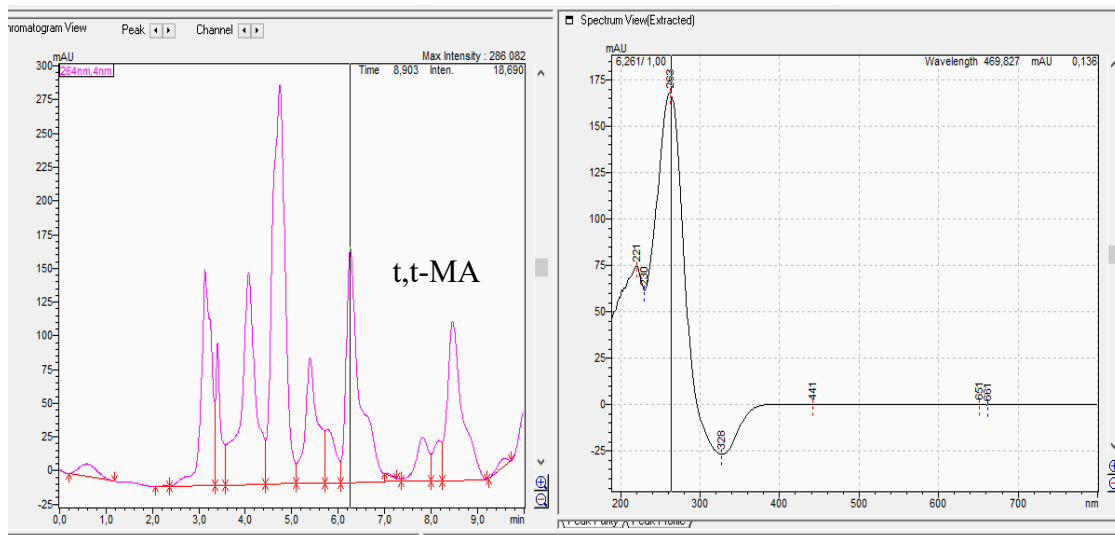


Figure 79: Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°114 AP

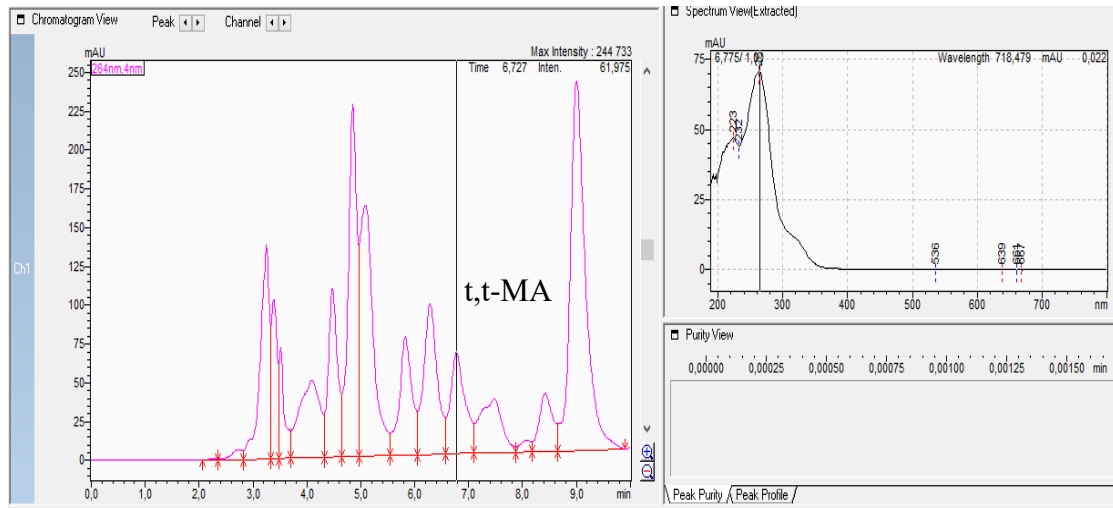


Figure 80: Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°58 AV

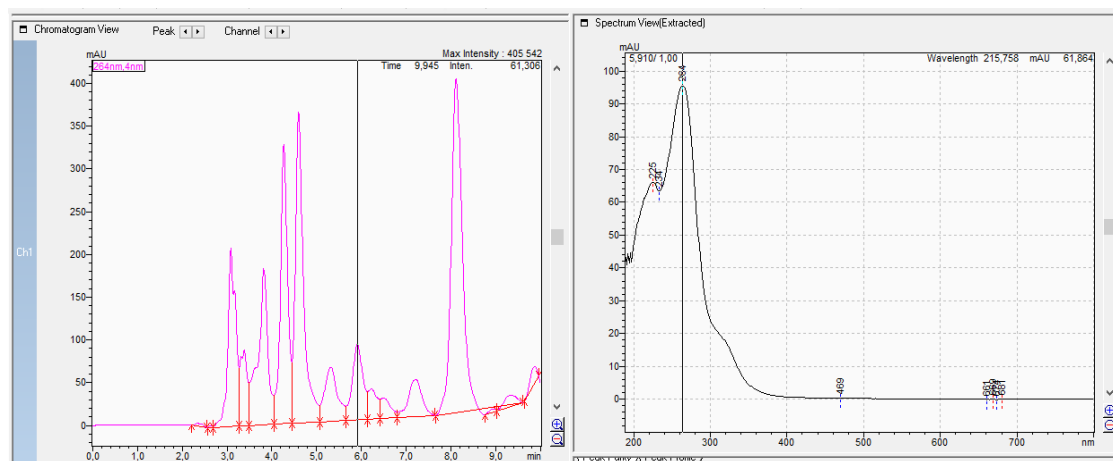


Figure 81: Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°129 AP

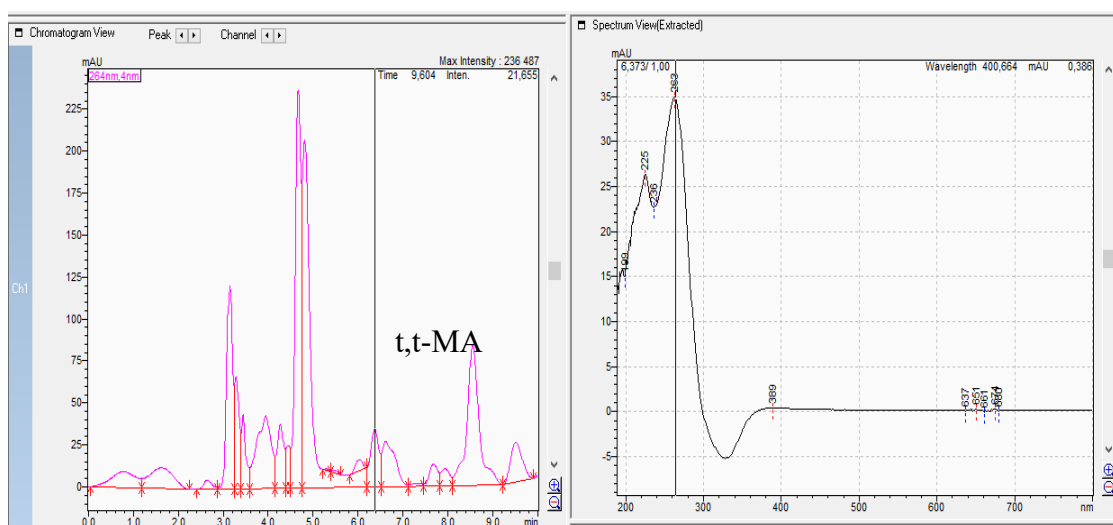


Figure 82: Chromatogramme et spectre t,t-MA du sujet n°133 AP

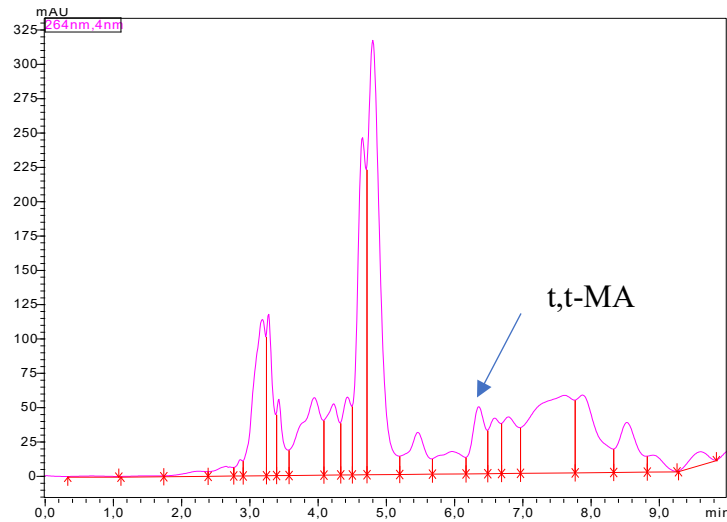


Figure 83: Chromatogramme du sujet NE (AP) n°18

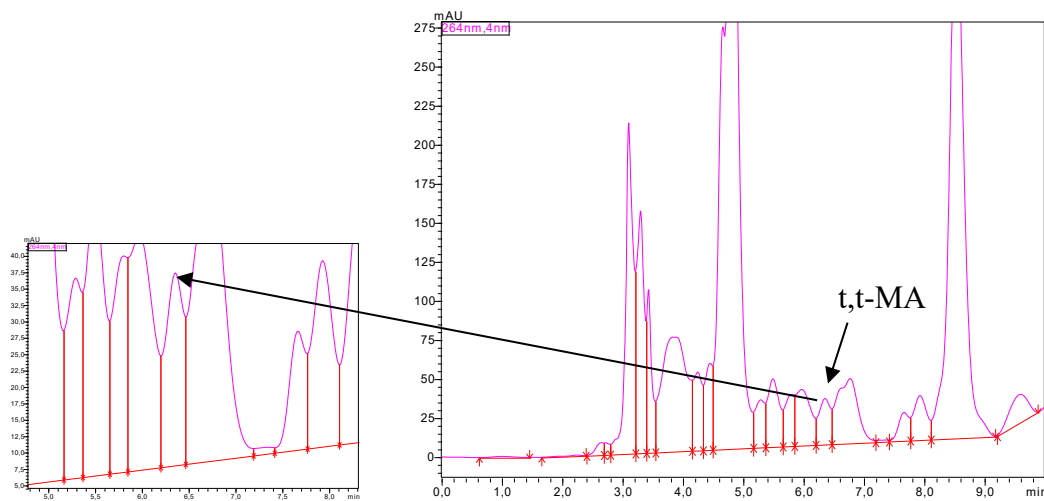


Figure 84: Chromatogramme du sujet NE n°17 (AP)

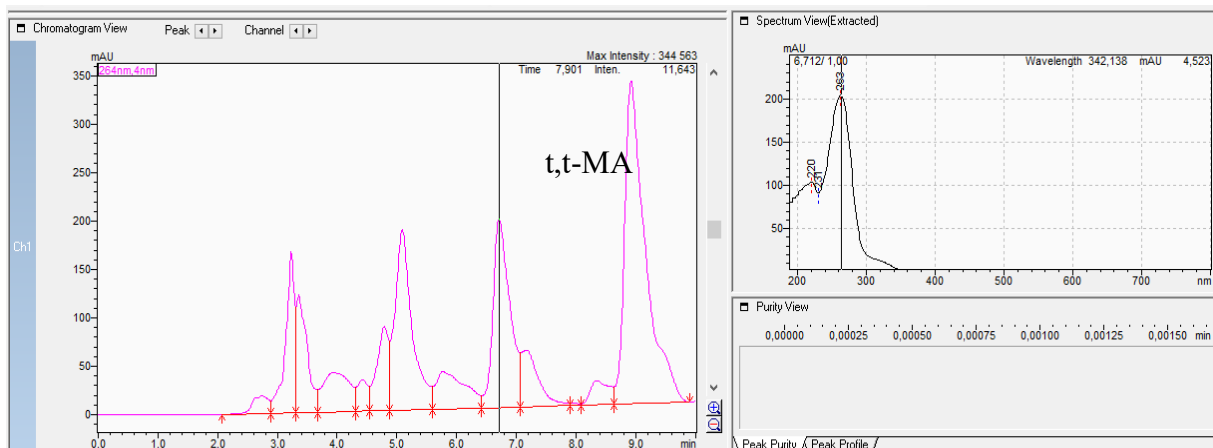


Figure 85: Présence d'un pic de t,t-MA chez sujet non-fumeur non exposé et consommant une boisson contenant l'acide sorbique la veille

II.9.4. Vérification de la distribution normale des différences des moyennes de mesure

La Figure 86 illustre l'histogramme de vérification de la normalité de distribution des différences de mesures du t,t-MA entre les deux techniques pour la série de mesures AV et AP chez les exposés.

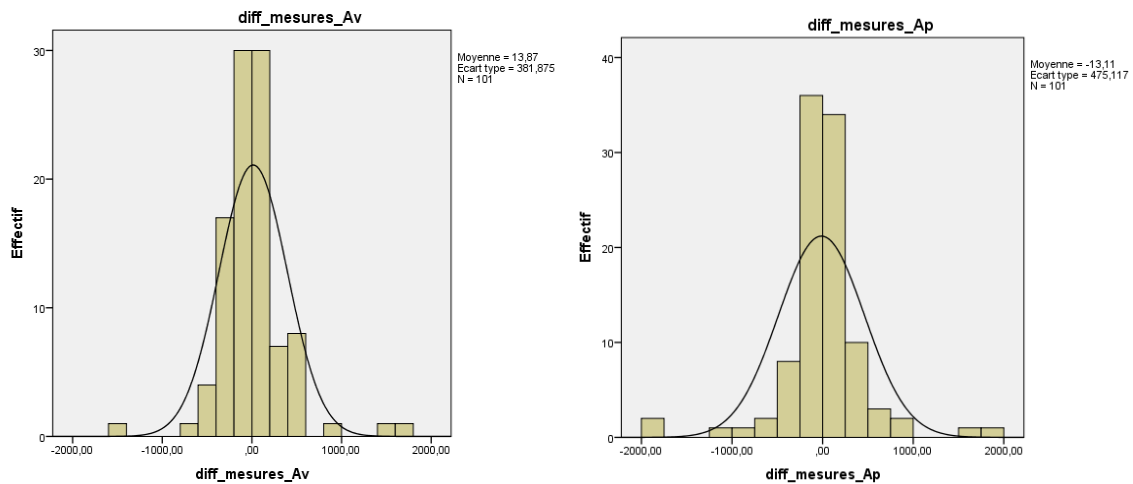


Figure 86: Vérification de la distribution des différences de mesures du t,t-MA entre HPLC-DAD et UPLC-MS/MS

II.9.5. Comparaison des moyennes des différences par le test t sur échantillon unique

Vu la distribution normale des différences des mesures, le test t pour comparaison sur échantillon unique a été utilisé (Tableau 105).

Tableau 95: Comparaison de moyennes des différences de mesures avec le zéro

Test sur échantillon unique						
	Valeur du test = 0					
	t	ddl	p value	Différence moyenne	Intervalle de confiance 95% de la différence	
					Inférieure	Supérieure
Différence des mesures AV	0,365	100	0,716	13,87	-61,5153	89,2587
Différence des mesures AP	- 0,277	100	0,782	-13,11	-106,9052	80,6830

$p > 0,05$ pour la moyenne des différences de mesure par les deux techniques des séries AV et AP, cela veut dire qu'elles sont différentes de 0 et donc la différence est significative.

II.9.6. Diagramme de Bland-Altman

Le Tableau 96 renseigne sur le calcul du biais (moyenne des différences de mesures) du t,t-MA pour la série AV (avant-poste) et la série de mesure AP (après poste).

Tableau 96: Paramètres du diagramme de Bland-Altman pour les mesures du t,t-MA (AV et AP)

Paramètre	Moyenne des différences (Biais)	Ecart type des différences	Limite de concordance inférieure	Limite de concordance supérieure
Mesures AV	13,87	381,88	-748,48	748,48
Mesures AP	-13,11	475,12	-931,23	931,23

Interprétation du tableau :

- **Biais**
 - Le **biais faible** dans les deux cas ($\pm 13 \mu\text{g/g}$ créa) indique que les deux méthodes donnent des résultats **globalement proches** en moyenne.
 - Le **signe du biais** (positif pour AV, négatif pour AP) suggère une **tendance légère** à la surestimation ou à la sous-estimation selon la méthode.
- **Limites de concordance**
 - Les **limites de concordance larges** (± 748 à $\pm 931 \mu\text{g/g}$ créa) traduisent une **variabilité importante** entre les deux méthodes.
 - Cela peut indiquer que, malgré une bonne concordance moyenne, les deux méthodes **ne sont pas interchangeables** pour des mesures individuelles.

La **Figure 87** illustre le diagramme de Bland-Altman des mesures AV

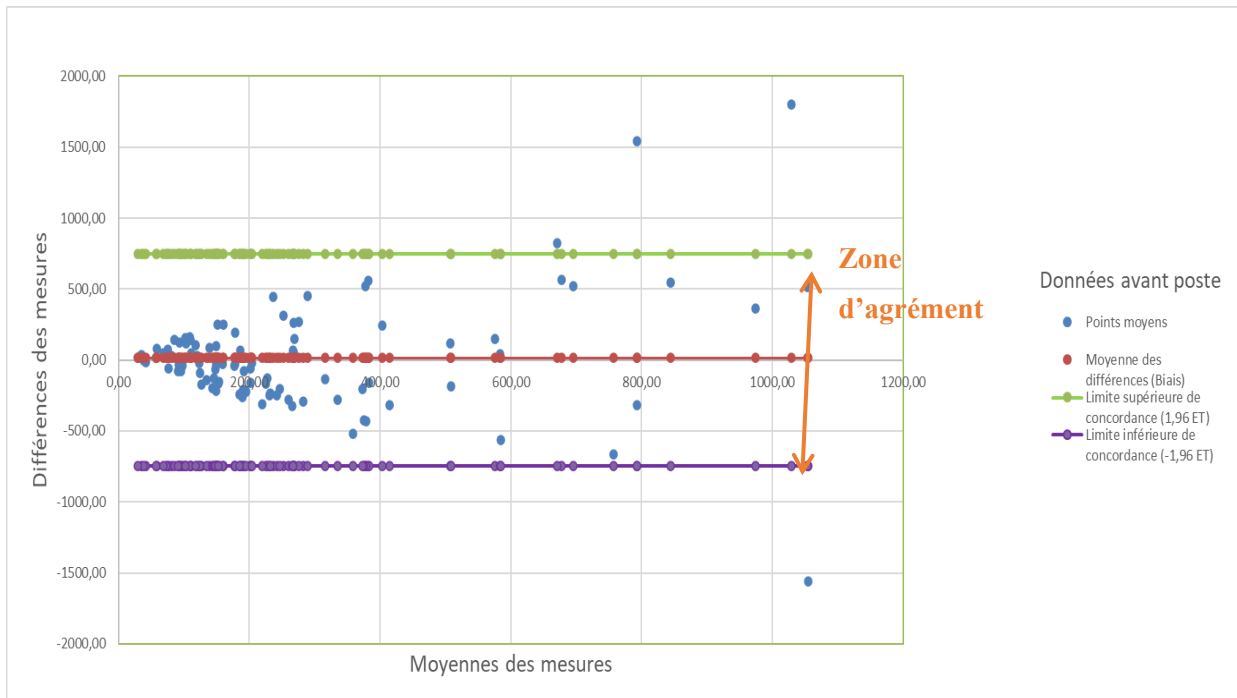


Figure 87: Diagramme de Bland-Altman des mesures AV

Les points bleus représentent les différences individuelles entre les deux méthodes en fonction de la moyenne des mesures.

- La dispersion verticale montre l'écart entre les méthodes pour chaque sujet.
- L'absence de tendance systématique (pas de dérive selon la moyenne) suggère que le biais est constant, quel que soit le niveau de t,t-MA.

Le diagramme de Bland-Altman montre une bonne concordance moyenne entre les deux méthodes de dosage du t,t-MA avant-poste, avec un biais faible. Toutefois, les limites de concordance relativement larges indiquent une variabilité inter-méthodes significative, ce qui pourrait limiter leur interchangeabilité pour une évaluation individuelle précise.

La **Figure 88** illustre le diagramme de Bland-Altman des mesures AP

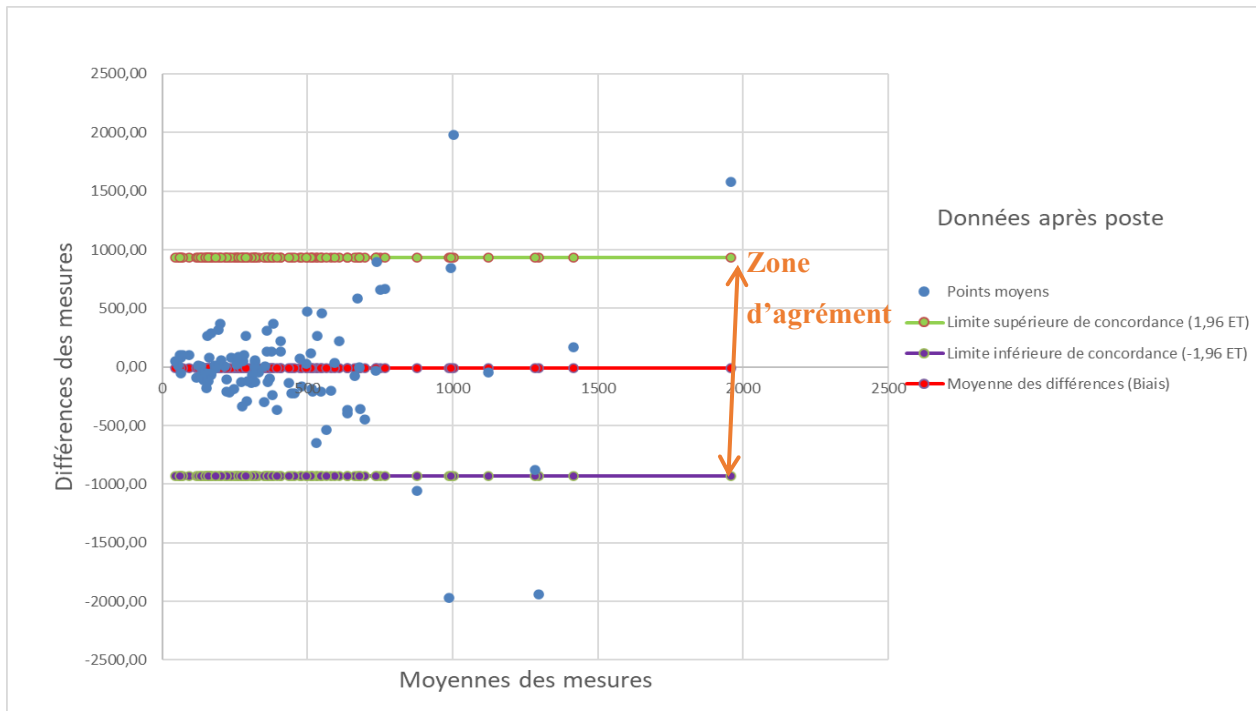


Figure 88: Diagramme de Bland-Altman des mesures AP

- Les points sont **relativement bien répartis** autour du biais, sans tendance systématique selon le niveau moyen du biomarqueur.
- Cela suggère que le **biais est constant** quel que soit le niveau de t,t-MA, mais que les méthodes peuvent diverger pour des mesures individuelles.

L'analyse du diagramme de Bland-Altman montre une bonne concordance entre les deux méthodes de dosage, avec 4,45% (N=9/202) des mesures situées en dehors de la zone d'agrément (outliers) en AV et AP ensemble.

II.9.7. Comparaison des courbes ROC

La Figure 89 présente Courbe ROC des valeurs t,t-MA $\mu\text{g/g}$ créa par HPLC-DAD

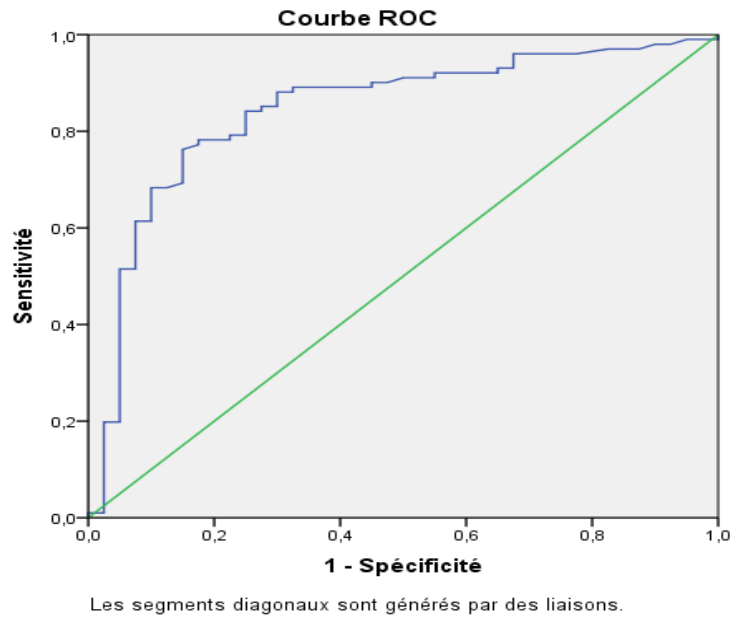


Figure 89: Courbe ROC des valeurs t,t-MA $\mu\text{g/g}$ créa par HPLC-DAD

Le Tableau 97 présente les données relatives à l'AUC de la courbe de ROC pour l'analyse de t,t-MA par HPLC-DAD.

Tableau 97: Références de l'AUC de la courbe de ROC pour t,t-MA par HPLC-DAD

Variable(s) de résultats tests : AP_t,t-MA_HPLC_μgCrea				
Zone	Erreur Std. ^a	Signif. asymptotique ^b	Intervalle de confiance 95% asymptotique	
			Borne inférieure	Borne supérieure
0,843	0,038	0,0001	0,768	0,919
a. Dans l'hypothèse non-paramétrique				
b. Hypothèse nulle /: zone vraie = 0.5				

La valeur de l'AUC (Aire Sous la Courbe) égale à 0,843 indique une très bonne performance diagnostique car plus elle est proche de 1, plus le test est efficace. Cela signifie que le test a 84,3 % de chances de classer correctement un échantillon positif par rapport à un négatif.

L'erreur standard égale à 0,038 reflète la variabilité de l'estimation de l'AUC. Une erreur faible montre que l'estimation est précise et fiable.

La significativité asymptotique de l'ordre de 0,0001, signifie que l'AUC est statistiquement différente de 0,5 et l'intervalle de confiance ne contient pas la valeur de 0,5 (qui signifie que le modèle est aléatoire) ce qui renforce la validité du test.

La Figure 90 présente Courbe ROC des valeurs t,t-MA $\mu\text{g/g}$ créa par HPLC-DAD

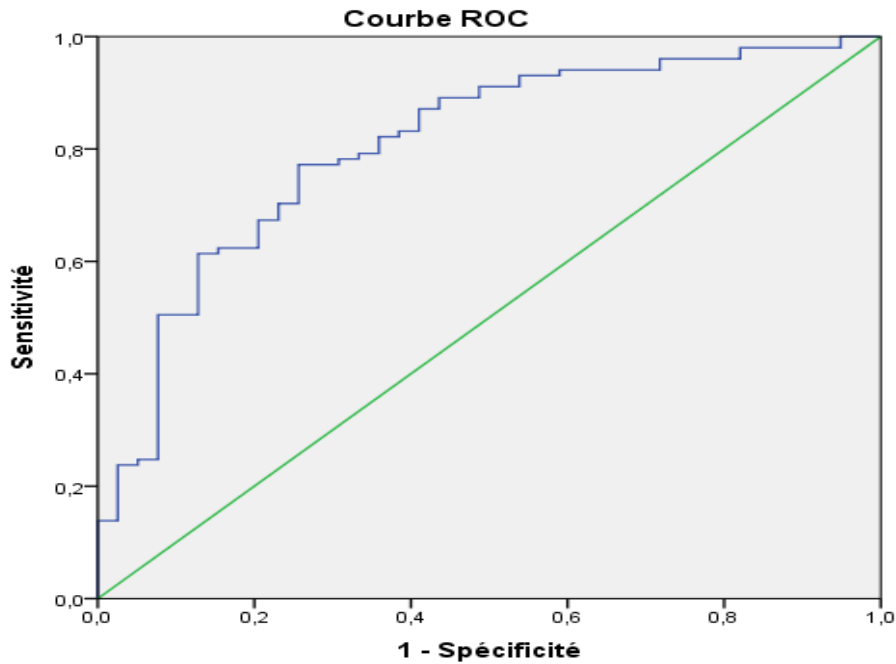


Figure 90: Courbe ROC des valeurs t,t-MA $\mu\text{g/g}$ créa par UPLC-MS/MS

Le Tableau 98 présente les données relatives à l'AUC de la courbe de ROC pour l'analyse du t,t-MA par UPLC-MS/MS.

Tableau 98: Références de l'AUC de la courbe de ROC pour t,t-MA par UPLC-MS/MS

Variable(s) de résultats tests: AP_t,t-MA_μg/créa				
Zone	Erreur Std. ^a	Signif. asymptotique ^b	Intervalle de confiance 95% asymptotique	
			Borne inférieure	Borne supérieure
0,806	0,041	0,0001	0,725	0,887
a. Dans l'hypothèse non-paramétrique				
b. Hypothèse nulle /: zone vraie = 0.5				

Les données du tableau indiquent une très bonne performance diagnostique car l'AUC est proche de 1 (0,806).

L'erreur standard est faible (0,041) montrant que l'estimation est précise et fiable.

La significativité asymptotique de l'ordre de 0,0001, signifie que l'AUC est statistiquement différente de 0,5 et l'intervalle de confiance ne contient pas la valeur de 0,5 (qui signifie que le modèle est aléatoire) ce qui renforce la validité du test.

La méthode par HPLC-DAD présente une AUC légèrement plus élevée (0,843).

II.10. Prédiction de l'exposition atmosphérique à partir des valeurs du S-PMA urinaire

Nous avons procédé l'analyse par groupes de population selon l'organisation suivante :

- **Sujets non exposés et non-fumeurs** : exposition via de la pollution environnementale (tabagisme passif y compris)
- **Sujets non exposés et fumeurs** : Exposition combinée par de la pollution atmosphérique + tabagisme actif
- **Exposés non-fumeurs** : exposition professionnelle et pollution ambiante
- **Exposés fumeurs** : exposition professionnelle et tabagisme
- **GHE « Pompe S »** : exposition type d'une pompe à essence en zone à trafic dense (N=21).

Formule utilisée [41]:

$[\text{Benzène atmosphérique}] (\text{mg/m}^3, \text{VLEP 8-h}) = 0,0758 \times [\text{S-PMA}] \text{ ur} (\mu\text{g/g créatinine}) - 0,317 (r = 0,968).$

- Elle n'est pas validée pour une concentration dans l'air inférieure à **0,3 mg/m³** (0,1 ppm, VLEP sur 8 h), on calcule des valeurs pour **5,5 et 6,8 µg/g créa de S-PMA**.
- Valeur recommandée par l'ACGIH : **0,064 mg/m³ (0,02 ppm) (recommandation pour S-PMA non établie)**
- L'IBE actuel de l'ACGIH pour le S-PMA est de 25 µg/ g créa qui correspond à une exposition de **0,5 ppm ≈ 1,59 mg/m³**

Le tableau 99 présente les différentes applications de la formule selon le sous-groupe étudié.

Tableau 99: Estimation du benzène atmosphérique pour différents groupes étudiés

Groupe	S-PMA ($\mu\text{g/g}$ créa)		Benzène atmosphérique estimé mg/m^3		
	Moyenne \pm ET	Min-max	Moyenne	Min	Max
Sujets non exposés et non-fumeurs N=26	0,65 \pm 0,33	0,1 – 1,29	-0,27	-0,31	-0,22
Sujets non exposés et fumeurs N=14	1,58 \pm 0,95	0,68-3,57	-0,20	-0,27	-0,05
Sujets exposés 101	3,88 \pm 4,76	0,25 – 29,88	-0,022	-0,29	1,95 (0,61ppm)
Exposés non-fumeurs N=63	2,47 \pm 2,96	0,25-18,82	-0,13	-0,30	1,11 (0,35 ppm)
Exposés fumeurs N=38	6,23 \pm 6,14	0,63-29,88	0,16 (0,05 ppm)	-0,27	1,95 (0,61ppm)
GHE « Pompe S » N=21	5,81 \pm 4,22	0,59-13,78	0,12 (0,04 ppm)	-0,27	0,73 (0,23 ppm)
Non-fumeurs de la pompe S (N=10)	3,97 \pm 2,77	0,59 – 8,32	-0,02	-0,29	0,31 (0,1ppm)
Fumeurs de la pompe S (N=11)	7,47 \pm 4,7	1,85- 13,78	0,25 (0,08 ppm)	-0,18	0,73 (0,23 ppm)
Pompes à essence dans Une zone à trafic faible (N=28)	3,27 \pm 3,41	0,38-16,42	-0,07	-0,29	0,93 (0,29 ppm)
Pompes à essence dans Une zone à trafic dense (N=31)	6,64 \pm 6,35	0,35-29,88	0,19 (0,06 ppm)	-0,29	1,95 (0,61 ppm)
Mécaniciens (N=42)	2,26 \pm 3,09	0,25-18,82	-0,15	-0,30	1,11 (0,35 ppm)

*Les valeurs négatives ne sont pas interprétables

- Toutes les valeurs calculées variaient entre **[0,12 – 1,95] mg/m^3** soit **[0,04-0,61] ppm**.

- Les **valeurs maximales** de benzène atmosphérique qui ont pu être calculées pour tous groupes confondus variaient entre **[0,31 -1,95] mg/m^3** soit **[0,1 – 0,61] ppm (100-610) ppb**.

- les valeurs moyennes variaient entre **[0,12 – 0,25] mg/m^3** soit **[0,04 – 0,08] ppm (40-80 ppb)**

III. Discussion

III.1. Rappel du contexte de l'étude et la problématique

Le cancer colorectal, de la prostate et du poumon sont la première cause de décès par cette maladie chez les hommes en Algérie [147]. Même si les causes sont multiples, l'exposition professionnelle aux éléments carcinogènes est fortement incriminée vu l'exposition récurrente et prolongée à ces substances encore plus si les moyens de protection collectifs et individuels ne sont pas respectés.

En plus d'être un polluant atmosphérique, l'exposition professionnelle au benzène reste préoccupante dans les secteurs du transport et du ravitaillement en carburant [1]. D'ailleurs les particules diesel sont classées cancérigènes du groupe 1 pour l'homme, et l'essence a été classée dans le groupe 2A « potentiellement cancérigène pour l'homme » [31].

Selon les responsables des raffineries, la teneur en composés aromatiques de l'essence varie entre 35 % et 40 %, avec une proportion de benzène représentant 2,5 % à 3 % du total des aromatiques [26].

Il a été classé comme cancérigène pour l'homme (groupe 1) par le CIRC en 1987 et est classé cancérigène de catégorie 1 par la Communauté Européenne depuis 2004 [12,25].

L'exposition au benzène est régulièrement évaluée par surveillance biologique et atmosphérique depuis les années 1960. Au fil du temps, un grand nombre d'approches ont été développées et appliquées dans le cadre de la prévention primaire [41].

Une base de données de métrologies a permis de définir quatre niveaux d'exposition au benzène intégrant les spécificités de l'exposition par emploi et par quantité de benzène pur dans le produit exposant : (1) : entre 0,1 et 1 ppm faible, (2) : entre 1 et 5 ppm moyenne, (3) : entre 5 et 15 ppm forte, (4) : >15 ppm très forte [22].

Les pompistes et garagistes (mécaniciens) sont classés dans le niveau d'exposition (1) c'est à dire faible.

Pour l'évaluation du niveau d'exposition au benzène, trois catégories ont été distinguées :

1. Les professions exposées au produit pur (production, utilisation en synthèse, transport, etc.) ;
2. Les professions exposées du fait de l'utilisation d'essence (teneur en benzène plus élevée que dans les autres compositions) ;

3. Les professions exposées du fait de l'utilisation de diluants, peintures, autres, contenant du benzène.

Notre étude s'est focalisée sur la deuxième distinction, à savoir, l'évaluation de la faible exposition professionnelle au benzène chez des travailleurs utilisant l'essence carburant à travers une démarche de biosurveillance toxicologique, basée sur la détermination des biomarqueurs d'exposition du benzène ainsi que les biomarqueurs d'effet génotoxique, hématotoxique et épigénétique.

Nous avons mené une étude descriptive à la fois transversale et longitudinale (chez les exposés), réalisée en deux temps sur des échantillons urinaires avant et après le travail, avec une approche analytique. L'étude compare deux groupes : 101 sujets exposés au benzène via le carburant (42 mécaniciens et 59 pompistes) après exclusion de 8 sujets dont la créatinine urinaire était en dehors de l'intervalle recommandé par l'ACGIH (0,3-3 g/L) ou qui n'ont pas fourni de prélèvement après poste et 40 sujets non exposés. Cette étude monocentrique a été conduite dans la wilaya de Annaba.

L'étude a été menée exclusivement sur des sujets de sexe masculin, âgés de 18 à 70 ans pour le groupe exposé (moyenne d'âge : $44,57 \pm 8,11$ ans) et de 23 à 67 ans pour le groupe non exposé (moyenne d'âge : $44,03 \pm 8,13$ ans).

III.2. Discussion du choix des biomarqueurs

Nous avons tenté de choisir différents types de biomarqueurs conformément aux recommandations de la littérature afin de mieux cerner l'état d'exposition de notre population d'étude.

III.2.1. Choix des biomarqueurs d'exposition

Les résultats de la revue systématique de Rahimpoor et al. (2023), ont montré qu'aucun des biomarqueurs introduits à ce jour n'est en mesure de fonctionner de manière optimale pour le suivi biologique de tous les travailleurs employés dans différentes industries. Il n'y a pas de consensus universel sur un ou plusieurs biomarqueurs de référence à évaluer [56].

Dans l'ensemble, il est recommandé d'appliquer plus d'un biomarqueur pour une plus grande précision. En l'absence de consensus, le choix du biomarqueur (génétique, immunologique ou métabolite) dépend des outils disponibles dans chaque laboratoire et/ou abordables pour le pays.

Avant de choisir l'indice biologique optimal, il convient d'évaluer la concentration et la voie d'exposition, ainsi que les habitudes personnelles des travailleurs [5].

Le meilleur biomarqueur est celui qui a la sensibilité et la spécificité les plus élevées en ce qui concerne l'exposition. La plupart des études indiquent que le meilleur biomarqueur d'exposition au benzène peut dépendre du niveau d'exposition atmosphérique comme suit :

benzène urinaire pour les très faibles concentrations (**de 0,032 à 0,32 mg/m³ soit de 0,01 à 0,1 ppm**), le **S-PMA** aux concentrations (**0,32 à 1,6 mg/m³ soit 0,1 à 0,5 ppm**) et le **t,t-MA** à une concentration élevée (**1,6 à 3,2 mg/m³ soit de 0,5 à 1 ppm**) [5].

Il semblerait, d'après les données disponibles, que seuls le S-PMA urinaire, le benzène urinaire et le benzène dans le sang puissent être des biomarqueurs utiles pour évaluer l'exposition à ces niveaux. Étant donné que l'urine est l'échantillon privilégié pour la biosurveillance humaine en milieu de travail, la détermination du S-PMA est la meilleure option, car le benzène urinaire semble intrinsèquement moins fiable, ce qui peut être dû à sa volatilité [101].

L'absence de cohérence entre les résultats de la plupart des études professionnelles rend difficile la sélection des métabolites d'exposition appropriés [5].

Par exemple, certaines études ont suggéré que le t,t-MA est le meilleur biomarqueur pour des expositions en dessous de la VLEP [29,148] tandis que plusieurs études recommandent le S-PMA [12] ou le benzène urinaire [70,115,149].

Bien que la toxicité du benzène ait été liée à son métabolisme, la production de métabolites liée à la dose n'est pas bien comprise chez l'homme, en particulier à de faibles niveaux d'exposition. L'étude de kim et al. (2006) conduite chez 250 travailleurs chinois a conclu que les faibles expositions au benzène (<0,1 ppm) entraînent une augmentation préférentielle des métabolites toxiques (hydroquinone et muconaldéhyde et par conséquent t,t-MA) et lorsque l'exposition au benzène augmente, la production totale des métabolites urinaires diminue fortement (entre 2.5 et 26 fois)[93].

Etant donné que nous ignorons le niveau de l'exposition atmosphérique et afin de le déduire, nous avons choisi de doser les deux biomarqueurs candidats (t,t-MA et S-PMA).

III.2.2. Choix des biomarqueurs d'effet génotoxique par stress oxydatif

Plusieurs études démontrent que l'exposition faible au benzène (0,6 mg/m³) peut provoquer des dommages à l'ADN [120].

Les bases guanines sont les sites privilégiés d'oxydation de l'ADN. Ce sont les cibles préférentielles des réactions de transfert d'électron [47]. La 8-Oxo-7,8-dihydroguanine (8-

oxoGua) est le produit d'oxydation le plus abondant, en raison du faible potentiel d'oxydation de la guanine en position C-8 [48].

La 8-hydroxy-2'désoxyguanosine (8-OHdGuo) ou la 8-oxo-7,8-dihydro-2'désoxyguanosine (8-oxodGuo) sont les lésions nucléotidiques uniques les plus fréquemment observées et étudiées qui pourraient induire des mutations dans la réplication de l'ADN [50,55]. Une fois libérées par les mécanismes de réparation par excision, n'étant pas reconnues par le système répliatif, vont passer dans la circulation sanguine, et une partie est éliminée dans les urines où c'est possible de les mesurer [48].

Ces composés sont considérés comme biomarqueurs d'effet génotoxique indirect et des biomarqueurs de susceptibilité (car ils reflètent l'activité de différents systèmes de réparation).

En plus du caractère non invasif des urines et étant très stables dans l'urine et ne subissent pas une métabolisation supplémentaire, ils reflètent bien les dommages et réparations liés à l'ADN de toutes les cellules de l'organisme [50,124].

Pour l'analyse comparative, il faut déterminer le rapport entre les bases oxydées et les bases libres exemple 8-OxodGuo/dGuo [55].

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi d'étudier six états de la guanine, libre et oxydée (Gua et 8OxoGua), le nucléoside de l'ADN (désoxyguanosine) libre et oxydé (dGuo et 8OxodGuo), et le nucléoside de l'ARN (guanosine) libre et oxydé (Guo et 8OxoGuo).

III.2.3. Choix des biomarqueurs d'effet épigénétique

La susceptibilité génétique ou les expositions environnementales à elles seules ne suffisent généralement pas à expliquer la pathogenèse de certaines maladies non transmissibles (MNT). L'épigénétique joue un rôle clé dans le processus de leur développement, car ses modifications sont étroitement liées à des expositions spécifiques. À ce jour, les biomarqueurs les plus prometteurs ont été étudiés dans des cohortes professionnelles ainsi que dans des études cas/témoins, incluant : la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, l'expression des microARN et les vésicules extracellulaires, la longueur des télomères et les altérations mitochondriales [58].

Dans la littérature, les altérations de la méthylation des acides nucléiques cellulaires induites par les xénobiotiques sont les mieux caractérisés [58] et sont largement étudiées dans les échantillons de sang périphérique, alors que peu d'expériences ont été rapportées de

déterminations urinaires de nucléotides/nucléosides méthylés après des processus d'excision cellulaire d'ADN ou d'ARN [9].

Les pompistes sont exposés professionnellement aux composés benzène, toluène, éthylbenzène et xylène (BTEX), ce qui les rend plus vulnérables aux effets biologiques de ce mélange présent dans l'essence. Les effets nocifs de l'exposition aux BTEX peuvent être potentialisés par l'inactivation génétique et épigénétique de gènes essentiels [59].

Ces marqueurs pourraient devenir des indicateurs essentiels d'effet précoce, car ils pourraient aider le médecin du travail à identifier les travailleurs présentant un risque accru de développer certaines maladies dans un environnement professionnel donné [58].

Nous avons choisi de faire une détermination large des biomarqueurs de l'effet épigénétique par méthylation à travers le dosage de 11 biomarqueurs urinaires concernant la cytosine libre (Cyto) et méthylée en C5 (5MeCyto) étant donné qu'elle est la base la plus concernée par la méthylation, et des nucléosides de l'ARN et de l'ADN libres (cytidine (Cyt) et désoxycytidine (dCyt) et méthylés en C5 à savoir la 5méthyl-désoxyCytidine (5MeCyt) et la 5Méthyl-désoxyCytidine (5MedCyt).

