

## Dosage urinaire de la cotinine comme biomarqueur de l'exposition à la nicotine à Kinshasa

Tuakuila J.<sup>1,2\*</sup>, Kabamba M.<sup>1</sup>, Mata H.<sup>1</sup>, Mata G.<sup>1</sup>

### Abstract

#### Cotinine levels in urine as a biomarker of exposure to nicotine in Kinshasa

270 urine samples of healthy volunteers were analyzed by high-pressure liquid chromatography with a DAD detector (HPLC-DAD). Smokers had higher levels of urinary cotinine (Cot-U) than non-smokers (140 µg/L versus 57 µg/L,  $p < 0.01$ ). Significant differences between urban and rural populations (100 µg/L versus <50 µg/L,  $p < 0.01$ ), between children and adults (60 µg/L versus 98 µg/L,  $p < 0.01$ ), and according to gender (52 µg/L for females versus 99 µg/L for males,  $p < 0.01$ ) were found, reflecting differences in the proportion of smokers among the groups. The low level of Cot-U measured in smokers, indicates that they were light smokers. The mean level observed in smokers (GM [95%CI]: 140 [115-171] µg/L) was comparable to the values reported among light smokers in the GerES survey (GM [95%CI]: ≤ 2 cigarette/day: 75 [44-101] µg/L; 3-5 cig/d: 323 [252-413] µg/L). In conclusion, this study provides information for assessment of active smoking in Kinshasa which represent about 36% of the studied population (>17 years, all were males) and the majority of them are light smokers (about 2 and 3 cigarettes/day).

Published online:  
27 March, 2014

**Keywords:**  
*cotinine, nicotine,  
biomarker, tobacco,  
exposition, Kinshasa*

<sup>1</sup> Environmental Chemistry, Faculty of Sciences, Université de Kinshasa, B.P. 190 KIN XI, Kinshasa, Democratic Republic of Congo.

<sup>2</sup> Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology (LTAP), Université catholique de Louvain, Avenue E. Mounier 53, box 52.02.12, 1200 Brussels, Belgium

\* To whom correspondence should be address. E-mail address: [joeltuakuila@yahoo.fr](mailto:joeltuakuila@yahoo.fr).

### INTRODUCTION

Les conséquences sanitaires du tabagisme actif et passif sont bien connues et comprennent principalement un excès de risque pour plusieurs types de cancer, la bronchite chronique, l'emphysème, les maladies respiratoires aiguës, les maladies cardiovasculaires, les accidents vasculaires cérébraux et autres troubles (US DHHS, 2006). La fumée produite par la combustion du tabac contient au moins 250 substances chimiques toxiques et/ou cancérigènes, et plus de 50 composés présents dans cette fumée sont potentiellement connus comme cancérigènes pour l'homme [NTP, 2004].

Le « biomarqueur » est un terme général regroupant des mesures spécifiques d'une interaction entre un système biologique et un agent environnemental. Les biomarqueurs d'exposition sont des indicateurs de la

dose interne des toxiques dans l'organisme résultant de l'exposition externe. La plupart des biomarqueurs d'exposition ne reflètent que l'exposition récente et pas l'exposition chronique cumulative [Tuakuila, 2010].

Bien que la nicotine ne soit qu'une des centaines de substances chimiques dans la fumée de tabac, avec son métabolite cotinine, mesurés dans les urines ou le plasma, ils sont de bons indicateurs internes largement utilisés en santé publique pour évaluer l'exposition au tabac et à la fumée du tabac (Hauroid et Lison, 2005; Angerer, 2007).

Dans les pays en développement (PD), l'impact grandissant du tabagisme, en particulier chez les jeunes, est la cause redoutée d'une augmentation significative des taux de cancers dans les prochaines années. En effet, on prévoit que ce fléau tuera dix

millions de personnes d'ici à 2030 dont 70% dans les pays pauvres (WHO, 2006).