Nous avons également pu déterminer deux biomarqueurs intermédiaires du processus de déméthylation qui sont le 5-Hydroxy-MéthylCytosine (5OHMeCyt) et le 5-Hydroxy-Méthyl-désoxy-Cytidine (5OHMedCyt).

La guanine est également sujette à la méthylation, nous avons choisi de déterminer les biomarqueurs suivants : la guanine méthylée en C1 et C7, la 1-Méthyl-Guanine (1MeGua) et 7-méthyl-Guanine (7MeGua) et la guanosine méthylée en C7 (7MeGuo).

III.2.4. Choix des biomarqueurs d'effet hématologique

Il est très connu que le benzène perturbe la FNS de par sa toxicité hématologique, nous avons choisi d'étudier huit paramètres de la formule numération sanguine, car en plus des principales lignées qui peuvent être perturbées (Globules rouges, globules blancs et plaquettes), des études ont rapporté que les paramètres les plus sensibles au benzène semblaient être les neutrophiles et le volume plaquettaire moyen (MPV) [106,112] et les lymphocytes [109].

Nous avons donc choisi d'analyser : les taux des Globules rouges, hémoglobine, hématocrite, taux des globules blancs, lymphocytes, neutrophiles, monocytes et plaquettes.

III.3. Discussion de la performance de l'analyse par UPLC-MS/MS

Les analyses des métabolites et des bases nucléiques urinaires ont été réalisées au niveau du laboratoire de toxicologie industrielle de l'Université de Parme en Italie. Un laboratoire équipé de technologies analytiques de pointe et fournit un appui essentiel aux recherches toxicologiques. Il est organisé en plusieurs secteurs spécialisés (chromatographies gazeuses et liquides à détection de spectrométrie de masse, biologie moléculaire et culture cellulaire.

Ses principales lignées de recherche sont la détection des biomarqueurs d'exposition et d'effet précoce liés aux expositions environnementales et professionnelles.

L'analyse s'est faite à l'aide d'un appareil de chromatographie liquide à Ultra Haute Performance à détecteur de masse en tandem (UPLC-MS/MS) de la marque Sciex, qui offre plusieurs avantages, outre une meilleure séparation et un volume d'injection et temps d'analyse réduits, une plage de masse de 5 à 2 000 daltons, ce qui le rend adapté à une large gamme de molécules.

La Technologie SelexION+ permet une séparation différentielle des ions pour une meilleure sélectivité et le détecteur IonDrive à haute énergie (High Energy Detector+) capture plus d'ions avec une meilleure linéarité et une plage dynamique élargie. Une commutation de polarité rapide en seulement 5 millisecondes, ce qui améliore le débit d'analyse.

Nous avons eu recours à deux méthodes distinctes :

La première pour le dosage des métabolites urinaires des xénobiotiques, à savoir le benzène et le toluène représentés par le t,t-MA, S-PMA et S-BMA respectivement. Avec une ionisation en mode Electrospray négative, analyse en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), un temps d'analyse de 14 min, la méthode a été conçue pour détecter une vingtaine de métabolites de différents autres polluants ainsi que leur étalons internes.

Les limites de détection et de quantification sont de **(0,8 et 2,66 µg/L)** pour le **t,t-MA**, **(0,05 et 0,18 µg/L)** pour le **S-PMA** et **(0,03 et 0,08 µg/L)** pour le **S-BMA**. Ces limites permettent de détecter les niveaux les plus bas chez la population générale. Grâce à l'UPLC le volume d'injection est très faible (1 µL) ainsi que le débit (0,3 mL/min).

Nos limites sont similaires à celles de l'étude de Mansi et al. (2012) pour le S-PMA (LD : 0,05 µg/L et LQ 0,1 µg/L) mais légèrement supérieures pour le t,t-MA par rapport à cette même étude (LD : 0,5 µg/L et LQ : 1,5 µg/L). Sedha et al. (2017) [104] ont utilisé la UPLC-MS/MS pour l'analyse simultanée de ces deux métabolites, leurs limites sont légèrement supérieures à

celles de la technique par UPLC-MS/MS (LD : 1 µg/L et LQ : 5 µg/L) pour le t,t-MA et (LD : 0,03 µg/L et LQ : 0,1 µg/L) pour le S-PMA, témoignant de l'apport des technologies du détecteur IonDrive à haute énergie.

Pour le t,t-MA des études ont pu descendre plus bas pour la LD du t,t-MA jusqu'à 0,5 µg/L pour Mansi et al. et 0,55 µg/L pour Tranfo et al. [17,103].

Le prétraitement constitue le point fort de la technique, car on a uniquement eu recours à 50 µL d'urine diluée au 1/4^{ème} dans une mixture aqueuse d'étalons internes et une centrifugation et microfiltration, contrairement à certaines études comme Tranfo et al. (2017), Lovreglio et al. (2010), Barbieri et al. (2008) et Maestri et al. (2005) [17,102,138,149] utilisant la LC-MS/MS, qui ont eu recours à l'extraction par SPE type SAX pour le S-PMA sur urines acidifiées, ou l'extraction liquide-liquide à partition à basse température après acidification et avec de l'acétonitrile comme Costa Amaral et al. (2019) [122], une opération qui dure 24h. Mansi et al. (2012) ont utilisé une hydrolyse acide (H₂SO₄ pendant 10 min) du précurseur du S-PMA ensuite une purification par SPE [103]. En plus nous n'avons pas eu à acidifier les urines pour conservation comme recommandé par Lovreglio et al. (2018) [1].

La deuxième méthode concerne la détection simultanée des bases nucléiques (oxydées et méthylées) et la cotinine pour lesquelles l'ionisation est en mode electrospray positive, et le mode de scan utilisé est le SRM (Selected Reaction Monitoring) afin de garantir une meilleure précision et éviter les interférences. Le temps d'analyse est de 20 min, avec un volume d'injection et débit très faibles (2 µL et 0,3 mL/min). Le temps d'analyse chromatographique est considérablement réduit grâce à l'usage de la colonne Atlantis dC18 qui a une forte rétention des composés polaires et peut opérer avec des phases mobiles 100% aqueuses. L'ajout de méthanol en post colonne était utile pour augmenter l'efficacité de l'ionisation des composés élués rapidement (Gua et 8-OxoGua) qui sont élués avec une phase mobile complètement aqueuse [125].

Le prétraitement consiste en une dilution au 1/2^{ème} après décongélation des urines et centrifugation, il est recommandé de laisser les échantillons à 37 C° pendant 10 mon afin de libérer le 8OxoGuo et le 8OxodGuo du précipité.

Selon la littérature, la détection des biomarqueurs oxydatifs des bases nucléiques urinaires par chromatographie liquide (UPLC-MS/MS) est considérée comme la méthode la plus précise et fiable [54], contrairement aux immuno-essais qui présentent un manque de précision, notamment en raison de leur variabilité et de possibles interférences analytiques [48,55].

Dans une revue systématique, Graille et al. 2020 recommandent l'utilisation de techniques chromatographiques pour le dosage des biomarqueurs du stress oxydatif de la guanine, permettant ainsi une meilleure interprétabilité des résultats [124].

III.4. Discussion des résultats des biomarqueurs d'exposition

III.4.1. Biomarqueurs d'exposition entre exposés et non exposés

Les S-PMA et t,t-MA ont été retrouvés dans tous les échantillons d'urine, grâce à la limite de détection basse de la technique et confirmant ainsi que le benzène est un polluant environnemental omniprésent.

Le Tableau 100 représente une comparaison de nos résultats avec quelques études similaires concernant l'exposition des travailleurs des pompes à essence.

Tableau 100 : Taux des biomarqueurs d'expositions rapportées dans des études similaires d'exposition professionnelle aux faibles taux de benzène via le carburant

Références	Population	Benzène atm Chez exposés	t,t-MA et S-PMA urinaires	Technique	ratio EX/NE
Fracasso et al. 2010 Italie [100]	51 pompistes 28 NE	Méd (min-max) µg/m ³ EX : 40.00 (8.00–260.00) NE : 5.40 (1.97–16.3)	Méd (min-max) µg/g créa EX : t,t-MA : 117.00 (30.00–418.00) S-PMA : 5.55 (1.55–15.00) NE t,t-MA : 84.00 (3.00–460.50) S-PMA : 1.90 (0.30–10.08)	HPLC-UV Immuno essai à chimiluminescence (S-PMA)	t,t-MA 1,39 S-PMA 2,92
Lovreglio et al. 2010 Italie [138]	23 pompistes 18 citernistes 31 NE	Méd (min-max) µg/m ³ EX : 20,9 (4,5 – 66,3) NE : 4,3 (<3-11,5)	Méd (min-max) µg/g créa EX : t,t-MA : 89 (11-157) S-PMA : 0,56 (0,05-3,33) NE : t,t-MA : 59 (13-734) S-PMA : 0,22 (0,03-4,48)	LC-MS/MS HPLC-UV	t,t-MA 1,5 S-PMA 2,54
Scheepers et al. 2019 Sri Lanka [150]	29 pompistes 16 NE	Méd (min-max) µg/m ³ 609 (65.1–1960)	Moy S-PMA EX : 3.02 µg/g créa Moy S-PMA NE: 1.07 µg/g créa	LC-MS	S-PMA 2,82
Chaiklieng et al. 2019 Thailand [91]	158 pompistes	Méd (min-max) ppb 5.4 (0.10-136.90)	t,t-MA µg/g créa (méd (min-max)) 188.69 (5.32–5,986.44)	HPLC-UV	/
Geraldino et al. 2020 Brésil [141]	179 pompistes 100 NE	/	t,t-MA (moy±ET) µg/g créa EX : 204 ± 277 NE : 126 ± 221	HPLC-UV	t,t-MA 1,62
Da Poça et al. 2021 Brésil [74]	Pompistes 108 NE 25	/	t,t-MA méd (min-max) (µg/g créa) EX : 100 (<LD- 3030) NE : 50 (<LD - 470)	HPLC-UV	t,t-MA 2
Giardini et al. 2023 Brésil [109]	Pompistes 258 NE 100	/	t,t-MA (moy±ET) mg/g créa EX : 280 ± 620 NE : 130 ± 220	HPLC-UV	t,t-MA 2,15
Gaudin et al. 2002 France [151]	Mécaniciens N=508 NE N=220	Méd (min-max) ppm EX : 0,05 (<0,002-1,4) NE : <0,002 – 0,031	t,t-MA méd (min-max) (µg/g créa) EX : 80 (30-1800) NE : 30 (3-300)	HPLC-UV	t,t-MA 0,26

Tableau 100 : Taux des biomarqueurs d'expositions rapportées dans des études similaires d'exposition professionnelle aux faibles taux de benzène via le carburant (suite)

Références	Population	Benzène atm Chez exposés	t,t-MA et S-PMA urinaires	Technique	ratio EX/NE
Notre étude	59 pompistes 39 NE	Prédiction à partir des valeurs du S-PMA Pompes à essence en zone urbaine : Moy= 0,06 ppm (190 µg/m³) Max : 0,61 ppm (1950 µg/m³)	t,t-MA méd (min-max) (µg/g créa) EX : 332,45 (39,2-1502,41) NE : 103,86 (14 - 682,18) S-PMA méd (min-max) (µg/g créa) EX : 2,73 (0,35 – 29,88) NE : 0,79 (0,1- 4,99)	UPLC-MS/MS	t,t-MA 3,2 S-PMA 3,45
Notre étude	42 mécaniciens 39 NE	/	t,t-MA méd (min-max) (µg/g créa) EX : 303,72 (42,5-2748,16) NE : 103,86 (14 - 682,18) S-PMA méd (min-max) (µg/g créa) EX : 1,26 (0,25 – 18,82) NE : 0,79 (0,1- 4,99)	UPLC-MS/MS	t,t-MA 2,92 S-PMA 1,59

Sans grande surprise les valeurs moyennes en après poste (AP) chez les sujets exposés sont **2,69 fois** supérieures pour le **t,t-MA** et **3,92** supérieures pour le **S-PMA** à celles des non exposés, la comparaison des médianes par le biais du test de Mann Whitney a conclu à des différences statistiquement hautement significatives pour les deux biomarqueurs (**médiane t,t-MA : NE= 103,86, EX= 319,73, $p<0,0001$**) et (**médiane S-PMA EX= 2,14, NE=0,79, $p<0,0001$**) (voir Tableau 71).

La comparaison a concerné les valeurs en après poste (AP) uniquement car les valeurs en avant-poste (AV) n'ont pas été mesurées chez les sujets non exposés. Mais même les valeurs en AV des exposés sont supérieures aux valeurs AP des NE (**1,80** fois pour le **t,t-MA** et **2,23** fois pour le **S-PMA**) (**$p<0,0001$**).

La différence entre les exposés et les non exposés a souvent été rapportée dans les études transversales de biomonitoring du benzène mais à des degrés différents, nous avons calculé les rapports des médianes ou moyennes des biomarqueurs d'exposition entre les EX/NE pour les études similaires à la nôtre (voir Tableau 100) réalisées durant les dernières vingtaines d'années dans différents pays, nos résultats représentent les rapports les plus élevés pour les deux

biomarqueurs témoignant d'une forte exposition de la population algérienne et bônoise spécialement cela dépend également de la quantité du benzène autorisée dans le carburant, plusieurs pays sont passés à 1% depuis 2000, l'Algérie à la limite de nos connaissances autorise encore 3% de benzène dans son essence.

La stratification par tranches d'âge a montré pareillement des différences significatives entre les deux groupes pour les trois catégories d'âge choisies concernant le **t,t-MA** (**p=0,011**, **p<0,0001**), et pour les deux premières tranches uniquement pour le S-PMA (**p=0,006**, **<0,0001** et **0,107**).

Cette classification de la population d'étude en tranches d'âge ≤ 40 ans (EX : N=34 (33,7%), NE N=11 (27,5%), **41-50 ans** (EX N=38 (37,6%), NE N= 20 (50%)), et **> 50 ans** (EX N=29 (28,7%, NE N=9 (22,5%)) répond à un double objectif : d'une part, assurer un effectif représentatif et interprétable statistiquement, permettant des comparaisons robustes entre les groupes ; d'autre part, considérer les aspects biologiques et physiopathologiques, notamment les variations métaboliques et les changements physiologiques associés à l'âge, qui peuvent influencer les biomarqueurs étudiés.

III.4.1.1. Le point sur le S-PMA

D'après les méthodes de biosurveillance humaine disponibles, le S-PMA urinaire semble être le biomarqueur le plus prometteur pour l'évaluation des expositions de faible niveau (c.-à-d. $<0,25$ ppm).

À l'heure actuelle, il n'existe pas de validation adéquate du S-PMA urinaire pour la biosurveillance des expositions au benzène inférieures à 0,25 ppm (VLEP sur 8 h) [12].

Des études comparatives ont montré que le S-PMA est un biomarqueur approprié pour les expositions au benzène jusqu'à 0,3 ppm (0,96 mg/m³) ou même 0,1 ppm (0,32 mg/m³) et qu'il le mieux corrélé à l'exposition atmosphérique. Certains auteurs ont observé qu'à des niveaux d'exposition au benzène relativement faibles, la complexité de la matrice urinaire supprimait l'ionisation [41]. Quand plusieurs études le recommandent avec le benzène urinaire, des études italiennes réalisées dans des industries de pétrochimie n'ont pas conclu à des différences significatives entre exposés et non exposés pour cause des niveaux de benzène atmosphérique deux fois plus faible que la VLEP établie par l'ACGIH (1,6 mg/m³) [103,133].

Concernant notre étude, le S-PMA a pu distinguer tous les sous-groupes comparés (EX/NE, fumeurs/non-fumeurs, les fumeurs exposés et non exposés, et les non-fumeurs exposés et non exposés) avec des différences statistiquement hautement significatives (**p<0,0001**).

Avec une médiane chez les exposés de **2,14 [0,25-29,88] µg/g créa** contre **0,79 (0,1-4,99) µg/g créa** chez les non exposés. Ces résultats se situent dans une plage intermédiaire, certains travaux, notamment les études italiennes, rapportant des valeurs plus élevées, tandis que d'autres présentent des niveaux plus faibles. Cette différence peut s'expliquer par le profil de la population étudiée, comme les travailleurs du secteur pétrochimique, ainsi que par l'application rigoureuse des réglementations visant à limiter les rejets industriels et automobiles polluants.

Les moyennes sont de **3,88±4,76 µg/g créa** chez les exposés, et **1,9±0,98 µg/g créa** chez les non exposés, ces résultats sont très similaires à ceux de l'étude de de Scheepers et al. 2019 (Sri Lanka) qui a rapporté des moyennes EX/ NE de **3,02/1,07 µg/ g créa** [150].

Jusqu'à présent, aucune source alimentaire ou autre qui conduirait à la formation de S-PMA urinaire n'a été signalée. Lorsque l'exposition au benzène est < 0,5 ppm, le tabagisme est le facteur de confusion principal pour le benzène et le S-PMA urinaires [41,73], il a été retrouvé qu'il est corrélé au nombre de cigarettes fumées [138].

Cela est effectivement confirmé par nos résultats, les sujets exposés et fumeurs présentent une moyenne de **6,23± 6,14 µg/g créa** et une médiane de **3,61 [0,63-29,88] µg/g créa**, soit une valeur environ 4 fois supérieure à celles des non exposés fumeurs ($p < 0,0001$) qui ont une moyenne de **1,58±0,95 µg/ g créa** et une médiane de **1,29 [0,68-3,57] µg/g créa**. Il est aussi modérément corrélé à la cotinine chez toute la population de l'étude ($r=0,414$, $p < 0,0001$) suggérant que la cotinine constitue un indicateur robuste de l'exposition au benzène dans l'ensemble de la population étudiée.

Il est cependant beaucoup moins corrélé à la cotinine quand l'analyse est faite chez les exposés uniquement ($r=0,241$, $p=0,015$).

Aucune corrélation entre la cotinine et le S-PMA n'a été détectée chez les fumeurs exposés ou non exposés à part. Il est en revanche fortement corrélé à la **créatinine** chez les fumeurs ($r=0,616$, $p=0,019$).

Il est également très rapporté dans la littérature les variations des niveaux du S-PMA urinaires en fonction des profils de polymorphisme génétique de la glutathion S-transférase (GSTT1), le génotype nul peut avoir pour conséquence la réduction jusqu'à 50% de la conjugaison de l'époxyde de benzène avec le glutathion pour former le S-PMA, cet effet est à prendre en considération afin de ne pas sous-estimer l'exposition des sujets avec génotype « GSTT1 nul » et vice versa [18,133–135].

Les mesures en avant et après poste contribuent à la maîtrise des facteurs confondants. Chez les exposés, les résultats montrent une nette augmentation des valeurs en AP jusqu'à 1,67 fois pour les médianes (AV : **1,28 [0,33-28,53]** µg/g créa, AP : **2,14 [0,25-29,88]** µg/g créa).

Nos résultats sont similaires à ceux de l'étude de Scheepers et al. 2019, qui ont mis en évidence, chez 29 pompistes au Sri Lanka, une médiane en AV : 2,40 [0,08–7,77] µg / g créa et en AP 3,02 [0,12–15,5] µg / g créa [150].

La stratification entre fumeurs et non-fumeurs, a montré un même rapport AP/AV égal à 1,5, mais avec un niveau de valeurs différent, en effet, chez les fumeurs les médianes en AV et AP sont égales à (AV : **2,42 [0,54-28,53]** µg/g créa, AP : **3,61 [0,63-29,88]**), chez les non-fumeurs (AV : **0,99 [0,33-6,13]**, AP : **1,44 [0,25-18,82]** µg/g créa).

Notons que la valeur maximale en AV dépasse l'IBE fixé par l'ACGIH pour une exposition à 0,5 ppm (25 µg/g créa), cela peut laisser penser à un effet cumulatif du benzène dans l'organisme maintenu par le tabagisme régulier et que le temps de repos de 48H (pour la majorité des participants) n'est pas suffisant pour éliminer toute la quantité absorbée.

III.4.1.2. Le point sur le t,t-MA

Plusieurs études ont mentionné dans leurs conclusions que le t,t-MA n'est utilisé comme biomarqueur qu'à un niveau d'exposition supérieur à 1 ppm de benzène (3,2 mg/m³) [5,41,152,153] car il ne montre pas des corrélations significatives avec le benzène atmosphérique [18]. L'un des objectifs de notre étude est de clarifier notre position vis-à-vis de cette affirmation et d'apporter une analyse approfondie à ce sujet.

Nos valeurs médianes du t,t-MA sont de **418,95±405,59 µg/g créa** chez les exposés et de **155,73±142,89 µg/g créa** chez les non exposés. Les médianes sont de **319 (39,2-2748) µg/g créa** chez les exposés contre **103,86 (14-682,18) µg/g créa**.

Nos valeurs sont les plus élevées parmi toutes les études citées concernant les sujets exposés [100,109,138,141], tandis que les valeurs observées chez les non exposés restent comparables. Cette tendance suggère que l'exposition est le facteur déterminant, plutôt que des variables confondantes, et confirme que, pour notre population, le t,t-MA constitue un biomarqueur fiable permettant de différencier efficacement les sujets exposés des non exposés. Toutes les études, comme nous, ont rendu des résultats doublement supérieurs chez les exposés que les non exposés [74,109,141].

Chaiklieng et al. 2019 ont rapporté que le t,t-MA était significativement corrélé aux concentrations de benzène atmosphérique de 10 ppb ($p=0,043$) [99] et Lovreglio et al. 2010 a conclu que le t,t-MA semble présenter une certaine validité même à des niveaux plus faibles car il a permis de différencier le groupe de conducteurs de camions-citernes (exposition médiane au benzène $246,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$) des deux autres groupes (exposition médiane des pompistes $20,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et exposition médiane des témoins $4,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$) [138].

Les études les plus fréquentes sur le t,t-MA proviennent du Brésil et de l'Italie, mettant en évidence deux approches divergentes. Dans les travaux brésiliens et une étude tunisienne, ce biomarqueur est largement utilisé, notamment en raison de la simplicité, de la faisabilité et de la reproductibilité de la méthode analytique par HPLC-UV, un équipement couramment disponible dans les laboratoires de toxicologie. Sa bonne corrélation avec les concentrations atmosphériques de benzène renforce son intérêt [74,109,141,154].

À l'inverse, les études italiennes préconisent son utilisation uniquement pour des niveaux d'exposition supérieurs à 0,1 ppm, estimant que les expositions enregistrées, même en milieu professionnel, restent en deçà de ce seuil [9,103,133,138].

Nous avons noté uniquement deux cas (5,12%) de dépassement de l'IBE chez les non exposés chez deux sujets non-fumeurs ($508,29$ et $682 \mu\text{g}/\text{g}$ créa).

Le t,t-MA perd sa spécificité car certains ingrédients alimentaires, tels que l'acide sorbique qui est utilisé comme conservateur (sorbate de calcium, sorbate de potassium, sorbate de sodium, E200 et E201) retrouvé dans les fromages, jus industriels, aliments précuits, viandes surgelées, peuvent être métabolisés en t,t-MA [70], en effet, une alimentation typique, comprenant une ingestion quotidienne de 6 à 30 mg d'acide sorbique, peut expliquer 10 à 50 % des niveaux urinaires de fond du t,t-MA chez les non-fumeurs et dans le cas d'individus consommant des quantités exceptionnellement élevées d'acide sorbique, la concentration de t,t-MA urinaire pourrait dépasser l'IBE défini par l'ACGIH [138,152] ce qui le rend moins approprié comme biomarqueur à des niveaux de benzène plus faibles [99,115]. Certains auteurs ont également suggéré que l'apport en fer via la consommation de viande pourrait influencer les niveaux urinaires de t,t-MA en accélérant le métabolisme du benzène [155]. De plus, sa demi-vie relativement courte d'environ 5 h le rend moins adapté pour détecter des expositions intermittentes que les métabolites à vie plus longue comme le S-PMA [12].

Par conséquent, il est recommandé de comparer la concentration de t,t-MA dans les échantillons d'urine avant et après le quart de travail pour contrôler ce facteur de confusion [148,152].

Effectivement, la comparaison des valeurs du t,t-MA en AV et AP a conclu à une différence statistiquement hautement significative ($p < 0,0001$) avec une médiane deux fois supérieure en AP (**319,73 [39,2-2748,16]**) $\mu\text{g/g créa}$ qu'en AV (**161,66 [34,66-1927,84]**) $\mu\text{g/g créa}$, confirmant que le t,t-MA n'est pas dû au sorbitol.

Bien que de bonnes corrélations entre le t,t-MA et le S-PMA soient trouvées pour une large gamme de concentrations de benzène atmosphérique, moins de 0,1 ppm à bien au-dessus de 1 ppm [12]. L'étude de corrélation chez toute la population d'étude indique un coefficient de corrélation de spearman ($r=0,552$, $p < 0,0001$) et chez les exposés ($r=0,560$, $p < 0,0001$).

La situation de l'Algérie, en tant que pays émergent, semble davantage se rapprocher du contexte brésilien, où l'utilisation du t,t-MA comme biomarqueur reste pertinente.

III.4.1.3. Dépassement des IBE

Les indicateurs biologiques d'exposition (IBE) sont des seuils établis pour évaluer l'exposition aux substances chimiques en milieu professionnel. Elles permettent de déterminer si une concentration mesurée d'un biomarqueur dépasse un niveau considéré comme tolérable.

Dans la population générale, le 95^{ème} percentile pour le t,t-MA urinaire chez des non-fumeurs est d'environ 150 $\mu\text{g/g}$ de créatinine [95], mais des valeurs urinaires aussi élevées que 700 $\mu\text{g/g}$ de créatinine ont été signalées après une exposition alimentaire à l'acide sorbique [12]. L'IBE du t,t-MA établie par l'ACGIH qui est de 500 $\mu\text{g/g créa}$ pour une exposition atmosphérique à 0,5 ppm de benzène permet de couvrir une exposition de fond liée aux interférences avec le sorbitol.

Chez les sujets non exposés, 30,77 % présentent des concentrations urinaires de t,t-MA supérieures à 150 $\mu\text{g/g}$ créatinine. Tous les fumeurs non exposés avaient des valeurs inférieures à 500 $\mu\text{g/g créa}$, et comme suscité, deux cas chez les non exposés non-fumeurs.

Chez les exposés les dépassements en AV et AP sont presque identiques, avec **23** cas en AV soit **22,8%** comportant 12 fumeurs et 11 non-fumeurs. En AP, on a noté **24 cas (23,8%)** dont 11 fumeurs et 13 non-fumeurs.

Chaiklieng et al. 2021 (Thailand) [156] ont rapporté 24% (N=46) de dépassements chez des pompistes, mais plusieurs autres études réalisées des d'années avant n'ont pas signalé de dépassements (Goethel 2014, Lovreglio 2010, Panev 2002) [15,138,148].

Pour le S-PMA, l'ACGIH a proposé un IBE de 25 $\mu\text{g/g créa}$ pour une exposition de 0,5 ppm de benzène atmosphérique. L'Agence Européenne des produits chimiques (ECHA) en revanche

propose une VLB de 2 µg/g créa pour les expositions de 0,05 ppm de benzène atmosphérique. Pour les fumeurs de la population générale une valeur de 0,5 µg/g créa est proposée [157].

Plus de 79% (N=31) de nos sujets non exposés ont des valeurs dépassant 0,5 µg/g créa et 4 sujets fumeurs (10,25%) dépassant la limite européenne de 2 µg/g créa confirmant que le tabagisme actif exposerait à plus de 0,05 ppm de benzène et que cette valeur est à discuter en milieu professionnel.

Concernant les sujets exposés, 2 (2%) cas de dépassement de la valeur de 25 µg/g créa en AV chez deux mécaniciens fumeurs, et un seul cas (1%) en AP chez un pompiste fumeur.

Le S-PMA dans les échantillons ponctuels, prélevés à la fin du quart de travail, peut être interprété en termes de conformité aux VLEP de 0,25 ppm et plus. En ce qui concerne la conformité, il convient de garder à l'esprit que les VLEP ont été calculées pour refléter les expositions de 8 heures pendant 5 jours par semaine durant la vie active (40 ans) c'est-à-dire 16 heures de repos entre deux expositions, pour notre population cela correspondrait mieux au rythme de travail du sous-groupe des mécaniciens qui ont un rythme de 5 jr/ semaine.

Par conséquent, le dépassement occasionnel des valeurs VLEP n'implique pas nécessairement un risque accru de cancers hématologiques, car ceux-ci sont associés à des expositions cumulatives sur une plus longue période (CIRC 2018) d'où l'intérêt de tracer un profil d'exposition [41].

Nous avons réalisé des tableaux croisés entre les valeurs du t,t-MA et S-PMA selon l'IBE 500 µg/g créa et la VLB 2 µg/g créa afin de pouvoir comprendre l'origine des dépassements simultanés des deux biomarqueurs.

En AV 8 sujets soit 34,78% ont des valeurs supérieures aux VLB, cela peut être expliqué en partie par le tabagisme. Quant aux 65,22% restant (N=15) ils présentent uniquement des dépassements du t,t-MA et des valeurs S-PMA inférieures à 2 µg/g créa ce qui peut avoir pour origine le sorbitol.

Les métaanalyses des études publiées rapportent que lorsque l'exposition au benzène est < 0,5 ppm, le tabagisme est le facteur de confusion principal pour le benzène et le S-PMA urinaires, ils sont directement corrélés au nombre de cigarettes fumées et au délai écoulé depuis la dernière cigarette [41]. Cela a été confirmé par l'analyse de corrélation, en effet, la cotinine urinaire en AP est bien corrélée avec le S-PMA en AV ($r=0,424$, $p<0,0001$) et l'est moins avec le S-PMA en AP ($r=0,241$, $p=0,015$).

En AP le nombre de dépassements des deux biomarqueurs au même temps est significativement différent de celui en AV ($p < 0,001$) avec 20 cas (19,8%).

On a noté également que **20 sujets (21,8%)** ont des valeurs du S-PMA supérieures à $2 \mu\text{g/g}$ créa mais le t,t-MA est inférieur à $500 \mu\text{g/g}$ créa en AV concluant à une exposition entre 0,05 ppm et 0,5 ppm en AV, la persistance du S-PMA dans les urines expliquée également par son temps de demi-vie plus lent (9 heures) que celui du t,t-MA (5 heures) [158].

En AP ce nombre s'élève à 33 (42,85%) avec une différence non significative avec les valeurs en AV ($p = 0,389$), à titre d'exemple, le sujet 114 a présenté un couple de valeur t,t-MA S-PMA égale à (99,54 et 3,04) $\mu\text{g/g}$ créa.

Ces résultats démontrent qu'il ne faut pas se fier aux résultats d'un seul biomarqueur d'exposition et de considérer les facteurs confondants individuels et de groupe.

Bien que le t,t-MA et le S-PMA soient fortement corrélés entre eux et que cette relation est également confirmée par un modèle de régression linéaire appliqué aux exposés.

L'équation obtenue :

AP t,t-MA = 398,212 + 46,436 × AP S-PMA ($B = 0,504$, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,246$, IC 95 % [30,55 – 62,32])

Cette équation indique que, lorsque AP S-PMA = 0, la concentration prédite de AP t,t-MA est de **398,212 $\mu\text{g/g}$ créa**, ce qui suggère une origine non liée au benzène, probablement le sorbitol et que **24,6%** de l'augmentation du t,t-MA est due à l'augmentation du S-PMA ce qui montre une corrélation partielle mais pas une dépendance totale. Lin et al. 2008 ont abouti à une corrélation puissante ($r = 0,823$) qui ne serait pas due aux interférences [135].

Toutefois, bien que ces biomarqueurs présentent une forte corrélation, ils sont produits par deux voies métaboliques distinctes et sont influencés par des facteurs spécifiques. Pour une évaluation plus affinée de l'exposition au benzène, le **ratio t,t-MA / S-PMA** a été calculé, permettant une meilleure distinction entre les différents niveaux d'exposition.

III.4.1.4. Ratio des concentrations urinaires t,t-MA / S-PMA

Pour chaque sujet, les deux biomarqueurs sont générés par l'exposition à la même quantité de benzène et donc leur rapport devrait être indépendant de la dose, mais seul le S-PMA est formé par la voie métabolique du glutathion (glutathion S-transférase GST) qui est sujette au polymorphisme génétique spécialement la GSTT1.

Ce ratio a été introduit pour la première fois par Lin et al. 2008 [135], qui ont affirmé que le rapport de concentration de t,t-MA à S-PMA révèle le rapport de production physique de ces deux métabolites pour la biotransformation du benzène en t,t-MA et S-PMA, en supposant que les efficacités d'excrétion de ces deux métabolites sont constantes.

Une valeur théorique de 20 a été calculée à partir du rapport des indices biologiques d'exposition (BEI) de l'ACGIH (**500/25**). Cette relation suggère que plus le rapport est faible, plus l'exposition au benzène dépasse 0,5 ppm.

99% des valeurs en AP et 97% en AV sont supérieures à 20 indiquant que notre population d'étude serait exposée à moins que 0,5 ppm de benzène ce qui a été confirmé par l'analyse de prédiction que nous avons réalisé à partir des valeurs du S-PMA à l'aide d'une formule publiée dans la littérature où les valeurs étaient comprises entre 0,04 et 0,61 ppm.

La moyenne du ratio chez les exposés est de **192±171,54** contre **249,5±313,89** chez les non exposés, la comparaison des médianes (133 et 107,93) a conclu à une différence non significative ($p=0,725$), en revanche la comparaison entre les trois groupes (pompistes, mécaniciens et non exposés) est hautement significative ($<0,0001$). De même la différence entre les médianes des rapports en AV et AP chez les exposés est non significative ($p=0,575$).

Une différence significative a été observée lors de la comparaison des sujets exposés fumeurs et non-fumeurs (73,81 et 154) ($p=0,008$), nos résultats sont concordants avec ceux des études de Lin et al. 2008, Mansi et al. 2012 et Carbonari et al. 2014 [103,133,135].

Ces données semblent confirmer l'hypothèse avancée par Rappaport et al. 2010, selon laquelle les humains métabolisent le benzène via deux enzymes, et non une seule [35]. De plus, la voie d'ouverture du cycle, qui conduit à la formation de t,t-MA, serait favorisée par une enzyme supposée à haute affinité, active principalement à des concentrations inférieures à 1 ppm.

De plus ces études ont trouvé que ce ratio est plus élevé dans les génotypes GSTT1 nul par rapport aux génotypes positifs confirmant la faible excrétion du S-PMA chez ces sujets et le compromis de l'utiliser en biomonitoring sans le phénotypage du polymorphisme de la GSTT1, il est indiqué que, à des niveaux d'exposition équivalents, des valeurs plus élevées du ratio sont associées aux génotypes null GSTT1 et GSTM1 [103,133,134]. Par conséquent, le ratio t,t-MA/S-PMA pourrait être considéré comme un marqueur de la susceptibilité individuelle à l'exposition professionnelle au benzène.

III.4.2. Facteurs influençant les taux des biomarqueurs d'exposition

Il a été prouvé que les facteurs de confusion non professionnels ont un impact significatif sur ces biomarqueurs et peuvent réduire leur validité [5].

III.4.2.1. Intensité de l'expositions au benzène atmosphérique

Les VLEP pour le benzène ont été abaissées de plus de 2 ordres de grandeur depuis que la première valeur de 100 ppm ait été proposée en 1946 pour atteindre des valeurs comprises entre 0,05 et 0,25 ppm qui ont été récemment proposées [5].

En novembre 2023, la direction de l'ACGIH a ratifié ses recommandations de valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) appelées TLV (Threshold Limit Value) pour l'année 2024. Le benzène se voit ainsi attribuer une TLV (8 h) de **0,02 ppm**. À l'heure actuelle, le pays possédant une réglementation contraignante qui se rapproche le plus de cette valeur est la Nouvelle-Zélande où la VLE (8 h) du benzène est égale à 0,05 ppm depuis l'année 2020 [159].

L'exposition professionnelle au benzène se produit souvent par inhalation, bien que l'exposition cutanée puisse également se produire. Jakasa et al. 2015 ont estimé que l'absorption cutanée représente environ 5% de l'absorption totale [160].

La concentration moyenne d'exposition professionnelle par inhalation au benzène dans différentes industries est près de trois cents fois plus élevée que la VLEP, comprise entre 0,005 et 357,8 mg/m³ [5].

Selon la littérature, l'échantillonnage actif serait plus adéquat pour la quantification des faibles expositions au benzène, nous n'avons pas pu mesurer le benzène atmosphérique pour notre population étudiée, mais nous avons tenté de le prédire à travers les valeurs du S-PMA urinaire au moyen de la droite de régression utilisée par la DFG allemande donnée par la formule suivante [41]:

$$\text{[Benzène atmosphérique] (mg/m}^3\text{)} = 0,0758 \times \text{[S-PMA] urinaire (}\mu\text{g/g créa)} - 0,317 \text{ (R}^2 = 0,968\text{)}.$$

Mais elle est limitée aux concentrations supérieures à 0,3 mg/m³ (0,1 ppm), une étude approfondie de Maestri et al. 2005 [102], chez 231 travailleurs non-fumeurs exposés au benzène dans l'air d'une moyenne de 11,4 μg/m³ avaient un taux urinaire moyen de S-PMA de 1,2 (plage de 0,2 à 8,8) μg/g de créatinine, tandis que chez 102 témoins non-fumeurs, une moyenne de S-PMA urinaire de 0,7 (plage de 0,1 à 4,0) μg/g de créatinine a été mesurée, après transformation

logarithmique des données, une faible corrélation a été observée entre les concentrations de benzène et les concentrations urinaires de S-PMA.

En effet, nous n'avons pas pu prédire les très faibles expositions en utilisant les moyennes des sujets non exposés (fumeurs et non-fumeurs).

La moyenne prédite chez les sujets exposés fumeurs (N=38) est de **160 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,05 ppm)** avec une concentration maximale atteignant **1950 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,61 ppm)**, détectée au niveau des pompes à essence en zone à trafic dense (N=31) où la moyenne estimée est de **190 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,06 ppm)**. Dans les zones à trafic faible, la concentration **maximale** calculée pour les pompes à essence est de **930 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,29 ppm)**.

Chez les sujets exposés non-fumeurs (N=63), la valeur prédite maximale s'élève à **1110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,35 ppm)**.

Ces résultats indiquent que chez les individus exposés, le tabagisme double l'exposition au benzène et peut même causer un dépassement de l'IBE proposé par l'ACGIH (1,6 mg/m^3). De plus, quel que soit la géolocalisation ou le statut tabagique, les valeurs maximales observées restent inférieures à 1 ppm.

Selon les études publiées (Uzma et al. 2010), la moyenne du benzène atmosphérique mesuré dans l'air ambiant des stations d'essence sur 12 heures est de 0,345 ppm (0,118 – 0,527) et estimé à $12.34 \times 10^{-3} \pm 20.29 \times 10^{-3}$ ppm dans la zone respiratoire des pompistes [121].

Enfin, sur la base de la droite de régression utilisée, il est estimé que les sujets non exposés seraient confrontés à une concentration inférieure à 0,1 ppm de benzène.

En plus de l'exposition professionnelle, le tabagisme passif et actif, s'ajoute la pollution atmosphérique. En effet, selon l'étude de Kharytonov et al. 2016, réalisée à Annaba, une augmentation significative de la concentration de dioxyde d'azote (NO_2) a été observée dans l'atmosphère des régions de Sidi Amar et El Bouni durant la dernière décennie, les activités de l'aciérie située dans le district de El Hadjar entraînent la formation de halos de pollution technogénique aérienne, comprenant du NO_2 , du benzène et du toluène, affectant non seulement le site industriel, mais également les infrastructures résidentielles voisines [161].

En outre, l'âge moyen des véhicules est d'environ 11 ans. Les émissions des gaz d'échappement sont considérées comme la principale source de pollution atmosphérique dans les zones urbaines en Algérie, comme le rapportent plusieurs études [13,26,162,163].

Kerchich et al. 2012 ont réalisé plusieurs mesures des BTEX dans des zones urbaines à Alger, la concentration maximale détectée était l'intérieur des véhicules (voir Tableau 101) [26].

Les études publiées sur les niveaux atmosphériques de benzène en Algérie restent limitées, et encore plus rares en ce qui concerne la biosurveillance en milieu professionnel, mais elles évoquent toutes des valeurs excédant la limite européenne autorisée ($5 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Nous avons synthétisé les données disponibles dans le **Tableau 101**.

Tableau 101 : Niveaux atmosphériques du benzène et toluène rapportés dans les études algériennes

Référence	Type d'exposition	Taux de polluants
Djafer et al. 2007 [14]	Zone industrielle (cokerie) Annaba	Benzène $7,35 \pm 10,06$ ppm
Kerbachi et al. 2006 [13]	Zone urbaine (proche du trafic routier) Alger	Benzène $27 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Toluène $39 \mu\text{g}/\text{m}^3$
Kerchich et al. 2012 [26]	Zone urbaine (proche du trafic routier) Alger	Benzène / toluène $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Zone urbaine : 2,7 / 9,7 Zone semi-rurale : 2,2 / 3,5 Tunnels : 13,9 / 32,9 Véhicules : 58,9 / 107,9
Naili et al. 2021 [164]	Zone industrielle (raffinerie) Arzew	Benzène $5,36 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Toluène $0,61 \mu\text{g}/\text{m}^3$
Boudehane et al. 2019 [27]	Zone urbaine (Hopital, Université) Ouargla	Benzene (12 – 27) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Toluene (22–87) $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Actuellement, l'Algérie ne dispose d'aucune valeur limite d'exposition (VLE) pour le benzène atmosphérique, considéré comme un polluant. En effet, le Décret exécutif n° 2006-02 du 7 janvier 2006, qui définit les valeurs limites, les seuils d'alerte et les objectifs de qualité de l'air, ne prend pas en compte les composés organiques volatiles (COVs) [24].

Il serait pertinent d'actualiser la réglementation environnementale afin d'intégrer des valeurs seuils spécifiques pour le benzène et les autres COVs, sur la base des standards internationaux. Cette mesure permettrait d'améliorer la surveillance de la pollution atmosphérique et d'optimiser les stratégies de réduction de l'exposition des populations.

III.4.2.2. Influence de la géolocalisation des pompes à essence

Nous avons examiné l'impact de la géolocalisation des stations-service sur les valeurs des biomarqueurs d'exposition et d'effet. Pour cela, le sous-groupe des pompistes ($n = 59$) a été réparti en fonction de la proximité de leur station par rapport au trafic routier.

Deux zones ont été définies :

La zone à trafic faible (Zone f), comprenant 28 pompistes (47,46 %) répartis sur 4 stations-service.

La zone à trafic dense (Zone d), regroupant 31 pompistes (52,54 %) également répartis sur 4 stations-service.

Cette classification permet d'analyser l'impact du flux de véhicules sur l'exposition professionnelle au benzène et aux autres polluants présents dans l'environnement des stations-service.

La différence entre les valeurs du t,t-MA et S-PMA en AP est fortement significative avec des p-value de 0,003 et 0,0001 respectivement.

La médiane du t,t-MA dans la zone à faible trafic routier autour est de 265,52 (39,2-720,47) $\mu\text{g/g}$ créa contre 417,26 (98,22-1502,41) $\mu\text{g/g}$ créa soit 1,57 fois inférieure.

Pour le S-PMA, la médiane dans la zone à fort trafic autour est plus que deux fois supérieure (2,21) avec une valeur de 4,88 (0,35-29,88) $\mu\text{g/g}$ créa contre 2,2 (0,38-16,42) $\mu\text{g/g}$ créa.

Selon l'étude Geraldino et al. (2020) [141] et Poça et al. 2021 [74] au Brésil, les travailleurs des stations situées en périphérie avaient des valeurs médianes t,t-MA significativement plus faibles que les travailleurs des stations situées dans la région la plus urbanisée (région du centre-ville) (médiane = 70 $\mu\text{g/g}$ créa; médiane = 150 $\mu\text{g/g}$ créa ; valeur $p = 0,002$, respectivement).

Chaiklieng et al. (2019) [91] ont évalué le niveau de benzène dans l'air chez 150 travailleurs de stations-service dans trois zones différentes en Thaïlande (urbaine, suburbaine et rurale), et ont observé une concentration plus élevée de benzène dans l'air dans les zones suburbaines que dans d'autres zones, engendrant un risque plus élevé de cancer. Le calcul de l'indice de risque a révélé des valeurs supérieures chez les pompistes en zone urbaine et suburbaine ($HI > 1$) en comparaison avec les pompistes en zone rurale [90].

L'étude de Karakitsios et al. [136] en Grèce, a abouti à la même comparaison même avec nombre plus réduit (10 pompistes en zone urbaine et 5 en zone rurale).

Les concentrations de composés organiques volatils (COV) dans l'environnement sont influencées par la consommation de carburant, le type et l'âge du véhicule, la fluidité et la vitesse de la circulation, ainsi que les conditions environnementales de la ville, il est probable que les différences environnementales entre les stations-service ont directement influencé l'augmentation des vapeurs de carburant et, par conséquent, l'exposition du travailleur.

La zone urbaine est majoritairement composée de voitures particulières équipées d'un catalyseur (70 %), mais une proportion de voitures sans catalyseur reste significative (8 %), suivie des motos (7 %), qui présentent toutes deux un fort potentiel d'émission de benzène, tandis que, sur les routes rurales, la fraction de véhicules diesel lourds (camions et autobus) est nettement plus élevée, atteignant 14 %, selon les résultats de Kerchich et al. 2012 à Alger [26].

Il est à noter également que la différence d'ancienneté entre nos deux sous-groupes est hautement significative ($p < 0,0001$), les pompistes des pompes à essence en proximité de la ville ont une médiane d'ancienneté de 12 ans (des valeurs entre 8 et 18 ans) contre une médiane de 3 ans pour les pompistes des zones excentrées (valeurs entre 2 et 6,75 ans), seul le AV S-PMA est corrélé à l'ancienneté dans ce sous-groupe ($r = 0,401$, $p = 0,025$). Les plus vieilles pompes à essences sont au centre-ville et cela va de soi qu'elles comportent les pompistes les plus anciens, ce qui constitue un double facteur de risque.

III.4.2.3. Influence de la saison sur le benzène atmosphérique

Notre échantillonnage s'est déroulé d'août à octobre 2024, où la température moyenne était 28°C avec des pics de température de 40°C entre midi et 14H, à Annaba comme dans le nord algérien et le pourtour méditerranéen, la saison chaude se prolonge jusqu'à fin septembre et début octobre. Quand les vents du Sirocco arrivent, la température peut excéder les 42°C .

Plusieurs études ont observé une augmentation notable des concentrations de hydrocarbures aromatiques monocycliques (MAH) en hiver. L'étude de Kerbachi et al. 2006, menée en bord de route à Alger, a révélé une différence modérée entre les deux saisons, avec des concentrations hivernales supérieures d'environ 10 % à celles enregistrées en été [13]. Pilia et al. 2021 ont trouvé des concentrations de benzène atmosphérique dans la région de Sardaigne en Italie trois fois supérieures en hiver qu'en été [28] et Kerchich et al. 2011 ont détecté $2,11 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en hiver contre $1,39 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en été [165].

En effet, le carburant d'été est différent de celui d'hiver, ce dernier peut contenir dans son mélange des additifs oxygénés visant à réduire la plus grande quantité d'émissions polluantes produite par temps froid. Certaines industries pétrolières en profitent pour ajouter à son

carburant hivernal des ingrédients qui empêchent la condensation et la formation de dépôts dans les canalisations. Par ailleurs, la formulation du carburant d'été le rend moins volatile, donc moins polluant, mais coûte légèrement plus cher à produire que le carburant d'hiver [19,166]. Il paraît qu'en été les conditions sont favorables à la dégradation photochimique des COV [165]. A contrario l'étude de Karakitsios et al. 2007 a révélé une augmentation des valeurs de 20% en été par rapport à l'hiver [136]. Sur la base de ces résultats, il serait préférable d'adapter la périodicité des procédures de biosurveillance chaque six mois pour couvrir toutes les saisons, avec une attention particulière à la saison froide.

Il serait préférable de reconduire cette étude durant la période froide pour étudier la différence d'exposition.

III.4.2.4. Influence du rythme de travail et de l'ancienneté au poste

Nous rappelons que tous les mécaniciens de notre population d'étude (N=42) travaillent à un rythme de 5 jours par semaine, 1,98% (N=2) de pompistes ont un rythme similaire. Pour le reste des pompistes, plusieurs rythmes de travail ont été rapportés. Partant de 8H par jour pendant 6 jours alternant jour et nuit (N=5, 4,95%), allant jusqu'à 48H d'affilée suivis de 48h de repos (N=4, 3,96%), le rythme majoritaire étant 24H et repos de 48H (N=44, 43,56%), et 3,96% des pompistes (N=4) travaillent deux fois 12H consécutives et se reposent pendant 48H.

La comparaison des valeurs des biomarqueurs d'exposition entre les différents rythmes de travail est statistiquement hautement significative ($p < 0,0001$) pour le AP S-PMA, le AV t,t-MA et la AP cotinine.

Les médianes du AP S-PMA les plus élevées sont similairement celles des rythmes 12H et 48H, **7,83 (2,05-18,74) $\mu\text{g/g créa}$** et **7,61 (0,83-29,88) $\mu\text{g/g créa}$** . Notons qu'il s'agit de deux pompes à essence en plein trafic routier dense (route très fréquentée du centre-ville de Annaba). La médiane la plus faible est celle du rythme 5 jours/ semaine avec une valeur de **1,19 (0,25-18,82) $\mu\text{g/g créa}$** .

Concernant le t,t-MA en AV, la valeur la plus élevée a été observée chez le groupe de 48H (**566,87 [171,06-1562,83] $\mu\text{g/g créa}$**), laissant penser à l'accumulation du benzène comme explication mais le AV S-PMA serait le biomarqueur qui normalement s'éliminerait plus tardivement vu son temps de demi-vie plus lent, d'ailleurs la corrélation entre AV S-PMA et AP S-PMA est fortement significative avec le nombre d'heures de travail avec des coefficients de corrélation et valeur p respectives de (**$r=0,334$, $p < 0,001$**) et (**$r=0,332$, $p < 0,001$**). Par ailleurs,

Goethel et al. 2014 ont rapporté une corrélation positive entre les niveaux urinaires de t,t-MA et la durée d'exposition ($r = 0,65$; $p < 0,001$) [15].

L'analyse de régression multiple progressive a permis de confirmer le lien chez les individus exposés, où le S-PMA, en tant que variable dépendante, est influencé par le t,t-MA et le nombre d'heures d'exposition.

Le modèle présente un coefficient de régression standardisé de **0,423**, (**B = 0,341**, **IC 95 % [0,219-0,463]**, **p < 0,0001**) et un coefficient de régression ajusté **R² = 0,42**, indiquant que **42 %** des variations du S-PMA sont expliquées par celles du t,t-MA, et donc par l'exposition au benzène ainsi que le temps d'exposition.

Cette relation a été testée chez les fumeurs et non-fumeurs exposés, où elle est également confirmée, avec des coefficients de R² respectifs de 0,466 et 0,383.

Les valeurs des médianes de AV t,t-MA les plus faibles sont identiquement celles des rythmes 12H et 24H, avec des valeurs respectives de **107,48 (34,66-152,88) µg/g créa** et **107,31 (37,35-408,77) µg/g créa**. Sachant que pour ces deux rythmes, le repos est de 48H, suggérant que l'exposition est similaire durant la journée, les travailleurs travaillant 12H d'affilée, rentrent chez eux à 20H pour revenir le lendemain à 8H, et vu que la charge de travail est basse le soir, cela rend ces deux rythmes similaires.

Pareillement pour les rythmes de 8H pendant 6 jours et 5 jours par semaine, les médianes sont très proches avec des valeurs respectives de **277 (406-1117) µg/g créa** et **257,98 (54,26-1927,84) µg/g créa**.

Le S-PMA est corrélé au nombre d'heures de travail par jour en AV 0,334 et en AP 0,322

Ces résultats confirment, les résultats avancés par les études, que les heures de travail prolongés et le temps limité de récupération influencent les valeurs des biomarqueurs d'exposition et influencent la charge corporelle en benzène [18].

De plus, apparemment les longues heures de travail et le stress poussent à une consommation accrue du tabac, en effet, les valeurs des médianes de la cotinine en AP les plus élevées sont celles des rythmes les plus lents 24H et 48H, avec des valeurs respectives de **1059 (0,59-5099,4) µg/g créa** et **585,36 (1,14-765,51) µg/g créa**. D'autant plus que même s'il est interdit de fumer dans les pompes à essence, les pompistes ont déclaré que cela ne les empêchait pas de le faire du moment qu'ils s'éloignent des sources de carburant. Cette habitude, modérément corrélée

au nombre d'heures de travail (**AP cotinine : $r=0,354$, $p<0,0001$**), constitue un facteur d'exposition et de risque supplémentaires.

Certaines études ont rapporté que même un travail de courte durée peut entraîner une augmentation de 2,5 à 4 fois l'absorption des solvants organiques et que l'augmentation de l'activité physique entraîne une augmentation significative de la concentration sanguine des mélanges d'hydrocarbures chez les humains exposés aux solvants organiques.

Les résultats d'Uzma et al. (2010) ont montré que, malgré une faible exposition au benzène dans l'atmosphère de travail, les travailleurs présentaient une absorption significative de benzène en raison des heures de travail prolongées [121].

La moyenne de l'ancienneté chez les exposés a été estimée à **12,77 ±10,41 ans** s'étalant sur une plage de (6 mois à 44 ans) contre 16,1±9,58 (3-40) ans chez les non exposés, la tranche majoritaire est celle inférieure ou égale à 10 ans (N=49, 48,5%). Aucune corrélation entre les biomarqueurs d'exposition et l'ancienneté n'a été détectée chez les exposés et les non exposés.

En plus du rythme d'exposition et les habitudes tabagiques, tous les sujets exposés ont déclaré ne pas utiliser des équipements de protection individuels (EPI) à l'exception des combinaisons ou tenues spéciales pour le travail, en raison de l'inconfort que ça pouvait générer que ce soit chez les pompistes et mécaniciens. Butt et al. 2017 ont mentionné que les EPI ne sont utilisées que chez seulement 16 (8 %) des travailleurs des pompes à essence car l'équipement n'était pas adapté au type de travail qu'ils effectuaient. Seuls les casques étaient utilisés, tandis que l'utilisation de lunettes, de gants et de masques n'était pas observée [10].

La réduction et le fractionnement des heures de travail et l'amélioration de la production individuelle sont recommandées par la plupart des études similaires réalisées dans des pays émergents [10,90,121,150].

III.4.2.5. Influence du tabagisme

La fumée principale des cigarettes constitue une source majeure de benzène, environ 45 µg de benzène pénètre dans les voies respiratoires à partir d'une seule cigarette, et l'inhalation quotidienne est estimée à 720 µg pour un fumeur consommant 16 cigarettes par jour (16 × 45 µg/cigarette). Cette exposition dépasse celle des pompistes, dont l'inhalation moyenne de benzène au cours d'un poste de travail est de **439 µg** selon la formule suivante : **Concentration en benzène dans l'air (61 µg/m³) × Volume respiré par heure (0,9 m³/h) × Durée de travail (8 h)**, ce qui est encore plus élevé chez les gros fumeurs. Cela peut fausser les résultats du biomonitoring du benzène à de faibles concentrations (< 0,15 ppm) [115].

Les résultats de la plupart des études indiquent que le tabagisme avant et pendant le quart de travail a eu un effet confusionnel significatif sur la concentration de biomarqueurs de benzène, le t,t-MA (22 études), le S-PMA (13 études) et le benzène urinaire (10 études) [5].

L'analyse de la différence entre les biomarqueurs d'exposition chez les fumeurs (N=51, 36,42%) et non-fumeurs (N=89, 63,57%) de la population d'étude (N=140) est statistiquement significative pour le t,t-MA (**p=0,022**) avec une médiane chez les fumeurs de **309,95 (44,57-1502,41) µg/g créa** et chez les non-fumeurs de **202,23 (14-2748,16) µg/g créa** et est hautement statistiquement significative pour le S-PMA (**p<0,0001**) avec des médianes fumeurs et non-fumeurs respectives de **2,88 (0,63-29,88) µg/g créa** et **1,13 (0,1-18,82) µg/g créa**.

La médiane du t,t-MA chez les exposés fumeurs (N=38) est de **348,95 µg/g créa** et chez les non exposés fumeurs (N=14) est de **101,86 µg/g créa (p<0,0001)**. Chez les non-fumeurs des deux groupes (**p<0,0001**), les médianes sont **288,14 µg/g créa** chez les exposés (N=63) et **106,31 µg/g créa** chez les non exposés (N=25).

Concernant le S-PMA, il est trois fois supérieur chez les fumeurs du groupe exposé que les fumeurs du groupe non exposé (médianes : **3,61 et 1,29 µg/g créa**) avec **p<0,0001**.

Des études italiennes rapportent des différences similaires mais des valeurs plus basses que les nôtres [100,103,138], par exemple, pour le t,t-MA (F : 112±80 µg/g créa, NF: 90±112 µg/g créa) et le S-PMA (F : 1,51±1,48 µg/g créa, NF : 1±2,46 µg/g créa) [138].

Ces différences peuvent être expliquées par les habitudes tabagiques dans les lieux publics en Europe, largement influencées par une réglementation plus stricte et uniformisée. L'Italie a été l'un des premiers pays européens à adopter une interdiction stricte du tabac dans les lieux publics fermés avec la loi Sirchia en 2005. Cette loi interdit de fumer dans les bars, restaurants et espaces publics clos, et a marqué un tournant dans la lutte contre le tabagisme. Plus

récemment, en 2023, le gouvernement italien a renforcé ces mesures en élargissant l'interdiction aux cigarettes électroniques et au tabac chauffé, supprimant les espaces fumeurs fermés et interdisant la publicité pour tous les produits contenant de la nicotine [167].

Chez les non-fumeurs, les exposés (N=64) ont présenté une médiane de S-PMA de **1,44 µg/g créa** contre **0,67 µg/g créa** chez les non exposés.

L'analyse de régression multiple par sélection progressive n'a pas révélé de modèle de S-PMA influencé par la cotinine chez les exposés, en revanche chez les non exposés fumeurs, un modèle a été identifié, incluant les variables **âge** et **cotinine**, avec un coefficient β de **0,307 (IC 95 % : < 0,0001 – 0,001)**. Ce modèle présente un coefficient de détermination **R² de 0,165**, indiquant une capacité modérée à expliquer la variance des données, et une valeur de p de 0,015, attestant de la significativité statistique de l'association observée.

Une étude dédiée à l'analyse du S-PMA chez la population générale, a conclu à un lien entre le S-PMA urinaire et l'âge des sujets non-fumeurs, les valeurs les plus élevées ont été retrouvées chez les sujets dépassant 65 ans et explique cela par le métabolisme plus lent ou les masses graisseuse plus élevée en rapport avec les autres tranches d'âge [168].

Ceci dit, nos valeurs des non-fumeurs non exposés sont supérieures à celles des études menées dans différents pays (Italie, Chine, Congo) [168–170].

Les deux biomarqueurs d'exposition sont fortement corrélés entre eux chez les fumeurs exposés (N=37, **r=0,565, p<0,0001**) et à un degré moindre chez les non-fumeurs exposés (N=45, **r=0,474, p<0,001**). En revanche, ils ne sont pas corrélés l'un à l'autre chez les fumeurs non exposés (N=13). Ces résultats concordent avec certaines données publiées évoquant des valeurs de r chez les fumeurs exposés supérieures à 0,5 [115]. Pour d'autres études la corrélation entre le t,t-MA et S-PMA est plus faible (F : r=0,38, NF : r=0,39, p<0,05) [138].

La cotinine a été détectée chez tous les sujets de l'étude avec une valeur minimale de 0,01 µg/g créa et une valeur maximale de 8422,97 µg/g créa. Il est à signaler que la différence des valeurs de la cotinine chez les fumeurs exposés et non exposés n'est pas significative (p=0,063), cependant elle l'est hautement (p<0,0001) entre les non-fumeurs des deux groupes, avec des médianes de **0,44 (0,03-876,61) µg/g créa** chez les non exposés et **1,53 (0,03-4335,53) µg/g créa** chez les exposés. Les intervalles sont au même temps très larges, cela peut être expliqué par les effectifs réduits des sous-groupes et le tabagisme passif et la consommation du tabac à chiquer.

Selon l'étude de Tranfo et al. 2017, le S-PMA s'est avéré être fortement corrélé avec la cotinine ($r=0,75$), sa concentration chez les fumeurs ($N=93$) étant environ dix fois supérieure à celle des non-fumeurs/ex-fumeurs (197/156) tandis que le t,t-MA des fumeurs est environ deux fois la valeur des non/ex-fumeurs [17].

Nous concernant, la corrélation entre le S-PMA et la cotinine a été observée chez toute la population ($N=140$, $r=0,414$, $p<0,0001$), chez les fumeurs totaux ($N=51$, $r=0,299$, $p=0,039$) et plus faiblement chez les exposés ($N=101$, $r=0,241$, $p=0,015$). Aucune corrélation n'a été observée entre la cotinine et le t,t-MA pour notre étude alors que Fustinoni et al. 2005 ont conclu à une forte corrélation entre le t,t-MA et la cotinine urinaire ($r=0,6$, $p<0,01$) et le S-PMA et la cotinine ($r=0,38$, $p<0,01$) chez les fumeurs [115].

Carbonari et al. (2014) ont confirmé que le rapport t,t-MA/S-PMA est plus élevé chez les non-fumeurs que chez les fumeurs [133]. C'est également le cas pour notre étude, le ratio chez non-fumeurs exposés est de **182,64** contre **93,26** chez les fumeurs exposés. Ce même ratio a été suggéré pour corriger le facteur confondant du tabagisme, mais il serait limité par un autre facteur confondant qui est le polymorphisme génétique de la glutathion S-transférase (GST1) [103,133].

La comparaison de la concentration de biomarqueurs dans les échantillons biologiques avant et après le quart de travail peut être utile pour contrôler ce facteur de confusion [5] ainsi que la recommandation de ne pas fumer au minimum deux heures avant le prélèvement [138]. Même si nous avons consigné l'éviction de fumer avant les prélèvements, mais cela n'a pas été totalement respecté par les participants.

Effectivement, la différence entre les valeurs AV et AP chez les exposés fumeurs est hautement statistiquement significative pour le S-PMA ($p<0,0001$) avec des médianes (AV= **2,42**, AP=**3,61**) $\mu\text{g/g créa}$, à *contrario*, la différence n'est pas significative pour les valeurs du t,t-MA en AV et AP chez les fumeurs ($p=0,086$), médianes en AV 167,3 $\mu\text{g/g créa}$ (34,66-1562,83) $\mu\text{g/g créa}$, et en AP 348,95 (99,54-1502) $\mu\text{g/g créa}$.

Chez les non-fumeurs les mesures en AV et AP sont hautement statistiquement significatives pour les deux biomarqueurs ($p<0,0001$).

Bien que la cotinine soit couramment utilisée comme biomarqueur pour valider le tabagisme autodéclaré, la sélection d'une valeur seuil optimale pour distinguer les vrais fumeurs des vrais non-fumeurs montre un manque de normalisation entre les études [171]. Selon une revue systématique établie en 2016, le cut-off de la cotinine urinaire pour distinguer fumeur actif et

passif est de 30 $\mu\text{g/L}$ (ng/mL) [97,171]. Un autre seuil ajusté par rapport à la créatinine, de 100 $\mu\text{g/g}$ créa est également proposée par plusieurs études [17].

Nous avons étudié nos résultats selon tous les cut-off proposés par les différentes études. Mais il est utile de rappeler que le seuil optimal pour la classification du statut tabagique peut varier selon les caractéristiques de la population, la région et même la qualité du tabac [171] et la réglementation en vigueur concernant le tabagisme dans les lieux publics qui peut influencer le statut du fumeur passif. La teneur en cotinine de l'urine reflète les apports en nicotine dès 2 à 3 jours précédents et donne une idée de la quantité de tabac consommée

La stratification des valeurs de la cotinine selon le seuil de 100 $\mu\text{g/g}$ créa a abouti à la classification de 54 fumeurs chez les exposés (38 déclarés) et 47 non-fumeurs (63 déclarés), et 16 fumeurs et 24 non-fumeurs chez les non exposés (déclarés 14 et 26).

Nous avons pensé à la consommation du tabac à chiquer comme explication à cette différence, qui est une source de cotinine mais non de benzène, pour éviter tout résultat biaisé, surtout que nous n'avons pas mentionné cette question dans le questionnaire, nous avons stratifié les exposés en trois catégories : **les vrais non-fumeurs (déclaré NF et cotinine <100 $\mu\text{g/g}$ créa) (N=45), les déclarés NF avec cotinine >100 $\mu\text{g/g}$ créa (N=18), et les vrais fumeurs (déclarés fumeurs et cotinine >100 $\mu\text{g/g}$ créa (N=36).**

Chez les exposés, la différence des moyennes du t,t-MA entre les vrais non-fumeurs (**398,73 \pm 459,13 $\mu\text{g/g}$ créa**), les consommateurs du tabac à chiquer (**361,73 \pm 438,35 $\mu\text{g/g}$ créa**) n'est pas statistiquement significative ($p=0,76$), elle ne l'est pas non plus avec les vrai fumeurs (**480,41 \pm 323,28 $\mu\text{g/g}$ créa**) ($p=0,35$).

En revanche, pour le S-PMA, la différence est hautement significative entre les vrais non-fumeurs et les vrais fumeurs ($p<0,0001$) avec des moyennes respectives de **2,42 \pm 3,06 $\mu\text{g/g}$ créa** et **6,5 \pm 6,19 $\mu\text{g/g}$ créa**, et elle n'est pas significative ($p=0,81$) entre les vrais non-fumeurs et les consommateurs du tabac à chiquer (**2,6 \pm 2,75 $\mu\text{g/g}$ créa**).

Notons que les médianes de la cotinine sont très proches entre les vrais fumeurs (F+ cot>100) (**1083,36 $\mu\text{g/g}$ créa**) et les consommateurs du tabac à chiquer (NF+ cot>100) (**1190 $\mu\text{g/g}$ créa**).

La stratification selon le seuil de 30 $\mu\text{g/L}$ de cotinine a abouti à des résultats similaires à ceux du seuil 100 $\mu\text{g/g}$ créa (56 fumeurs et 45 non-fumeurs chez les exposés, et 17 fumeurs et 23 non-fumeurs chez les non exposés), indiquant que les deux seuils peuvent être utilisés pour déterminer le statut tabagique des individus, l'avantage de cette stratification est la

différenciation des fumeurs passifs (valeurs de cotinine entre 10-30 $\mu\text{g/L}$), fumeurs actifs (valeurs entre 30 et 100 $\mu\text{g/L}$) et fumeurs réguliers (valeurs supérieures à 100 $\mu\text{g/L}$).

Ces résultats indiquent que les consommateurs de tabac à chiquer ne sont pas exposés au benzène, ce dernier étant principalement issu de la combustion du tabac.

Par ailleurs, le S-PMA s'impose comme le biomarqueur le plus sensible et pertinent pour différencier les statuts tabagiques à exposition équivalente, tandis que le t,t-MA, en raison de son manque de spécificité, ne permet de distinguer que les fumeurs des exposés et non exposés, cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés par Barbieri et al. 2008 indiquant que les valeurs du S-PMA ne discriminent pas l'exposition résultant des habitudes tabagiques [149].

En outre, l'utilisation d'un seuil de cotinine fixé à 100 $\mu\text{g/g}$ créatinine pour l'analyse de l'exposition des groupes requiert une prise en compte de la consommation du tabac à chiquer, sous peine de biais dans les résultats.

Enfin, cette habitude, largement répandue au sud de l'Asie, car la plus grande population de consommateurs de tabac à chiquer se trouve en Inde, avec 185,8 millions de consommateurs, soit 68 % de tous les consommateurs de tabac à chiquer dans le monde [172], mais aussi en Afrique du Nord (Algérie, Tunisie), reste peu mentionnée dans les revues systématiques publiées, ce qui souligne l'importance d'adapter les méthodologies aux spécificités régionales.

III.4.2.6. Influence de la co-exposition au toluène

Il a été largement rapporté que la co-exposition au toluène peut être un facteur de confusion dans la modification de la concentration du t,t-MA et S-PMA [18,70,90,149].

Plusieurs études algériennes et étrangères mesurant le benzène et toluène atmosphériques en milieu urbain, ont révélé que le toluène était le polluant le plus abondant des deux [1,26,27,162,164], notamment à Annaba [161].

L'analyse atmosphérique dans les pompes à essence a révélé une relation linéaire significative ($r = 0,846$) entre ces deux composés [156]. En Thaïlande (Chaiklieng et al. 2021), la concentration moyenne de toluène mesurée dans une station-service était de $40,30 \pm 66,67$ ppb, suggérant une exposition non négligeable. La plus forte concentration a été observée chez les pompistes, avec une plage de 8,08 à 410,06 ppb par rapport aux autres travailleurs des pompes à essence [156].

Le toluène étant un inhibiteur compétitif du métabolisme du benzène, entraîne une diminution de la formation de métabolites du benzène et par conséquent une réduction de la toxicité [4,149].

Il a été démontré que l'exposition au toluène inhibe le métabolisme et la myélotoxicité qui en résulte, bien qu'à des concentrations relativement élevées. Plus récemment, des concentrations plus faibles de toluène ont été suggérées pour renforcer les effets du benzène sur l'induction des micronoyaux [106].

Comme le benzène, le toluène subit plusieurs biotransformations enzymatiques, la principale voie est l'hydroxylation en alcool benzoïque par la CYP450 donnant l'acide hippurique, oxydation sur le cycle produisant l'ortho-crésol et en un faible pourcentage est conjugué au glutathion par la Glutathion-S-transférase produisant les acides mercapturiques : acide toluyl-mercapturique et l'acide S-Benzyl mercapturique (S-BMA) comme montré sur la Figure 31 [138].

Plusieurs études ont utilisé l'acide hippurique comme biomarqueur du toluène [109] mais peu ont utilisé le S-BMA qui est plus spécifique.

Nous avons dosé le S-BMA urinaire dans tous les prélèvements afin d'étudier la source et l'impact de la co-exposition au toluène sur les biomarqueurs d'exposition et d'effet du benzène. Nous signalons que les VLB pour le S-BMA ne semblent pas être officiellement établies dans les réglementations européennes et américaines [173]. Cependant, certaines études indiquent que la valeur d'imprégnation en population générale adulte est inférieure à 22 µg/g de créatinine (95^e percentile) [138].

Chez tous les sujets de l'étude (141), la moyenne du AP S-BMA est de **3,9±3,19 µg/g créa** et la médiane est de **2,97 (0,31-17,1) µg/g créa**. Il serait modérément corrélé au t,t-MA (**r=0,423, p<0,0001**) et non corrélé au S-PMA ($p > 0,05$).

La différence entre les exposés et non exposés est non significative ($p=0,169$, médianes **2,98 [0,72-16,46]** et **2,54 [0,31-17,1]**), de même entre les fumeurs et non-fumeurs de chaque groupe à part, ainsi qu'en fonction des différentes tranches d'âge, tranches d'ancienneté, le rythme du travail et la géolocalisation ($p>0,05$).

Chez les exposés ; les valeurs du S-BMA en AV [**0,52-51,32**] µg/g créa et AP [**0,72-16,46**] µg/g créa sont fortement corrélées (**r=0,539, p<0,0001**) mais ne sont pas statistiquement différentes les unes des autres ($p=0,797$), de même que chez les fumeurs et non-fumeurs.

Le AV S-BMA est modérément corrélé au AV t,t-MA (**r=0,351, p<0,0001**) et non corrélé au AV S-PMA (**p>0,05**). L'unique différence significative observée, est celle pour le AV S-BMA entre les fumeurs et non-fumeurs exposés (**p=0,04**) dont les médianes et plages respectives sont **2,49**

[0,53-51,32] µg/g créa et 3,42 [0,52-35,32] µg/g créa. Notons que les valeurs les maximales du S-BMA sont observées chez des fumeurs en avant-poste.

Cette corrélation est plus forte pour les valeurs S-BMA en AP, avec le AP t,t-MA (**r=0,416, p<0,0001**), la valeur de r est plus élevée chez les exposés fumeurs (**r=0,592, p<0,0001**) que chez les exposés non-fumeurs (**r=0,410, p=0,005**).

Les AP S-BMA et AP t,t-MA sont également très corrélés chez les non exposés (**r=0,517, p<0,001**), la valeur de r la plus élevée a été observée chez le sous-groupe fumeur non exposé (**N=14, r=0,835, p<0,0001**) dont la médiane et plage sont égales à **2,34 [0,75-17,10] µg/g créa**, mais la différence avec les non-fumeurs du même groupe n'est pas significative (**p>0,05**). Aucune corrélation chez les non-fumeurs non exposés.

Cette relation significative chez les fumeurs a été confirmée par un modèle de régression multiple progressive, révélant un coefficient de régression standardisé élevé (**β = 0,865**), indiquant une forte association. La valeur de **B = 47,71** (IC 95 % [**29,37-66,04**]) et le R² ajusté de **0,726** attestent de la robustesse du modèle, avec une signification statistique marquée (**p < 0,0001**). Ces résultats suggèrent que la variation du S-BMA constitue un facteur prédictif clé dans l'accumulation de t,t-MA chez les individus de ce groupe confirmant que le tabagisme est une source potentielle de toluène et de benzène, proportionnellement moins importante, mais une teneur de 134,9 à 238,6 g/cigarette a été observée [138].

Les corrélations plus fortes en AP qu'en AV entre le S-BMA et le t,t-MA attestent que l'exposition au toluène est directement liée à l'utilisation du carburant.

La différence non significative entre les groupes exposés et non exposés pourrait refléter une équivalence des niveaux d'exposition, influencée par diverses sources, notamment professionnelles, tabagiques et environnementales liées à la pollution atmosphérique.

Les valeurs chez les sujets non exposés et non-fumeurs (**N=26, moyenne 3,5±3,2 µg / g créa et plage [0,31-17,1] µg/g créa**) reflètent l'exposition de la population générale, elles sont inférieures aux valeurs rapportées par les études antérieures, où le toluène a été détecté chez des sujets non-fumeurs et non exposés à des valeurs moyennes variant entre [**4,9 -38**] µg/g créa (Alwis, 2012 et Rosting, 2020) [174,175].

La corrélation du S-BMA avec le t,t-MA est non pas le S-PMA chez les individus exposés, peut être expliquée par un mécanisme compétitif impliquant la Glutathion S-transférase (GST), qui intervient dans la formation des deux métabolites.

En présence de toluène, le métabolisme du benzène semble s'orienter préférentiellement vers le t,t-MA, cela est crucial dans la potentialisation de la toxicité du benzène car la production du S-PMA constitue est une voie de détoxification [149], une corrélation entre le t,t-MA et l'acide hippurique ($p=0,025$) a été documentée par l'étude de Chaiklieng et al. 2021 [156]. Des études rapportent des corrélations entre le benzène atmosphérique et le toluène urinaire et le S-BMA [138].

Cette compétition est confirmée par les valeurs de S-BMA plus élevées en AV chez les non-fumeurs que les fumeurs, car l'apport du benzène par le tabagisme va baisser la production du S-BMA.

Carrieri et al. 2018 indiquent que le toluène environnemental semble inhiber le métabolisme du benzène en S-PMA, même à faibles concentrations, entraînant ainsi une sous-estimation des niveaux de S-PMA par rapport à l'exposition réelle des travailleurs au benzène [18]. Une diminution statistiquement significative du rapport S-PMA μg / benzène ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) a été observée à mesure que la concentration environnementale de toluène augmentait.

Inversement, Il paraît que le métabolisme du toluène en acide hippurique et la conversion en o-crésol sont également réduits sous l'effet du benzène, mais dans une moindre mesure [176].

Il a été rapporté que le S-BMA pouvait être issu d'autres substances chimiques comme le chlorate de benzyle, l'acétate de benzyle, le benzaldéhyde, le N-nitroso-N-méthylbenzylamine et l'alcool benzylique qui est retrouvé dans les cosmétiques [138], ce qui peut expliquer l'absence de différence entre les sujets exposés et les sujets de la population générale compromettant ainsi sa spécificité [174]. Des études recommandent le toluène urinaire comme biomarqueur plus spécifique [138,149].

Des auteurs rapportent que le S-BMA a permis de différencier le groupe ayant la plus forte exposition (chauffeurs de camions-citernes) des autres groupes exposés [138], et que la concentration en S-BMA était significativement corrélée aux niveaux de toluène atmosphérique dans les groupes exposés ainsi que dans l'ensemble de l'échantillon [138,156]. Le ratio Toluène/Benzène atmosphériques est fortement recommandé pour différencier les différents niveaux d'exposition [69,138,150].

III.4.2.7. Autres facteurs (prise d'alcool et IMC)

Bien que tous les participants aient déclaré ne pas consommer d'alcool, une affirmation potentiellement influencée par le caractère tabou du sujet, plusieurs études indiquent que la consommation d'alcool dans les 48 heures précédant le prélèvement n'altère pas

significativement les niveaux de biomarqueurs benzéniques [5]. Toutefois, la littérature rapporte que la CYP2E1, impliquée dans le métabolisme du benzène, est également induite par l'alcool et l'aniline, suggérant une possible interaction métabolique. En effet, une synergie avec l'alcool a été démontrée dans certaines études [177]. Enfin, selon Lovreglio (2010), la consommation d'alcool était corrélée aux concentrations urinaires de S-PMA, S-BMA et de toluène chez l'ensemble des sujets analysés [138].

Un autre facteur influençant qui a été mentionné dans la littérature, est l'indice de masse corporelle (IMC). Il a été suggéré que le surpoids pourrait réduire l'excrétion du benzène en favorisant son accumulation dans les tissus adipeux, ce qui serait susceptible d'augmenter l'induction de micronoyaux [149]. Cette hypothèse est renforcée par la liposolubilité élevée du benzène, qui favorise son stockage temporaire suivi d'une libération progressive et d'une biotransformation, notamment via la voie métabolique menant à la formation du S-PMA. Par ailleurs, Lovreglio et al. (2010) rapportent que les concentrations urinaires de S-PMA semblent également influencées par l'IMC [138].

Il convient de noter que l'influence de l'IMC n'a pas été analysée dans le cadre de la présente étude. Toutefois, au vu des données issues de la littérature suggérant un rôle potentiel de l'IMC dans le métabolisme et la biotransformation du benzène, il serait pertinent d'intégrer cette variable dans de futures recherches afin d'affiner l'interprétation des biomarqueurs d'exposition et d'effet.

III.4.3. Comparaison entre les professions (pompistes et mécaniciens)

Nous avons sélectionné deux métiers exposant au benzène via les carburants et présentant des niveaux d'exposition similaires (niveau 1 : exposition faible entre 0,1 et 1 ppm) selon la littérature [22], mais différant par les voies de pénétration, les modalités d'utilisations et la durée d'exposition. Cette démarche vise à identifier la profession présentant le risque le plus élevé. Les pompistes seraient exposés par inhalation au benzène et un moindre degré par voie cutanée, et le contraire pour les mécaniciens où la voie cutanée est très impliquée dans l'absorption des solvants du moment que les EPI ne sont pas utilisés.

La moyenne d'âge des pompistes ($n = 59$) est de **43 ± 9,85 ans**, et ne diffère pas de manière statistiquement significative de celle des mécaniciens ($n = 42$), estimée à **46 ± 11,08 ans**. En revanche, une différence significative est observée concernant l'ancienneté dans le poste ($p < 0,001$), la médiane est de **8 ans [0,58–34]** chez les pompistes contre **19 ans [0,5–44]** chez les mécaniciens.

Cette disparité peut s'expliquer par plusieurs facteurs contextuels. 50 % des stations-service visitées (n = 4) sont relativement récentes et situées en périphérie urbaine, zones où le recrutement privilégie des profils jeunes, souvent moins expérimentés, les pompistes les plus anciens ont été rencontrés dans les plus vieilles stations de service (centre-ville).

Par ailleurs, le métier de pompiste semble connaître une forte rotation du personnel, probablement liée à des conditions de travail exigeantes (horaires décalés, exposition prolongée, absence de stabilité contractuelle), entraînant un turnover élevé. À l'inverse, les mécaniciens, en raison de leurs compétences techniques spécifiques et de l'investissement en formation que requiert leur métier, bénéficient d'une plus grande stabilité professionnelle. Leur expertise est souvent valorisée et retenue par les employeurs, ce qui peut expliquer leur ancienneté plus élevée.

La différence entre les valeurs du t,t-MA est non significative en AP ($p > 0,05$), les médianes sont très proches avec **332 $\mu\text{g/g}$ créa [39,2-1502,41]** chez les pompistes et **303,72 $\mu\text{g/g}$ créa [42,5-2748,16]** chez les mécaniciens. Cependant la différence est hautement statistiquement significative pour les valeurs en AV ($p < 0,0001$), médianes respectives **132,79 $\mu\text{g/g}$ créa [34,66-1562,83]** et **271,41 $\mu\text{g/g}$ créa [54,22-1927,84]**.

L'inverse est valable pour le S-PMA où les valeurs en AV sont identiques (médianes **1,28 et 1,27 $\mu\text{g/g}$ créa**, $p > 0,05$) et les valeurs en AP sont hautement significativement différentes ($p < 0,0001$) avec une médiane chez les pompistes 2,16 fois supérieure à celle des mécaniciens (**2,73 et 1,26 $\mu\text{g/g}$ créa**).

Face à ces résultats, le calcul du ratio semble mieux distinguer les deux expositions, en effet il est hautement significativement plus faible chez les pompistes que chez les mécaniciens en AV (**75,03 et 202**) et en AP (**91,54 et 226,46**) attestant d'une exposition plus forte.

Nous avons éliminé l'effet du tabagisme en comparant pompistes non-fumeurs (N=32) avec mécaniciens non-fumeurs (N=31), les différences ont demeuré très significatives en AV ($p = 0,002$) et en AP ($p = 0,003$) avec des valeurs du ratio deux fois inférieures chez les pompistes.

L'analyse de corrélation entre les biomarqueurs d'exposition (t,t-MA et S-PMA) indique des valeurs du coefficient rho de Spearman similaires entre les deux sous-groupes de professions. En AP la valeur de r est **0,596** chez les pompistes et **0,591** chez les mécaniciens ($p < 0,0001$), en AV elle est supérieure chez les mécaniciens (**r=0,676**, $p < 0,0001$) que chez les pompistes (**0,441**, $p < 0,0001$). Cela peut être expliqué par le rythme d'exposition plus régulier des mécaniciens,

qui sont exposés 5 jours par semaine (et parfois 6) ce qui pourrait influencer les valeurs en AV par un effet plus cumulatif.

Le S-BMA, comme suscité, est similairement corrélé au t,t-MA chez les deux professions ($r = 0,411$ et $r = 0,415$, $p < 0,001$) en AV, et identiquement en AP ($r = 0,359$, $p = 0,005$ et $0,02$).

Ces résultats concluent d'une exposition supérieure chez les pompistes expliquée par les différences du rythme de travail, des voies de pénétration ainsi que la teneur du benzène atmosphérique.

En effet, les prédiction de la concentration du benzène atmosphérique que nous avons réalisée à l'aide de la droite de régression nous ont permis de calculer uniquement la valeur maximale détectée chez les mécaniciens qui est égale à **0,35 ppm (1,11 mg/m³)**, elle est proche de la valeur maximale prédite pour les pompes à essence situées en zone à faible trafic routier égale à **0,29 ppm (0,93 mg/ m³)**, le maximum prédit pour une pompe à essence située en zone à trafic dense est presque le double **0,61 ppm (1,95 mg/m³)** dont la moyenne est **0,06 ppm (0,19 mg/m³)**.

Nos résultats concordent avec ceux d'une revue systématique publiée en 2023 mentionnant une moyenne d'exposition chez les pompistes à 0,08 ppm soit $(0,26 \pm 0,38 \text{ mg/m}^3)$ [5] et ceux de Chaiklieng et al. 2017 ayant rapporté une valeur maximale de 0,13 ppm chez des pompistes mesurée à l'aide d'une pompe individuelle située dans la zone respiratoire (moyenne 0,012 ppm) [90].

Certains auteurs ont étudié l'exposition des autres travailleurs des pompes à essence tels que les gérants, les graisseurs, les laveurs de voitures, les magasiniers, et les chauffeurs citernistes, ces derniers se sont avérés être les travailleurs les plus exposés de toute la chaine de distribution du carburant, et méritent une attention particulière par les médecins du travail [1,74,141,178].

Quant aux mécaniciens, les tâches liées aux carburants comprennent notamment la vidange ou le remplissage du réservoir d'essence, le changement de la pompe à carburant ou du filtre à carburant, le nettoyage ou le remplacement de la conduite de carburant, ainsi que le réglage du carburateur ou du système d'injection [179].

Des facteurs jouant un rôle important dans la détermination de l'exposition ont été identifiés, comme l'aération ou le confinement du garage, l'activité de réparation à l'intérieur ou en plein air. Certains garages visités disposent de sanitaires et d'une chambre de repos pour manger à l'intérieur du garage sans aucune aération ce qui représente un facteur de risque aggravant.

Williams et al. 2015 rapportent des niveaux d'exposition chez les mécaniciens justifiant nos résultats, en effet, la concentration du benzène atmosphérique dans les garages mécaniques aux USA variait entre 0,01 et 0,05 ppm avec un maximum de 0,38 ppm [179]. Une étude portant sur 234 mécaniciens italiens a estimé une concentration moyenne de benzène égale à 0,05 ppm (maximum 0,15 ppm) [180]. Plus loin encore, Hotz et al. en 1997 ont rapporté une concentration moyenne de benzène d'environ 0,01 ppm (avec un 95e percentile à 0,14 ppm), sur la base de mesures effectuées auprès de 156 mécaniciens travaillant dans des garages civils et militaires en Europe [181].

Des expositions plus élevées au benzène ont été associées aux petits ateliers de réparation et aux installations ne disposant pas d'une ventilation adéquate ou de systèmes d'extraction locale des polluants spécialement en hiver [182].

Cependant, peu d'études expérimentales ont évalué le flux cutané du benzène lorsqu'il est présent à faibles concentrations dans des mélanges de solvants. Il est suggéré que la voie cutanée ne contribuerait pas de manière significative à l'exposition totale au benzène chez les mécaniciens automobiles, sauf peut-être pour les travailleurs ayant des contacts fréquents et prolongés [33].

Les mécaniciens spécialisés dans les petits moteurs ainsi que ceux travaillant principalement sur des moteurs diesel seraient exposés à des niveaux de benzène plus faibles que les mécaniciens spécialisés dans les véhicules lourds [151,179].

Les données disponibles suggèrent que les mécaniciens automobiles ne sont généralement pas exposés à des niveaux significatifs de benzène sur leur lieu de travail, sauf pour des tâches ponctuelles liées aux carburants, de courte durée. Les expositions sur une période complète de travail demeurent bien inférieures aux limites d'exposition professionnelle actuelles [151,179,183] mais nous concernant nous avons tout de même observée des dépassements des VLB chez 35% (N=15) d'entre eux en AV (7 F et 8 NF) et chez 28% (N=12) en AP (3 F et 8 NF) nous poussant à recommander leur biosurveillance professionnelle .

III.5. Discussion des signes cliniques déclarés

En nous basant sur l'étude de Chaiklieng et al. (2015) [139], nous avons divisé les symptômes liés au benzène en 5 catégories des plus faibles aux plus sévères.

Les questions sur l'état clinique étaient basées sur leurs expériences de symptômes pendant ou après le quart de travail des 6 derniers mois : **(1) Sans symptômes, (2) symptômes légers**

(céphalées, vertige, démangeaison, mal de gorge), **(3) symptômes modérés** (Dyspnée, douleurs thoraciques, nausées, vomissements, crampes, vision floue, irritation cutanée, anxiété, somnolence), **(4) symptômes graves** (toutes infections confondues, hémorragie, épistaxis, convulsion, coma), **(5) symptômes chroniques** (leucémie, IDM, AVC, Anémie, thrombopénie, leucopénie). Mais nous avons rapporté d'autres signes mentionnés par les travailleurs.

Un total de **137** déclarations de symptômes a été recensé dont **48,92% (N=68)** sont des signes neurologiques (céphalées, vertiges, asthénie, anxiété, acouphènes, fourmillement, insomnie), **11,51% (N=16)** signes musculaires (crampes) et **10,79% (N=15)** des signes urologiques (brûlures mictionnelles, prostate, néphropathie). Le nombre de symptômes par sujet variaient entre 0 et 8.