En République Démocratique du Congo (RDC), contrairement à la lutte conventionnelle contre les maladies endémiques telles que les maladies infectieuses et parasitaires où les schémas thérapeutique et de monitoring sont bien adaptés dans les différentes provinces, la prise en charge des intoxications environnementales et professionnelles revêt un caractère particulier du fait de la diversité des polluants chimiques et de leur évolution. Malheureusement, les dimensions exactes de ce phénomène sont encore mal dégagées vu le manque de données statistiques exhaustives dans le pays.

Les niveaux d'exposition de la population kinoise au tabagisme ne sont pas déterminés. Ce manque de données ne permet pas, d'une part, d'estimer le risque de maladies liées au tabac (à côté d'autres facteurs déjà connus) et, d'autre part, empêche les autorités de la ville de gérer les émissions dues au tabac dans les milieux publics.

Ainsi, évaluer le niveau d'imprégnation à la nicotine dans la population de Kinshasa permettrait de comprendre l'influence du tabagisme sur l'état de santé de la population et, dans le futur, servira de guide aux pouvoirs décisionnels de la ville pour réglementer ce secteur. Le sujet de ce travail se place dans le cadre de cet objectif général.

## MATERIEL ET METHODES

### Design de l'étude

Il s'agit d'une enquête transversale réalisée (du 30 Novembre au 30 Décembre 2010) dans une population dont les bases de sondage n'existent presque pas. A cet effet, 22 communes de la ville ont été numérotées dans l'ordre alphabétique (exception faite de 2 communes rurales qui ont servi de témoin pour la comparaison) et 11 communes ont été sélectionnées par un sondage systématique: le n°1 a été choisi aléatoirement et le reste (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21) a été choisi systématiquement avec un pas de sondage de 2. A l'intérieur de chaque commune sélectionnée, un axe à partir du centre de la commune a été déterminé aléatoirement par un procédé mécanique (lancement d'une baquette). Les quartiers situés sur la ligne ainsi définie ont été notés. Ensuite un quartier parmi cette liste a été tiré au sort. Après avoir identifié tous les sujets volontaires recrutés au moyen des ondes des médias d'audience urbaine (qui ont expliqué le but et les moyens de l'étude) des quartiers sélectionnés, ces derniers ont été invités à se présenter aux centres de santé de proximité. Les critères de sélection des participants sont: un seul membre d'une même famille,

répartition équilibrée des hommes et des femmes, être âgé de 6 ans et plus au moment de l'étude, être en bonne santé mentale et physique, avoir résidé dans la ville de Kinshasa au moins 6 mois avant la date de l'étude et avoir habité dans les quartiers (avenues/rues) des communes sélectionnées pour l'étude. L'exclusion est faite aux personnes manifestement malades et non-résidentes pour une durée d'au moins 6 mois.

### Méthodes de Laboratoire

20 ml d'urine chez les personnes âgées de 6 à 70 ans ont été prélevés et les flacons en polypropylène contenant les urines ont été conservés au frais à - 20°C pendant 4 semaines de prélèvement, puis acheminés par avion au laboratoire de toxicologie industrielle de l'Université Catholique de Louvain (UCL) pour l'analyse proprement dite. Le dosage de la cotinine parmi d'autres polluants vraisemblablement présents dans les échantillons d'urines a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance [HPLC Agilent /DAD HEWLETT-PACKARD G1315A; colonne analytique: Symetryshield (100\*3 mm); phase mobile: RP 8-3,5 µm (Réf: 186000703) d'une solution de 4 mM solution tampon d'acétate de sodium; débit 0,300 ml/min]. Brièvement, 100 µl de N-Ethylnorcotinine 2000 µg/L (standard interne), 500 µl de NaOH 8N et 2 ml de chloroforme ont été ajoutés à 2 ml d'urine puis ce mélange a été homogénéisé pendant 15 secondes, centrifugé pendant 5 minutes (3000 tours/min) puis décanté. 1 ml de la phase organique de ce mélange a été recueilli puis évaporé à sec sous azote (N<sub>2</sub>) à 60°C. Le résidu de ce dernier a été redissout dans 300 µl de solvant de reconstitution constitué d'un mélange eau (H<sub>2</sub>O):méthanol (MeOH) (90:10). La solution de calibration a été préparée en additionnant 9,8 ml de diluant (urine d'un non-fumeur à cotinine négatif) à 200 µl de la solution 100000 µg/L N-Ethylnorcotinine pour obtenir des solutions à différentes concentrations (µg/L): 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 et 2,0. La limite de détection fixée est 50 µg/L et le temps de rétention 5,20 min (± 5%).