Parmi les sujets exposés, **58,41 % (n = 58)** ont rapporté au moins un symptôme, tandis que **42,57 % (n = 43)** se sont déclarés asymptomatiques. Les plus fréquemment rapportés étaient les céphalées (15,83 %) et l'asthénie (15,11 %), suivis par les crampes musculaires (11,51 %), les brûlures mictionnelles (7,19 %), les vertiges (5,76 %) et les acouphènes (5 %).

D'autres symptômes, rapportés dans des proportions comprises entre 2 % et 4 %, incluaient : tachycardies, irritations cutanées, insomnie, fourmillements, dyspnée et côlon irritable. Enfin, des symptômes plus rares (moins de 2 %) tels que épistaxis, anxiété, irritation oculaire, nausées et néphropathies ont également été recensés.

La comparaison des biomarqueurs d'exposition entre les sujets exposés symptomatiques (N=58) et asymptomatiques (N=43) a mis en évidence une différence statistiquement significative pour le **AP S-PMA (p=0,046)**, les valeurs médianes étaient respectivement **2,73 µg/g créa [0,25-18,74]** et **1,46 µg/g créa [0,25-29,88]**. En revanche, aucune différence significative n'a été observée concernant le dépassement de la VLB du t,t-MA. En effet, **79,3%** des sujets symptomatiques présentaient des concentrations de t,t-MA inférieures au seuil de 500 µg/g créa suggérant que ce biomarqueur ne permet pas à lui seul de prédire la survenue de symptômes.

Par ailleurs, des corrélations faibles ont été mise en évidence entre le nombre de symptômes déclarés et le **AV S-PMA (r=0,391, p=0,002)**, le **AP S-PMA (r=0,278, p=0,035)** et le **AP t,t-MA (r=0,296, p=0,024)**.

22 sujets âgés de plus de 51 ans (**75,86%**) ont déclaré au moins un symptôme contre **7 (24,14%)** asymptomatiques, représentant ainsi la tranche d'âge majoritaire chez les sujets

symptomatiques (**37,9%**). Les proportions des sujets symptomatiques des autres tranches d'âge sont 19 (55,88%) pour les moins de 40 ans et 17 (44,73%) sujets ayant entre 40 et 50 ans représentant respectivement **32,75%** et **29,31%** des sujets symptomatiques. Ces différences ne sont pas statistiquement significatives mais il est clair que la vulnérabilité liée à l'âge est bel et bien présente.

Plus de la moitié des sujets ayant une ancienneté inférieure à 10 ans (**N=28, 57,14%**) présentent des symptômes, soit **48,3%** des sujets symptomatiques totaux. Ceux ayant une expérience entre 10 et 20 ans représentent (**N= 20, 34,5%**) des sujets symptomatiques.

La moitié des plus anciens (>20 ans) avec (**N=10, 55%**) ont au moins déclaré un symptôme, représentant ainsi **17,2%** des sujets symptomatiques totaux. Il a été observé que le nombre de symptômes est corrélé à l'ancienneté (**r=0,288, p=0,028**).

Il est également possible d'hypothétiser que les travailleurs récemment recrutés seraient davantage sujets à des symptômes modérés tels que les céphalées ou les vertiges, en lien avec une adaptation physiologique encore incomplète, tandis que chez les travailleurs plus anciens, un phénomène de tolérance ou d'habituation pourrait atténuer la perception ou l'expression de ces manifestations.

L'analyse du statut tabagique n'a pas révélé de différence statistiquement significative entre les sujets symptomatiques et asymptomatiques (test du khi², p = 0,366). Toutefois, une majorité de sujets symptomatiques (n = 34 ; 58,6 %) et asymptomatiques (n = 29 ; 67,5 %) étaient des non-fumeurs, ce qui suggère que le tabagisme ne constitue pas, dans cet échantillon, un facteur explicatif déterminant de la symptomatologie rapportée.

Le tableau croisé entre pompistes et mécaniciens en fonction de la présentation ou non de symptômes a révélé une différence hautement significative (**p < 0,0001**), en effet, **75,9%** (**N=44**) des sujets symptomatiques sont représentés par **74,6%** des pompistes, contre **14 (33,33%)** mécaniciens.

Les principaux signes rapportés par les pompistes par rapport aux déclarations totales sont les céphalées (18,7%), asthénie (13,08%), crampes (12,15%), brûlures mictionnelles (9,35%), vertiges et tachycardies (5,6%).

Les pompistes des zones à trafic dense ont présenté deux fois plus de symptômes que ceux des zones à trafic faible (**médiane zone d= 2, médiane zone f= 1, p=0,009**).

En revanche les mécaniciens ont majoritairement rapporté des signes d'asthénie chronique (25,93%) suivis des irritations cutanées (14,81%), crampes (11,11%) et céphalées et vertiges (7,4%).

Nos résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui indiquent que les premiers signes et symptômes liés à l'exposition au benzène varient de légers à modérés et rarement graves [91,139] et souvent difficiles à percevoir comme spécifiques.

Les premières plaintes subjectives sont généralement des maux de tête, des étourdissements et une perte d'appétit, mais une augmentation du pouls, une chute de la pression artérielle, un essoufflement et une faiblesse peuvent également survenir [141]. L'asthénie est un symptôme connu de l'intoxication au benzène, dans l'étude de Geraldino et al. 2020 [141], elle était plus fréquente chez les travailleurs présentant les niveaux les plus faibles de t,t-MA urinaire. Dans l'étude égyptienne de Alfadaly et al. (2016), les dermatites allergiques étaient le signe le plus fréquent [88].

Chaiklieng et al. (2019), ont rapporté une association significative entre la détection du t,t-MA et la présence de symptômes chez les pompistes, même lorsque les concentrations restaient faibles. Environ 65 % des sujets présentaient des symptômes, en grande majorité légers, **incluant céphalées, vertiges, sécheresse cutanée, maux de gorge et toux**. Par ailleurs, 51 travailleurs (41,1 %) présentaient des symptômes d'intensité modérée, les plus fréquents étant : somnolence, faiblesse musculaire, douleurs thoraciques, épistaxis (type scorbutique), tremblements, nausées, sensations de brûlure cutanée et anoxie. Des symptômes graves tels que l'anémie et une perte de conscience ont été observés chez six individus.

Giardini et al. 2023 ont indiqué que les symptômes les plus signalés étaient la **somnolence (45,1 %)**, les **maux de tête (38,3 %)**, les **étourdissements (27,5 %)**, les **picotements (25,4 %)**, les **mouvements involontaires (25 %)** et la **faiblesse (21,9 %)** [109].

Cette observation suggère que des niveaux d'exposition modérés peuvent suffire à induire des effets subjectifs, principalement d'ordre neurologique et musculaire, ce qui justifie l'importance d'un suivi clinique, même en l'absence de dépassement des seuils réglementaires, en particulier lorsqu'ils s'accompagnent d'altérations hématologiques.

Il est essentiel d'étendre ce suivi aux mélanges de composés organiques volatils dominants, notamment les BTEX, dont la toxicité est bien documentée. Plusieurs études les impliquent dans la genèse de troubles neurologiques chez les travailleurs exposés aux carburants, à l'instar de l'étude taïwanaise de Hong et al. 2023 [76].

D'autres auteurs tel que Yansu He et al. 2024 et Chen et al. 2023 ont conclu que les mélanges de composés BTEX ont été associés à des affections cardiovasculaires telles que l'insuffisance cardiaque congestive (ICC), l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde et les maladies coronaires [80,81]. Pris individuellement, le benzène, le toluène et l'éthylbenzène présentaient également une association avec l'ICC [80]. Liu et al. 2024 ont mis en évidence une association entre l'exposition aux BTEX et les troubles de l'audition [184].

III.6. Discussion des biomarqueurs urinaires d'effet génotoxique par stress oxydatif

Les concentrations tissulaires des dérivés oxydés de la guanine constituent des instantanés spécifiques d'un organe ou d'un type cellulaire donné, reflétant l'équilibre entre la formation de dommages oxydatifs et leur élimination (via les mécanismes de réparation) assurée par les systèmes antioxydants.

Lorsque cet équilibre est rompu au profit des espèces oxydantes, un stress oxydatif s'installe, entraînant l'accumulation de lésions oxydatives. Cela résulte d'un déséquilibre entre la formation des lésions et les mécanismes de réparation ou de renouvellement moléculaire assurés par des systèmes spécifiques.

L'excrétion urinaire offre une mesure intégrée du stress oxydatif à l'échelle de l'organisme entier, particulièrement adaptée aux contextes où le stress oxydatif est systémique. Elle représente le taux moyen d'oxydation des acides nucléiques (ADN et ARN). Bien que l'oxydation des précurseurs nucléiques ait été démontrée, son impact quantitatif reste discuté dans la littérature [185].

Dans cette section, l'analyse porte sur les six biomarqueurs urinaires dosés dans le cadre de l'étude, à savoir : **la Guanine, la 8-OxoGuanine, la Guanosine, la 8-OxoGuanosine, la désoxyGuanosine et la 8-OxodésoxyGuanosine.**

Tous les biomarqueurs d'oxydation des acides nucléiques ont été détectés chez tous les sujets de l'étude, cela est expliqué par le fait que ce sont des substances endogènes qui subissent un turnover permanent.

Nous avons suivi les recommandations de la revue systématique de Graille et al. 2020 indiquant l'ajustement des échantillons urinaires à la créatinine, de quantifier les produits oxydés de la guanine par des méthodes chimiques, et de présenter les résultats sous forme de médiane et de

quartiles. Cette approche permettrait une comparaison plus fiable des valeurs entre les différentes études [124].

La **8OxoGua** s'est avérée être la base la plus représentée parmi tous les biomarqueurs analysés, avec une médiane et intervalle chez les exposés de **14,31 µg/g créa [2,6-89,76]** et chez les non exposés de **16,02µg/g créa [2,05-111,03]**. Ses concentrations seraient **5 à 7 fois** plus élevées que celles de la 8OxoGuo et 8OxodGuo.

Ces résultats convergent avec ce qui est rapporté dans la littérature, en effet, ce biomarqueur montre la plus grande variabilité intra et inter-individuelle parmi tous les biomarqueurs oxydés et peut être spécialement influencé par le sexe. Cette variabilité pourrait être attribuée en partie au polymorphisme génétique du gène hOGG1 impliqué dans la réparation par BER, dont la prévalence est d'environ 20% chez les populations caucasiennes et qui entraîne des conséquences fonctionnelles sur l'activité enzymatique [123,125]. Tranfo et al. 2019 ont déclaré qu'il n'était pas possible d'apporter une interprétation convaincante des résultats vu que ce dernier peut être formé à partir du remaniement de l'ADN et de l'ARN [186].

La comparaison entre les valeurs de ces biomarqueurs en AP chez les exposés et non exposés a mis en évidence des différences significatives pour les biomarqueurs de l'ADN, avec des valeurs médianes supérieures chez les exposés, à savoir la **dGuo** avec (**p=0,004**) et médianes **2,14 µg/g créa [0,32-12,04]** et **1,45 µg/g créa [0,17-9,07]** et la **8-OxodGuo** dont **p=0,048** et médianes **2,4 µg/g créa [0,59-6,73]** et **1,96 µg/g créa [0,38-7,3]**.

Concernant les produits de l'ARN, seule la **Guo** a présenté une différence fortement significative (**p<0,01**) dont les médianes respectives chez les exposés et non exposés sont **73,16 µg/g créa [18,84-467,67]** et **49,5 µg/g créa [5,29-416,64]**, contrairement à la forme oxydée (8OxoGuo) dont (**p>0,05**). En revanche la comparaison du ratio (**8OxoGuo/Guo**) est statistiquement significative (**p=0,012**).

Il a été démontré que les niveaux de 8-OxoGuo pouvant résulter du renouvellement et/ou de la réparation de l'ARN, ou encore du pool de GTP, étaient significativement associés à l'exposition professionnelle au styrène et au benzène [16,187].

III.6.1. Relation avec les biomarqueurs d'exposition du benzène et du toluène

L'analyse des corrélations chez la population entière (N=141) a mis en évidence des corrélations entre le t,t-MA, S-PMA et S-BMA avec certains biomarqueurs de l'effet oxydatif des acides nucléiques.

En effet, le t,t-MA est fortement corrélé, aussi bien avec les bases nucléiques non modifiées de l'ARN (**Guo** : $r=0,453$, $p<0,0001$) et de l'ADN (**dGuo** : $r=0,572$, $p<0,0001$) qu'avec les bases oxydées des acides nucléiques respectifs, **8OxoGuo** ($r=0,285$, $p<0,0001$) et **8OxodGuo** ($r=0,439$, $p<0,0001$).

Les corrélations avec le S-PMA ont montré des coefficients (rho de spearman) plus faibles, **Guo** ($r=0,201$, $p=0,017$), **dGuo** ($r=0,221$, $p=0,008$) et **8OxodGuo** ($r=0,231$, $p=0,006$).

Cette constatation peut être expliquée par les corrélations que représente le S-BMA avec ces mêmes biomarqueurs dont les coefficients de corrélation sont : **dGuo** ($r=0,252$, $p=0,003$), **Guo** ($r=0,319$), **8OxoGuo** ($r=0,384$) et **8OxodGuo** ($r=0,384$) avec $p<0,0001$ pour les trois. Ces relations se sont avérées plus fortes que celle du S-PMA, renforçant ainsi l'hypothèse de la compétition émanant de la co-exposition entre le toluène et le benzène rapportée par plusieurs auteurs et expliquée précédemment.

Afin de mieux cerner les tendances observées chez **les exposés**, nous avons focalisé l'analyse sur les biomarqueurs ayant présenté des différences significatives entre sujets exposés et non exposés (**Guo**, **dGuo** et **8OxodGuo**).

En effet, les dGuo et Guo n'ont montré une corrélation qu'avec le t,t-MA (**dGuo** : $r=0,541$, **Guo** : $r=0,383$, $p<0,0001$) ainsi qu'une corrélation plus modérée avec le S-BMA (**dGuo** : $r=0,217$, **Guo** : $r=0,311$, $p=0,03$), sans lien significatif avec le S-PMA.

En revanche le AP **8OxodGuo** a présenté une faible corrélation avec le S-PMA ($r=0,202$, $p=0,043$) comparée à ses corrélations avec le t,t-MA et S-BMA ($r=0,444$ et $r=0,407$) toutes deux hautement significatives ($p < 0,0001$).

La conduite des régressions multiples progressives chez les exposés a affirmé ces observations pour les valeurs AP du **8OxodGuo** comme variable dépendante, indiquant une influence hautement significative ($p<0,0001$) du AP **t,t-MA** ($\beta=0,242$) et de la AP **créatinine** ($\beta=0,443$) et un coefficient de régression $R^2=0,330$. Cependant **36,7%** ($R^2=0,367$) des valeurs de AV **8OxodGuo** se sont avérées être influencées modérément par le AV **S-PMA** ($\beta=0,200$) et fortement par la AV **créatinine** ($\beta=0,559$) ($p<0,0001$).

Le modèle généré pour le **8OxoGuo en AP** ($R^2=0,326$, $p<0,0001$) a conclu à une influence modérée par l'ancienneté, la créatinine, et le S-BMA.

Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs études ayant rapporté que le **8OxodGuo** était significativement plus élevé chez les sujets exposés au carburant que les non exposés

[9,16,64,186,188]. Nos corrélations entre le 8OxodGuo et le t,t-MA sont en accord avec celles Manini et al. 2010 (0,462, $p < 0,01$) [16] et Göethel et al. 2014 ($r = 0,439$, $p < 0,001$) [15].

L'étude de Fenga et al. 2017, conduite chez 80 pompistes et 63 sujets non exposés, a conclu également à une corrélation significative entre le 8OxodGuo et le t,t-MA (0,377, $p < 0,0001$) [188], sachant que pour cette étude, le t,t-MA a été analysé par HPLC-DAD et le 8OxodGuo par méthode immuno-enzymatique (ELISA), ces résultats démontrent que même avec des techniques moins sensibles que l'UPLC-MS/MS, le lien entre ces deux biomarqueurs peut être prouvé.

Bien que notre étude ait révélé une faible corrélation impliquant le S-PMA, des résultats similaires ont été rapportés par Pilia et al. (2021) ($r = 0,222$, $p = 0,043$), sans que le rôle potentiel du S-BMA, en tant que biomarqueur compétitif, n'ait été exploré [28]. En revanche, Andreoli et al. (2015) et Tranfo et al. 2017 soulignent que le S-PMA est un bon traceur des dommages oxydatifs aux acides nucléiques qui peuvent être détectés même à de très faibles niveaux d'exposition [17,189].

Il a été également remarqué, que tous les biomarqueurs sont corrélés entre eux, le coefficient de corrélation variait entre ($0,218 < r < 0,659$) et négativement avec la créatinine ($-0,235 < r < -0,594$). Manini et al. 2010 et Andreoli et al. 2011 ont avancé des résultats similaires [16,123], indiquant qu'il y a un remaniement permanent entre les différentes bases.

III.6.2. Influence du tabagisme sur les biomarqueurs oxydatifs

La comparaison entre les fumeurs et non-fumeurs totaux (F=49, NF=68) et au sein du groupe des exposés uniquement (EX.F=36, EX.NF=45) n'a révélé aucune différence significative ($p > 0,05$), pareillement pour la comparaison de la catégorie des fumeurs des deux groupes (EX=38, NE=14).

Cependant la comparaison chez les non-fumeurs (EX=63, NE=26) a ressorti des différences concernant la Guo (**$p = 0,007$**) et dGuo (**$p = 0,013$**), les médianes EX et NE sont respectivement **(73,24 et 46,22 $\mu\text{g/g créa}$)** et **(1,97 et 1,34 $\mu\text{g/g créa}$)**.

Afin d'affiner les résultats nous avons effectué la comparaison en fonction des statuts tabagiques répartis selon les valeurs de la cotinine urinaire, à savoir, les **vrais non-fumeurs** (déclaré NF et cot < 100 $\mu\text{g/g créa}$) (EX=45, NE=23), les **vrais fumeurs** (déclaré F et cot > 100 $\mu\text{g/g créa}$) (EX=36, NE=13) et les consommateurs du **tabac à chiquer** (déclaré NF et cot > 100 $\mu\text{g/g créa}$) (EX=18, NE=3).

Chez les **vrais non-fumeurs**, des différences statistiquement significatives ont été observées pour la **Guo** ($p = 0,005$) et la **dGuo** ($p = 0,014$), et une différence significative a également été mise en évidence pour la **8-oxodGuo** ($p = 0,029$). Les médianes de cette dernière étaient de **2,72 $\mu\text{g/g créa}$** chez les exposés (intervalle : **0,98–6,37 $\mu\text{g/g créa}$**) contre **1,77 $\mu\text{g/g créa}$** chez les non-exposés (intervalle : **0,38–3,4 $\mu\text{g/g créa}$**).

Ces résultats mettent en évidence un effet oxydatif attribuable à l'exposition professionnelle seule, indépendamment du tabagisme, avec un niveau de 8OxodGuo environ **1,5 fois** plus élevé chez les sujets exposés par rapport aux non-exposés.

L'étude des corrélations entre biomarqueurs d'effet oxydatif et biomarqueurs d'exposition a révélé des corrélations positives chez les différents statuts tabagiques des deux groupes.

La **8OxodGuo** a montré des fortes corrélations hautement significatives avec le t,t-MA chez les **exposés fumeurs** ($N=37$, $r=0,648$, $p<0,0001$) et **non exposés non-fumeurs** ($N=23$, $r=0,505$, $p<0,001$), en revanche elle est plus modérée chez les **exposés non-fumeurs** ($N=45$, $r=0,314$, $p=0,036$) et non significative chez les non exposés fumeurs.

Avec le **S-PMA** et **S-BMA**, elle a présenté des corrélations chez les **exposés fumeurs** (**S-PMA : $r=0,346$, $p=0,033$ – S-BMA : $r=0,477$, $p=0,002$**) et chez les exposés **non-fumeurs** (**S-BMA : $r=0,339$, $p=0,023$**) et aucune chez les non exposés.

Concernant la **dGuo** et la **Guo**, nous avons remarqué qu'elles ont présenté des corrélations similaires avec le t,t-MA chez les différents sous-groupes : fumeurs exposés (**dGuo : $r=0,575$, Guo : $r=0,587$, $p<0,0001$**), non-fumeurs exposés (**dGuo : $r=0,538$, $p<0,0001$ - Guo : $r=0,342$, $p=0,022$) et non exposés non-fumeurs (**dGuo : $r=0,584$, $p=0,003$ – Guo : $r=0,641$, $p<0,001$) et uniquement avec le S-BMA chez les exposés fumeurs (**dGuo : $r=0,002$, $p=0,002$ – Guo : $r=0,579$, $p<0,0001$**).****

Aucun biomarqueur n'a révélé une corrélation avec la cotinine en AV et en AP, ces résultats ont été confirmés par l'absence d'influence de la cotinine lors des analyses de régression multiples réalisées. Et aucune différence significative n'a été détectée entre les vrais fumeurs et les consommateurs du tabac à chiquer des deux groupes.

Les tendances du 8OxodGuo sont confirmées par des modèles progressifs de régression multiples aussi bien chez les fumeurs et non-fumeurs.

Chez les exposés fumeurs, la **8OxodGuo** serait dépendante du t,t-MA selon un béta standardisé de **0,566, R²=301, p<0,0001**, et chez les non exposés fumeurs, le modèle a révélé une influence par la créatinine selon un béta standardisé de **0,644, R²=0,334, p=0,013**.

Chez les non exposés non-fumeurs, c'est le t,t-MA qui semble influencer le **8OxodGuo** (Béta=0,505, R²=0,304, 0,014), le **dGuo** (Béta=0,573, R²=297, p=0,002) et le **Guo** (Béta=0,529, R²=0,246, p=0,008).

Il a été remarqué que la créatinine est le prédicteur le plus influençant dans les différents modèles de régression multiple conduits, **dGuo (13%), Guo (10,4%), 8OxodGuo (28,8%), 8OxoGuo (17%)**, des résultats similaires ont été mentionnés dans l'étude de Andreoli et al. 2011 qui ont trouvé une influence de la créatinine de 11,35 et 38% sur la 8OxoGua et 8OxodGuo [123].

Le tabac à chiquer, tout comme le tabagisme passif constituent une source non négligeable de stress oxydatif. Plusieurs études ont montré que ces formes d'exposition au tabac peuvent induire des dommages oxydatifs à l'ADN similaires à ceux observés chez les fumeurs actifs et sont même incriminés dans la cancérogenèse selon une revue systématique récente (Gil et al. 2024) [190]. L'exposition à la fumée de tabac environnementale a été associée à une augmentation des lésions oxydatives de l'ADN, telles que la formation de 8OxodGuo. De même, les composés toxiques présents dans le tabac à chiquer, notamment les nitrosamines et les métaux lourds peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), contribuant ainsi à l'instabilité génomique [50].

La 8OxodGuo est le biomarqueur urinaire le plus étudié des acides nucléiques oxydés, bien que les résultats obtenus soient souvent inconsistants. Ces divergences ont été attribuées à la diversité des méthodes analytiques utilisées par les chercheurs, ce qui a conduit à d'importants efforts pour harmoniser les protocoles de dosage [53,55].

Dans notre échantillon, la cotinine n'a pas influencé le 8OxodGuo dans les modèles de régressions multiples, ces résultats sont similaires à certaines études (Kimura et al. 2006, Manini et al. 2008, Manini et al. 2010, Andreoli et al. 2011, Buonauro et al. 2020, Pilia et al. 2021) [16,28,123,187,191,192], mais d'autres, ont observé des taux plus élevés de 8OxoGuo et 8OxodGuo chez les fumeurs (Kanaya et al. 2007, Folsinki et al. 2007, Graille et al. 2020) [124,193,194] et que le tabagisme était associé à 50% des dommages oxydatifs de l'ADN [50].

Il a été constaté que des facteurs constitutionnels, tels que le sexe, la perte de poids, l'hygiène alimentaire, l'indice de masse corporelle, les facteurs génétiques et l'efficacité des systèmes de

réparation de l'ADN ainsi que les expositions environnementales telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie, influencent l'excrétion urinaire de ces biomarqueurs [53,64,124]. Il faut noter que le 8-OxodGuo urinaire ne provient pas uniquement de la réparation de l'ADN endommagé, mais aussi de l'incorporation accidentelle de nucléotides oxydés (8-oxodGTP) dans l'ADN, suivie de leur élimination [9,186,195].

Le Tableau 102 montre une comparaison entre les données descriptives de notre étude et celle de Tranfo et al. 2017, ayant utilisé la LC-MS/MS et étant réalisée chez 446 individus sains de la population générale italienne composés de 93 fumeurs et 353 non-fumeurs [17].

La comparaison montre clairement que nos résultats concernant les sujets exposés, sont nettement inférieurs à ceux de l'étude en question. Ces différences peuvent être liées au nombre plus réduit de notre échantillon, toutefois, Tranfo et al. ont abouti à la même conclusion que nous, en ne trouvant aucune différence significative entre les fumeurs et les non-fumeurs pour les trois biomarqueurs oxydatifs analysés. Néanmoins ils se sont basés sur les la corrélations entre le 8OxodGuo et le S-PMA et la cotinine pour juger de l'existence d'une influence liée au tabagisme qui a pu être masquée par les facteurs environnementaux et professionnels.

Tableau 102 : Tableau comparatif des résultats des produits oxydés de la guanine de notre étude et ceux de la littérature chez les fumeurs et non-fumeurs

	Notre étude (chez les exposés)				Etude de Tranfo et al. 2017 [17] (pop générale)			
Biomarqueur	Moy±ET	Méd	Min	Max	Moy±ET	Méd	Min	Max
	Cotinine <100 µg/g créa + NF (N=45)				Cotinine <100 µg/g créa (N=353)			
8OxoGua	19,78±19,90	14,06	2,60	89,76	38,11±38,79	26,51	1,9	262,46
8OxodGuo	2,75±1,43	2,51	0,98	6,73	7,8±3,53	7,2	2,82	19,8
8OxoGuo	4,41±2,87	3,28	0,47	15,91	12,15±5,72	11,66	3,72	31,77
	Cotinine > 100 µg/g créa + F (N=36)				Cotinine >100 µg/g créa (N=93)			
8OxoGua	22,56±16,36	18,55	3,12	73,57	31.32±23,9	25,47	1,71	115,18
8OxodGuo	2,86±1,67	2,50	0,59	6,71	7,9±3,36	7,48	1,91	17,75
8OxoGuo	3,38±1,64	3,10	0,78	5,97	12,23±5,2	11,3	2,19	23,98

Toutes les valeurs sont en µg/g créa

Des données ont indiqué que la supplémentation en antioxydants comme (acétate de D-alpha-tocophéryle, acide ascorbique, coenzyme Q10) n'a pas diminué le taux d'excrétion urinaire du 8OxodGuo chez les fumeurs, en revanche, quatre semaines de cessations de fumer a conclu à 21% de baisse du taux urinaire de ce biomarqueur [50].

III.6.3. Influence du moment du prélèvement (comparaisons AV ET AP)

Les comparaisons entre les valeurs AV et AP chez les exposés totaux (N=101), les fumeurs (N=38), les non-fumeurs (N=6) n'ont révélé aucune différence significative.

La 8OxodGuo est plus élevée en AP (médiane 2,4 $\mu\text{g/g}$ créa) qu'en AV (médiane 2,11 $\mu\text{g/g}$ créa) mais cette différence est non significative.

Cependant les valeurs AV de la Guo, dGuo et la 8OxodGuo, en plus des corrélations avec le t,t-MA et S-BMA comme en AP, ont montré des corrélations avec le S-PMA, dont les valeurs respectives de r et p sont (0,220 et 0,027), (0,240 et 0,016) et (0,445 et <0,0001), contrairement aux valeurs AP précédemment mentionnées. Le AV 8OxoGuo, comme en AP, a été corrélé uniquement avec le AV t,t-MA (0,326, $p < 0,001$) et le AV S-BMA ($r = 0,361$, $p < 0,0001$).

Cette corrélation du 8OxodGuo avec le S-PMA en AV peut être soit due soit à son effet plus cumulatif et temps de demi-vie plus lent, soit au tabagisme.

Mais selon Andreoli et al. (2011) ont démontré qu'aucun des dérivés de la guanine ne présentait de variation significative au cours de la journée. Ce constat revêt une importance particulière pour les pratiques de biomonitoring, car il suggère que le moment du prélèvement urinaire n'est pas un facteur critique dans l'évaluation de l'oxydation des acides nucléiques [123]. Cependant Lovreglio et al. (2020), les biomarqueurs urinaires de dommages oxydatifs étaient significativement plus élevés en fin de poste qu'en avant-poste pour la 8-oxoGuo et la 8-OxodGuo ($p < 0,001$) [9].

III.6.4. Influence de la profession sur les biomarqueurs oxydatifs (comparaison entre pompistes et mécaniciens)

L'analyse des corrélations des biomarqueurs de l'effet oxydatif avec les biomarqueurs d'exposition du benzène chez les pompistes et mécaniciens a montré plusieurs similarités et des coefficients de corrélations très proches confirmant ainsi les comparaisons entre biomarqueurs d'exposition suscités, et suggérant une exposition similaire des deux sous-groupes.

La seule différence réside dans les corrélations du Guo et dGuo avec le S-BMA qui sont modérées chez les pompistes ($r = 0,405$ et $r = 0,335$) et non significatives chez les mécaniciens.

La comparaison des pompistes selon la géolocalisation de leurs pompes à essence a révélé des différences statistiquement significatives concernant le AV ($p = 0,027$) et AP ($p = 0,014$) 8OxoGuo ainsi que son ratio en AV ($p = 0,023$) et le AP 8OxoGua ($p = 0,028$) dont les médianes

se sont révélées être plus élevées chez les travailleurs des zones à faible trafic routier que celles avoisinant un trafic dense.

Le **8OxodGuo** est fortement associé au **t,t-MA** ($r=0,741$, $p<0,0001$) et au **S-PMA** ($r=0,466$, $p=0,008$) chez les pompistes de la zone d, alors que ces corrélations sont non significatives pour la zone f.

Andreoli et al. 2015 ont souligné que les biomarqueurs d'oxydation de l'ADN sont dépendants des niveaux d'urbanisation [189].

III.6.5. Influence de l'âge, l'ancienneté au travail et le nombre d'heures travaillées

La comparaison entre les deux groupes selon les tranches d'âge a révélé une distinction plus marquée pour la catégorie (≥ 51 ans) pour les trois biomarqueurs suscités. En effet, les valeurs de p sont : **0,019** pour la **dGuo**, **0,035** pour la **Guo** et concernant la **8OxodGuo**, p est plus bas avec une valeur de **0,035**. La comparaison est non significative entre les autres tranches d'âge.

Le **8OxoGuo** est l'unique produit qui a présenté une corrélation significative avec l'âge ($r=0,166$, $p<0,0001$) et l'ancienneté ($r=0,231$, $p=0,006$) chez toute la population d'étude. L'analyse des corrélations chez les exposés et les non exposés chacun à part, n'a révélé aucune corrélation avec l'âge et une corrélation avec l'ancienneté chez les exposés ($r=0,241$, $p=0,015$).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Andreoli et al. (2011), selon lesquels seuls la 8-OxoGua et la 8-OxoGuo présentaient une association significative avec l'âge ($r = 0,197$; $p<0,001$ et $r=0,280$; $p<0,0001$, respectivement) [123] et ceux de Tranfo et al. 2019 qui ont conclu à une influence significative de l'âge élevé sur le 8OxoGuo. En revanche, Pilia et al. 2021 a rapporté que l'âge était un prédicteur significatif du 8OxodGuo.

En effet, une augmentation du stress oxydatif liée à l'âge a été largement documentée dans la littérature, expliquée par la réduction de l'efficacité des systèmes antioxydants et la modification possible de la fonction mitochondriale. D'autre part, une réduction dépendante de l'âge de hOGG1, la principale enzyme impliquée dans l'élimination de la 8-Oxoguanine, a également été signalée, ce qui peut conduire à l'accumulation de produits d'oxydation dans l'ADN [47,123].

De plus, la localisation cytoplasmique de l'ARN, combinée à ses propriétés structurales (simple brin ; bases non protégées ni par des liaisons hydrogène ni par des protéines structurales), le rend plus vulnérable aux agressions oxydatives comparativement à l'ADN.

Les isoenzymes du cytochrome P450, impliquées dans la biotransformation de phase I du benzène et du styrène et localisées dans le réticulum endoplasmique, pourraient être responsables de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant à l'oxydation de l'ARN cytoplasmique, de plus aucun mécanisme de réparation de l'ARN n'a été à ce jour rapporté [9,123,196].

Nos résultats sont cohérents avec l'étude de Fenga et al. 2017, qui a rapporté que les corrélations du 8OxodGuo sont plus fortes avec d'ancienneté ($r=0,312$, $p<0,01$) qu'avec l'âge ($r=0,242$, $p<0,05$) et sont plus robustes avec les biomarqueurs d'exposition du ($p<0,001$) [188].

La comparaison des valeurs des six biomarqueurs d'oxydation de la guanine entre les différentes tranches d'ancienneté n'a pas révélé de différences significatives.

Des modèles de régression multiple progressive chez les exposés non-fumeurs du **AP 8OxoGuo** et **AP 8OxodGuo** en tant que variable dépendante ont révélé une influence par l'**ancienneté** (Béta standardisés respectifs **0,421** et **0,313**), et les coefficients de régression ajustés sont de **$R^2=0,432$ et $0,342$** avec **$p<0,0001$** .

L'étude de Moro et al. (2019) a trouvé que tous les biomarqueurs du stress oxydatif, d'effet immunologique et inflammatoire étaient corrélés aux nombre d'années d'exposition [7]. Et Butt et al. 2017 ont trouvé lors de la comparaison basée sur l'ancienneté professionnelle (<10 ans vs >10 ans) que les fréquences des cellules micronuclées et binuclées étaient plus élevées chez les travailleurs ayant plus de 10 ans d'expérience par rapport à ceux ayant moins de 10 ans [10].

Parmi tous les biomarqueurs oxydatifs, le **AV 8OxodGuo** était le seul à être corrélé avec le nombre d'heures travaillées par jour (**$r=0,274$, $p=0,006$**).

Xiong et al. 2016 ont prouvé qu'une exposition prolongée à de faibles niveaux de benzène pourrait réduire la capacité antioxydante et augmenter le risque de dommages à l'ADN chez les pompistes travaillant dans les stations-service [197].

Les niveaux urinaires de 8-OxodGuo représentent l'une des lésions de l'ADN les plus étudiées, et constituent un biomarqueur bien établi, indicatif de dommages à l'ADN à court terme. Nos résultats confirment qu'il représente donc un biomarqueur approprié pour évaluer les altérations de l'ADN induites par l'exposition à des agents potentiellement cancérigènes pour l'homme.

Certains auteurs ont mentionné que la 8OxoGuo urinaire, qui reflète l'oxydation de l'ARN, semble être le biomarqueur le plus adapté pour détecter des effets réversibles à court terme [186].

Certaines études ont limité leurs analyses aux deux nucléosides oxydés (8-OxodGuo et 8-OxoGuo), car la 8OxoGua présente une variabilité beaucoup plus importante et une corrélation plus faible avec les autres paramètres d'exposition. Quand d'autres se concentrent uniquement sur la 8-OxodGuo, qui est de loin la plus étudiée, notamment dans les études cliniques, et qui montre plus fréquemment une corrélation avec des biomarqueurs du cancer ou d'autres indicateurs biologiques.

Ces résultats suggèrent qu'une exposition chronique à faible dose au benzène, comme celle observée chez les pompistes et mécaniciens, peut induire des dommages oxydatifs à l'ADN, comme en témoigne l'altération des niveaux de 8OxodGuo. Ce composé pourrait ainsi constituer un biomarqueur non invasif de dommages génotoxiques précoces chez les sujets exposés [188].

Plusieurs études ont prouvé le lien entre les taux faibles du benzène (<1ppm) et les effets génotoxiques diverses, tels que les micronoyaux, les aberrations chromosomiques, les comètes avec le 8OxodGuo (Fracasso et al. 2010, Butt et al. 2017, Fenga et al. 2017, Moro et al. 2019, Costa Amara et al. 2019, Zhou et al. 2020, Buonauro et al. 2020, Poça et al. 2021, Elkama et al. 2024) [7,10,31,74,100,120,122,188,192] et que les patients cancéreux excrétaient des niveaux significativement élevés de 8OxodGuo et 8OxoGuo [8,53,123], d'autres ont mentionné qu'il existe des preuves que l'oxydation de l'ADN est particulièrement associée au cancer, tandis que l'oxydation de l'ARN semble plus associée aux maladies neurodégénératives et au diabète [185].

Wang et al. 2024 ont mentionné dans leurs revue systématique des effets tels que une augmentation du nombre de copies des mitochondries, une prolongation des télomères, une altération de la réponse de réparation des dommages à l'ADN (DDRR), des perturbations de l'expression dans les ARN non codants et des changements épigénétiques [73].

III.7. Discussion des biomarqueurs d'effet épigénétique

Pour rappel, la **méthylation** de l'ADN consiste en l'ajout de groupes méthyle (CH₃) aux bases cytosine de l'ADN, souvent au niveau des îlots CpG, qui sont des régions riches en cytosine et guanine, opération catalysée par l'ADN méthyltransférase (DNMTs). La méthylation est associée à la répression de l'expression génique [137].

La **déméthylation** se fait par les enzymes de la famille **TET (Ten Eleven Translocation)** convertissent la 5-Méthylcytosine (5MeCyto) en 5-HydroxyMéthylCytosine (5OHMeCyto), puis en 5-formylCytosine (5fC) et 5-CarboxyCytosine (5caC) (voir Figure 30), amorçant la déméthylation active. Des données suggèrent que la déméthylation active de l'ADN implique des mécanismes de réparation de l'ADN, notamment les voies de réparation par excision de base (BER) et de réparation par excision de nucléotides (NER). Ces bases modifiées sont ensuite reconnues et excisées par des glycosylases spécifiques (comme **TDG**), puis remplacées par des bases non méthylées via la voie BER [198].

La déméthylation influence la régulation (répression ou activation) des gènes et divers processus biologiques comme le développement embryonnaire, différenciation cellulaire, neurodéveloppement mais aussi l'initiation et la progression des cancers [199].

Elle est utilisée dans le diagnostic de diverses maladies, notamment le cancer, où des schémas spécifiques de méthylation peuvent indiquer la présence de la maladie. Les transposons sont des séquences d'ADN qui peuvent se déplacer et provoquer des mutations. La méthylation empêche ces éléments de s'activer, protégeant ainsi l'intégrité du génome.

Dans notre étude, la comparaison entre les sujets exposés et non exposés a mis en évidence une différence significative de la cytosine libre **AP Cyto (p= 0,015)** avec des médianes respectives de **104,29 µg/g créa** et **81,87 µg/g créa**, et de la cytosine méthylée **AP 5MeCyto (p=0,01)** toujours supérieure chez les exposés que chez les non exposés (médianes : **EX : 27,68 µg/ g créa** [4,95 – 198,2] et **NE : 19,55 µg/ g créa** [3,17 – 72,88]), cependant la différence du **ratio** est non significative (**p > 0,05**).

Concernant le **5OHMeCyto**, la valeur du ratio est significativement (**p<0,001**) plus basse chez les exposés (**médiane = 0,037**) que chez les non exposés (**médiane= 0,059**) car les valeurs de la Cyto sont plus élevées.

Ces résultats peuvent renseigner sur un effet de déméthylation chez les exposés comme il a été rapporté dans la littérature.

La première étude ayant investigué les changements épigénétiques induits par l'exposition aux faibles taux de benzène est celle de Bollati et al. 2007. Réalisée chez 78 pompistes et 58 sujets non exposés sur échantillons sanguins (lymphocytes) par pyroséquençage après PCR sur ADN traité au bisulfite.

Les auteurs ont observé **une hypométhylation globale de l'ADN**, mesurée par la méthylation des séquences répétées LINE-1 et Alu-1 (dont le rôle est crucial à la stabilité génomique) chez les sujets exposés par rapport aux témoins, l'étude de Rota et al. 2018 chez 89 pompistes a rapporté des résultats similaires [114,200].

L'étude de Lovreglio et al. 2020, a mentionné une augmentation des **5MeCyto, 1MeGua et 7MeGua en AP** [9].

Parallèlement, une **hyperméthylation spécifique du gène suppresseur de tumeur p15** a été rapportée, avec des niveaux deux fois plus élevés chez les travailleurs exposés, en particulier les pompistes. En effet, le promoteur p15 présente une méthylation faible ou nulle dans les cellules normales et est hyperméthylé au fur et à mesure que la cellule progresse à travers le processus en plusieurs étapes menant au développement du phénotype malin complet [114]. La **LAM** est l'un des rares néoplasmes à présenter une **hyperméthylation de p15**, contribuant probablement à la prolifération cellulaire dérégulée [58].

Par ailleurs l'étude Silvestre 2020, a détecté une hyperméthylation des deux gènes **p14^{ARF}** et **p16^{INK4A}**, très bien caractérisés comme des gènes suppresseurs de tumeurs, significativement élevée chez le groupe des pompistes par rapport au groupe non exposé ($p=0,004$ et $p<0,001$, respectivement), celle du p16 est corrélée aux aberrations chromosomiques [59].

Cependant l'étude de Seow et al. 2012 réalisée chez des travailleurs en pétrochimie (N=158) n'a souligné aucune différence significative de méthylation des transposons Line-1 et Alu entre les exposés et non exposés [200,201].

Ces résultats suggèrent que l'exposition chronique aux BTEX en général et au benzène en particulier, peut induire à la fois une instabilité génomique par hypométhylation globale et une inactivation épigénétique de gènes clés par hyperméthylation ciblée, deux mécanismes potentiellement impliqués dans la cancérogenèse [59,114].

III.7.1. Relation avec les biomarqueurs d'exposition

Les deux nucléosides méthylés de l'ARN, le **5MeCyt** et **7MeGuo** ont également présenté des valeurs significativement supérieures chez les exposés que les non exposés (**p=0,035** et **p=0,04**). En revanche ceux de l'ADN, le (**dCyt**), le (**5MedCyt**) et le (**5OHMedCyt**) sont sans significativité.

Le t,t-MA serait hautement corrélé (**p<0,0001**) à tous ces produits (**0,276 < r < 0,518**) chez tous les sujets de l'étude, la corrélation maximale était avec le **7MeGuo (r=0,518)** suivie de celle avec le **5MeCyto (r=0,425, p<0,0001)**.

En revanche, le S-BMA présente plus de corrélations que le S-PMA qui serait uniquement associé avec le **5MeCyto (r=0,295, p<0,0001)**.

Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Seow et al. 2012 qui ont observé des associations uniquement entre le S-PMA et la méthylation de l'ADN et aucune avec le t,t-MA [201]. Et Lovreglio et al. 2020, ont approuvé l'association de le 5MeCyto avec le S-PMA.

La forte corrélation observée entre le t,t-MA et les nucléosides méthylés de l'ARN, en particulier la 7MeGuo, suggère que l'exposition au benzène pourrait influencer directement les processus de méthylation post-transcriptionnelle. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Liu et al. 2014 qui reconnaissent la méthylation de l'ARN comme un mécanisme épigénétique dynamique, impliqué dans la régulation de la stabilité, de la traduction et du transport des ARN messagers [196].

Ainsi, les altérations de ces marques pourraient refléter une réponse cellulaire sensible à l'exposition environnementale, positionnant la méthylation de l'ARN comme un biomarqueur émergent d'effet en contexte professionnel.

III.7.2. Lien avec l'âge et l'ancienneté

La comparaison entre les deux groupes selon l'âge, a révélé des valeurs significativement plus élevées chez la tranche de sujets (**≥ 51 ans**) pour le **7MeGuo (EX : 24,25 µg/g créa, NE : 14,21 µg/g créa, p=0,049)**, **dCyt (EX : 1,9 µg/g créa, NE : 0,65 µg/g créa, p=0,012)** et **5OHMedCyt (EX : 1,3 µg/g créa, NE : 0,45 µg/g créa, p=0,009)**.

Parmi l'ensemble des biomarqueurs étudiés, seul le **5OHMeCyto**, un intermédiaire de la déméthylation active de l'ADN, a montré une corrélation significative avec l'âge chez les sujets exposés (**r = 0,250 ; p = 0,012**). Cette association a été confirmée par l'analyse de régression

multiple, où l'âge apparaît comme un facteur prédictif indépendant ($\beta = 0,243$; $p = 0,04$), bien que la variance expliquée reste modeste ($R^2 = 0,05$).

De manière intéressante, cette relation est nettement renforcée chez les sujets non exposés mais fumeurs, où l'effet de l'âge sur le 5OHMedCyt devient particulièrement marqué ($\beta = -0,828$; $R^2 = 0,674$; $p < 0,0001$).

Ce résultat suggère que le vieillissement, combiné au tabagisme, pourrait moduler l'activité des enzymes TET impliquées dans la déméthylation, entraînant une altération du profil épigénétique avec l'âge, même en l'absence d'exposition professionnelle.

En ce qui concerne l'ancienneté au poste, celle-ci apparaît comme un facteur significatif influençant certains biomarqueurs épigénétiques. Une **relation négative** a été observée entre l'ancienneté et le 5OHMedCyt ($\beta = -0,233$; $R^2 = 0,248$; $p < 0,0001$), suggérant que la durée d'exposition pourrait être associée à une réduction de l'activité de déméthylation active de l'ADN, possiblement par épuisement enzymatique ou adaptation cellulaire prolongée.

À l'inverse, l'ancienneté est positivement corrélée à la 7MeGuo ($r=0,512$, $p<0,001$), ce lien est confirmé par un modèle de régression multiple ($\beta = 0,529$; $R^2 = 0,260$; $p < 0,0001$) incluant le S-BMA et la créatinine, renforçant l'hypothèse d'une accumulation progressive des altérations épigénétiques de l'ARN en lien avec la durée d'exposition. Cependant la comparaison entre les tranches d'ancienneté n'est pas significative.

Ces résultats suggèrent que l'ancienneté pourrait jouer un rôle double : réduction des mécanismes de réparation épigénétique de l'ADN, et accumulation de modifications post-transcriptionnelles de l'ARN, traduisant une empreinte biologique durable de l'exposition professionnelle.

Rappelons que l'ancienneté est également corrélée au nombre de symptômes rapportés ($r=0,288$, $p=0,028$), ces derniers sont significativement corrélés aux niveaux urinaires de 5MeCyto ($r = 0,261$; $p = 0,048$) ainsi que de dCyt ($r = 0,358$; $p = 0,006$) ainsi qu'avec le t,t-MA ($r=0,296$) et le S-PMA ($r=0,278$).

Il est important de noter que les niveaux du AP 5OHMeCyto sont supérieurs chez les sujets symptomatiques comparés aux sujets asymptomatiques ($p=0,002$), médianes respectives (**4,48 $\mu\text{g/g créa}$ et 2,58 $\mu\text{g/g créa}$**).

Ces corrélations suggèrent que les symptômes cliniques ressentis par les travailleurs exposés pourraient être en partie liés à l'exposition au benzène et à ses effets moléculaires profonds.

Ainsi, les symptômes rapportés par les travailleurs ne doivent pas être considérés comme de simples manifestations subjectives, mais comme des signaux biologiquement plausibles.

III.7.3. Lien entre biomarqueurs méthylés

Il a été remarqué que les biomarqueurs de cytosine méthylés et libres sont corrélés entre eux, le coefficient de corrélation variant entre $0,242 < r < 0,688$.

Cela peut indiquer que les processus biologiques sont interconnectés et pourrait signifier que l'augmentation des bases libres entraîne une augmentation parallèle des bases oxydées, ce qui peut refléter une **activité accrue de réparation de l'ADN**, où l'excès de bases libres provient de la réparation des bases endommagées ou bien une augmentation du catabolisme des nucléotides, liée au stress cellulaire ou à la toxicité environnementale.

III.7.4. Lien avec les biomarqueurs du stress oxydatif

Chez les exposés, le **AP 7MeGuo** et le **AP 5MedCyt** sont corrélés avec le **AP 8OxodGuo** ($r=0,343$ et $0,431$) tous deux avec $p<0,0001$.

Ces corrélations suggèrent une interaction étroite entre les altérations épigénétiques et les processus oxydatifs induits par l'exposition au benzène.

Cette hypothèse est appuyée par des travaux de Fenga et al. 2017 montrant que même à faibles doses, le benzène peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), capables d'activer plusieurs voies de signalisation intracellulaire telles que l'inflammation et l'apoptose. Ces voies jouent un rôle clé dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose, et sont également impliquées dans les mécanismes de leucémogénèse [188].

Ainsi, l'activation de ces cascades par le stress oxydatif pourrait contribuer à la dérégulation des marques épigénétiques observées, renforçant l'idée que la méthylation de l'ADN et de l'ARN pourrait constituer un pont mécanistique entre exposition environnementale et toxicité cellulaire.

III.7.5. Influence du tabagisme

Nous avons conduit une comparaison entre exposés (N=36) et non exposés (N=23) fumeurs (selon le seuil de cotinine) afin de vérifier l'effet de l'exposition dans un milieu oxydatif, il en est ressorti une différence significative pour le **dCyt** uniquement ($p=0,028$).

En revanche, la comparaison entre non-fumeurs exposés (N=45) et non exposés (N=23) selon le seuil de la cotinine, permet de ressortir l'effet exclusif de l'exposition sans l'influence du tabagisme actif et du tabac à chiquer, le **Cyto**, le **5MeCyt** et le **5OHMedCyt** ont montré des différences significatives (**p=0,014**, **p=0,005** et **p=0,048**) avec des médianes supérieures chez les exposés renforçant l'hypothèse de déméthylation de l'AND et ARN chez les exposés.

Afin de mieux cerner l'effet du tabagisme dans un contexte d'exposition similaire, nous avons comparé les fumeurs avec les non-fumeurs du même groupe (sujets exposés).

Les **fumeurs exposés (N=38)** auraient des valeurs supérieures que les non-fumeurs (N=63) du même groupe pour les biomarqueurs suivants : **AP 5MeCyto** (médianes **33,99 µg/g créa** et **24,28 µg/g créa**, **p=0,036**), le **AP dCyt** (médianes **2,13 µg/g créa** et **1,51 µg/g créa**, **p=0,009**), le **7MeGuo** (médianes **23,8 µg/g créa** et **30,13 µg/g créa**, **p=0,028**) et le ratio du **AP 5OHMedCyt** (**1,21** et **1,55**, **p=0,047**).

Nous avons conduit la même comparaison au sein du groupe des non exposés, afin de juger de l'influence de tabagisme seul, le **5OHMedCyt** serait deux fois supérieur chez les fumeurs (médiane **6,49 µg/g créa**) que les non-fumeurs (médiane **3,27 µg/g créa**).

L'analyse des corrélations a révélé que le **5MeCyto** et **7MeGuo** ont des corrélations avec le t,t-MA supérieures chez les fumeurs (**r=0,411** et **r=0,580**) que les non-fumeurs (**r=0,371** et **r=0,411**).

Le **5MeCyto** est corrélé au **8OxodGuo** (**r=0,535**, **p<0,001**) et le **8OxoGuo** (**r=0,388**, **p=0,016**) uniquement chez les fumeurs.

L'analyse des régressions multiples a révélé que la créatinine, comme pour les biomarqueurs oxydatifs, est le facteur le plus prédictif chez les exposés, les valeurs du Béta standardisé sont plus élevées chez les exposés fumeurs (**0,298 < B < 0,761**).

La **Cyt** est l'unique biomarqueur influencé par la cotinine selon un modèle incluant l'ancienneté et la créatinine (**B=0,281**, **R²=0,577**, **p<0,0001**).

Lovreglio et al. 2020 ont observé une dépendance positive des concentrations urinaires de 5MeCyto, 5MeCyt et 5MedCyt à la cotinine urinaire [9].

L'ensemble de ces résultats semble, en outre, être en accord avec les preuves antérieures dans la littérature d'un modèle de méthylation aberrant, consistant en une hypométhylation globale associée à une hyperméthylation des gènes onco-suppresseurs, en réponse à l'exposition à la

fumée de tabac [9,202]. En revanche, Bollati et al. 2007 n'ont trouvé aucune association avec la cotinine, le statut tabagique et le nombre de cigarettes fumées par jour [114].

III.7.6. Comparaison entre les valeurs AV et AP

Chez l'ensemble des exposés, la médiane du **AP 1MeGua** (**41,64 µg/g créa [6,82-167,22]**) est significativement supérieure (**p=0,032**) à celle en AV (**29,9 µg/g créa [5,46-284,25]**) et l'inverse pour le **5MeCyt** (**p=0,016**) dont les valeurs en AP (**6,21 µg/g créa [0,67-217,83]**) sont significativement inférieures à celles en AV (**6,48 µg/g créa [0,63-593,35]**) avec un ratio hautement significatif (**p<0,0001**).

Nos résultats sont similaires à ceux de Lovreglio et al. 2020 pour la 1MeGua,

Chez les fumeurs, les valeurs **AP 5MeCyto** sont significativement plus élevées (**p=0,036**) (médianes **33,99 µg/g créa** et **21,56 µg/g créa**) ainsi que le ratio du **7MeGuo** (**p=0,001**).

Tandis que chez les non-fumeurs, c'est le **5OHMedCyt** qui serait réduit en AP par rapport aux valeurs en AV (**p=0,02**).

Le ratio du **AP 5MeCyt** est statistiquement significatif chez les fumeurs (**p=0,006**) et non-fumeurs (**p<0,0001**).

L'analyse chez les pompistes uniquement, a fait ressortir une différence pour le **7MeGuo** (**p=0,008**) dont la médiane AP est égale à **27,33 µg/g créa** et en AV à **17,22 µg/g créa**.

III.7.7. Comparaison entre pompistes et mécaniciens et géolocalisation

Le **AP 5OHMeCyt** ainsi que son **ratio** ont présenté des médianes supérieures chez les pompistes comparés aux mécaniciens (valeurs de *p* respectives **0,006 et 0,005**) témoignant d'un mécanisme de déméthylation plus accru.

Ces résultats concordent avec nos résultats du ratio **t,t-MA / S-PMA** qui est environs **2,5** plus faible chez les pompistes que chez les mécaniciens en **AV (75,03 et 202)** et en **AP (91,54 et 226,46)** attestant d'une exposition plus forte.

Le **7MeGuo** a révélé des corrélations exclusives chez les pompistes avec le **t,t-MA (r=0,696, p<0,0001)**, le **S-PMA (r = 0,308 ; p = 0,018)** et la **S-BMA (r=0,449, p<0,0001)**.

A contrario, les ratios de bases méthylées sur bases libres tels que le **AV 7MeGua/Gua**, **AV 1MeGua / Gua** et le **AV 7MeGuo/Guo**, ont présenté des valeurs significativement supérieures chez les mécaniciens (valeurs de *p* respectives : **<0,0001, 0,004 et 0,008**). Ces différences peuvent être expliquées par le rythme de travail des mécaniciens (8H par jour durant 5 jours par semaine) qui influencerait les valeurs en avant-poste à la suite d'un effet cumulatif.

Les différentes voies d'absorption (inhalation versus cutanée) peuvent influencer la méthylation ou le renouvellement cellulaire, modifiant ainsi le rapport entre la forme méthylée et la forme native.

La comparaison des pompistes selon leur géolocalisation a révélé un paradoxe apparent entre exposition et réponse biologique. En effet, les niveaux d'exposition au benzène, évalués par les biomarqueurs urinaires **t,t-MA** et **S-PMA**, étaient significativement plus élevés chez les travailleurs en zone à trafic dense. Pourtant, les niveaux de **5MeCyt (en AV : p = 0,036 ; en AP : p = 0,009)** et de **5OHMedCyt (en AV et AP : p < 0,0001)** étaient plus faibles dans cette même zone que chez les pompistes en zone à trafic faible.

De plus, tous les ratios de bases méthylées sur bases libres étaient plus élevés chez les travailleurs en zone à faible trafic, suggérant une activité de déméthylation plus élevée chez ces derniers.

Toutefois, il est également possible que d'autres facteurs environnementaux ou professionnels présents en zone à trafic dense, tels que la co-exposition à d'autres solvants, les particules fines, ou le stress oxydatif chronique contribuent à induire une hyperméthylation de l'ADN et de l'ARN, en modulant l'activité des enzymes de méthylation (DNMTs) ou de déméthylation (TETs).

À la limite des connaissances actuelles, notre étude serait la première à avoir analysé ces biomarqueurs épigénétiques chez des mécaniciens, mettant en lumière une population professionnelle jusqu'ici peu étudiée dans ce contexte.

Nos résultats mettent en évidence une vulnérabilité biologique accrue chez les pompistes, traduite par une déméthylation significative de l'ADN et de l'ARN en lien avec une exposition plus intense au benzène et toluène.

Cette altération épigénétique, associée à des corrélations fortes entre biomarqueurs d'exposition et d'effet, souligne l'importance de considérer cette catégorie professionnelle comme particulièrement à risque. Ces données appellent à un renforcement des mesures de prévention, de surveillance biologique, et de reconnaissance de leur exposition dans les politiques de santé au travail.

Les études expérimentales et épidémiologiques sur les altérations de la méthylation de l'ADN induites par les expositions professionnelles sont de plus en plus nombreuses, et suggèrent que la méthylation, tant globale que gène-spécifique, est fortement affectée. Ces marqueurs épigénétiques pourraient ainsi représenter des biomarqueurs prometteurs pour l'évaluation des risques professionnels à l'avenir [9,58,59,196,200].

Ces études ont été en majorité menées sur du sang périphérique et peu d'études ont analysé les produits urinaires des acides nucléiques méthylés. La première étude publiée pour ces biomarqueurs urinaires est celle de Lovreglio et al. 2020 réalisée auprès de 93 travailleurs d'une cockerie italienne.

Nos résultats convergent avec ceux de cette dernière concernant le **5MeCyto** comme biomarqueur sensible et potentiel qui a pu différencier les différents groupes étudiés selon l'exposition et selon le statut tabagique, mais aussi, notre étude révèle que **7MeGuo** serait également un biomarqueur très pertinent dans un contexte de faibles expositions au benzène.

Notre étude se distingue d'être, à la limite de nos connaissances, la première publiée qui a dosé le 5OHMeCyto et le 5OHMedCyt, biomarqueurs intermédiaires de déméthylation de l'ARN et l'ADN, et qui ont fourni des données intéressantes confirmant les hypothèses déjà avancées au sujet de l'hypométhylation globale chez les sujets exposés aux carcinogènes.

Toutefois, il est important de souligner que la portée biologique des indicateurs de méthylation des acides nucléiques quantifiés dans cette étude reste encore incertaine. Contrairement aux modifications épigénétiques évaluées directement sur les séquences d'ADN, l'excrétion urinaire des nucléotides et nucléosides méthylés sous forme libre traduisent la quantité éliminée

par l'organisme. Ainsi leur concentration urinaire pourrait être influencée par plusieurs facteurs interdépendants, notamment l'intensité de l'exposition, l'efficacité des mécanismes de réparation (et leurs polymorphismes génétiques), le rythme du renouvellement cellulaire, l'exposition à d'autres xénobiotiques, ou par des facteurs endogènes et exogènes non explorés dans la présente étude.

Des recherches complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces altérations.

Contrairement à l'étude de Lovreglio et al. (2020), qui n'a pas spécifiquement pris en compte les scénarios de co-exposition à plusieurs composés organiques volatils. Notre travail met en évidence le rôle potentiel du toluène comme facteur contributif aux altérations épigénétiques au moyen de la détection de nombreuses corrélations avec le S-BMA justifiant des corrélations faibles avec le S-PMA.

Ces résultats soulignent l'importance d'adopter une approche intégrée tenant compte de la complexité des expositions pour interpréter les biomarqueurs épigénétiques de manière pertinente.

III.8. Discussion des biomarqueurs de l'effet hématologique

Nous avons étudié les huit paramètres de la FNS les plus rapportés dans la littérature, à savoir, les globules rouges (GR), hémoglobine (HB), hémocrite (Hct), globules blancs (GB), lymphocytes (Lymph), neutrophiles (Neutro), monocytes (Mono) et plaquettes (Plq).

III.8.1. Lien avec les biomarqueurs d'exposition et les données clinico-professionnelles

Aucune différence significative n'a été rapportée entre les sujets exposés (N=65) et non exposés (N=37) pour tous les paramètres étudiés.

Cependant, la comparaison entre les trois groupes d'exposition est très significative pour l'HB, GR, GB et Hct. La comparaison selon la répartition par rapport aux seuils de normalité a révélé une différence légèrement significative ($p=0,045$) concernant les GR avec une moyenne plus faible chez les exposés ($4,68 \pm 0,58$ T/L) et les pompistes ($p=0,027$).

En effet, 20% des exposés (N=13/65) ont des valeurs inférieures au seuil de 4,28 T/L de GR contre 5,4% chez les non exposés (N=2/37).

Ces données sont tout aussi valables pour l'HB, où 18,5% (N=12/65) des valeurs sont inférieures au seuil de 13 G/dL chez les exposés contre 8,1% (N=3) chez les non exposés mais

cette différence est statistiquement non significative, et elle est significative entre les groupes ($p=0,026$).

La médiane des GR chez les pompistes (**4,54 T/L**) est significativement inférieure ($p=0,017$) à celle des mécaniciens (**4,92 T/L**) et plus modérément l'hématocrite ($p=0,044$).

Et la fraction majoritaire des GR et HB inférieurs aux seuils a été observée chez les pompistes (**N=10, 76,92%**) contre **23,08% (N=3)** chez les mécaniciens. La différence entre les deux médianes des deux groupes de métiers pour l'**HB** est très significative ($p=0,004$) (**pompistes : 13,75 G/dL, mécaniciens : 14,6 G/dL**).

Concernant les GB, **10,76%** des valeurs (**N=7/65**) sont supérieures au seuil de 10 G/L chez les exposés, représentés majoritairement par les pompistes (N=5) et deux mécaniciens.

Les neutrophiles sont le paramètre qui a montré le maximum de dépassements de seuil (7 G/L) avec **31,48% (N=17/54)** chez les exposés (7 pompistes et 10 mécaniciens) et **18,75% (N=6/32)** chez les non exposés, et de valeurs inférieures au seuil également (2 G/L) avec **11,11% (N=6/54)** dont (2 pompistes et 4 mécaniciens) et **6,25% (N=2/32)** chez les exposés et non exposés respectivement.

La différence entre les médianes des neutrophiles des pompistes et mécaniciens est statistiquement très significative ($p=0,004$) (**pompistes : 4,92 G/L, mécaniciens : 3,7 G/L**), ces données justifient les valeurs plus élevées de GB ($p=0,012$) observées chez les pompistes (**8,23 G/L**) contre (**7,27 G/L**) chez les mécaniciens. Cela pourrait également justifier la fréquence des brûlures mictionnelles chez les pompistes.

Les monocytes ont montré **23,1% (N=15)** dépassements du seuil chez les exposés contre **21,6% (N=8)** chez les non exposés ($p>0,05$).

Les lymphocytes et plaquettes sont les paramètres les moins perturbés.

Cependant, les lymphocytes ont montré une différence très significative ($p=0,003$) entre exposés fumeurs et non-fumeurs avec une médiane plus élevée chez les fumeurs (**2,73 G/L**), cette observation est tout aussi valable pour les **GB (p=0,009)** chez ces mêmes sujets, ces résultats concordent avec l'étude de Pesatori et al. 2009 pour les fumeurs [110] .

Cependant, les données de la littérature restent contrastées. Qu et al. 2002 n'ont pas mis en évidence d'effet clair du benzène sur les lymphocytes dans leur analyse, suggérant que ces derniers pourraient être moins sensibles à l'exposition chronique au benzène que les

neutrophiles [112]. Par ailleurs, North et al. 2020 soulignent qu'aucune immunosuppression profonde n'est rapportée dans le cadre des expositions modernes au benzène [30].

Les plaquettes seraient significativement supérieures ($p=0,031$) chez les exposés fumeurs (médiane 256 G/L) que les non exposés fumeurs (médiane 222 G/L). Elles ont présenté une corrélation avec le **t,t-MA** ($r=0,249$, $p=0,046$) et le **S-PMA** ($r=0,330$, $p=0,007$) chez l'ensemble des exposés et les exposés fumeurs. Aucune corrélation n'a été révélée avec le **S-BMA**.

Ces données suggèrent un effet indirectement stimulant de ces deux lignées par le benzène issu du tabagisme et de l'exposition professionnelle.

Aucun modèle de régression multiple n'a révélé une prédiction des biomarqueurs d'exposition du benzène sur les différents paramètres étudiés, ces résultats ont été avancés par Qu et al. 2002 également.

En revanche, l'analyse des régressions multiples progressives chez les sujets exposés, a révélé que l'**HB** serait influencée positivement par l'**âge** et l'**ancienneté** selon un modèle ($B=0,484$, $p<0,0001$, $R^2=0,176$).

L'analyse des corrélations chez les pompistes a révélé une association positive du **t,t-MA** avec l'**HB** ($r=0,358$, $p=0,032$) et les **GR** ($r=0,341$, $p=0,042$). Costa Amaral et al. 2019 ont observé un lien entre le t,t-MA et les GB [122].

En revanche aucun lien n'a été détecté entre les biomarqueurs d'exposition du benzène et les biomarqueurs hématologiques chez les mécaniciens.

Le **nombre de symptômes** est positivement corrélé avec les paramètres de la lignée rouge, **GR** ($r=0,535$, $p<0,001$), **Hct** ($r=0,426$, $p=0,008$) et **HB** ($r=0,343$, $p=0,035$). Rappelons qu'il est aussi corrélé avec le **t,t-MA** ($r=0,296$, $p=0,024$) et **S-PMA** ($r=0,278$, $p=0,025$).

Ces résultats expliquent les données avancées concernant la différence d'exposition atmosphérique entre les deux sous-groupes de métiers suggérant une adaptation physiologique ou professionnelle chez les sujets plus expérimentés, où une exposition prolongée au benzène pourrait induire des mécanismes compensatoires ou sélectionner des profils biologiques plus résilients.

Liu et al. 2000, Alfadaly et al. 2016 et Giardini et al. 2023 ont trouvé des valeurs de GB, GR, HB, Hct et lymphocytes plus élevées chez les pompistes que les sujets non exposés [88], en revanche les neutrophiles étaient inférieures [109] comme l'ont également évoqué Saeedi et al. 2024 [69].

Selon une revue systématique publiée en 2024, étudiant les nouveaux effets liés aux faibles expositions au benzène, l'évaluation des doses-réponses inhabituelles indique une surcompensation cellulaire et une reprogrammation pour surmonter la toxicité et favoriser la survie. Cependant, ces mécanismes anormaux favorisent également l'induction de la leucémie [73].

En revanche, le **nombre d'heures travaillées** par jour serait négativement corrélé à l'HB ($r = -0,427$, $p < 0,0001$) et au GR ($r = -0,261$, $p = 0,036$) et positivement corrélé au taux de **Neutro** ($r = 0,303$, $p = 0,026$). Qu et al. 2002 ont trouvé que la durée d'exposition montre une faible association uniquement avec les neutrophiles et que c'est plutôt l'intensité de l'exposition qui prédit la dépression de la moelle osseuse plutôt que la durée d'exposition [112].

Les rapports sur les anomalies hématologiques des travailleurs exposés à de faibles niveaux différaient les uns des autres [107]. Quand certaines études, à l'instar de Collins et al. 1997, Tsai et al. 2004, Pesatori et al. 2009, Swaen et al. 2010 et Koh et al. 2015 n'ont pas trouvé d'association entre l'exposition faible au benzène et la baisse des paramètres de la FNS [105,110,111,203], d'autres ont prouvé que les concentrations d'hémoglobine n'ont diminué que chez les travailleurs exposés à des doses de ≥ 10 ppm [71,106].

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté une association négative significative des globules blancs atteignant les 15% [72], plaquettes, neutrophiles segmentés, les basophiles [71,72,112,113,122].

Les paramètres les plus sensibles au benzène semblaient être les neutrophiles et le volume plaquettaire moyen (MPV) [106,112] et les lymphocytes [109].

Le S-BMA n'est apparu dans aucun modèle de régression multiple comme facteur de prédiction des biomarqueurs hématologiques, cependant, l'exposition au toluène a été rapportée comme facteur de confusion potentiel pour certains effets sanguins périphériques (lymphocytes, neutrophiles et monocytes) [106], d'où la nécessité d'examiner les niveaux des deux composés dans l'environnement professionnel.

Ces données mettent en lumière un effet délétère de la charge professionnelle, qui pourrait refléter un stress oxydatif accru ou une perturbation métabolique liée à la durée d'exposition aux COV et témoigner d'une inflammation subclinique.

III.8.2. Lien avec les biomarqueurs d'effet oxydatif et épigénétique

Le **8OxodGuo** est le biomarqueur ayant montré le plus de corrélations avec les biomarqueurs hématologiques chez les exposés. Il a été positivement corrélé avec les **GR** ($r=0,260$, $p=0,036$), **HB** ($r=0,300$, $p=0,015$), **Hct** ($r=0,304$, $p=0,014$), **Lymph** ($r=0,307$, $p=0,013$), et négativement corrélé avec les **Neutro** ($r= - 0,270$, $p=0,044$).

L'analyse des régressions multiples a mis en évidence une influence positive mais faible entre le **8OxodGuo** et le taux des **GR** ($B=0,266$, $p=0,032$, $R^2=0,056$).

Et inversement, l'influence est négative sur les **GB** selon un modèle ($B= - 0,590$, $p=0,003$, $R^2=0,317$) et les **Neutro** ($B = - 0,473$, $p<0,0001$, $R^2 = 0,537$).

Les analyses de Qu et al. 2002 ont mis en évidence de fortes associations inverses entre l'exposition cumulée au benzène et les taux de GR, GB, neutrophiles et monocytes

Les neutrophiles sont le biomarqueur qui a montré le plus de corrélations négatives avec les biomarqueurs épigénétiques tels que **7MeGua** ($r = - 0,375$, $p=0,005$), **5MedCyt** ($r = - 0,343$, $p=0,011$), **5MeCyt** ($r = - 0,288$, $p=0,035$) et la **5MeCyto** ($r = - 0,276$, $p=0,044$). L'association avec le **5MeCyto** est plus forte chez les fumeurs ($r = - 0,497$, $p=0,019$).

Le **7MeGua** a été mis en évidence comme facteur influençant négativement les **Neutro** selon un modèle de régression multiple ($B= - 0,403$, $p=0,003$, $R^2=0,146$).

Les **Lymph** seraient influencés par le **5OHMedCyt** ($B= - 0,414$, $p<0,001$, $R^2=0,309$).

Ces résultats convergent avec ceux avancés par l'étude de Schnatter et al. 2010, portée sur 928 travailleurs exposés au benzène dans différentes industries, les paramètres les plus sensibles au benzène sont les neutrophiles et le volume moyen des plaquettes [106].

Guo et al. dans une étude publiée en 2021 a, en outre, révélé que les personnes exposées au benzène ont une fréquence plus élevée de méthylation du promoteur dans le gène du Colony-Stimulating Factor Receptor 3 (CSF3R), qui est nécessaire à la production de neutrophiles. Ce

taux de méthylation élevé a été corrélé à une réduction significative des neutrophiles chez les participants exposés au benzène [67].

III.9. Comparaison entre les deux techniques de dosage du t,t-MA urinaire

III.9.1. Technique de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD

Nous avons procédé à l'optimisation et la validation d'une méthode d'extraction du t,t-MA par SPE suivie d'une analyse chromatographique par HPLC à détecteur de barrettes de diode.

Le t,t-MA a été élué à 6,4 min, pour un temps d'analyse total de 10 min. Les performances de la méthode ont été évaluées en termes de linéarité, limites de détection et de quantification, précision intra- et inter-jour, ainsi que justesse.

La fonction de réponse a été effectuée sur matrice en trois séries, une courbe moyenne a été ensuite tracée ayant un coefficient de détermination de $R^2=0,996$.

La courbe de linéarité (concentrations calculées en fonction des concentrations introduites) dans la plage de concentration étudiée [0,3 - 3] mg/L, a montré un coefficient de détermination très proche de 1 ($R^2= 0,98$). Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été estimées respectivement à 0,09 mg/L et 0,3 mg/L, confirmant la sensibilité de la méthode.

La répétabilité (intra-série) et la fidélité intermédiaire (inter-séries) ont été jugées satisfaisantes, avec des coefficients de variation variant entre (0,27% et 6,8%), étant inclus dans l'intervalle d'acceptabilité, la méthode a été jugée fidèle.

La justesse exprimée en termes de recouvrements, a révélé des biais relatifs variant entre (-14,8% et -10%), les valeurs extrêmes concernaient la concentration 2,5 mg/L, nous pensons que l'utilisation de deux micropipettes différentes pour la prise d'essai (1 mL et 500 μ L) a augmenté la valeur de l'erreur systématique. Néanmoins ces valeurs sont incluses dans l'intervalle d'acceptabilité.

Le profil d'exactitude a été établi sur trois niveaux de concentration (0,4, 1 et 2,5 mg/L), couvrant la plage attendue chez les sujets exposés. Pour chaque niveau, le taux de récupération a été évalué sur des répliques indépendants (N=9), un intervalle de tolérance calculé pour les trois niveaux à un niveau de confiance B= 80% conformément aux exigences du profil d'exactitude appliqué en bioanalyse [204].

Les intervalles d'acceptabilité ont été fixés à $\pm 15\%$ conformément aux recommandations de la SFSTP, et le pourcentage d'échantillons inclus dans ces limites a atteint 100%, démontrant une justesse acceptable. Le profil d'exactitude obtenu valide ainsi la capacité de la méthode à produire des résultats fiables sur l'ensemble de la plage analytique ciblée.

Les réponses observées dans la matrice sont systématiquement supérieures à celles obtenues dans l'eau, traduisant un effet matrice positif. Les écarts relatifs sont de 142 % à 0,5 mg/L, 128,5 % à 1 mg/L, et 116 % à 2 mg/L, ce qui suggère que la matrice biologique exerce une amplification du signal chromatographique, probablement par des interactions physico-chimiques entre le soluté et les composants endogènes. Inversement, Gomes et al. 2016 ont observé un effet matrice négatif baissant la sensibilité de 50% [142].

Afin de pallier cet effet et de garantir la fiabilité de la quantification, toutes les courbes d'étalonnage, standards de validation ainsi que les standards de contrôle ont été préparés dans une matrice vierge préalablement vérifiée.

Cette stratégie permet de minimiser l'impact de l'effet matrice sur la mesure, cependant cet effet matrice plus marqué pour les faibles concentrations ne nous a pas permis d'avoir une limite de détection et quantification plus basses. Costa-Amaral et al. 2019 ont rapporté une limite de détection proche de la nôtre estimée à 0,11 mg/L [122].

Gomes et al. 2016 ont proposé une technique de dosage du t,t-MA reposant sur une extraction SPE-SAX suivie d'une séparation chromatographique à l'aide de la colonne Aminex HPX-87H utilisant un mécanisme d'exclusion ionique.

Dans ce système, les ions fortement chargés tels que les sels minéraux ou les ions inorganiques sont repoussés par la résine, tandis que les petites molécules polaires peu ou faiblement ionisées, comme les acides organiques faibles (dont le t,t-MA), peuvent pénétrer partiellement dans la phase stationnaire. La séparation repose alors sur les différences de distribution du soluté entre la phase mobile (souvent de l'eau acidifiée) et la phase immobilisée sur la résine. Ce mécanisme permet une séparation efficace des acides organiques et a permis d'obtenir des LD et LQ très basses comparées à celles décrites dans la littérature (0,11 and 0,36 $\mu\text{g/L}$, respectivement) [142].

La méthode d'extraction au moyen des cartouches SPE SAX a montré un rendement d'extraction variant de 97% à 100%. Ces résultats indiquent que le lit de résine de 200 mg est suffisant pour assurer une fixation optimale du t,t-MA, la majorité des études consultées ont

utilisé des cartouches contenant 500 mg de résine [122,141] ce qui positionne cette approche comme une alternative économique et performante.

Certaines études ont exploré une extraction liquide-liquide par l'éthyl acétate avec détection par GC-MS après dérivation [82]. D'autres ont utilisé l'acide vanillique comme étalon interne afin d'améliorer la précision des résultats et réduire les biais liés à l'extraction [152].

L'incertitude de mesure a été estimée pour chaque niveau de concentration étudié (0,4 – 1 – 2,5 mg/L), à partir de neuf mesures répétées. L'écart-type expérimental a été utilisé pour calculer l'incertitude-type associée à la justesse de récupération. En supposant un facteur d'élargissement $k = 2$ (niveau de confiance 95 %), l'incertitude élargie sur les mesures de récupération a été estimée respectivement pour les trois niveaux à (0,02, 0,04 et 0,1 mg/L), toutes situées dans l'intervalle d'acceptabilité fixé à ± 15 %.

Ces résultats attestent d'un bon niveau de fiabilité analytique pour le dosage du t,t-MA par HPLC-DAD.

III.9.2. Analyse du diagramme de BLAND-ALTMAN

Afin d'évaluer le degré d'accord entre les mesures obtenues par la méthode HPLC-DAD avec une méthode de référence (UPLC-MS/MS), un diagramme de Bland-Altman a été établi. Cette approche graphique permet d'analyser les écarts entre deux séries de mesures en tenant compte de la moyenne et de la dispersion des différences.

La distribution normale des moyennes des différences a été vérifiée impliquant le calcul des limites de concordance inférieure et supérieure à un niveau de confiance de 95 % par la formule (moyenne \pm 1.96 ET).

95,54% (N=193) des mesures ont été incluses dans la zone d'agrément.

Les moyennes du t,t-MA par HPLC-DAD et UPLC-MS/MS en AV sont **269 \pm 271,41 μ g/g créa** et **283,35 \pm 337,25 μ g/g créa**, et en AP, respectivement, **431 \pm 394,68 μ g/g créa** et **418,95 \pm 405,59 μ g/g créa**.

Le test de comparaison des moyennes sur échantillon unique a montré une **différence significative** entre les deux méthodes pour les valeurs AV et AP ($p < 0,001$). La méthode par HPLC a sous-estimé les valeurs du t,t-MA en AV et les a surestimés en AP.

Parmi les 202 paires de mesures (101 en AV et 101 en AP) comparées entre la méthode HPLC-DAD et la UPLC-MS/MS, 9 échantillons (soit 4,45 %) se situent en dehors des limites de concordance définies par le diagramme de Bland-Altman appelés outliers. Ce faible taux d'écart extrêmes est considéré acceptable dans une approche analytique comparative.

Ces écarts méritent une investigation supplémentaire, le Tableau 103 détaille les deux mesures pour chacun de ces valeurs aberrantes.

Tableau 103 : Valeurs des deux mesure des outliers

Valeurs AV (mg/L)			Valeurs AP (mg/L)		
ID Échantillon	Mesure HPLC-DAD	Mesure UPLC-MS/MS	ID Échantillon	Mesure HPLC-DAD	Mesure UPLC-MS/MS
15	1,54	0,23	84	0,96	2,25
20	ND	0,59	91	ND	5,04
29	ND	2,7	114	4,5	0,96
85	0,3	1,24	140	0,68	0,1
			151	1,07	0,26

Les échantillons présentant des concentrations plus élevées par HPLC-DAD (ID : 15, 114, 140 et 151) peuvent être attribués à des interférences analytiques, notamment la présence de sorbitol, ou à une dégradation partielle du substrat, les échantillons ayant été conservés entre un et quatre mois avant leur analyse par UPLC-MS/MS.

À l'inverse, les échantillons pour lesquels les valeurs obtenues par UPLC-MS/MS sont supérieures (et non détectées par HPLC-DAD) peuvent être expliqués par un effet matrice significatif, susceptible d'entraver la détection des faibles concentrations dans certaines matrices, indépendamment de la limite de détection théorique.

Ces différences confirment la présence des biais négatifs et positifs dans les mesures obtenues par HPLC-DAD, pouvant être attribués à une sensibilité analytique moindre, à un effet matrice résiduel, une interférence par le sorbitol, ou à une perte partielle du composé lors de l'extraction.

III.9.3. Comparaison des courbes de ROC

La performance discriminante des deux méthodes analytiques a été évaluée par l'analyse des courbes ROC. L'AUC obtenue pour la méthode **HPLC-DAD (0,843 ; IC 95 % : 0,768–0,919)** est légèrement supérieure à celle observée pour la méthode **UPLC-MS/MS (0,806 ; IC 95 % : 0,725–0,887)**, bien que la valeur obtenue pour HPLC-DAD soit légèrement supérieure, cette différence doit être interprétée avec prudence. Les résultats du test sur échantillon unique ont mis en évidence des écarts significatifs entre les moyennes, et le diagramme de Bland-Altman a révélé la présence de biais systématiques variables.

Bien que les deux méthodes présentent une excellente sensibilité ($p < 0,0001$), la différence entre les AUC pourra être testée statistiquement via un test de DeLong afin de confirmer la supériorité significative d'une méthode sur l'autre.

Comparée à des méthodes plus sophistiquées comme la UPLC-MS/MS, la HPLC-DAD présente l'avantage d'être plus accessible, moins coûteuse, et facilement implémentable dans les laboratoires hospitaliers ou universitaires, mais la LC-MS/MS malgré son coût élevé, offre la possibilité de détecter simultanément plusieurs biomarqueurs sans une étape de prétraitement.

En somme, cette méthode constitue une alternative fiable pour le dosage du t,t-MA, bien que sa sensibilité soit légèrement inférieure, elle reste suffisante pour détecter des variations biologiquement pertinentes, notamment dans les contextes où les ressources analytiques sont limitées, tout en maintenant une qualité de mesure conforme aux exigences scientifiques.

III.10. Points forts de l'étude

Cette étude présente plusieurs éléments originaux et méthodologiques qui renforcent sa robustesse et sa pertinence toxicologique :

- Inclusion de deux populations professionnelles exposées, avec une approche à la fois transversale et longitudinale (pré- et post-travail).
- Analyse complète de 30 paramètres par sujet, couvrant à la fois l'exposition, les effets biologiques et les facteurs modulateurs.
- Prise en compte de facteurs confondants, notamment le tabagisme actif et chiqué (dosé via la cotinine) et la co-exposition aux solvants (toluène), renforçant la précision de l'interprétation.
- Utilisation combinée de deux biomarqueurs d'exposition (t,t-MA, S-PMA) et deux biomarqueurs d'effet précoce.
- Dosage innovant de produits d'oxydation et de méthylation de l'ADN et de l'ARN, incluant la quantification des bases libres alors que des études similaires se sont focalisées sur uniquement le 8-OH-dGuanosine (Pilia et al., Focasioni et al., Tranfo et al., Lagorio et al., Goethel et al.) [15,17,28,64,100], et des dérivés méthylés peu explorés (5OHméthylcytosine, 5OHméthyldCytosine).
- Correction systématique des concentrations urinaires en fonction de la créatinine, garantissant la comparabilité interindividuelle.
- Utilisation de la méthode UPLC-MS/MS, reconnue comme la plus fiable pour le dosage des produits d'oxydation nucléique (Graille et al. 2020 [124]), avec des calibrants standards, assurant une très haute précision des résultats [124,126].
- Cette étude, et à la limite de nos connaissances est la première au niveau national à avoir analysé le S-PMA en tant que biomarqueur d'exposition, et l'une des rares au niveau maghrébin à avoir évalué les effets génotoxiques par stress oxydatif sur l'ADN et l'ARN via le dosage des biomarqueurs urinaires.
- Au niveau international, et à la limite de nos connaissances, il s'agit des rares ayant dosé les biomarqueurs urinaires des acides nucléiques méthylés et oxydés chez des mécaniciens, et à avoir analysé les associations entre produits méthylés et biomarqueurs hématologiques.
- À notre connaissance, peu d'études ont intégré le dosage du S-BMA dans une approche combinée de biomonitoring et d'évaluation des effets épigénétiques ou génotoxiques.

- Notre travail se distingue par l'analyse conjointe de ce biomarqueur spécifique du toluène avec des marqueurs de stress oxydatif, épigénétique et des paramètres hématologiques.
- Cette étude se distingue par sa stratégie comparative intégrée, permettant une interprétation fine des effets biologiques de l'exposition au benzène et au toluène. Les analyses ont été conduites selon plusieurs axes : statut professionnel (exposés vs non exposés), comportement tabagique (fumeurs vs non-fumeurs), catégorie d'activité (pompistes vs mécaniciens), et contexte environnemental (zone à trafic dense vs à trafic faible).

III.11. Limites de l'étude et perspectives d'amélioration

Malgré sa solidité méthodologique, l'étude comporte certaines limites liées au design, aux contraintes logistiques, et à certains facteurs biologiques ou environnementaux. Les points suivants permettent de nuancer l'interprétation des résultats et d'ouvrir des perspectives d'amélioration :

- Absence de comparaison saisonnière, notamment avec la période hivernale, comme réalisé par Pilia et al. et Karakitsios et al., ce qui pourrait influencer certains biomarqueurs environnementaux ou métaboliques.
- Non-mesure du benzène atmosphérique personnel via des dispositifs individuels, contrairement à d'autres travaux de référence (Pilia, Lovreglio, Bollati, Karakitsios, Mansi [9,28,103,114,136] limitant la précision de l'exposition externe.
- Facteurs confondants du stress oxydatif non explorés, tels que l'IMC, une exposition récente aux rayonnements ou la co-exposition à d'autres agents comme les HAP, les métaux, la poussière ou l'effort physique ainsi que les comorbidités non diagnostiquées telles que le diabète et HTA (Andreoli, Graille, Lovreglio [19],[158]).
- Absence de prise en compte des facteurs non professionnels, comme les habitudes alimentaires ou la pollution environnementale, qui peuvent moduler la méthylation des acides nucléiques.
- Manque de données sur le nombre total de travailleurs ciblés à Annaba, rendant difficile l'appréciation de la représentativité épidémiologique de l'échantillon.
- Le nombre des exposés et non exposés doit idéalement être comparable comme dans l'étude de Lovreglio et al. et Butt et al. [9,10], mais notre étude a tout de même un échantillon similaire à celui de Fracasso et al. et Lagorio et al. [64,100], et supérieur à ceux de Moro et al., El Kama et al. ou Goethel et al. [15,31,118].

Partie pratique - III. Discussion

- Limites analytiques de la méthode HPLC-DAD, notamment l'absence d'étalon interne pour compenser les effets d'extraction ou de matrice, bien que cette lacune soit également présente dans plusieurs études comparables. D'autant plus que l'extraction par SPE est chronophage et sujette à variabilité manuelle, avec un coût élevé et une disponibilité limitée des cartouches.
- Fiabilité partielle de la chaîne de prélèvements, certains échantillons ayant été acheminés par les employés eux-mêmes, sans garantie formelle du respect des conditions de transport et de conservation.

Conclusion

IV. Conclusion

Les vapeurs d'essence et les gaz d'échappement ont été classés par le CIRC comme étant possiblement cancérogènes pour l'homme.

Les effets cancérogènes du benzène ne présentent pas de seuil de sécurité, et les conséquences possibles doivent être prises en compte pour l'ensemble des employés, qu'ils soient exposés directement ou indirectement à ce cancérogène professionnel.

La présente étude a adopté une approche exhaustive de l'évaluation de l'exposition professionnelle au benzène, intégrant l'analyse de biomarqueurs d'exposition, d'effet génotoxique via le stress oxydatif, ainsi que les modifications épigénétiques. Elle tient compte des facteurs confondants tels que le statut tabagique, la co-exposition à d'autres solvants, la géolocalisation ainsi que des manifestations cliniques susceptibles d'être associées à cette exposition. Cette investigation repose sur une méthodologie comparative, à la fois transversale entre individus non exposés et exposés et longitudinale, à travers des prélèvements effectués avant et après le poste de travail chez ces derniers.

Le constat le plus marquant concerne la différence significative observée entre les sujets exposés et non exposés, en ce qui concerne les biomarqueurs d'exposition. Les rapports de médianes (EX/NE) pour les deux biomarqueurs testés (t,t-MA et S-PMA) se révèlent être parmi les plus élevés comparés aux données des études disponibles, témoignant d'une forte exposition au benzène au sein de la population algérienne, et plus particulièrement bônoise. Il n'existe pas de consensus universel concernant un ou plusieurs biomarqueurs de référence à privilégier. De manière générale, il est recommandé d'utiliser plusieurs biomarqueurs afin d'améliorer la précision.

En l'absence de consensus, le choix du biomarqueur d'effet (génétique, épigénétique, immunologique ou inflammatoire) dépend des outils disponibles dans chaque laboratoire et/ou de ce qui est financièrement accessible au niveau du pays.