### Méthodes statistiques

Les moyennes géométriques et les percentiles (25<sup>e</sup>, 50<sup>e</sup>, 75<sup>e</sup>, 95<sup>e</sup>) ont été calculés en utilisant les logiciels NCSS (NCSS Institute Inc. 2004). Les moyennes géométriques n'ont été calculées que lorsque le nombre de résultats détectables fut supérieur à 60%. Pour ce calcul, les résultats individuels sous la limite de détection ont été remplacés par une valeur égale à la moitié de cette limite. Les intervalles de confiance à 95% (IUPAC, 1997) pour les moyennes géométriques ont été calculés. Les tests de comparaison (T-tests, Chi-carré, ...) ont été appliqués pour tester les différents groupes en faisant

les transformations logarithmiques des résultats. Les différences significatives ont été considérées à un seuil de  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTATS ET DISCUSSION

Il est toujours important dans une telle étude de s'assurer que l'échantillonnage soit représentatif de la population cible. Pour l'âge, les gens ont été choisis au hasard à l'intérieur d'une plage de 6 à 70 ans (Moyenne  $\pm$  SD :  $31 \pm 18$  ans). Au cours de recrutement, les participants étaient classés selon différentes stratifications d'âge afin d'essayer de ressortir une représentativité pour ces différentes classes d'âge de la population générale (6-17 ans : 25,0% et 18 ans et plus : 74,5%). Pour le genre, l'objectif était d'obtenir le même nombre des femmes et des hommes pour une bonne comparaison mais nos données montrent que des femmes sont légèrement plus nombreuses que les hommes (50,5% de femmes contre 49,5% d'hommes). Pour le statut fumeur, nous avons stratifié nos résultats selon le statut tabagique, aucun biais majeur ne semble découler de cette sélection (35,9% des fumeurs actifs). Toutes les personnes n'ayant pas rempli le questionnaire d'enquête, manifestement malades, ou non-résident depuis plus de 6 mois dans les rues/avenues sélectionnées ont été exclues de l'étude pour éviter de biaiser les résultats d'analyse. A l'exception du statut tabagique, les caractéristiques des participants sont similaires dans les deux zones de l'étude (sub-rurale et urbaine) (Tableau I).

**Tableau I. Caractéristiques démographiques des participants**

	Urbain	Sub-rural	P
Nombre des participants	220	50	
Age, ans <sup>a</sup>	31 $\pm$ 18 [6-70]	36 $\pm$ 15 [6-60]	0,55
6-17, n (%)	56 (25,4%)	12 (24,0%)	0,83
$\geq$ 18, n (%)	164 (74,5%)	38 (76,0%)	
<b>Sexe:</b>			
Masculin, n (%)	109 (49,5%)	21 (42,0%)	
Féminin, n (%)	111 (50,5%)	29 (58,0%)	0,93
Fumeurs actifs, n (%)	79 (35,9%)	6 (12,0%)	0,001

<sup>a</sup>Moyenne arithmétique  $\pm$  Ecart-type [minimum - maximum]; p: degré de signification statistique obtenue par t-test des valeurs log-transformées

Dans l'ensemble, nous considérons qu'un grand effort a été fait pour sélectionner un échantillon

reflétant la population générale. Cependant, l'absence de données démographiques fiables et actualisées dans la ville de Kinshasa ne nous permet pas de confirmer la représentativité de notre échantillonnage.