Cependant si les biomarqueurs d'exposition ne sont pas correctement sélectionnés, les résultats du biomonitoring peuvent s'avérer peu utiles pour détecter les altérations précoces de l'organisme. Nos résultats ont mis en lumière l'intérêt d'utiliser le ratio t,t-MA /S-PMA afin de corriger les interférences liées au tabagisme, principal facteur confondant des faibles expositions (< 0,5 ppm), et qui peut même être assimilé à une exposition professionnelle pour

un sujet non exposé et fumeur actif et multiplierait le taux du S-PMA urinaire par un facteur de trois.

Le t,t-MA a été le biomarqueur qui a présenté le plus de corrélations avec les différents biomarqueurs d'effet, malgré les interférences qu'il peut y avoir avec le conservateur alimentaire sorbitol. Les dépassements de l'IBE de l'ACGIH se sont avérés non déterminants d'un risque accru d'exposition vu qu'ils peuvent être observés chez des individus non exposés. D'où l'intérêt de réduire ces biais par des analyses en avant et après travail.

En somme, l'association de ces deux biomarqueurs constitue la solution optimale.

Le niveau d'exposition par inhalation au benzène devrait être idéalement déterminé avant de sélectionner le biomarqueur le plus approprié. Dans cette étude, le niveau d'exposition atmosphérique a pu être prédit à l'aide d'une courbe de régression en fonction des valeurs du S-PMA urinaire, les valeurs variaient entre 0,04 et 0,61 ppm en fonction du statut tabagique et de la géolocalisation des pompes à essence.

De nouvelles investigations indiquent que les limites d'exposition actuelles au benzène pour les travailleurs sont inacceptables et que les seuils devraient être inférieurs à 0,07 ppm, contre 1 ppm actuellement dans la plupart des pays.

Or, en Algérie la situation est critique dans le sens où aucune VLEP n'existe pour le benzène en milieu professionnel ni en milieu urbain.

Il est important de souligner que les VLEP ont été établies pour une exposition de 8 heures de travail par jour pendant 5 jours par semaine, autrement dit avec 16 heures de repos entre deux expositions, cependant le dépassement occasionnel de ces valeurs n'est pas très informatif en soi, et n'implique pas nécessairement un risque accru de cancers hématologiques, car ceux-ci sont associés à des expositions cumulatives sur une plus longue période d'où l'intérêt de tracer un profil d'exposition.

Le constat le plus significatif concerne la co-exposition significative au toluène, évaluée via son métabolite minoritaire le S-BMA et tant documentée par des travaux algériens, qui avec des mécanismes compétitifs pour la formation du S-PMA (forme détox du benzène) va aggraver l'exposition à ce dernier. Le S-BMA s'est avéré avoir, avec le t,t-MA, le maximum de corrélations avec les différents biomarqueurs d'effet. Mais étant lui-même issu d'autres substances chimiques, des auteurs recommandent l'analyse du toluène urinaire ou bien le toluène atmosphérique, afin de mieux évaluer l'exposition totale et ne pas sous-estimer les valeurs du S-PMA.

Nos résultats ont révélé une exposition supérieure chez les pompistes comparés aux mécaniciens, accentuée encore chez ceux travaillant dans des pompes à essence à proximité des trafics routiers denses et les zones fortement urbanisées, le rythme de travail a été un facteur déterminant du niveau d'exposition plus que l'ancienneté, en effet, les durées de travail de 12 heures, 24 heures et 48 heures constituent un facteur de risque supplémentaire au manque de port des moyens de protection individuels, ces données témoignent du caractère non cumulatif du benzène.

Nos résultats renforcent l'importance de la surveillance des expositions professionnelles, indépendamment des fonctions occupées ou des voies d'exposition et notamment pour d'autres métiers, tels que les chauffeurs de citernes, qui seraient selon les études, les sujets les plus professionnellement exposés.

Ces conclusions accentuent l'intérêt du suivi périodique et biotoxilogique même en cas de bilan hématologique normal.

Le dépistage des symptômes liés à une co-exposition au benzène et au toluène, notamment les signes neurologiques et musculaires tels que les crampes et l'asthénie chronique, devrait être intégré aux programmes de surveillance de la santé des travailleurs. Le nombre de symptômes déclaré par sujet a été corrélé avec les biomarqueurs d'exposition, d'effet et le nombre d'heures travaillées, ces résultats soulignent l'importance d'accorder une attention particulière aux altérations cliniques même mineures et en l'absence de pathologie avérée, dans le cadre de la surveillance sanitaire des employés de stations-service et des autres populations partageant le même environnement.

L'investigation des biomarqueurs du stress oxydatif lié aux dommages de l'ADN et l'ARN a révélé la pertinence du 8OxodGuosine et le 8OxoGuanosine comme biomarqueurs déterminants et corrélés avec les différents biomarqueurs étudiés. À ce jour, peu de biomarqueurs d'effet sont pleinement validés pour un usage individuel en routine. Ces derniers sont prometteurs, mais leur usage reste plus adapté au suivi collectif.

Les études ont montré que ces lésions, si elles ne sont pas réparées, peuvent contribuer à la mutagénicité et à la promotion du cancer. De nombreux travaux menés au cours des vingt dernières années, ainsi que les progrès réalisés dans leur estimation quantitative par diverses techniques analytiques dans les cellules sanguines ou l'urine, ont établi ces marqueurs comme majeurs, non seulement de la cancérogénèse, mais également du vieillissement et des maladies dégénératives.

L'analyse des biomarqueurs de méthylation des acides nucléiques a ressorti le 7MeGuo et 5MeCyt comme deux biomarqueurs potentiels qui ont pu différencier les sujets exposés des non exposés et qui seraient associés avec l'intensité de l'exposition,

Notre étude se distingue d'être, à la limite de nos connaissances, la première qui a dosé le 5OHMeCyt et le 5OHMedCyt, biomarqueurs intermédiaires de déméthylation de l'ARN et l'ADN, et qui ont fourni des données intéressantes confirmant les hypothèses déjà avancées au sujet de l'hypométhylation globale chez les sujets exposés aux carcinogènes.

Toutefois, l'excrétion urinaire des nucléotides et nucléosides méthylés pourrait également être influencée par l'exposition à d'autres xénobiotiques, ou par des facteurs endogènes et exogènes non explorés dans la présente étude.

Des recherches complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces altérations et le défi qui attend les médecins du travail et les chercheurs est de taille. Ils devront interpréter ces marqueurs non seulement comme des indicateurs de risque professionnel, mais également comme des reflets d'influences liées au mode de vie, potentiellement modifiables.

L'élimination complète des substances toxiques dans les milieux de travail n'est pas toujours réalisable. Cependant, le suivi des travailleurs exposés peut contribuer à réduire les niveaux d'exposition et à atténuer les dommages potentiels.

Dans ce contexte, le suivi biologique couplé aux biomarqueurs d'exposition constitue un outil pertinent pour évaluer l'exposition et les effets sanitaires possibles.

Dans l'ensemble, nos résultats enrichissent les connaissances sur les effets potentiels sur la santé liés à une exposition à faible dose au benzène, et pourraient s'avérer utiles dans l'élaboration de stratégies gouvernementales de prévention.

L'utilisation de données scientifiques est essentielle pour améliorer considérablement l'évaluation des risques, en passant d'une approche fondée sur la population à une approche individualisée qui rentre dans un contexte de médecine de précision postulant que la prévention et le traitement médical doivent être adaptés aux personnes, en tenant compte du profil génomique, des conditions préexistantes, des expositions environnementales et d'une série de facteurs de risque propres à chaque individu, autrement dit, une approche de biologie des systèmes.

Recommandations et perspectives

Au terme de cette étude, plusieurs constats méthodologiques et scientifiques émergent, ouvrant la voie à des pistes concrètes d'amélioration dans la surveillance de l'exposition professionnelle au benzène.

Dans cette dernière section, nous formulons des recommandations basées sur les résultats obtenus, en les articulant autour de considérations réglementaires et préventives. Nous proposons également des perspectives de recherche afin d'approfondir les mécanismes de toxicité, d'optimiser les outils de biomonitoring et de promouvoir une approche individualisée de l'évaluation du risque.

Au niveau réglementaire

- **Instaurer des Valeurs Moyennes d'Exposition (VLEP) spécifiques à l'Algérie**, fondées sur les études nationales et alignées avec les normes internationales, tout en procédant à une révision des seuils d'exposition professionnelle à la lumière des données biologiques disponibles.
- **Réduire la teneur en benzène dans les carburants**, afin de diminuer l'exposition professionnelle des travailleurs et d'atténuer l'impact environnemental pour l'ensemble de la population.
- **Équiper les stations-service de systèmes de récupération des vapeurs**, comme le font certains pays émergents tels que le Brésil, afin de limiter l'exposition aux composés volatils lors du ravitaillement.
- **Mettre en place des pompes à essence en libre-service**, accompagnées d'un système de permanence adapté, notamment avec l'essor des paiements électroniques (cartes bancaires, cartes prépayées), pour réduire les durées d'exposition directe des travailleurs.
- **Adopter une réglementation stricte interdisant de fumer sur les lieux de travail**, à l'image des politiques de prévention appliquées dans les pays européens, afin de limiter les synergies toxiques et les risques sanitaires cumulés.
- **Établir une politique nationale de biosurveillance obligatoire en milieu professionnel**, dans le cadre d'une politique de santé au travail structurée et réglementée. Cette démarche devrait s'appuyer sur la mise à disposition des moyens

techniques et humains nécessaires, au niveau national ou, à défaut, dans des pôles de référence spécialisés en réponse à l'absence actuelle d'un encadrement formel.

- **Harmoniser les modalités d'interprétation des résultats biologiques et les prises de décision**, afin de garantir une cohérence dans les évaluations de risque et les actions correctives mises en œuvre.

Démarches de biosurveillance

- **Correction des interférences** : Utiliser le ratio t,t-MA / S-PMA si l'analyse de ces deux biomarqueurs est disponible, ajuster les résultats par rapport à la créatinine et demander des prélèvements en avant et après le travail afin de mieux se rapprocher de l'exposition réelle.
- **Ciblage des populations à risque** : Accorder une attention renforcée aux sujets âgés (> 50 ans) (métabolisme altéré, susceptibilité accrue), travailleurs avec forte ancienneté (effets cumulatifs), IMC élevé (stockage et lipophile), fumeurs y compris tabac à chiquer et les travailleurs en zones à forte exposition, même asymptomatiques.
- **Limites du bilan hématologique** : un bilan normal n'exclut pas une exposition significative car les mécanismes moléculaires peuvent masquer les effets biologiques. Il est recommandé de surveiller particulièrement les neutrophiles, indicateurs sensibles de stress oxydatif ou inflammation subclinique.
- Il est nécessaire de disposer de valeurs de référence algériennes représentatives, afin d'améliorer la précision des interprétations biologiques dans les contextes locaux. Cette perspective pourrait faire l'objet d'un travail multicentrique national, à visée normative.
- **Variabilité saisonnière** : les expositions diffèrent entre hiver et été (ventilation, température, absorption cutanée). Il est recommandé de réaliser un profil d'exposition semestriel (un prélèvement en période froide et un autre en période chaude).
- **Tabac à chiquer et cotinine** : mentionner explicitement le tabac à chiquer dans les questionnaires. Car il augmente la cotinine urinaire mais pas le benzène ce qui est important pour éviter les faux positifs ou interprétations erronées.
- **SBE du toluène** : nous recommandons la surveillance biologique de l'exposition au toluène, car la co-exposition avec le benzène peut induire une baisse du S-PMA et une interprétation à tort des résultats. La surveillance peut se faire via le toluène atmosphérique, ou les métabolites urinaires, le S-BMA ou l'acide hippurique (HA).

- **Deux scénarios se présentent :**
- **Disponibilité d'une LC-MS/MS :** permet un screening simultané de multiples biomarqueurs, offrant un gain de temps significatif. Bien que le coût des étalons soit élevé, cette technique autorise une interprétation plus exhaustive et intégrée des résultats.
- **Disponibilité d'une HPLC-DAD et Kit ELISA :** permet l'analyse ciblée du t,t-MA et de l'acide hippurique (HA). Toutefois, le temps d'analyse est plus long (prétraitement) et le coût des cartouches de SPE reste élevé. Bien que l'interprétation soit possible à partir de deux biomarqueurs, cette méthode présente un risque accru d'interférences analytiques. L'analyse du **8OxodGuo par ELISA** peut contenir 96 puits, sur une durée de 6 H par analyse et nécessite une conservation à - 80°C. cette technique ne peut pas différencier le 8OxodGuo du 8OxoGuo.
- Prise en compte les facteurs confondants : Sexe, âge, IMC, état d'hydratation, pathologies rénales, radiographies pour l'utilisation des biomarqueurs d'effet pxydatif et épigénétique.

Pour la prévention et la santé au travail

- Un système de rotation obligatoire des équipes parmi les employés chargés du ravitaillement des véhicules devrait être instauré, avec des durées inférieures à 12H ou au maximum 8H par jour, afin d'éviter une accumulation excessive de l'exposition individuelle.
- Les biomarqueurs disponibles devraient être analysés conjointement avec les examens cliniques, les bilans sanguins réguliers tels que l'hémogramme, ainsi que les marqueurs biochimiques (transaminases).
- La surveillance médicale semestrielle pour les sujets exposés au benzène doit prendre en considération même les symptômes mineurs.
- Des mesures, telles que l'apport en antioxydants et de vitamine A, et le temps de repos après exposition, pourraient également contribuer à l'amélioration de la qualité de vie des sujets exposés au travail.
- Des compléments alimentaires à base de glutathion et vitamine C ont été recommandés par les études à titre préventif.
- Sensibilisation des travailleurs aux risques liés aux BTEX et au tabac (actif et passif)

- Renforcement des mesures de protection individuelle (EPI)
- Amélioration de la ventilation dans les garages mécaniques.

Perspectives de recherche

- **Approfondissement des mécanismes biologiques** : évaluation du lien entre biomarqueurs précoces et pathologies chroniques (cancer, maladies neurodégénératives)
- Des niveaux plus élevés de métabolites peuvent être associés aux géotypes nuls GSTT1 ou GSTM1 de la Glutathion S transférase, lesquels sont impliqués dans une augmentation du risque sanitaire. Il est donc recommandé d'identifier les phénotypes GSTT1 nuls en parallèle du biomonitoring du S-PMA chez la population algérienne.
- **Développement de la recherche des nouveaux biomarqueurs**
- Les études protéomiques futures pourraient permettre l'identification de biomarqueurs supplémentaires liés à l'exposition au benzène et aider à élucider les mécanismes sous-jacents à sa toxicité et aux pathologies associées. L'exploitation de la protéomique constitue une approche prometteuse pour détecter des biomarqueurs d'effet précoce.
- Le glutathion peut jouer un rôle de défense important contre les dommages à l'ADN dépendants du benzène et, par conséquent, son utilisation comme biomarqueur de sensibilité potentiel devrait être étudiée plus avant.
- Étude des voies moléculaires impliquées dans l'oxydation de l'ADN et de l'ARN.

Références bibliographiques

1. Lovreglio P, De Palma G, Barbieri A, Andreoli R, Drago I, Greco L, et al. Biological monitoring of exposure to low concentrations of benzene in workers at a metallurgical coke production plant: new insights into S-phenylmercapturic acid and urinary benzene. *Biomarkers*. 2 janv 2018;23(1):70-7.
2. Alves G, Nunes RA, Melo K, Ornellas MHF. Tumors due to chronic exposure to benzene and biomarkers of exposure. *J Cancer Metastasis Treat*. 20 mai 2022;8(5):N/A-N/A.
3. Schnatter AR, Rooseboom M, Kocabas NA, North CM, Dalzell A, Twisk J, et al. Derivation of an occupational exposure limit for benzene using epidemiological study quality assessment tools. *Toxicol Lett*. 1 nov 2020;334:117-44.
4. Assessment UENC for E. Benzene CASRN 71-43-2 | IRIS | US EPA, ORD [Internet]. [cité 16 janv 2025]. Disponible sur: https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=276
5. Rahimpour R, Jalilian H, Mohammadi H, Rahmani A. Biological exposure indices of occupational exposure to benzene: A systematic review. *Heliyon*. nov 2023;9(11):e21576.
6. Air quality guidelines for Europe, 2nd edition [Internet]. [cité 16 janv 2025]. Disponible sur: <https://www.who.int/publications/i/item/9789289013581>
7. Moro AM, Sauer E, Brucker N, Charão MF, Gauer B, Do Nascimento SN, et al. Evaluation of immunological, inflammatory, and oxidative stress biomarkers in gasoline station attendants. *BMC Pharmacol Toxicol*. déc 2019;20(S1):75.
8. Yoon JH, Kwak WS, Ahn YS. A brief review of relationship between occupational benzene exposure and hematopoietic cancer. *Ann Occup Environ Med*. 10 mai 2018;30(1):33.
9. Lovreglio P, Stufano A, Andreoli R, Tomasi C, Cagnazzi P, Barbieri A, et al. Urinary biomarkers of nucleic acid oxidation and methylation in workers exposed to low concentrations of benzene. *Toxicol Lett*. oct 2020;331:235-41.
10. Butt F, Cheema K, Nisar N, Qureshi J. Cytogenetic bio-monitoring in fuel station attendants of Gujrat, Pakistan through buccal micronucleus cytome assay. *J Pak Med Assoc*. 2017;67(7).
11. Verma DK, des Tombe K. Benzene in gasoline and crude oil: occupational and environmental implications. *AIHA J*. 1 mars 2002;63(2):225-30.
12. Boogaard PJ. Human biomonitoring of low-level benzene exposures. *Crit Rev Toxicol*. 26 nov 2022;52(10):799-810.
13. Kerbachi R, Boughedaoui M, Bounoua L, Keddam M. Ambient air pollution by aromatic hydrocarbons in Algiers. *Atmos Environ*. juill 2006;40(21):3995-4003.
14. Djafer R, Touati K, Benchaar M, Aoucheri W, Chapuis F, Azzouz M. L'exposition au benzène des ouvriers de la cokerie du complexe sidérurgique d'Annaba (Algérie). 2007;6.
15. Göethel G, Brucker N, M. Moro A, F. Charão M, Fracasso R, Barth A, et al. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. août 2014;770:61-5.

16. Manini P, De Palma G, Andreoli R, Mozzoni P, Poli D, Goldoni M, et al. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol Lett.* avr 2010;193(3):229-35.
17. Tranfo G, Pignini D, Paci E, Marini F, Bonanni RC. Association of exposure to benzene and smoking with oxidative damage to nucleic acids by means of biological monitoring of general population volunteers. *Environ Sci Pollut Res.* juin 2017;24(16):13885-94.
18. Carrieri M, Spatari G, Tranfo G, Sapienza D, Scapellato ML, Bartolucci GB, et al. Biological monitoring of low level exposure to benzene in an oil refinery: Effect of modulating factors. *Toxicol Lett.* déc 2018;298:70-5.
19. Boust C, Lebreton R. Combustibles et carburants pétroliers, Aide-mémoire technique, INRS, 2019
20. IEA – International Energy Agency [Internet]. IEA. [cité 4 déc 2024]. Disponible sur: <https://www.iea.org>
21. Hydrocarbures : l'Algérie va augmenter sa production en 2025 [Internet]. TSA. 2024 [cité 4 déc 2024]. Disponible sur: <https://www.tsa-algerie.com/hydrocarbures-voici-les-recettes-de-lalgerie-en-2024-et-les-previsions-pour-2025/>
22. Éléments techniques sur l'exposition professionnelle aux carburants et solvants pétroliers 2007.pdf.
23. Theme. Ministère Algérien de l'énergie et des mines [Internet]. [cité 4 déc 2024]. Disponible sur: <https://energy.gov.dz>
24. Décret exécutif n° 2006-02 du 7 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 7 janvier 2006 définissant les valeurs limites, les s.
25. Centre international de recherche sur le cancer, éditeur. A review of human carcinogens. Lyon: International agency for research on cancer; 2012. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans).
26. Kerchich Y, Kerbach R. Measurement of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene) levels at urban and semirural areas of Algiers City using passive air samplers. *J Air Waste Manag Assoc.* déc 2012;62(12):1370-9.
27. Boudehane A, Atia S, Cecinato A. Indoor and Outdoor BTEX in the hospital and the university estates of Ouargla city, Algeria. *Indian.journals.* 19 déc 2019;12(6):311-6.
28. Pilia I, Campagna M, Marcias G, Fabbri D, Meloni F, Spatari G, et al. Biomarkers of Low-Level Environmental Exposure to Benzene and Oxidative DNA Damage in Primary School Children in Sardinia, Italy. *Int J Environ Res Public Health.* 27 avr 2021;18(9):4644.
29. Chakroun R, Faidi F, Hedhili A, Kolsi M, Fehri S, Nouaigui H. Determination of urinary trans,trans-muconic acid reference values in the general Tunisian population. *Ann Biol Clin (Paris).* mars 2009;67(2):163-9.

Références bibliographiques

30. North CM, Rooseboom M, Kocabas NA, Schnatter AR, Faulhammer F, Williams SD. Modes of action considerations in threshold expectations for health effects of benzene. *Toxicol Lett.* nov 2020;334:78-86.
31. Elkama A, Şentürk K, Karahalil B. Assessment of genotoxicity biomarkers in gasoline station attendants due to occupational exposure. *Toxicol Ind Health.* juin 2024;40(6):337-51.
32. Biological Monitoring of chemical exposure in the workplace: guidelines. Volume 1. Geneva: WHO; 1996. 300 p.
33. Adami G, Larese F, Venier M, Barbieri P, Lo Coco F, Reisenhofer E. Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin in vitro. *Toxicol In Vitro.* déc 2006;20(8):1321-30.
34. Health effects. In: Toxicological Profile for Benzene [Internet]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2007 [cité 6 janv 2025]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK591289/>
35. Rappaport SM, Kim S, Lan Q, Li G, Vermeulen R, Waidyanatha S, et al. Human benzene metabolism following occupational and environmental exposures. *Chem Biol Interact.* 19 mars 2010;184(1-2):189-95.
36. Whysner J, Vijayaraj Reddy M, Ross PM, Mohan M, Lax EA. Genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mutat Res Mutat Res.* 1 mars 2004;566(2):99-130.
37. Ross D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. *J Toxicol Environ Health A.* 10 nov 2000;61(5-6):357-72.
38. Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kim DY, et al. Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp Hematol.* 2001;
39. Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson BA, Lan Q, Smith MT, et al. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* nov 2006;15(11):2246-52.
40. Snyder R. Overview of the toxicology of benzene. *J Toxicol Environ Health A.* 10 nov 2000;61(5-6):339-46.
41. Boogaard PJ. Human biomonitoring of low-level benzene exposures. *Crit Rev Toxicol.* 26 nov 2022;52(10):799-810.
42. IARC. Benzene [Internet]. [cité 29 mai 2025]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Benzene-2018>
43. Zhang L, McHale CM, Rothman N, Li G, Ji Z, Vermeulen R, et al. Systems biology of human benzene exposure. *Chem Biol Interact.* mars 2010;184(1-2):86-93.

44. Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Kobayashi K, Tsuda C, Miyazaki T, et al. Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking. *J Bone Miner Res.* 1 nov 2011;26(11):2682-94.
45. Ma C, Sun Y, Pi C, Wang H, Sun H, Yu X, et al. Sirt3 Attenuates Oxidative Stress Damage and Rescues Cellular Senescence in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Targeting Superoxide Dismutase 2. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 16 nov 2020 [cité 23 sept 2025];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2020.599376/full>
46. Borges RS, Carneiro AS, Barros TG, Barros CAL, Neto AMJC, da Silva ABF. Understanding the cytotoxicity or cytoprotective effects of biological and synthetic quinone derivatives by redox mechanism. *J Mol Model.* déc 2014;20(12):2541.
47. Kinetics, Structure, and Mechanism of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine Bypass by Human DNA Polymerase η . *J Biol Chem.* 1 juin 2014;289(24):16867-82.
48. Baudin B. Marqueurs d'oxydation des acides nucléiques. *Rev Francoph Lab.* mai 2020;2020(522):56-61.
49. Labo Link, Les biomarqueurs biologiques du stress oxydant, Mars 2014.
50. Pilger A, Rüdiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health.* 27 sept 2006;80(1):1-15.
51. 8 Oxoguanine - Alchetron, The Free Social Encyclopedia [Internet]. Alchetron.com. 2017 [cité 15 janv 2025]. Disponible sur: <https://alchetron.com/8-Oxoguanine>
52. D'Augustin O, Huet S, Campalans A, Radicella JP. Lost in the Crowd: How Does Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 (OGG1) Find 8-Oxoguanine in the Genome? *Int J Mol Sci.* janv 2020;21(21):8360.
53. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J Environ Sci Health Part C.* 7 mai 2009;27(2):120-39.
54. Baudin B., Marqueurs d'oxydation des acides nucléiques. *Rev Francoph Lab.* 1 mai 2020;2020(522):56-61.
55. Korkmaz KS, Debelec Butuner B, Roggenbuck D. Detection of 8-OHdG as a diagnostic biomarker. *J Lab Precis Med.* nov 2018;3:95-95.
56. Alves G, Nunes RA, Melo K, Ornellas MHF. Tumors due to chronic exposure to benzene and biomarkers of exposure. *J Cancer Metastasis Treat* 2022;8:20. <https://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2022.02>
57. Schiffman C, McHale CM, Hubbard AE, Zhang L, Thomas R, Vermeulen R, et al., Identification of gene expression predictors of occupational benzene exposure. *PLoS ONE* 2018, 13 (10): e0205427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205427>

58. Ferrari L, Pavanello S, Bollati V. Molecular and epigenetic markers as promising tools to quantify the effect of occupational exposures and the risk of developing non-communicable diseases. *Med Lav.* 28 juin 2019;110(3):168-90.
59. Silvestre RT, Bravo M, Santiago F, Delmonico L, Scherrer L, Otero UB, et al. Hypermethylation in Gene Promoters Are Induced by Chronic Exposure to Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes. *Pak J Biol Sci PJBS.* mars 2020;23(4):518-25.
60. anses valeur toxicologique de référence cancérogène par inhalation pour le benzène 2014.pdf.
61. Xie Z, Zhang Y, Guliaev AB, Shen H, Hang B, Singer B, et al. The *p*-benzoquinone DNA adducts derived from benzene are highly mutagenic. *DNA Repair.* 8 déc 2005;4(12):1399-409.
62. Bodell WJ, Levay G, Pongracz K. Investigation of benzene-DNA adducts and their detection in human bone marrow. *Environ Health Perspect [Internet].* mars 1993 [cité 14 janv 2025]; Disponible sur: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.9399241>
63. Hartwig A. The role of DNA repair in benzene-induced carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 19 mars 2010;184(1):269-72.
64. Lagorio S, Tagesson C, Forastiere F, Iavarone I, Axelson O, Carere A. Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup Environ Med.* nov 1994;51(11):739-43.
65. Matherat G, Caractérisation fonctionnelle du facteur CXXC5 (RINF) au cours de l'hématopoïèse normale et pathologique [Internet]. [cité 1 déc 2024]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/340446066_Caracterisation_fonctionnelle_du_facteur_CXXC5_RINF_au_cours_de_l%27hematopoiese_normale_et_pathologique
66. IARC, Carcinogenicity of benzene, October 2017, Disponible sur: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30832-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30832-X)
67. Guo H, Ahn S, Zhang L. Benzene-associated immunosuppression and chronic inflammation in humans: a systematic review. *Occup Environ Med.* mai 2021;78(5):377-84.
68. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science.* 24 mars 2017;355(6331):1330-4.
69. Saeedi M, Malekmohammadi B, Tajalli S. Interaction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene with human's body: Insights into characteristics, sources and health risks. *J Hazard Mater Adv.* 1 nov 2024;16:100459.
70. Hays SM, Kirman CR, Cox LA, Sarang SS. Benzene metabolism and health risk evaluation: insights gained from biomonitoring. *Crit Rev Toxicol.* oct 2024;54(9):685-93.
71. Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science.* 3 déc 2004;306(5702):1774-6.

72. Bassig BA, Zhang L, Vermeulen R, Tang X, Li G, Hu W, et al. Comparison of hematological alterations and markers of B-cell activation in workers exposed to benzene, formaldehyde and trichloroethylene. *Carcinogenesis*. juill 2016;37(7):692-700.
73. Wang T, Cao Y, Xia Z, Christiani DC, Au WW. Review on novel toxicological effects and personalized health hazard in workers exposed to low doses of benzene. *Arch Toxicol*. 1 févr 2024;98(2):365-74.
74. Poça KS da, Giardini I, Silva PVB, Geraldino BR, Bellomo A, Alves JA, et al. Gasoline-station workers in Brazil: Benzene exposure; Genotoxic and immunotoxic effects. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 1 mai 2021;865:503322.
75. Rana I, Dahlberg S, Steinmaus C, Zhang L. Benzene exposure and non-Hodgkin lymphoma: a systematic review and meta-analysis of human studies. *Lancet Planet Health*. sept 2021;5(9):e633-43.
76. Qiu H, Chuang KJ, Fan YC, Chang TP, Chuang HC, Wong ELY, et al. Association between ambient BTEX mixture and neurological hospitalizations: A multicity time-series study in Taiwan. *Ecotoxicol Environ Saf*. 15 sept 2023;263:115239.
77. Chiavarini M, Rosignoli P, Sorbara B, Giacchetta I, Fabiani R. Benzene Exposure and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Human Studies. *Int J Environ Res Public Health*. 9 févr 2024;21(2):205.
78. Kim KH, Jahan SA, Kabir E. A review on human health perspective of air pollution with respect to allergies and asthma. *Environ Int*. 1 sept 2013;59:41-52.
79. Chen WH, Chang CF, Lai CH, Peng YP, Su YJ, Chen GF. Multivariate analysis of carcinogenic equivalence (CEQ) to characterize carcinogenic VOC emissions in a typical petrochemical industrial park in Taiwan. *Environ Int*. 1 avr 2024;186:108548.
80. He Y, Qiu H, Wang W, Lin Y, Ho KF. Exposure to BTEX is associated with cardiovascular disease, dyslipidemia and leukocytosis in national US population. *Sci Total Environ*. 1 avr 2024;919:170639.
81. Chen D, Sandler DP, Keil AP, Heiss G, Whitsel EA, Edwards JK, et al. Volatile Hydrocarbon Exposures and Incident Coronary Heart Disease Events: Up to Ten Years of Follow-up among Deepwater Horizon Oil Spill Workers. *Environ Health Perspect*. mai 2023;131(5):057006.
82. Abplanalp W, DeJarnett N, Riggs DW, Conklin DJ, McCracken JP, Srivastava S, et al. Benzene exposure is associated with cardiovascular disease risk. *PLOS ONE*. 8 sept 2017;12(9):e0183602.
83. Jin K, Zhu F, Wu B, Li M, Wang X, Cheng X, et al. Leukemia risk assessment of exposure to low-levels of benzene based on the linearized multistage model. *Front Public Health*. 2024;12:1355739.
84. Thomas R, Hubbard AE, McHale CM, Zhang L, Rappaport SM, Lan Q, et al. Characterization of Changes in Gene Expression and Biochemical Pathways at Low Levels of Benzene Exposure. *PLOS ONE*. 1 mai 2014;9(5):e91828.

85. Tumors due to chronic exposure to benzene and biomarkers of exposure [Internet]. [cité 19 févr 2025]. Disponible sur: <https://www.oaepublish.com/articles/2394-4722.2022.02>
86. Sassano M, Seyyedsalehi MS, Boffetta P. Occupational benzene exposure and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Res.* 21 mai 2024;119213.
87. Godono A, Dito A, Martini G, Picciaiolo MV, Di Lorenzo A, Ciocan C, et al. Occupational benzene exposure and risk of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Environ Res.* 21 sept 2024;263(Pt 1):120033.
88. Alfadaly N, Aboul-Hagag KE, Al-Robaee A, Al Shobaili H, Azoliban a. Toxicological study on the health effects of long term exposure to benzene in benzene filling workers, qassim region, KSA. *Egypt J Forensic Sci Appl Toxicol.* 1 juin 2016;16(1):81-94.
89. Health effects. In: *Toxicological Profile for Benzene* [Internet]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2007 [cité 4 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK591289/>
90. Chaiklieng S, Suggaravetsiri P, Tangsawad S, Pruktharathikul V. Health Risk Assessment via Biomarker of Benzene Exposure in Gasoline Station Workers - *J Health Sci* [Internet]. 30 oct 2017 [cité 19 févr 2025]; Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/Health-Risk-Assessment-via-Biomarker-of-Benzene-in-Chaiklieng-Suggaravetsiri/76d75e8c329cbeae7e6249dc15835dc53e98345a>
91. Chaiklieng, Suggaravetsiri, Autrup. Risk Assessment on Benzene Exposure among Gasoline Station Workers. *Int J Environ Res Public Health.* 16 juill 2019;16(14):2545.
92. McHale CM, Zhang L, Lan Q, Li G, Hubbard AE, Forrest MS, et al. Changes in the peripheral blood transcriptome associated with occupational benzene exposure identified by cross-comparison on two microarray platforms. *Genomics.* avr 2009;93(4):343-9.
93. Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson BA, Lan Q, Rothman N, et al. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis.* avr 2006;27(4):772-81.
94. Perbellini L, Princivalle A, Cerpelloni M, Pasini F, Brugnone F. Comparison of breath, blood and urine concentrations in the biomonitoring of environmental exposure to 1,3-butadiene, 2,5-dimethylfuran, and benzene. *Int Arch Occup Environ Health.* juill 2003;76(6):461-6.
95. Benzène (71-43-2) / Acide trans, trans muconique urinaire - Biotox - INRS [Internet]. [cité 12 sept 2024]. Disponible sur: https://www.inrs.fr/publications/bdd/biotox/dosage.html?refINRS=Dosage_104
96. Knudsen LE, Tolonen H, Scheepers PTJ, Loots I, Vorkamp K, Hajeb P, et al. Implementation and coordination of an ethics framework in HBM4EU - Experiences and reflections. *Int J Hyg Environ Health.* mars 2023;248:114098.
97. Fustinoni S, Campo L, Polledri E, Mercadante R, Erspamer L, Ranzi A, et al. A Validated Method for Urinary Cotinine Quantification Used to Classify Active and Environmental Tobacco Smoke Exposure. *Curr Anal Chem.* 9(3):447-56.

98. Bader M, Van Weyenbergh T, Verwerft E, Van Pul J, Lang S, Oberlinner C. Human biomonitoring after chemical incidents and during short-term maintenance work as a tool for exposure analysis and assessment. *Toxicol Lett.* 15 déc 2014;231(3):328-36.
99. Chaiklieng S, Suggaravetsiri P, Kaminski N, Autrup H. Factors Affecting Urinary t-t-Muconic Acid Detection among Benzene Exposed Workers at Gasoline Stations. *Int J Environ Res Public Health.* 30 oct 2019;16(21):4209.
100. Fracasso ME, Doria D, Bartolucci GB, Carrieri M, Lovreglio P, Ballini A, et al. Low air levels of benzene: Correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicol Lett.* 15 janv 2010;192(1):22-8.
101. Committee for Risk Assessment, Opinion on scientific evaluation of occupational exposure limits for Benzene [Internet]. [cité 9 août 2024]. Disponible sur: https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/benzene_opinion_en.pdf/4fec9aac-9ed5-2aae-7b70-5226705358c7
102. Maestri L, Negri S, Ferrari M, Ghittori S, Imbriani M. Determination of urinary S-phenylmercapturic acid, a specific metabolite of benzene, by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2005;19(9):1139-44.
103. Mansi A, Bruni R, Capone P, Paci E, Pignini D, Simeoni C, et al. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: Modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary t,t-MA/SPMA ratio. *Toxicol Lett.* août 2012;213(1):57-62.
104. Sedha S, Doctor P. Simultaneous Determination of Urinary Trans, Trans-muconic Acid (t,t-MA) and S-phenyl-mercapturic acid (SPMA) by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Pharma Int.* 2016;1(3):138-49.
105. Swaen GMH, van Amelsvoort L, Twisk JJ, Verstraeten E, Slootweg R, Collins JJ, et al. Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. *Chem Biol Interact.* 19 mars 2010;184(1):94-100.
106. Robert Schnatter A, Kerzic PJ, Zhou Y, Chen M, Nicolich MJ, Lavelle K, et al. Peripheral blood effects in benzene-exposed workers. *Chem Biol Interact.* 19 mars 2010;184(1):174-81.
107. Lee CR, Yoo CI, Lee JH, Kim SR, Kim Y. Hematological changes of children exposed to volatile organic compounds containing low levels of benzene. *Sci Total Environ.* 1 nov 2002;299(1):237-45.
108. Khuder SA, Youngdale MC, Bisesi MS, Schaub EA. Assessment of Complete Blood Count Variations Among Workers Exposed to Low Levels of Benzene. *J Occup Environ Med.* sept 1999;41(9):821.
109. Giardini I, da Poça KS, da Silva PVB, Andrade Silva VJC, Cintra DS, Friedrich K, et al. Hematological Changes in Gas Station Workers. *Int J Environ Res Public Health.* janv 2023;20(10):5896.
110. Pesatori AC, Garte S, Popov T, Georgieva T, Panev T, Bonzini M, et al. Early effects of low benzene exposure on blood cell counts in Bulgarian petrochemical workers.

111. Koh DH, Jeon HK, Lee SG, Ryu HW. The relationship between low-level benzene exposure and blood cell counts in Korean workers. *Occup Environ Med.* 1 juin 2015;72(6):421-7.
112. Qu Q, Shore R, Li G, Jin X, Chen LC, Cohen B, et al. Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. *Am J Ind Med.* oct 2002;42(4):275-85.
113. Casale T, Sacco C, Ricci S, Loreti B, Pacchiarotti A, Cupelli V, et al. Workers exposed to low levels of benzene present in urban air: Assessment of peripheral blood count variations. *Chemosphere.* 1 juin 2016;152:392-8.
114. Bollati V, Baccarelli A., Hou L, et al. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res [Internet].* 2 janv 2007 [cité 12 déc 2024];67(3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17283117/>
115. Fustinoni S, Buratti M, Campo L, Colombi A, Consonni D, Pesatori AC, et al. Urinary *t,t*-muconic acid, *S*-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem Biol Interact.* 30 mai 2005;153-154:253-6.
116. Belal SF, Shaalan RA, Ragab MAA, El-Attar EA, Agami M. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for muconic, mandelic, hippuric and methylhippuric acids analysis in human urine as metabolites for fuel exposure. *Microchem J.* sept 2019;149:103992.
117. Tests de génotoxicité : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérogènes. MISE AU POINT. 2021;
118. Moro AM, Charão MF, Brucker N, Durgante J, Baierle M, Bubols G, et al. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* juin 2013;754(1-2):63-70.
119. Villarini M, Guerrera E, Vannini S. Cytogenetic biomonitoring of road tunnel construction workers: buccal micronucleus cytome assay. *Ann Ig Med Prev E COMUNITÀ [Internet].* 2021 [cité 4 mai 2024];(4). Disponible sur: <https://doi.org/10.7416/ai.2020.2397>
120. Zhou Y, Wang K, Wang B, Pu Y, Zhang J. Occupational benzene exposure and the risk of genetic damage: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* déc 2020;20(1):1113.
121. Uzma N, Kumar BS, Hazari MAH. Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. *Am J Ind Med.* déc 2010;53(12):1264-70.
122. Costa-Amaral IC, Carvalho LVB, Santos MVC, Valente D, Pereira AC, Figueiredo VO, et al. Environmental Assessment and Evaluation of Oxidative Stress and Genotoxicity Biomarkers Related to Chronic Occupational Exposure to Benzene. *Int J Environ Res Public Health.* 1 juin 2019;16(12):E2240.
123. Andreoli R, Mutti A, Goldoni M, Manini P, Apostoli P, De Palma G. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy)ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radic Biol Med.* janv 2011;50(2):254-61.

124. Graille M, Wild P, Sauvain JJ, Hemmendinger M, Guseva Canu I, Hopf NB. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 26 mai 2020;21(11):3743.
125. Andreoli R, Manini P, Palma GD, Alinovi R, Goldoni M, Niessen WMA, et al. Quantitative determination of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers. *Biomarkers.* mai 2010;15(3):221-31.
126. Barregard L, Møller P, Henriksen T, Mistry V, Koppen G, Rossner P, et al. Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal.* 20 juin 2013;18(18):2377-91.
127. Lan Q, Zhang L, Hakim F, Shen M, Memon S, Li G, et al. Lymphocyte toxicity and T cell receptor excision circles in workers exposed to benzene. *Chem Biol Interact.* 30 mai 2005;153-154:111-5.
128. Schiffman C, McHale CM, Hubbard AE, Zhang L, Thomas R, Vermeulen R, et al. Identification of gene expression predictors of occupational benzene exposure. Peddada SD, éditeur. *PLOS ONE.* 9 oct 2018;13(10):e0205427.
129. Lan Q, Zhang L, Shen M, Jo WJ, Vermeulen R, Li G, et al. Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between DNA repair and genomic maintenance and development of benzene hematotoxicity. *Carcinogenesis.* janv 2009;30(1):50-8.
130. Shen M, Lan Q, Zhang L et al. Polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair pathway and susceptibility to benzene-induced hematotoxicity. *Carcinogenesis* [Internet]. oct 2006 [cité 12 déc 2024];27(10). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728435/>
131. Ross D. Functions and distribution of NQO1 in human bone marrow: Potential clues to benzene toxicity. *Chem Biol Interact.* mai 2005;153-154:137-46.
132. Bauer AK, Faiola B, Abernethy DJ, Marchan R, Pluta LJ, Wong VA, et al. Genetic Susceptibility to Benzene-induced Toxicity: Role of NADPH: Quinone Oxidoreductase-1.
133. Carbonari D, Proietto A, Fioretti M, Tranfo G, Paci E, Papacchini M, et al. Influence of genetic polymorphism on t,t-MA/S-PMA ratio in 301 benzene exposed subjects. *Toxicol Lett.* déc 2014;231(2):205-12.
134. Ramírez-Lopera V, Uribe-Castro D, Bautista-Amorocho H, Silva-Sayago JA, Mateus-Sánchez E, Ardila-Barbosa WY, et al. The effects of genetic polymorphisms on benzene-exposed workers: A systematic review. *Health Sci Rep.* sept 2021;4(3):e327.
135. Lin LC, Chen WJ, Chiung YM, Shih TS, Liao PC. Association between GST genetic polymorphism and dose-related production of urinary benzene metabolite markers, trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* juin 2008;17(6):1460-9.
136. Karakitsios SP, Papaloukas CL, Kassomenos PA, Pilidis GA. Assessment and prediction of exposure to benzene of filling station employees. *Atmos Environ.* déc 2007;41(40):9555-69.

137. Scourzic L, Mouly E, Bernard OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med.* 2015;7(1):9.
138. Lovreglio P, Barbieri A, Carrieri M, Sabatini L, Fracasso ME, Doria D, et al. Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. *Int Arch Occup Environ Health.* 1 mars 2010;83(3):341-56.
139. Chaiklieng S, Pimpasaeng C, Thappasaraphong S. Benzene Exposure at Gasoline Stations: Health Risk Assessment. *Hum Ecol Risk Assess Int J.* 17 nov 2015;21(8):2213-22.
140. Jamaledin Shahtaheri S, Ghamari F, Golbabaie F, Rahimi-Froushani A, Abdollahi M. Sample Preparation Followed by High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Analysis for Monitoring Muconic Acid as a Biomarker of Occupational Exposure to Benzene. *Int J Occup Saf Ergon.* janv 2005;11(4):377-88.
141. Geraldino BR, Nunes RFN, Gomes JB, Giardini I, Da Silva PVB, Campos É, et al. Analysis of Benzene Exposure in Gas Station Workers Using Trans,Trans-Muconic Acid. *Int J Environ Res Public Health.* 23 juill 2020;17(15):5295.
142. Gomes R, Sanson A, Lobo F, Afonso R, Coutrim M. Method for the Determination of Benzene Metabolite t,t-Muconic Acid in Urine by HPLC-UV with an Ion Exclusion Column. *Separations.* 13 mai 2016;3(2):14.
143. Olmos V, Lenzken SC, Lopez CM, Villaamil EC. High-Performance Liquid Chromatography Method for Urinary trans, trans-Muconic Acid. Application to Environmental Exposure to Benzene. *J Anal Toxicol.* 1 mai 2006;30(4):258-61.
144. Hornung RW, Reed LD. Estimation of Average Concentration in the Presence of Nondetectable Values. *Appl Occup Environ Hyg.* 1 janv 1990;5(1):46-51.
145. Solberg H. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clin Chim Acta* [Internet]. 1 janv 1987 [cité 23 déc 2024]; Disponible sur: https://www.academia.edu/3729325/Approved_recommendation_1987_on_the_theory_of_reference_values_Part_5_Statistical_treatment_of_collected_reference_values_Determination_of_reference_limits
146. Troussard X, Vol S, Cornet E, Bardet V, Couaillac JP, Fossat C, et al. Determination of full blood count normal reference values for adults in France. *Ann Biol Clin (Paris).* sept 2014;72(5):561-81.
147. WHO, Algeria Fact Sheets, [Internet]. [cité 28 mai 2025]. Disponible sur: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/12-algeria-fact-sheet.pdf>
148. Panev T, Popov T, Georgieva T, Chohadjieva D. Assessment of the correlation between exposure to benzene and urinary excretion of t, t-muconic acid in workers from a petrochemical plant. *Int Arch Occup Environ Health.* oct 2002;75 Suppl:S97-100.
149. Barbieri A, Violante FS, Sabatini L, Graziosi F, Mattioli S. Urinary biomarkers and low-level environmental benzene concentration: assessing occupational and general exposure. *Chemosphere.* déc 2008;74(1):64-9.

150. Scheepers PTJ, De Werdt L, Van Dael M, Anzion R, Vanoirbeek J, Duca RC, et al. Assessment of exposure of gas station attendants in Sri Lanka to benzene, toluene and xylenes. *Environ Res.* nov 2019;178:108670.
151. Lefebvre M. ; R. Gaudin, P. Ducos, J.M. Francin, P. Marsan, A. Robert, Département Polluants et santé, T. Nicot, Département Ingénierie des procédés ; C. Lefèvre, Département Métrologie des polluants ; Centre de Lorraine, INRS, Vandœuvre-lès-Nancy,. 2002;
152. Jalai A, Ramezani Z, Ebrahim K. Urinary Trans, Trans -Muconic Acid is Not a Reliable Biomarker for Low-level Environmental and Occupational Benzene Exposures. *Saf Health Work.* juin 2017;8(2):220-5.
153. Zhang L, Ye F li, Chen T, Mei Y, Song S zhen. Trans, Trans-Muconic Acid as a Biomarker of Occupational Exposure to High-Level Benzene in China. *J Occup Environ Med.* oct 2011;53(10):1194-8.
154. Chakroun R, Kaabachi N, Hedhili A, Feki M, Nouaigui H, Laiba MB, et al. Benzene Exposure Monitoring of Tunisian Workers. *J Occup Environ Med.* déc 2002;44(12):1173.
155. Nirmawati S, Tualeka AR, Adi AC. Effect of Food Containing High Fe (Iron) Intake to Urinary Trans, Trans-muconic Acid (Tt-ma) Levels on Workers Exposed to Benzene. *Indian J Public Health Res Dev.* janv 2018;9(1):53-7.
156. Chaiklieng S, Suggaravetsiri P, Kaminski N, Autrup H. Exposure to benzene and toluene of gasoline station workers in Khon Kaen, Thailand and adverse effects. *Hum Ecol Risk Assess Int J.* 29 juill 2021;27(7):1823-37.
157. Benzène (71-43-2) / Acide S-phénylmercapturique urinaire - Biotox - INRS [Internet]. [cité 23 févr 2025]. Disponible sur: https://www.inrs.fr/publications/bdd/biotox/dosage.html?refINRS=Dosage_384
158. Benzène (71-43-2) / Benzène sanguin - Biotox - INRS [Internet]. [cité 5 mars 2025]. Disponible sur: https://www.inrs.fr/publications/bdd/biotox/dosage.html?refINRS=Dosage_117
159. Sicotte MA. Abaissement de la valeur limite du benzène par l'ACGIH [Internet]. Solub - Accueil - Démarche de substitution des solvants en milieu de travail. 2024 [cité 19 juin 2025]. Disponible sur: <https://solub.irsst.qc.ca/abaissement-de-la-valeur-limite-du-benzene-par-lacgih/>
160. Jakasa I, Kezic S, Boogard PJ et al., Dermal uptake of petroleum substances. *Toxicol Lett* [Internet]. 6 janv 2015 [cité 13 mai 2025];235(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25827404/>
161. Kharytonov M, Klimkina I, Benselhoub A, Bouhedja A, Abdelaziz I, Aissi A. Air pollution mapping in the Wilaya of Annaba (NE of Algeria). *Min Sci* [Internet]. 2016 [cité 2 avr 2024]; Disponible sur: <http://www.miningscience.pwr.edu.pl/Air-pollution-mapping-in-the-Wilaya-of-Annaba-Ne-of-Algeria-,68765,0,2.html>
162. Yacine M, Cecinato A, Assami K, Meklati B. INDOOR AND OUTDOOR VOC EMISSIONS IN URBAN AREAS OF NORTHERN ALGERIA Author(s): Moussaoui Yacine; Cecinato Angelo; Assami Karim; et al.Source: FRESINIUS ENVIRONMENTAL

- BULLETIN Volume: 21 Issue: 5 Pages: 1090-1098 Published: 2012. Fresenius Environ Bull. 1 mai 2012;21:1090-8.
163. Yacine M, Balducci C, Cecinato A, Meklati B. Chemical composition of extractable organic matter of airborne particles in urban and rural atmospheres of northern algeria. *Fresenius Environ Bull.* 1 janv 2010;19:2497-508.
 164. Naili S, Morsli A. Impact of industrial atmospheric emissions on ambient air quality in Arzew area, Algeria. *Maghrebien J Pure Appl Sci.* 26 avr 2021;7(1):31-6.
 165. Kerchich Y, Kerbachi R, Khatraoui H. Ambient Air Levels of Aromatic Organic Compounds in the Urban Area of Algiers, Algeria. *Asian J Chem.* 2011;23(1):323-30.
 166. Tout savoir sur les différents carburants | FAQ [Internet]. Home. [cité 11 juin 2025]. Disponible sur: https://www.aral.de/fr_lu/luxembourg/home/faq/faq-les-carburants/faq-tout-savoir-sur-les-differents-carburants.html
 167. L'Italie renforce ses mesures contre l'usage du tabac, des cigarettes électroniques et du tabac chauffé [Internet]. Génération sans tabac. [cité 16 juin 2025]. Disponible sur: <https://www.generationsanstabac.org/fr/actualites/litalie-renforce-ses-mesures-contre-lusage-du-tabac-des-cigarettes-electroniques-et-du-tabac-chauffe/>
 168. Tranfo G, Pignini D, Paci E, Bauleo L, Forastiere F, Ancona C. Biomonitoring of Urinary Benzene Metabolite SPMA in the General Population in Central Italy. *Toxics.* 11 juill 2018;6(3):37.
 169. Tuakuila J. S-phenylmercapturic acid (S-PMA) levels in urine as an indicator of exposure to benzene in the Kinshasa population. *Int J Hyg Environ Health.* 1 juill 2013;216(4):494-8.
 170. Hecht SS, Koh WP, Wang R, Chen M, Carmella SG, Murphy SE, et al. Elevated Levels of Mercapturic Acids of Acrolein and Crotonaldehyde in the Urine of Chinese Women in Singapore Who Regularly Cook at Home. *PLOS ONE.* 25 mars 2015;10(3):e0120023.
 171. Kim S. Overview of Cotinine Cutoff Values for Smoking Status Classification. *Int J Environ Res Public Health.* déc 2016;13(12):1236.
 172. Les dernières données mondiales révèlent que le tabagisme a causé près de 8 millions de décès en 2019 et que 90 % des nouveaux fumeurs sont dépendants à l'âge de 25 ans [Internet]. Index Santé. [cité 14 juin 2025]. Disponible sur: <https://www.indexsante.ca/nouvelles/1052/les-dernieres-donnees-mondiales-revelent-que-le-tabagisme-a-cause-pres-de-8-millions-de-deces-en-2019.php>
 173. Toluène (108-88-3) / Acide S-benzylmercapturique (S-BMA) urinaire - Biotox - INRS [Internet]. [cité 16 juin 2025]. Disponible sur: https://www.inrs.fr/publications/bdd/biotox/dosage.html?refINRS=DosageN_429
 174. Rosting C, Olsen R. Biomonitoring of the benzene metabolite s-phenylmercapturic acid and the toluene metabolite s-benzylmercapturic acid in urine from firefighters. *Toxicol Lett.* sept 2020;329:20-5.

175. Alwis KU, Blount BC, Britt AS, Patel D, Ashley DL. Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MSMS). *Anal Chim Acta*. 31 oct 2012;750:152-60.
176. Inoue O, Seiji K, Watanabe T, Kasahara M, Nakatsuka H, Yin S, et al. Mutual metabolic suppression between benzene and toluene in man. *Int Arch Occup Environ Health*. 1 janv 1988;60(1):15-20.
177. Assessment - Benzene CASRN 71-43-2 IRIS US EPA, ORD.
178. Carrieri M, Bonfiglio E, Scapellato ML, Maccà I, Tranfo G, Faranda P, et al. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. *Toxicol Lett*. 10 avr 2006;162(2-3):146-52.
179. Williams PRD, Mani A. Benzene Exposures and Risk Potential for Vehicle Mechanics from Gasoline and Petroleum-Derived Products. *J Toxicol Environ Health Part B*. 17 nov 2015;18(7-8):371-99.
180. Scarselli A, Binazzi A, Di Marzio D. Occupational exposure levels to benzene in Italy: findings from a national database. *Int Arch Occup Environ Health*. août 2011;84(6):617-25.
181. Williams PRD, Sahmel J, Knutsen J, Spencer J, Bunge AL. Dermal absorption of benzene in occupational settings: estimating flux and applications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol*. févr 2011;41(2):111-42.
182. Nordlinder r, Ramnäs o. Exposure to benzene at different workplaces in Sweden. *Ann Occup Hyg*. 1 janv 1987;31(3):345-55.
183. Popp W, Rauscher D, Müller G, Angerer J, Norpoth K. Concentrations of benzene in blood and S-phenylmercapturic and t,t-muconic acid in urine in car mechanics. *Int Arch Occup Environ Health*. 1994;66(1):1-6.
184. Liu Y, Long Z, Qiu J, Chen Q, Yang A, Xiao M, et al. Combined effects of benzene, toluene, xylene, ethylbenzene, and styrene exposure on hearing loss mediated by oxidative stress at realistic low levels. *Environ Pollut*. 15 déc 2024;363:125149.
185. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 1 févr 2014;1840(2):801-8.
186. Tranfo G, Paci E, Carrieri M, Marchetti E, Sisto R, Gherardi M, et al. Levels of Urinary Biomarkers of Oxidatively Generated Damage to DNA and RNA in Different Groups of Workers Compared to General Population. *Int J Environ Res Public Health*. août 2019;16(16):2995.
187. Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Petyx M, Corradi M, et al. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol Lett*. 10 sept 2008;181(1):25-30.

188. Fenga C, Gangemi S, Teodoro M, Rapisarda V, Golokhvast K, Docea AO, et al. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. *Toxicol Rep.* 1 janv 2017;4:291-5.
189. Andreoli R, Spatari G, Pignini D, Poli D, Banda I, Goldoni M, et al. Urinary biomarkers of exposure and of oxidative damage in children exposed to low airborne concentrations of benzene. *Environ Res.* oct 2015;142:264-72.
190. Gil GF, Anderson JA, Aravkin A, Bhangdia K, Carr S, Dai X, et al. Health effects associated with chewing tobacco: a Burden of Proof study. *Nat Commun.* 5 févr 2024;15(1):1082.
191. Kimura S, Yamauchi H, Hibino Y, Iwamoto M, Sera K, Ogino K. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanine in healthy Japanese people. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* mai 2006;98(5):496-502.
192. Buonauro F, Paci E, Pignini D, Marini F, Bauleo L, Ancona C, et al. Chemometric Study of the Correlation between Human Exposure to Benzene and PAHs and Urinary Excretion of Oxidative Stress Biomarkers. *Atmosphere.* déc 2020;11(12):1341.
193. Kanaya S, Ikeya M, Yamamoto K, Moriya T, Furuhashi K, Sonoda M, et al. Comparison of an oxidative stress biomarker « urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, » between smokers and non-smokers. *BioFactors Oxf Engl.* 2004;22(1-4):255-8.
194. Foksinski M, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Guz J, Szpila A, et al. Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. *Eur J Nutr.* 1 avr 2007;46(3):174-80.
195. Chen CHS, Yuan TH, Shie RH, Wu KY, Chan CC. Linking sources to early effects by profiling urine metabolome of residents living near oil refineries and coal-fired power plants. *Environ Int.* 1 mai 2017;102:87-96.
196. Liu J, Jia G. Methylation modifications in eukaryotic messenger RNA. *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao.* 20 janv 2014;41(1):21-33.
197. Xiong F, Li Q, Zhou B, Huang J, Liang G, Zhang L, et al. Oxidative Stress and Genotoxicity of Long-Term Occupational Exposure to Low Levels of BTEX in Gas Station Workers. *Int J Environ Res Public Health.* déc 2016;13(12):1212.
198. Hu CW, Liu HH, Li YJ, Chao MR. Direct analysis of 5-methylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with N-methylated purines and oxidized DNA lesions. *Chem Res Toxicol.* 20 févr 2012;25(2):462-70.
199. Yang DZ, Chen ZZ, Chi M, Dong YY, Pu SZ, Sun Q. An Improved Approach for Practical Synthesis of 5-Hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5hmdC) Phosphoramidite and Triphosphate. *Molecules.* janv 2022;27(3):749.
200. Rota F, Conti A, Campo L, Favero C, Cantone L, Motta V, et al. Epigenetic and Transcriptional Modifications in Repetitive Elements in Petrol Station Workers Exposed to Benzene and MTBE. *Int J Environ Res Public Health.* 12 avr 2018;15(4):735.

201. Seow WJ, Pesatori AC, Dimont E, Farmer PB, Albetti B, Ettinger AS, et al. Urinary benzene biomarkers and DNA methylation in Bulgarian petrochemical workers: study findings and comparison of linear and beta regression models. *PloS One*. 2012;7(12):e50471.
202. Chappell G, Pogribny IP, Guyton KZ, Rusyn I. Epigenetic alterations induced by genotoxic occupational and environmental human chemical carcinogens: A systematic literature review. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016;768:27-45.
203. Tsai SP, Fox EE, Ransdell JD, Wendt JK, Waddell LC, Donnelly RP. A hematology surveillance study of petrochemical workers exposed to benzene. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1 août 2004;40(1):67-73.
204. Garmoum K. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. 5 juin 2016 [cité 18 juill 2025]; Disponible sur: https://www.academia.edu/25887763/Validation_des_m%C3%A9thodes_danalyse_quantitative_par_le_profil_dexactitude
205. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II. *J Pharm Biomed Anal*. 21 sept 2007;45(1):70-81.

Annexes

Annexe I: Approbation du comité d'éthique

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE LA SANTE
CHU ANNABA
COMITE D'ETHIQUE DU CHU
Réf. 001.24/ma/66/2018

Annaba le 07 fevrier 2024

Attestation d'approbation éthique

Je soussigné prof. Mira Abdelhamid, président du Comité d'éthique du CHU d'Annaba, certifie que le docteur Kerkoub Fazia, maitre assistante en toxicologie, effectue un travail de recherche impliquant des sujets humains, depuis le 01 janvier 2023 .

Il s'agit d'une thèse intitulée: «**Evaluation biotoxicologique de l'exposition professionnelle au benzène contenu dans le carburant**», encadrée par le professeur Djaffer, de la faculté de médecine d'Annaba.

A ce titre, le Dr Kerkoub Fazia collecte des prélèvements biologiques urinaires et sanguins afin de réaliser des analyses biologiques, en collaboration avec le médecin du travail responsable des malades.

Le Dr. Kerkoub Fazia assure effectuer ses recherches dans le respect total des principes éthiques liés à la confidentialité, le consentement, la non malfeasance et la justice.


MIRA Abdelhamid
Président
du Comité d'Ethique
du C.H.U. d'Annaba
N° 1726

Annexe II: Consentement éclairé des sujets participant à l'étude

Laboratoire de toxicologie – CHU Ibn Sina Annaba

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ POUR LA PARTICIPATION À LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Je, soussigné(e), né le, donne mon consentement pour que les résultats de mes analyses biologiques soient utilisés de manière anonyme dans la recherche scientifique.

Je comprends que :

- Mes informations personnelles seront supprimées de tous les résultats d'analyse avant leur utilisation dans la recherche.
- Avoir compris que mes échantillons biologiques, prélevés dans le cadre du soin et/ou de la recherche, peuvent être conservés et utilisés à des fins de recherche
- Les résultats de mes analyses peuvent être partagés avec d'autres chercheurs, mais sans aucune information permettant de m'identifier.
- Dans le cas où des informations importantes concernant ma santé seraient mises en évidence lors de ces recherches, je peux en être informé(e) par mon médecin
- Ma participation est volontaire et je peux retirer mon consentement à tout moment, sans conséquences pour mes soins médicaux.

Date et Signature :

موافقة مستنيرة على المشاركة في البحث العلمي

أنا الموقع أدناه... المولود يوم.....، أعطي موافقتي على استخدام نتائج تحاليلي البيولوجية بشكل مجهول في البحث العلمي.

أفهم أن:

سنتم إزالة معلوماتي الشخصية من جميع نتائج التحليل قبل استخدامها في البحث.

أنا أفهم أن العينات البيولوجية الخاصة بي، التي تم أخذها في إطار التحاليل الطبية، يمكن أن تحفظ وتستخدم لأغراض البحث العلمي

يمكن مشاركة نتائج تحاليلي مع باحثين آخرين، ولكن بدون أي معلومات تتيح التعرف علي.

- في حالة كشف أي معلومات مهمة تتعلق بصحتي خلال هذه الأبحاث، يمكن أن أكون على علم بها من خلال طبيبي المعين

مشاركتي طوعية وأستطيع سحب موافقتي في أي وقت، دون أي تأثير على الرعاية الطبية التي ألتفها.

التاريخ و التوقيع:

Annexe III: Fiche de renseignements

Centre Hospitalo-Universitaire Ibn Sina – Annaba
Laboratoire de Toxicologie
Unité Toxicologie Professionnelle

Fiche de renseignements pour le dosage de l'acide trans,trans-Muconique urinaire

Informations sur le patient			Date de naissance :				
Nom		Age :	Tel :	Reçu le :			
Prénom		Service /Médecin :					
Signes cliniques présentés les 6 derniers mois			Fréquence				
Asymptomatique <input type="checkbox"/>			1/mois	1/semaine	pendant travail	Après travail	continu
Faibles : mal de tête <input type="checkbox"/> vertige <input type="checkbox"/> mal de gorge <input type="checkbox"/> démangeaison <input type="checkbox"/>							
Modérés : douleurs thoraciques <input type="checkbox"/> dyspnée <input type="checkbox"/> fatigue chronique <input type="checkbox"/> nausées <input type="checkbox"/> vomissement <input type="checkbox"/> crampes <input type="checkbox"/> vision floue <input type="checkbox"/> irritation <input type="checkbox"/> troubles de l'équilibre <input type="checkbox"/> somnolence <input type="checkbox"/> irritation cutanée <input type="checkbox"/>							
Sévères : infections <input type="checkbox"/> hémorragie <input type="checkbox"/> épistaxis <input type="checkbox"/> convulsion <input type="checkbox"/> coma <input type="checkbox"/>							
Chroniques : troubles cardiaques (AVC, IDM, arythmie) anémie <input type="checkbox"/> thrombopénie <input type="checkbox"/> leucopénie <input type="checkbox"/> leucémie <input type="checkbox"/>							
Autres:.....							
Médicaments en cours						
Tabagisme		Non-Fumeur <input type="checkbox"/> Fumeur <input type="checkbox"/> Nbre de cigarettes/jr.....					
Prise d'alcool		Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>					
Prise de fer		Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>					
Aliments pris le jour du pvt		Fromage <input type="checkbox"/> Jus indus <input type="checkbox"/> Yaourt <input type="checkbox"/> Confiserie <input type="checkbox"/> Non précisé <input type="checkbox"/> Viande <input type="checkbox"/>					
Informations sur l'activité professionnelle							
Fonction :		Adresse pro :			Ancienneté :		
Rythme de travail :	Nbre H/jr	Jr/semaine			rythme exceptionnel		
Ancien poste :.....							
Moyens de protection :							
Solvants utilisés :							
Informations sur l'échantillon							
Numéro d'échantillon :			Type : urine				
Exposition aux solvants le jour du pvt : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>			Fin de semaine : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> Cig 2H avant le pvt : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>				
	Avant poste			Après poste			
Date du pvt							
Heure du pvt							
Fiche remplie par							

Date d'analyse :	Type cartouche :	Extrait par :
Avant poste	Après poste	Contrôle [C]
Tr :	Tr :	Tr :
H :	H :	H :
[C] mg/L:	[C]mg/L :	R :
Créatinine urinaire Av g/L	Créatinine urinaire Ap g/L	Normes : 0,3 g/L -3 g/L
[AV] µg/g.créa	[AP] µg/g.créa	
Normes :	-0,4 mg/g. de créatinine (population générale NF) -500 µg/g.créa fin de poste (ACGIH)/300-750 µg/g.créa u	

Fiche élaborée par Dr KERKOUB

Annexe IV: Résultats de la validation de la méthode de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD

1. Choix du protocole de validation

Nous nous sommes basés sur les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) (2006) pour valider notre méthode [205]. Et étant donné la présence d'un effet matrice (développé plus loin) nous avons choisi le protocole V5 selon le logigramme illustré ci-dessous.

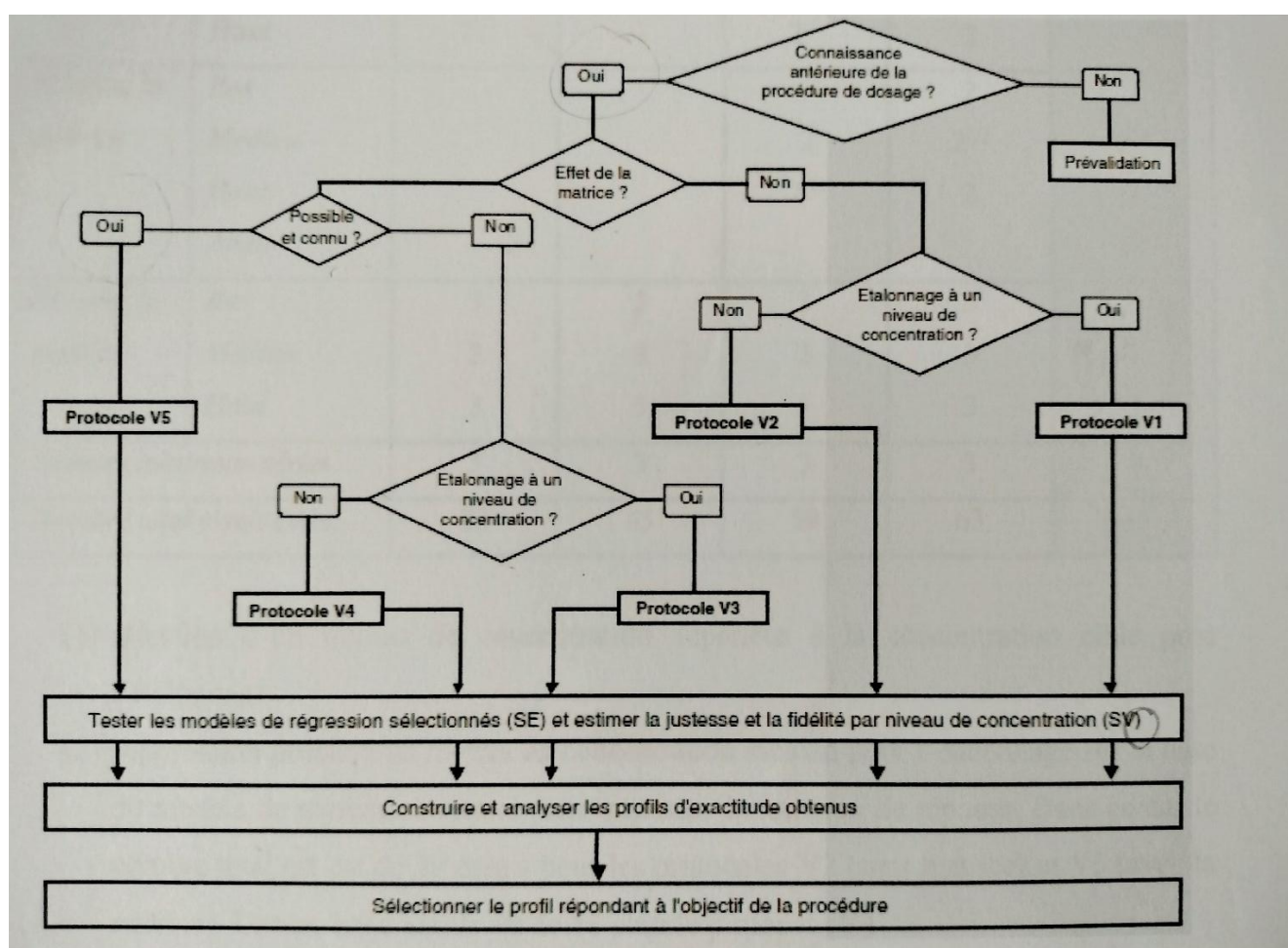


Figure 91: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation selon SFSTP 2006 [205]

Le Tableau 104 présente également, selon le protocole choisi, le nombre total des essais à réaliser pour valider la procédure analytique concernée. Et nous avons choisi de tracer une courbe matrice avec cinq standards de calibration répétée une seule fois par série (jour) au lieu de deux. Nous avons choisi trois standards de validation (bas, médian et haut) répétés chacun trois fois en trois séries.

Tableau 104: Choix du nombre de standards de calibration et de validation en fonction du protocole choisi

Standards	Niveau de concentration	Protocoles				
		V1	V2	V3	V4	V5
SC sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
SC avec matrice	Bas				2	2
	Médian				2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut			2	2	2
	Additionnel			2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽³⁾
SV avec matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre de séries minimum		3	3	3	3	3
Nombre total des essais		33	45	39	63	45

SC : Standard de calibration SV : standard de validation

- (1) : Sélection d'un niveau de concentration supérieur à la concentration cible pour l'étalonnage
- (2) : Suppression possible du niveau médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse. Dans ce cas le nombre total est de 39 essais pour les protocoles V2 et V5 et 51 pour le protocole V4.
- (3) Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple fonction logistique).

2. Limite de détection et de quantification

La limite de détection a été déterminée par analyses chromatographiques successives des extraits d'échantillons de faible concentration (0,4 mg/L).

La limite de détection (LD) est égale à trois fois l'écart type (moyenne \pm ET = 0,39 \pm 0,03) est de 0,09 mg/L (ppm).

La limite de quantification (LQ) égale à dix fois l'écart type (LQ=10 x 0,03= 0,3 mg/L) et est le premier point de la gamme d'étalonnage.

3. Etude de sélectivité vis-à-vis des composants endogènes

Afin d'étudier la sélectivité, nous avons analysé 6 échantillons d'urines vierges différentes de sujets masculins non-fumeurs et n'ayant pas consommé depuis 24H d'aliments contenant du sorbitol. Les chromatogrammes obtenus n'ont pas présenté de pics au temps de rétention du t,t-MA.

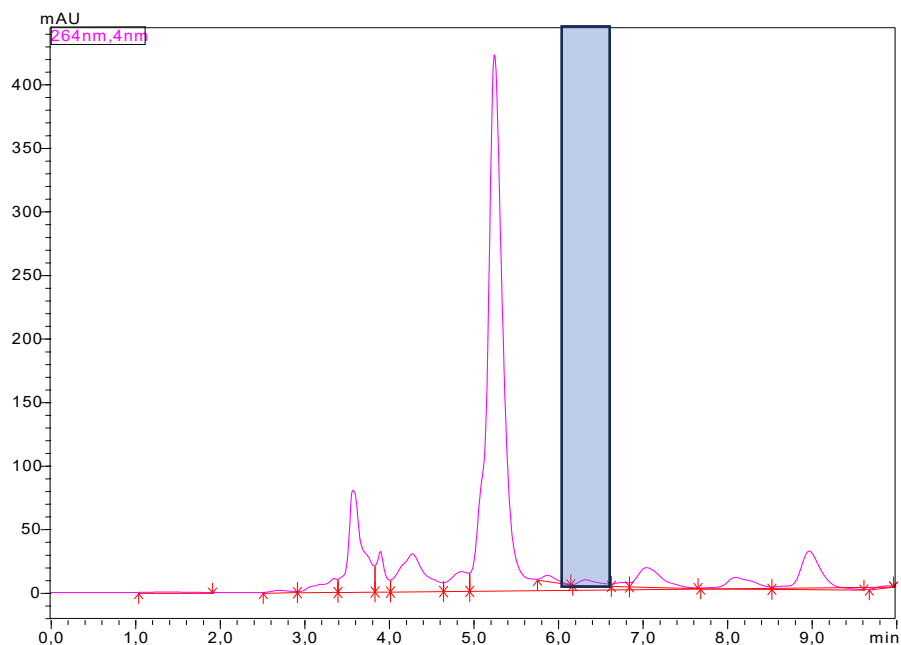


Figure 92: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°1 Chromato blanc 1

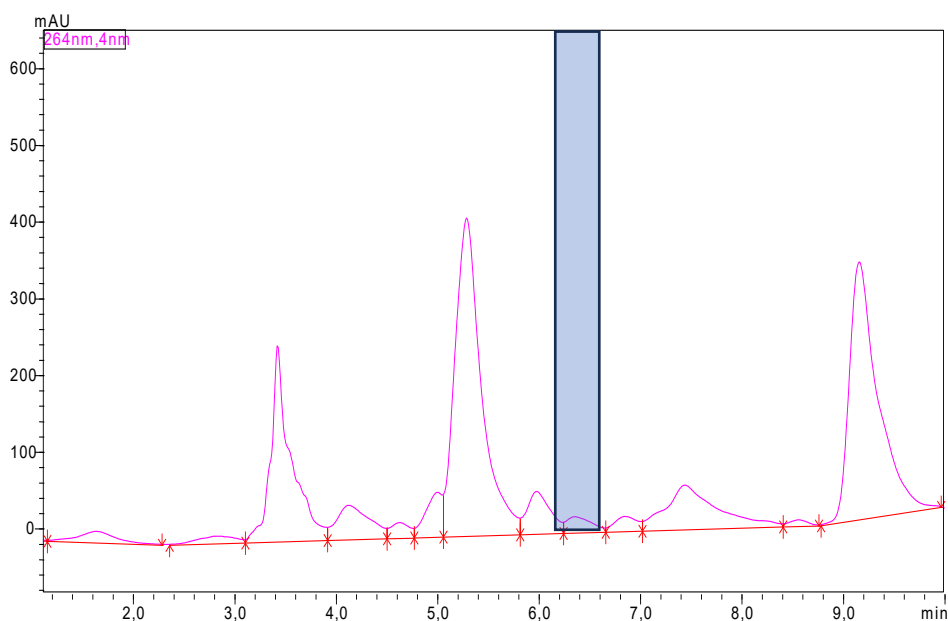


Figure 93: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°2

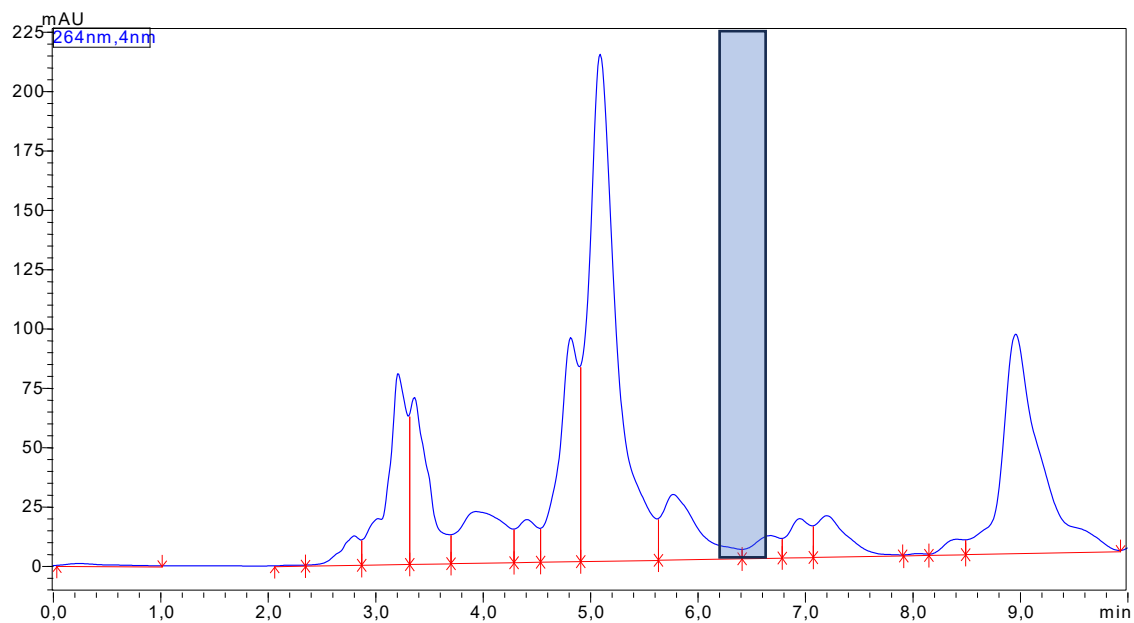


Figure 94: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°3

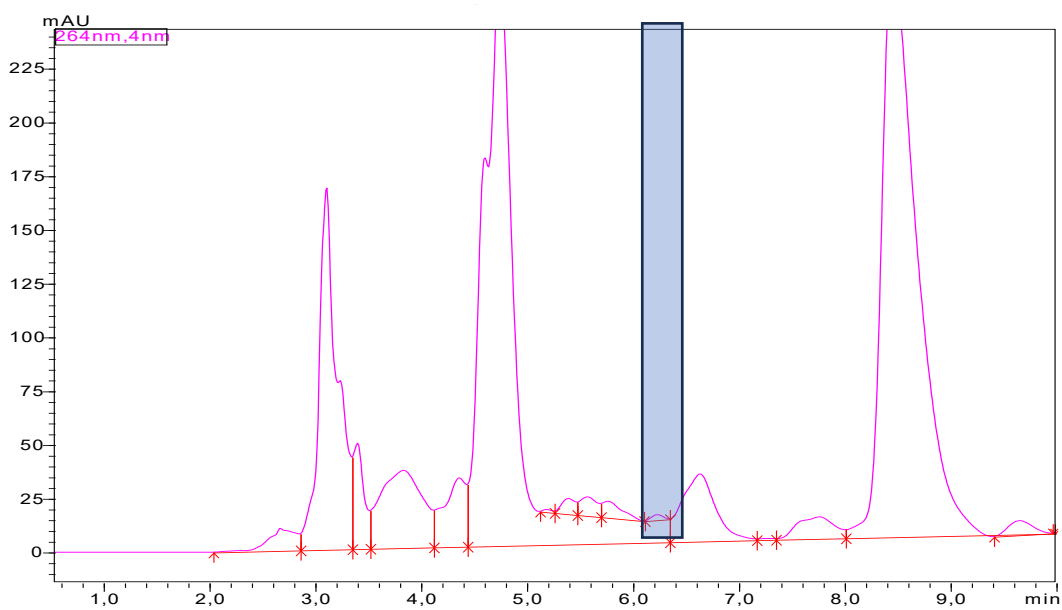


Figure 95: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°4

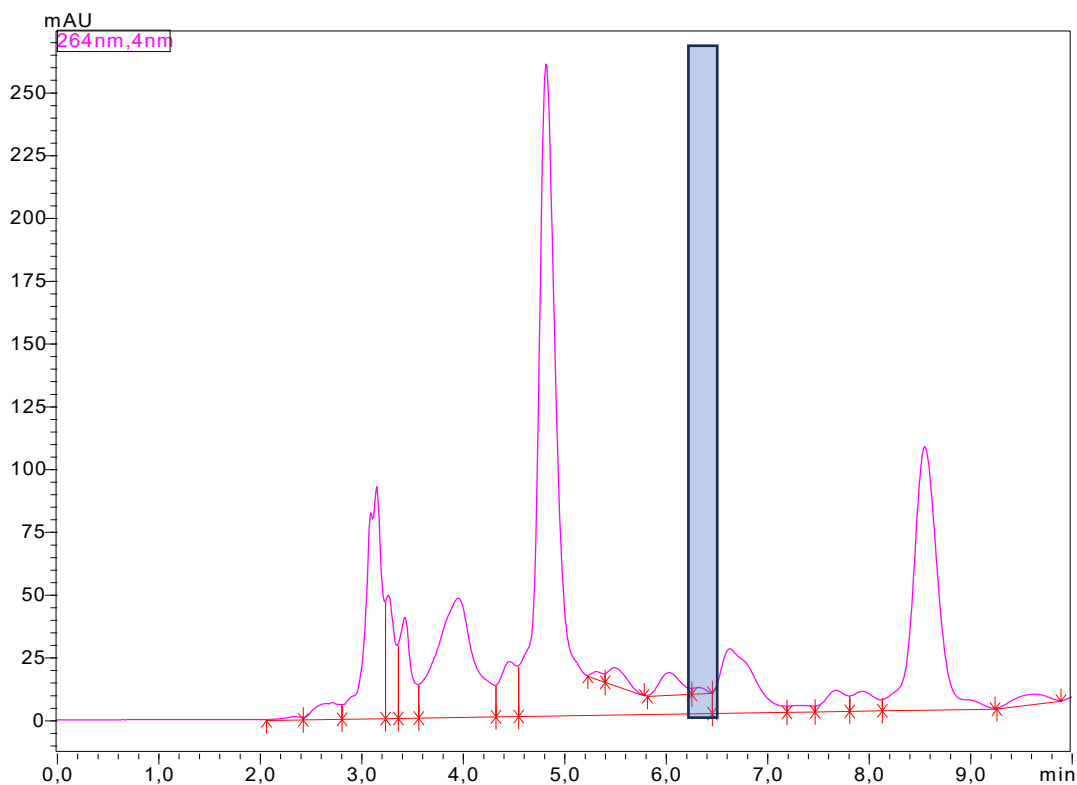


Figure 96: Chromatogramme d'un blanc matrice extrait N°5

4. Fonction de réponse du t,t-MA

La figure 97 illustre la courbe d'étalonnage réalisée dans l'eau.

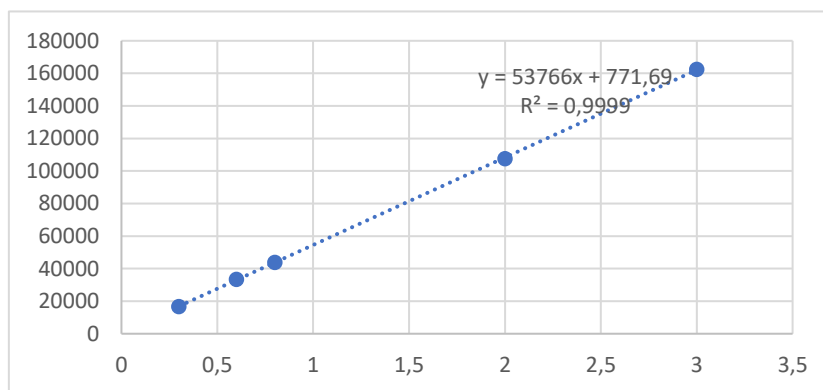


Figure 97: Courbe d'étalonnage effectuée dans l'eau

Les courbes dans les figures 98, 99 et 100 illustrent les trois courbes d'étalonnage dans la matrice des trois jours de validation.

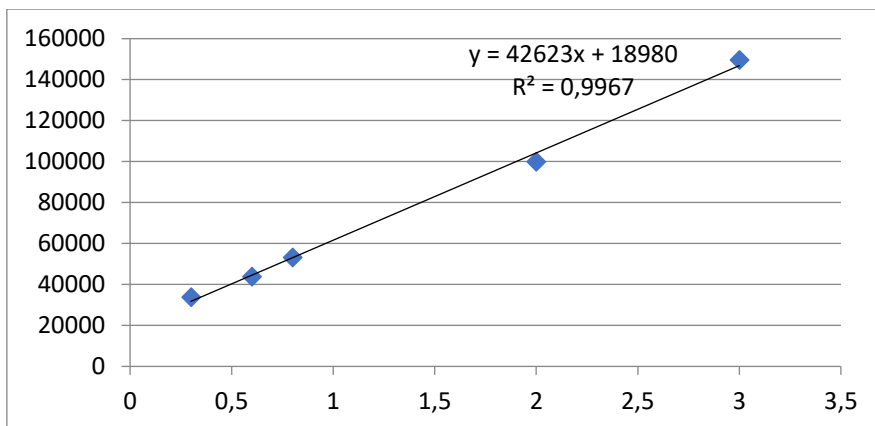


Figure 98: Courbe de calibration de la première série de validation (J1) dans la matrice

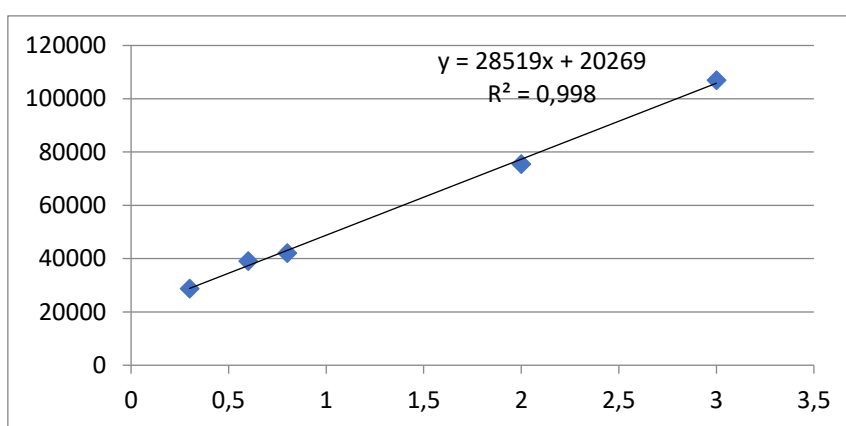


Figure 99: Courbe de calibration de la deuxième série de validation (J2) dans la matrice

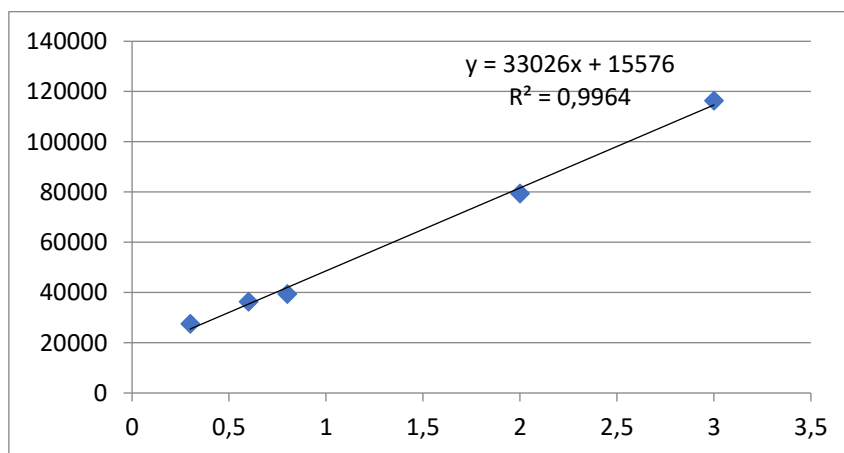


Figure 100 : Courbe de calibration de la troisième série de validation (J3) dans la matrice

La courbe de la figure 101 constitue la moyenne des trois courbes d'étalonnage dans la matrice.

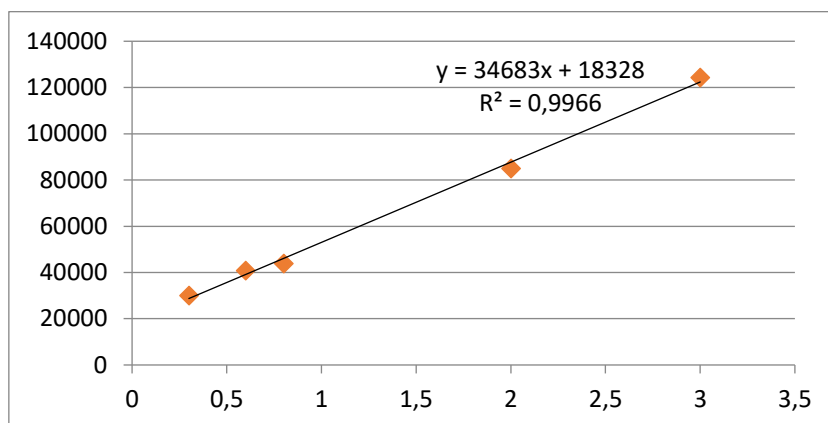


Figure 101: Courbe de calibration moyenne des trois séries dans la matrice

La figure 102 montre les trois courbes des trois séries de mesures.