La cotinine, métabolite de la nicotine, est actuellement considérée comme le meilleur biomarqueur pour évaluer le statut de fumeur actif de tabac (Matsukura, 1979; Benowitz, 1996). Ce biomarqueur a été aussi utilisé dans les études épidémiologiques pour évaluer les effets de tabac sur la santé humaine, estimer l'exposition environnementale de la fumée de tabac et évaluer l'efficacité des méthodes d'intervention mises en place sur l'arrêt de la consommation de tabac (Trout et al., 1998).

Comme escompté, les concentrations de la cotinine urinaire obtenues chez les fumeurs sont plus élevées que celles observées chez les non-fumeurs (140  $\mu$ g/L contre 57  $\mu$ g/L,  $p < 0,01$ ).

**Tableau II. Concentrations urinaires de la cotinine dans la population de Kinshasa (n=220; 6-70 ans)**

Paramètres	Cotinine ( $\mu$ g/l)	
	Non-fumeurs (n=141)	Fumeurs (n=79)
LD	50	50
N < LD	53 (37,6%)	0
Percentiles	25	80
	50	90
	75	200
	95	709
	Min	25
Max	1200	1234
MG (IC à 95%)	57,7 (49,1-67,8)	140,3 (115,5 - 171,2)

LD=limite de détection, N= taille de l'échantillon, Min= valeur minimale; Max= valeur maximale, MG= moyenne géométrique (IC= intervalle de confiance à 95%)

Les différences statistiquement significatives ont aussi été observées entre les enfants et les adultes (60  $\mu$ g/L contre 98  $\mu$ g/L,  $p < 0,01$ ), les populations urbaines et sub-rurales (100 contre  $< 50$   $\mu$ g/L,  $p < 0,01$ ), et selon les sexes (52  $\mu$ g/L pour le sexe féminin contre 99  $\mu$ g/L pour le sexe masculin,  $p < 0,01$ ) (Tableau II, Tableau III), reflétant ainsi la différence dans la proportion des fumeurs actifs parmi les groupes étudiés.

Les faibles concentrations de la cotinine mesurées chez les fumeurs actifs indiquent que ce sous-groupe est constitué des petits fumeurs. La valeur moyenne observée chez les fumeurs (MG [IC à 95%]): 140 [115-

171] µg/L) est comparable aux valeurs rapportées dans les enquêtes allemandes GerES chez les petits fumeurs (MG [IC à 95%]: ≤ 2 cigarettes/jour: 75 [44-101] µg/L; 3-5 cigarettes/jour: 323 [252-413] µg/L) (Heinrich et al., 2005).

**Tableau III.** Comparaison de la cotinine urinaire dans les différents sous-groupes de la population étudiée (valeurs exprimées comme MG (IC à 95%))

Paramètres	Cotinine (µg/l)	
Age	6 - 17 ans	60 (51-67)
	> 17 ans	98 (89-119)
	<i>p</i> *	<0,01
Sexe	Masculin	99 (90-106)
	Féminin	52 (51-54)
	<i>p</i> *	<0.01
Habitudes tabagiques (adultes)	Fumeurs actifs	100 (98-114)
	Non-fumeurs	57 (50-65)
	<i>p</i> *	<0,01

\**p*-value : degré de signification statistique obtenue par t-test des valeurs log-transformées.

Avec des méthodes analytiques appropriées (par exemple: techniques d'immunodosage telles que Cotinine Enzyme Immunoassay), la cotinine urinaire peut aussi être utilisée dans le diagnostic du tabagisme passif (exposition environnementale à la fumée du tabac) mais la limite de détection élevée de la méthode utilisée dans cette étude n'a permis que de détecter le tabagisme actif. Par conséquent, les concentrations de la cotinine dans le sous-groupe de non-fumeurs ne peuvent pas être comparées à celles utilisant des méthodes très sensibles rapportées dans les autres études des populations des non-fumeurs.