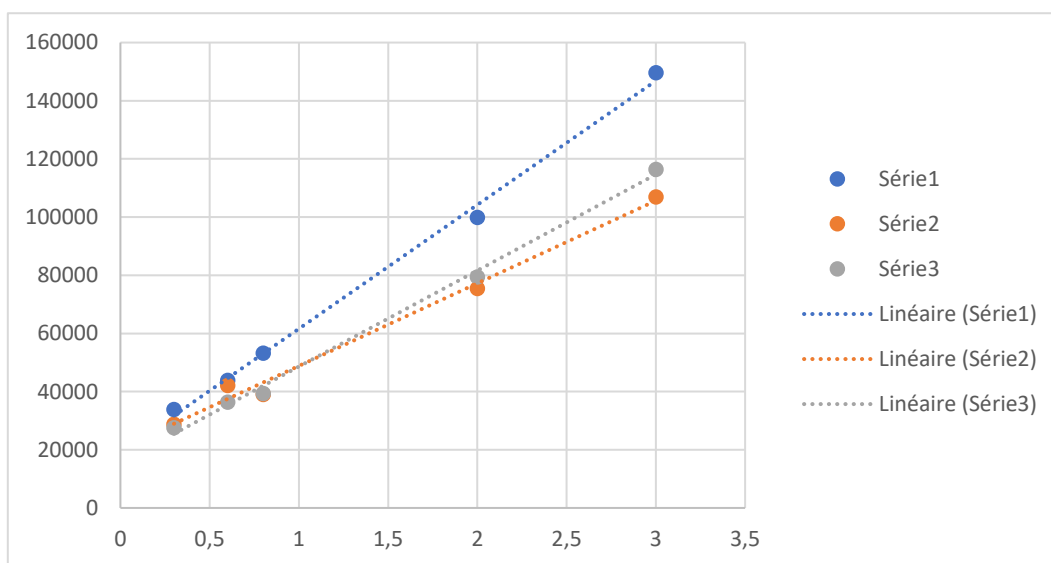


Figure 102: Les trois courbes des trois séries de mesures

D'après le calcul des recouvrements ($R\% = \frac{[C]_{calculée\ Moyenne}}{[C]_{introduite}} \times 100$), toutes les valeurs sont incluses dans le domaine d'acceptabilité, à savoir, +/- 20% pour le premier point de la gamme (limite de quantification inférieure) et +/- 15% pour les autres points de la gamme.

Le tableau 105 montre le calcul des recouvrements des cinq points de la gamme d'étalonnage sur les trois jours.

Tableau 105: Calcul des recouvrements de la gamme d'étalonnage du t,t-MA

[C]	H1	H2	H3	H moy	C calc Moy mg/L	Recouvrement %	Limite d'acceptation
0,3	33848	28797	27581	30075	0,34	113	± 20
0,6	43877	42125	36344	40782	0,65	108	± 15
0,8	53228	39062	39376	43889	0,74	92,5	
2	99903	75460	79445	84936	1,92	96	
3	149620	106982	116409	124337	3,06	102	

5. Vérification de l'homogénéité des variances

Afin d'étudier l'homogénéité des variances de réponses, le test de Cochran a été effectué sur les valeurs de la gamme d'étalonnage établies sur trois jours. Les résultats sont répertoriés dans le tableau suivant.

La concentration calculée est déterminée selon la formule suivante : $C_{calculée} = \sigma^2_{max} / \sum \sigma^2$, et est comparée à la concentration tabulée ($C_{0,05, n-1, k}$) sur le tableau de Cochran pour un nombre de série n égal à 03, un nombre de population k égal à 05 et à un risque $\alpha = 5\%$.

On lit la valeur de Concentration tabulée dans la table de Cochran³ pour un risque généralement choisi à 5% et pour n (nombre de séries) et k (nombre de valeurs cibles).

Si $C_{calculée} \leq C_{tabulée}$, les variances sont dites homogènes au risque $\alpha=5\%$. Cela signifie que la plus grande variance observée dans les séries ne doit pas dépasser cette valeur (en proportion des variances totales), sinon elle est considérée comme aberrante. Le tableau 106 présente le calcul de l'homogénéité des variances des 5 points de la gamme d'étalonnage sur les trois jours de validation.

Tableau 106: Vérification de l'homogénéité des variances (Test de Cochran)

[C]	H1	H2	H3	H moy	C calc	Var (σ^2)	σ^2 max
0,3	33848	28797	27581	30075	0,34	11044424,3	501639649
0,6	43877	42125	36344	40782	0,65	15539259	$\Sigma \sigma^2$
0,8	53228	39062	39376	43889	0,74	65442009,3	765643714,7
2	99903	75460	79445	84936	1,92	171978373	C calc= 0,655
3	149620	106982	116409	124337	3,06	501639649	C tab= 0,769

H : hauteur **[C]** : concentration **Hmoy** : Moyenne des hauteurs **Ccalc** : concentration calculée **Ctab** : Concentration tabulée **Var** : variance **σ^2 max** : variance maximale **$\Sigma \sigma^2$** : Somme des variances

La concentration calculée étant inférieure à la concentration tabulée, les variances du t,t-MA sont dites homogènes au risque d'erreur $\alpha = 5\%$.

6. Linéarité

L'exigence de linéarité s'applique aux résultats [**concentration calculée= f (concentrations introduites)**], et non pas aux réponses [signal = f (concentrations introduites)] (SFSTP,2003). La linéarité a été étudiée par rapport aux concentrations calculées des standards de validation en fonction de leurs concentrations théoriques respectives.

La figure 103 montre la courbe de linéarité du t,t-MA tracée avec les valeurs des concentrations cibles en fonction des moyennes des réponses des SV.

Une bonne linéarité est obtenue dans notre domaine de dosage (0,3-3 mg/L) ainsi qu'une pente (0,9539) et un coefficient de détermination ($R^2=0,98$) proches de 1. L'ordonnée à l'origine est très proche de 0.

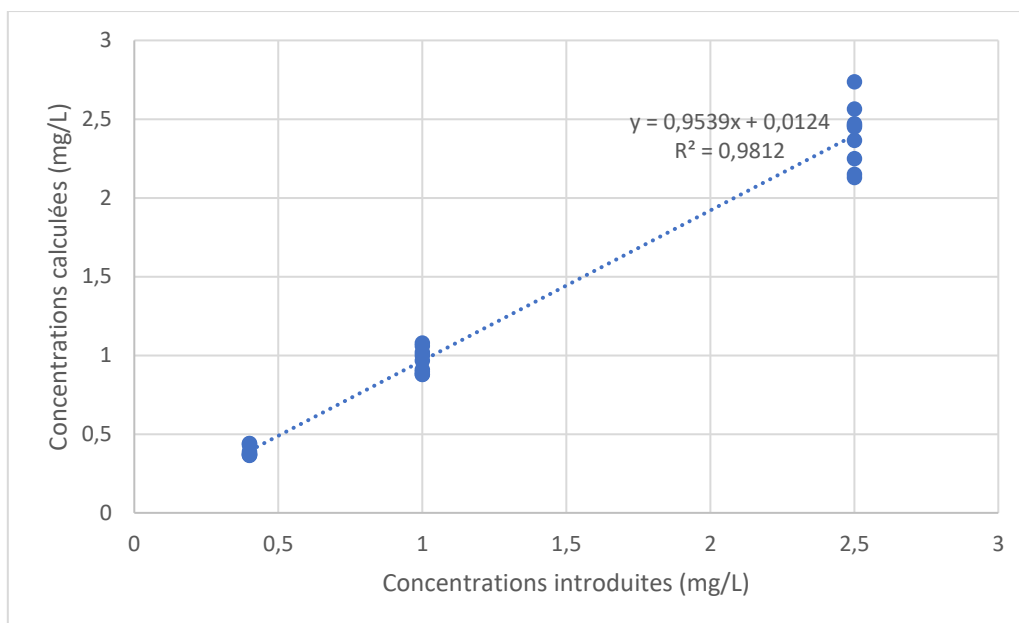


Figure 103: Courbe de linéarité du t,t-MA

7. Fidélité et justesse

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie. Elle est exprimée par le coefficient de variation $CV\% = (\text{Ecart type} / \text{Moyenne}) \times 100$.

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne (M) d'une série de mesures et une valeur de référence (Vr). La justesse est exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou de biais relatif (RSD Relative Standard Deviation). **Biais (B) = [(M- Vr)/Vr] x 100**.

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques et la fidélité sur les erreurs aléatoires. Justesse et fidélité constituent l'exactitude.

La justesse et fidélité ont été calculées à partir de l'analyse répétée trois fois par jour pour chacun des trois niveaux de concentrations des standards de validation (SV) (0,4, 1 et 2,5 ppm) préparés dans d'un pool d'urine enrichi. L'analyse est répétée sur trois jours.

Tous les coefficients de variation sont inclus dans les limites d'acceptation (0,27%-6,80%).

La justesse de tous les SV des trois jours de validation du t,t-MA, sont dans les limites d'acceptation (-14,8 % – 10%). Le tableau 107 présente les concentrations calculées, biais relatifs et coefficient de variation intra et inter séries.

Tableau 107: Calcul des coefficients de variation intra-jour et inter-jours et des biais relatifs

C	H J1	C J1 mg/L	BR % J1	CV% intra J1	H J2	C J2 mg/L	BR% J2	CV% intra J2	C J3 mg/L	H J3	BR% J3	CV% intra J3	moy inter jr	CV % inter	BR % inter
0,4	37983	0,44	10	5,25	27598	0,36	-9,00	0,55	0,38	31078	-5	6,21	0,39	7,13	-1,36
	37 976	0,44	10		27907	0,37	-7,50		0,43	32498	7,5				
	35 442	0,39	-2,5		27703	0,37	-8,20		0,37	30987	-7,5				
M		0,42	5,83			0,37	-8,23		0,39		-1,67				
1	61952	1	0	6,80	45151	0,90	-10,45	6,73	0,91	46332	-9	5,93	0,97	6,79	-3,44
	56505	0,88	-12		47464	0,97	-3,45		0,88	45418	-12				
	64418	1,06	6		51212	1,08	7,90		1,02	49627	2				
M		0,98	-2			0,98	-2,00		0,94		-6,33				
2,5	123718	2,45	-2	0,27	105974	2,74	9,49	5,37	2,13	81239	-14,8	2,29	2,40	6,44	-4,1
	123988	2,46	-1,6		100285	2,56	2,60		2,25	84550	-10				
	124464	2,47	-1,2		93684	2,37	-5,40		2,15	81708	-14				
M		2,46	-1,6			2,56	2,23		2,18		-12,93				

H : hauteur du pic **J** : jour **CV** : coefficient de variation **BR** : Biais relatif (%) **C** : concentration (mg/L) **M** : moyenne inter : inter jours

8. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de la méthode a aussi été évalué à trois niveaux de concentrations (0,5, 1 et 2 ppm). Des urines vierges (testées au préalable) sont chargées par la quantité correspondante, ensuite extraites. La quantité d'analyte mesurée dans l'extrait, est rapportée à celle donnée par un éluat de blanc matrice chargé après extraction renfermant la même quantité. Le rendement d'extraction est

ensuite calculé selon la formule :
$$R (\%) = \frac{\text{Hauteur du pic avec extraction}}{\text{Hauteur du pic sans extraction}} \times 100$$

Le tableau 108 présente les calculs du rendement d'extraction sur trois concentrations différentes (0,5, 1 et 2 mg/L).

Tableau 108: Mesure du rendement d'extraction

Niveau (mg/L)	Réponse sans extraction (Hauteur)	Réponse avec extraction Hauteur 1 ^{ère} mesure	R % 1 ^{ère} mesure	Réponse avec extraction Hauteur 2 ^{ème} mesure	R % 2 ^{ème} mesure	Moyenne du rendement %
0,5	38553	37397	97%	38967	101%	99%
1	44 181	43298	98%	45801	103 %	100,5%
2	76 084	73041	96%	75460	99%	97,5%

9. Effet matrice

L'effet matrice a été évalué à trois niveaux de concentrations (**0,5, 1 et 2 mg/L**) et sur deux mesures. Un blanc matrice est extrait ensuite chargé par une quantité correspondante de t,t-MA. La quantité mesurée est rapportée à celle obtenue dans l'eau.

Tableau 109: Mesure de l'effet matrice

Niveau (mg/L)	Réponse dans l'eau (Hauteur)	Hauteur du pic 1 ^{ère} mesure	Première mesure %	Hauteur du pic 2 ^{ème} mesure	Deuxième mesure %	Moyenne %
0,5	26641	38294	144	37289	140	142
1	53350	66693	125	70444	132	128,5
2	107968	121985	113	128241	119	116

Les résultats montrent un effet matrice positif car toutes les valeurs sont supérieures à 100%.

Pour pallier cet effet, les courbes d'étalonnage sont toujours réalisées dans une matrice vierge préalablement extraite et analysée.

10. Profil d'exactitude

Les profils d'exactitude permettent d'avoir une estimation du défaut de fidélité et du défaut de justesse à différents niveaux de concentration en un seul graphique.

Pour élaborer le profil d'exactitude nous avons combiné sous une forme graphique, un intervalle de tolérance calculés à trois niveaux de concentration (0,4, 1 et 2,5 mg/L) et un intervalle d'acceptabilité ($\pm 15\%$) à un niveau de confiance $B= 80\%$.

L'intervalle de tolérance est un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne au niveau considéré.

- **Calcul des limites de tolérance**

Le facteur de couverture (k) dépend du niveau de confiance souhaité (80%) et du nombre de répétitions n (N=9), selon les tables statistiques $k_{tol} \approx 1,53$.

- $LTI = \text{Moyenne des biais} - k_{tol} \times ET$
- $LTS = \text{Moyenne des biais} + k_{tol} \times ET$

Où :

k_{tol} : Facteur de tolérance ET : Ecart type LTI : Limite de tolérance inférieure LTS : Limite de tolérance supérieure

- Si l'intervalle de tolérance est entièrement compris dans l'intervalle d'acceptabilité ($\pm 15\%$), on peut alors conclure que la méthode est capable de fournir des résultats acceptables dans une proportion au moins égale à β . La méthode est validée ;

- Mais dès que l'intervalle de tolérance sort de l'intervalle d'acceptabilité, on peut conclure que la méthode n'est plus capable de fournir suffisamment de résultats acceptables, en fonction des choix faits au départ de l'étude. La méthode n'est pas validée.

Tableau 110: Calculs pour le profil d'exactitude

Valeur cible mg/L	Moyenne des biais %	Moyenne des ET des biais	Limite de tolérance inférieure %	Limite de tolérance supérieure %
0,4	-1,36	3,06	-6,04	3,33
1	-3,44	0,82	-4,70	-2,19
2,5	-4,10	2,65	-8,16	-0,05

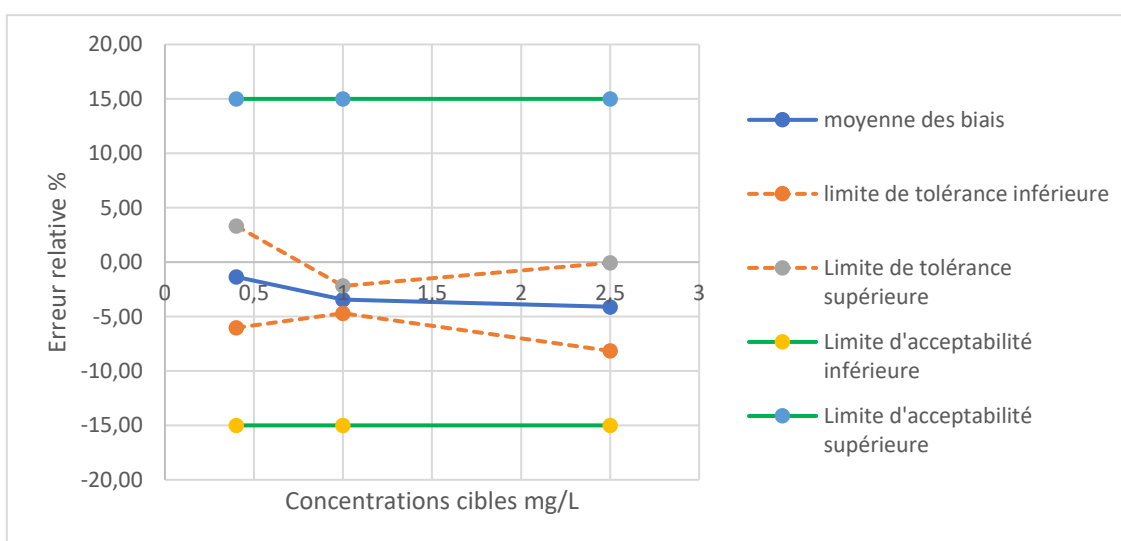


Figure 120 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage du t,t-MA par HPLC-DAD

Les biais moyens pour toutes les concentrations analysées (0,4, 1 et 2,5 mg/L) sont inclus dans les limites de tolérance calculées. Cela démontre la cohérence et la répétabilité des données.

Les biais moyens respectent également les critères d'acceptabilité fixés, notamment dans la plage de $\pm 15\%$ des valeurs nominales, confirmant ainsi la conformité de la méthode aux exigences réglementaires ou expérimentales.

Les limites de tolérance calculées montrent que la méthode présente une variabilité maîtrisée, avec des écarts-types faibles pour chaque concentration.

Ces observations indiquent que la méthode est fiable pour les concentrations testées et qu'elle peut être utilisée avec confiance pour des analyses similaires.

Intervalle de confiance (IC)

Calculé selon la formule : $IC = \bar{x} \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$

Pour un niveau de confiance 95 %, avec une valeur critique $t \approx 2.306$ (à partir de la table de Student pour un ddl $(n-1)=(9-1)= 8$).

Tableau 111: Intervalles de confiance de la méthode

Concentration mg/L	Moyenne mg/L	Intervalle de Confiance (mg/L)
0,4	0,39	[0,37 ; 0,41]
1,0	0,97	[0,92 ; 1,02]
2,5	2,40	[2,24 ; 2,55]

11. Effet mémoire

Afin de s'assurer de l'absence d'un effet mémoire, nous avons injecté du méthanol avant et après l'analyse d'un échantillon urinaire chargé avec 3 mg/L de t,t-MA. Aucun signal provenant de résidus de t,t-MA n'est apparu dans les chromatogrammes du méthanol.

12. Cycle de congélation-décongélation (étude de stabilité)

Un échantillon chargé avec une concentration connue (1 mg/L) a été congelé pendant 24H ensuite décongelé et analysé.

Tableau 112 : Données de stabilité d'un cycle de congélation

Conc introduite	C calculée après décongélation mg/L	R%	CV%	B%
1 mg/L	0,98	98 %	1,45 %	10,3 %
	0,96	96%		

CV : Coefficient de variation B% : Biais relatif R% : rendement

Le biais étant inclus dans l'intervalle de référence $\pm 15\%$, nous concluons qu'un cycle de congélation décongélation n'influe pas sur la stabilité de l'échantillon.

13. Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est « un paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurage ». L'incertitude permet donc d'évaluer la dispersion des valeurs effectuées sur un échantillon, tout comme la fidélité. Il existe cependant des différences fondamentales entre ces deux notions :

L'incertitude de mesure s'applique à une mesure, tandis que la fidélité caractérise une méthode. En ce sens, l'incertitude de mesure est plus proche de l'exactitude, qui concerne également un mesurage. L'estimation de l'incertitude de mesure ne fait pas partie de la validation d'une méthode analytique. L'incertitude associée à une mesure va permettre à l'utilisateur final de ce résultat de prendre une décision concernant sa conformité.

L'incertitude-type (u) se calcule par l'écart type (s) de chaque mesure divisé par la racine du nombre de répliques (n) : $u = \frac{s}{\sqrt{n}}$

- Pour le niveau 0,4 : $0,39 \pm 0,01$ mg/L
- Pour le niveau 1 : $0,97 \pm 0,02$ mg/L
- Pour le niveau 2,5 : $2,4 \pm 0,05$ mg/L

Pour exprimer l'incertitude élargie avec un niveau de confiance de 95 %, l'incertitude type est multipliée par un facteur d'élargissement (k) égal à 2 soit :

- Pour le niveau 0,4 : $0,39 \pm 0,02$ mg/L
- Pour le niveau 1 : $0,97 \pm 0,04$ mg/L
- Pour le niveau 2,5 : $2,4 \pm 0,1$ mg/L

Annexe V : Tests post Hoc

Tableau ancienneté

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	3.504	83.11	53.82	-0.442	< .001	.001	< .001
NE - méc	-0.054	83.11	83.60	0.044	.957	1.000	.957
pom - méc	-3.614	53.82	83.60	0.397	< .001	< .001	< .001

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau tranches d'ancienneté

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	3.155	80.35	54.57	-0.375	.002	.005	.003
NE - méc	-0.548	80.35	85.18	0.082	.584	1.000	.584
pom - méc	-3.800	54.57	85.18	0.425	< .001	< .001	< .001

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau AP t,t-MA

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-5.467	39.62	85.37	0.670	< .001	< .001	< .001
NE - méc	-4.288	39.62	78.29	0.530	< .001	< .001	< .001
pom - méc	0.866	85.37	78.29	-0.086	.387	1.000	.387

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau AP S-PMA

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-6.609	39.59	94.91	0.761	< .001	< .001	< .001
NE - méc	-2.808	39.59	64.92	0.402	.005	.015	.005
pom - méc	3.663	94.91	64.92	-0.455	< .001	< .001	< .001

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Ratio ttma/S-PMA AP

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	2.068	72.93	55.63	-0.262	.039	.116	.077

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - méc	-1.977	72.93	90.76	0.276	.048	.144	.077
pom - méc	-4.261	55.63	90.76	0.483	< .001	< .001	< .001

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau AP Guanosine*Dunn's Post Hoc Comparisons - profession*

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-2.064	56.88	74.14	0.252	.039	.117	.078
NE - méc	-2.566	56.88	80.04	0.319	.010	.031	.031
pom - méc	-0.714	74.14	80.04	0.090	.475	1.000	.475

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau AP déoxyGuanosine*Dunn's Post Hoc Comparisons - profession*

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-2.345	54.74	74.37	0.288	.019	.057	.038
NE - méc	-2.766	54.74	79.69	0.346	.006	.017	.017
pom - méc	-0.649	74.37	79.69	0.083	.516	1.000	.516

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau AP Cytosine*Dunn's Post Hoc Comparisons - profession*

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-2.360	57.70	77.44	0.280	.018	.055	.055
NE - méc	-1.875	57.70	74.62	0.240	.061	.182	.122
pom - méc	0.342	77.44	74.62	-0.040	.732	1.000	.732

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau 5MeCyto*Dunn's Post Hoc Comparisons - profession*

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-2.619	56.98	78.89	0.317	.009	.026	.026
NE - méc	-1.806	56.98	73.27	0.223	.071	.213	.142
pom - méc	0.681	78.89	73.27	-0.074	.496	1.000	.496

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau 7MeGuo

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-2.597	59.79	81.52	0.317	.009	.028	.028
NE - méc	-0.789	59.79	66.90	0.088	.430	1.000	.430
pom - méc	1.772	81.52	66.90	-0.199	.076	.229	.153

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau 5OHMeCyto

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-0.516	74.65	78.97	0.064	.606	1.000	.606
NE - méc	2.030	74.65	56.33	-0.263	.042	.127	.085
pom - méc	2.745	78.97	56.33	-0.319	.006	.018	.018

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Tableau cotinine urinaire

Dunn's Post Hoc Comparisons - profession

Comparison	z	W _i	W _j	r _{rb}	p	p _{bonf}	p _{holm}
NE - pom	-4.090	54.53	88.75	0.468	< .001	< .001	< .001
NE - méc	-0.802	54.53	61.76	0.127	.423	1.000	.423
pom - méc	3.272	88.75	61.76	-0.400	.001	.003	.002

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Ttma chez les fumeurs

Post Hoc Comparisons - profession

		Mean Difference	SE	df	t	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	-340.01	95.07	48	-3.577	.002	.002
	méc	-265.46	115.37	48	-2.301	.077	.052
pom	méc	74.56	100.73	48	0.740	1.000	.463

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

S-PMA chez les fumeurs

Post Hoc Comparisons - profession

		Mean Difference	SE	df	t	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	-6.069	1.643	49	-3.695	.002	.002
	méc	-1.170	2.010	49	-0.582	1.000	.563
pom	méc	4.899	1.784	49	2.746	.025	.017

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

t,t-MA chez les non-fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	-138.9	101.36	86	-1.371	.522	.174
	méc	-324.7	102.09	86	-3.181	.006	.006
pom	méc	-185.7	96.74	86	-1.920	.175	.116

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

S-PMA chez les non-fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	-2.178	0.671	85	-3.245	.005	.005
	méc	-1.438	0.676	85	-2.128	.109	.073
pom	méc	0.740	0.634	85	1.167	.739	.246

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

Ancienneté chez les non-fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	7.943	2.558	86	3.105	.008	.005
	méc	-0.715	2.577	86	-0.277	1.000	.782
pom	méc	-8.657	2.442	86	-3.545	.002	.002

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

Cotinine chez les non-fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	-563.8	192.9	86	-2.922	.013	.013
	méc	-133.0	194.3	86	-0.684	1.000	.496
pom	méc	430.8	184.1	86	2.340	.065	.043

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

7MeGua chez les non-fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{tukey}	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	159.1	505.7	86	0.315	.947	1.000	.754
	méc	-1360.2	509.3	86	-2.670	.024	.027	.018
pom	méc	-1519.2	482.7	86	-3.147	.006	.007	.007

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

1MeGua chez les non-fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{tukey}	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	1.728	31.94	86	0.054	.998	1.000	.957
	méc	-80.368	32.17	86	-2.498	.038	.043	.029
pom	méc	-82.096	30.49	86	-2.693	.023	.026	.026

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

HB chez les non-fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{tukey}	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	0.941	0.380	63	2.478	.042	.048	.048
	méc	0.030	0.370	63	0.081	.996	1.000	.936
pom	méc	-0.911	0.388	63	-2.351	.056	.066	.048

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

GR chez les non fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{tukey}	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	0.415	0.140	63	2.966	.012	.013	.013
	méc	0.013	0.136	63	0.094	.995	1.000	.925
pom	méc	-0.402	0.143	63	-2.817	.018	.019	.013

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

Hct chez les non fumeurs*Post Hoc Comparisons - profession*

		Mean Difference	SE	df	t	p _{tukey}	p _{bonf}	p _{holm}
NE	pom	2.782	1.027	62	2.710	.023	.026	.026
	méc	0.962	1.001	62	0.961	.604	1.000	.340
pom	méc	-1.820	1.037	62	-1.754	.194	.253	.169

Note. P-value adjusted for comparing a family of 3 estimates.

Auteur : **KERKOUB Fazia** - Encadrant : **DJAFER Rachid**

Titre : **Evaluation biotoxicologique de l'exposition professionnelle au benzène contenu dans le carburant**

Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat En Sciences Médicales de Toxicologie (D.E.S.M)

RESUME

Introduction : Le benzène est un produit chimique présent dans une grande variété de produits pétroliers plus légers, tels que l'essence en tant qu'antidétonant jusqu'à 3% en Algérie. Par conséquent, les travailleurs utilisant le carburant peuvent y être exposés professionnellement et encourir un risque pour leur santé, car il est cancérigène de type 1, génotoxique, hématotoxique et immunosuppresseur même à faible dose selon les dernières données littéraires. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'exposition professionnelle aux faibles taux de benzène atmosphérique émanant du carburant en combinant biomarqueurs d'exposition et d'effets génotoxiques et épigénétiques précoces.

Matériel et Méthodes : Il s'agit d'une étude descriptive transversale et monocentrique à visée analytique réalisée chez 141 sujets, un groupe exposé (EX) de 101 sujets (59 pompistes, 42 mécaniciens) comparés à 40 sujets non professionnellement exposés au benzène (NE), les exposés sont moyennement âgés de ($44,5 \pm 8,1$) ans et appariés aux non exposés ($44,02 \pm 8,13$ ans). La collecte des informations s'est faite par un questionnaire sur les données professionnelles, cliniques et habitudes tabagiques. Une étude longitudinale a été réalisée en collectant deux échantillons urinaires en avant (AV) et après poste (AP). Nous avons analysé deux biomarqueurs d'exposition (BM) spécifiques du benzène : l'Acide trans,trans-Muconique (t,t-MA) et l'Acide S-Phényl Mercapturique (S-PMA), trois biomarqueurs des dommages oxydatifs de l'ADN et l'ARN (8OxoGuanine, 8OxoGuanosine, 8OxodésoxyGuanosine) ainsi que les Guanosine, Guanine et désoxyGuanosine libres, onze biomarqueurs d'effet épigénétique sous forme de produits de méthylation en C7 de la guanine et en C5 de la cytidine et huit paramètres de l'effet hématologique. Tous les résultats ont été exprimés en μg par g de créatinine. Les facteurs confondants, tabagisme et co-exposition au toluène ont été évalués par mesure de la cotinine et S-BMA (Acide S-Benzyl Mercapturique) urinaires. Tous les biomarqueurs ont été détectés par UPLC-MS/MS. Le t,t-MA a été analysé doublement par HPLC-DAD afin de comparer les deux méthodes.

Résultats : Les EX ont des valeurs du t,t-MA et S-PMA, 2,69 et 3,92 fois supérieures à celles des NE. Les valeurs en AP sont supérieures aux valeurs en AV de 2 fois pour t,t-MA et 1,75 fois pour le S-PMA, ces deux BM sont fortement corrélés entre eux ($r = 0,560$, $p < 0,0001$). 24 sujets (23,8%) des EX ont dépassé la valeur de l'indicateur biologique d'exposition (IBE) du t,t-MA de $500 \mu\text{g/g}$ créa de l'ACGIH pour 0,5 ppm de benzène atmosphérique. Le ratio t,t-MA/S-PMA est significativement plus bas chez les fumeurs que les non-fumeurs ($p = 0,008$). Ces BM sont entre 1,5 – 2 fois supérieurs chez les pompistes travaillant en zone à trafic dense. Le S-PMA a été 2,16 fois supérieur chez les pompistes comparés aux mécaniciens, et 35% (N=15) de dépassements de l'IBE ont été observés chez les mécaniciens. Le S-BMA a été corrélé au t,t-MA ($r = 0,423$, $p < 0,0001$) et non corrélé au S-PMA ($p > 0,05$) témoignant d'un mécanisme compétitif pour la Glutathion S-transférase (GST) qui intervient dans la formation des deux métabolites. 58,41 % (n = 58) des EX ont rapporté au moins un symptôme dont 44 (74,6%) pompistes, le AP S-PMA est significatif chez les symptomatiques ($p=0,046$). Le nombre de symptômes est corrélé à l'ancienneté ($r = 0,288$, $p=0,028$) et GR ($r=0,535$, $p<0,001$). Les signes majoritaires sont asthénie, céphalées, crampes, irritations cutanées et brûlures mictionnelles. Le t,t-MA est corrélé au 8OxoGuo ($r=0,439$, $p<0,0001$) et plus faiblement le S-PMA ($r=0,231$, $p=0,006$) et le S-BMA ($r=0,384$, $p < 0,0001$). L'association avec le t,t-MA est plus élevée chez les fumeurs (N=37, $r=0,648$, $p<0,0001$) et les pompistes des zones à trafic dense ($r=0,741$, $p<0,0001$). Le 8OxoGuo est l'unique produit qui a présenté une corrélation significative avec l'âge ($r=0,166$, $p<0,0001$) et l'ancienneté ($r=0,231$, $p=0,006$). La Cytosine libre ($p = 0,015$) et méthylée 5MeCyto ($p=0,01$) en AP sont plus élevés chez les EX ainsi que les deux nucléosides méthylés de l'ARN (le 5MeCyt et 7MeGuo) indiquant une déméthylation globale. Le t,t-MA est fortement corrélé au 7MeGuo ($r=0,518$, $p<0,0001$). 20% des exposés (N=13/65) ont des GR inférieurs aux normes et 10,76% (N=7/65) d'hyperleucocytose. L'HB a été influencée positivement par l'âge et l'ancienneté selon un modèle ($B=0,484$, $p<0,0001$, $R^2=0,176$) et négativement par le nombre d'heures travaillées par jour ($r = - 0,427$, $p<0,0001$). Le 8OxoGuo influence à la baisse les neutrophiles ($B = - 0,473$, $p<0,0001$, $R^2 = 0,537$).

Conclusion : A la limite de nos connaissances, cette étude est l'une des rares au niveau international à associer des biomarqueurs épigénétiques, oxydatifs et hématologiques aux métabolites du benzène. Nos résultats enrichissent les connaissances sur les effets moléculaires potentiels liés à une exposition à faible dose au benzène, et pourraient s'avérer utiles dans l'élaboration de stratégies gouvernementales de prévention ainsi qu'une évaluation des risques basée sur une approche de biologie des systèmes.

Mots clés : Benzène, Exposition, Carburant, Pompistes, Mécaniciens, Biomarqueurs, Génotoxicité, Epigénétique

Title: **Biotoxicological assessment of occupational exposure to benzene present in gasoline**

ABSTRACT

Introduction: Benzene is a chemical compound found in a wide range of lighter petroleum products, such as gasoline, where it is used as an antiknock agent in concentrations up to 3% in Algeria. Consequently, occupations involving fuel use may lead to occupational exposure and present health risks, as benzene is classified as a Group 1 carcinogen. It is also genotoxic, hematotoxic, and immunosuppressive even at low doses according to the most recent scientific literature. The objective of this study is to assess occupational exposure to low levels of airborne benzene emitted from fuel, by combining exposure biomarkers with early genotoxic and epigenetic effect biomarkers.

Material & Methods: This study is a descriptive, cross-sectional, single-center investigation with an analytical aim, conducted among 141 participants. The exposed group (EX) consisted of 101 individuals (59 gas station attendants and 42 mechanics), compared with 40 non-occupationally exposed subjects (NE). The exposed subjects were middle-aged (mean age: 44.5 ± 8.1 years), matched to the non-exposed group (mean age: 44.02 ± 8.13 years). Data collection was carried out through a structured questionnaire covering occupational history, clinical characteristics, and smoking habits. A longitudinal sub-study was also conducted by collecting two urine samples: one before (pre-shift, AV) and one after the work shift (post-shift, AP).

Two specific benzene exposure biomarkers were analyzed: trans,trans-Muconic Acid (t,t-MA) and S-Phenylmercapturic Acid (S-PMA). In addition, three biomarkers of oxidative damage to DNA and RNA were measured: 8-oxoguanine, 8-oxoguanosine, and 8-oxo-2'-deoxyguanosine, along with free guanosine, guanine, and deoxyguanosine. Eleven epigenetic effect biomarkers were assessed as methylation products at position C7 of guanine and C5 of cytidine, as well as eight hematological effect parameters. All results were expressed in micrograms per gram of creatinine. Confounding factors such as tobacco use and co-exposure to toluene were evaluated by measuring urinary cotinine and S-Benzylmercapturic Acid (S-BMA). All biomarkers were detected via UPLC-MS/MS, and t,t-MA was additionally analyzed using HPLC-DAD to compare both analytical methods.

Results: Levels of t,t-MA and S-PMA in the exposed group (EX) were 2.69 and 3.92 times higher, respectively, than those in the non-exposed group (NE). Post-shift (AP) concentrations were higher than pre-shift (AV) values by a factor of 2 for t,t-MA and 1.75 for S-PMA. These two exposure biomarkers were strongly correlated ($r = 0.560$, $p < 0.0001$). Among the EX, 24 individuals (23.8%) exceeded the biological exposure limit (BEL) for t,t-MA set by ACGIH (500 $\mu\text{g/g}$ creatinine for 0.5 ppm atmospheric benzene). The t,t-MA/S-PMA ratio was significantly lower in smokers than in non-smokers ($p = 0.008$). These biomarkers were 1.5–2 times higher in pump attendants working in high-traffic zones. S-PMA levels were 2.16 times higher in pump attendants than in mechanics, and 35% ($n = 15$) of mechanics exceeded the BELs. S-BMA showed a positive correlation with t,t-MA ($r = 0.423$, $p < 0.0001$), but not with S-PMA ($p > 0.05$), suggesting a competitive mechanism via Glutathione S-transferase (GST), involved in the formation of both metabolites. In total, 58.41% ($n = 58$) of the EX reported at least one symptom, including 44 pump attendants (74.6%). Post-shift S-PMA levels were significantly higher in symptomatic subjects ($p = 0.046$). The number of reported symptoms correlated with job seniority ($r = 0.288$, $p = 0.028$) and red blood cell count ($r = 0.535$, $p < 0.001$). The most frequently reported symptoms were fatigue, headaches, cramps, skin irritation, and burning during urination. t,t-MA was significantly correlated with 8-oxo-2'-deoxyguanosine ($r = 0.439$, $p < 0.0001$), and less strongly with S-PMA ($r = 0.231$, $p = 0.006$) and S-BMA ($r = 0.384$, $p < 0.0001$). The correlation with t,t-MA was even stronger among smokers ($n = 37$, $r = 0.648$, $p < 0.0001$) and pump attendants working in high-traffic areas ($r = 0.741$, $p < 0.0001$). 8-oxoguanosine was the only oxidative biomarker significantly associated with age ($r = 0.166$, $p < 0.0001$) and job seniority ($r = 0.231$, $p = 0.006$). Post-shift levels of free cytosine ($p = 0.015$) and methylated cytosine ($p = 0.01$) were higher in EX, as were the methylated RNA nucleosides (5MeCyt and 7MeGuo), suggesting global RNA and DNA demethylation. t,t-MA was strongly correlated with 7MeGuo ($r = 0.518$, $p < 0.0001$). Among the EX, 20% ($n = 13/65$) had red blood cell counts below the reference range, and 10.76% ($n = 7/65$) had hyperleukocytosis. Hemoglobin levels were positively influenced by age and job seniority ($B = 0.484$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.176$), and negatively by the number of working hours per day ($r = -0.427$, $p < 0.0001$). Finally, 8OxodGuo had a significant negative effect on neutrophil count ($B = -0.473$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.537$).

Conclusion: At the edge of current knowledge, this study is among the few internationally, to integrate epigenetic, oxidative, and hematological biomarkers with benzene metabolites. Our findings contribute to advancing the understanding of potential molecular effects associated with low-dose benzene exposure and may support the development of governmental preventive strategies, as well as risk assessments grounded in a systems biology approach.

Key words: Benzene, exposure, gasoline, gas station attendants, mechanics, biomarkers, genotoxicity, epigenetic

العنوان: التقييم البيولوجي السمي للتعرض المهني للبنزين الموجود في الوقود

ملخص

المقدمة:

البنزين مركب كيميائي يوجد في العديد من المنتجات البترولية الخفيفة، مثل البنزين المستخدم كمضاد للاحتراق بنسبة تصل إلى 3% في الجازات. لذلك، فإن المهن المرتبطة باستخدام الوقود قد تتعرض له مهنيًا، مما يشكل خطراً صحياً نظراً لكونه مادة مسرطنة من النوع الأول، ومؤثرة على الجينات والدم والجهاز المناعي حتى عند الجرعات المنخفضة، وفقاً لأحدث البيانات العلمية. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التعرض المهني لتركيزات منخفضة من البنزين الجوي المنبعث من الوقود، من خلال الجمع بين المؤشرات البيولوجية للتعرض والتأثيرات الجينية والبيئية المبكرة.

المواد والطرق:

أجريت دراسة وصفية مقطعية أحادية المركز ذات هدف تحليلي على 141 مشاركاً، منهم 101 شخصاً معرضاً مهنيًا (59 عامل محطة وقود، 42 ميكانيكياً) مقارنة بـ 40 شخصاً غير معرضين مهنيًا للبنزين. تم جمع المعلومات عبر استبيان يشمل البيانات المهنية والسريرية وعادات التدخين. كما تم إجراء دراسة طولية بجمع عينتين بوليتين قبل وبعد العمل. تم تحليل مؤشرين بيولوجيين للتعرض للبنزين: حمض الترانس-ترانس-ميوكونيك (t,t-MA) وحمض S-فينيل ميركاتوريك (S-PMA)، بالإضافة إلى ثلاثة مؤشرات لأضرار الأكسدة في الحمض النووي والحمض النووي الريبي، وستة نوكلوزيدات حرة، وأحد عشر مؤشراً للتأثيرات اللاجينية، وثمانية مؤشرات دموية. تم التعبير عن جميع النتائج بوحدتي ميكروغرام لكل جرام كرياتينين. تم تقييم عوامل الالتباس مثل التدخين والتعرض المشترك للتولوين عبر قياس الكوتينين وحمض S-بنزيل ميركاتوريك (S-BMA) في البول. تم الكشف عن جميع المؤشرات باستخدام تقنية UPLC-MS/MS، وتم تحليل t,t-MA أيضاً باستخدام HPLC-DAD للمقارنة بين الطريقتين.

النتائج:

كانت قيم t,t-MA و S-PMA لدى المعرضين مهنيًا أعلى بـ 2.69 و 3.92 مرة من غير المعرضين. كما كانت القيم بعد العمل أعلى من قبل العمل بمرتين لـ t,t-MA و 1.75 مرة لـ S-PMA، مع وجود ارتباط قوي بينهما ($r = 0.560, p < 0.0001$). تجاوزت 32 مشاركاً (23.8%) من المعرضين القيمة المرجعية البيولوجية لـ 500 t,t-MA ميكروغرام/غ كرياتينين حسب ACGIH. كان معدل t,t-MA/S-PMA أقل بشكل ملحوظ لدى المدخنين ($p = 0.008$). كانت المؤشرات أعلى بـ 1.5 إلى 2 مرة لدى العاملين في مناطق ذات حركة مرور كثيفة. سجل S-PMA ارتفاعاً بـ 2.16 مرة لدى عمال المحطات مقارنة بالميكانيكيين، مع تجاوز 35% منهم للقيمة المرجعية. ارتبط S-BMA بـ t,t-MA ($r = 0.423, p < 0.0001$) ولم يرتبط بـ S-PMA، مما يشير إلى آلية تنافسية على إنزيم GST. أبلغ 58.41% من المعرضين عن أعراض صحية، خاصة عمال المحطات (74.6%)، وكان S-PMA بعد العمل أعلى بشكل ملحوظ لدى المصابين بالأعراض ($p = 0.046$). ارتبط عدد الأعراض بالخبرة المهنية وعدد كريات الدم الحمراء. الأعراض الأكثر شيوعاً كانت التعب، الصداع، التشنجات، التهيجات الجلدية، والحرقة البولية. ارتبط t,t-MA بـ 8OxodGuo ($r = 0.439, p < 0.0001$)، وارتبط S-PMA و S-BMA بشكل أضعف. كانت هذه الارتباطات أقوى لدى المدخنين وعمال المحطات في المناطق المزدحمة. كان 8OxoGuo المؤشر الوحيد المرتبط بالعمر والخبرة. سجلت السيستوزين الحرة والمثيلة ارتفاعاً بعد العمل لدى المعرضين، وكذلك نوكلوزيدات RNA المثيلة، مما يشير إلى إزالة مثيلة شاملة. ارتبط t,t-MA بـ 7 MeGuo ($r = 0.518, p < 0.0001$). سجل 20% من المعرضين انخفاضاً في عدد كريات الدم الحمراء، و 10.76% منهم ارتفاعاً في عدد الكريات البيضاء. تأثرت الهيموغلوبين إيجابياً بالعمر والخبرة، وسلبياً بعدد ساعات العمل اليومية. أثر 8OxodGuo سلباً على عدد العدلات.

الخلاصة:

تُعد هذه الدراسة من الدراسات النادرة عالمياً التي تربط بين المؤشرات البيولوجية اللاجينية والأكسدة والدموية وبين مستقلبات البنزين. تساهم نتائجنا في تعزيز المعرفة حول التأثيرات الجزيئية المحتملة للتعرض المهني للبنزين بجرعات منخفضة، وقد تكون مفيدة في تطوير استراتيجيات وقائية حكومية وتقييم المخاطر وفقاً لمقاربة بيولوجيا الأنظمة.

الكلمات المفتاحية:

بنزين، التعرض، الوقود، عمال محطات البنزين، ميكانيكيون، مؤشرات بيولوجية، السمية الجينية، اللاجينية