## CONCLUSION

L'étude réalisée a permis de fournir des informations sur l'évaluation du tabagisme actif à Kinshasa qui représente près de 36% de la population étudiée (>17 ans) dont la majorité est constituée des petits fumeurs (en moyenne 2 à 3 cigarettes/jour).

## RESUME

270 échantillons d'urine, prélevés chez des personnes en bonne santé vivant à Kinshasa, ont été analysés par HPLC - DAD. Les concentrations de la cotinine urinaire obtenues chez les fumeurs sont plus élevées que celles observées chez les non-fumeurs (MG : 140 µg/L contre 57 µg/L, *p*<0,01). C'est la même observation entre les

enfants et les adultes (60 contre 98 µg/L, *p*<0,01), les populations urbaines et sub-rurales (100 contre <50 µg/L, *p*<0,01), et selon les sexes (52 µg/L pour le sexe féminin contre 99 µg/L pour le sexe masculin, *p*<0,01), reflétant ainsi la différence dans la proportion des fumeurs actifs parmi les groupes étudiés. Les faibles concentrations de la cotinine mesurées chez les fumeurs actifs indiquent que ce sous-groupe est constitué des petits fumeurs. La valeur moyenne observée chez les fumeurs (MG [IC à 95%]: 140 [115-171] µg/L) est comparable aux valeurs rapportées dans les enquêtes allemandes GerES chez les petits fumeurs (MG [IC à 95%]: ≤ 2 cigarettes/jour: 75 [44-101] µg/L; 3-5 cigarettes/jour: 323 [252-413] µg/L). En conclusion, l'étude réalisée a permis de fournir des informations sur l'évaluation du tabagisme actif à Kinshasa qui représente près de 36% de la population étudiée (>17 ans, tous de sexe masculin) dont la majorité est constituée des petits fumeurs (en moyenne 2 à 3 cigarettes/jour).

**Mots clés :** cotinine, nicotine, biomarqueur, tabac, exposition, Kinshasa

## REFERENCES ET NOTES

- Angerer J, Ewers U, Wilhelm M (2007). Human biomonitoring: State of the art. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **210**: 201-228.
- Benowitz NL (1996). Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.* **18**(2), 188-204.
- Haufroid V, Lison D (2005). Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: a minireview. *Int Arch Occup Environ Health* **78**: 343-354.
- Heinrich J, Hölscher B, Seiwert M, Carty C, Merkel G, Schulz C (2005). Nicotine and cotinine in adults' urine. The German Environmental Survey 1998. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* **15**: 74-80.
- Matsukura S, Sakamoto, N, Seino, Y, Tamada, T, Matsuyama, H, Muranaka, H (1979). Cotinine excretion and daily cigarette smoking in habituated smokers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **25**:555-561.
- National Toxicology Program (NTP) (2004). Tobacco related exposures. In Report on Carcinogens. 11<sup>th</sup> ed. [online]. Available at URL: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s176toba.pdf>. 13/04/12
- Trout D, Decker J, Mueller C, Bernert JT, Pirkle J (1998). Exposure of casino employees to environmental tobacco smoke. *J. Occup. Environ. Med.* **40**: 270-276.
- Tuakuila, J (2010). Biomonitoring de l'exposition aux différents polluants environnementaux dans la population de Kinshasa. Thèse de doctorat, UCL, Bruxelles – Belgique.

**U.S. Department of Health and Human Services (U.S. DHHS)** (2006). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General-Executive Summary. Available at URL: <http://www.surgeongeneral.gov/library/secondhandsmoke/>. 4/13/12

**World Health Organisation (WHO)**, 2006. The health of the people : the African Regional Health Report, WHO press, Geneva.

### Remerciements

Nous tenons à remercier tous les participants à l'étude, le laboratoire *LTAP* pour les analyses et la Coopération Technique Belge (*CTB*) pour son support financier.