



HAL
open science

Métabolisme cutané et biomarqueurs d'exposition aux mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

Etienne Bourgart

► To cite this version:

Etienne Bourgart. Métabolisme cutané et biomarqueurs d'exposition aux mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAS026 . tel-02503982

HAL Id: tel-02503982

<https://theses.hal.science/tel-02503982v1>

Submitted on 10 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes en biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Etienne BOURGART

Thèse dirigée par **Anne MAITRE, PUPH, CHUGA**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC IMAG UMR CNRS 5525
Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des
Populations (EPSP)**
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition
et l'Environnement**

Métabolisme cutané et biomarqueurs d'exposition aux mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

Thèse soutenue publiquement le **19 février 2019**,
devant le jury composé de :

Pr, Marie-Thérèse, LECCIA

Directeur du service de dermatologie, CHU de Grenoble, Président et
Examineur

Dr, Nancy, HOPF

Chercheuse à l'IST de Lausanne, Rapporteur

Pr, Henri, SCHROEDER

Chercheur à l'Université de Lorraine, Rapporteur

Dr, Christophe, ROUSSELLE

Directeur d'unité à l'ANSES, Examineur

Dr, Thierry, DOUKI

Chef adjoint de l'équipe INAC du CEA de Grenoble, Examineur

Pr Anne MAITRE

Responsable de l'équipe EPSP et de l'UM Toxicologie Professionnelle du
CHU de Grenoble, directeur de thèse



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithme en biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Etienne BOURGART

Thèse dirigée par **Anne MAITRE, PUPH, CHUGA**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC IMAG UMR CNRS 5525**
Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des
Populations (EPSP)
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition**
et l'Environnement

Métabolisme cutané et biomarqueurs d'exposition aux mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

Thèse soutenue publiquement le **19 février 2019**,
devant le jury composé de :

Pr, Marie-Thérèse, LECCIA

Directeur du service de dermatologie, CHU de Grenoble, Président et
Examineur

Dr, Nancy, HOPF

Chercheuse à l'IST de Lausanne, Rapporteur

Pr, Henri, SCHROEDER

Chercheur à l'Université de Lorraine, Rapporteur

Dr, Christophe, ROUSSELLE

Directeur d'unité à l'ANSES, Examineur

Dr, Thierry, DOUKI

Chef adjoint de l'équipe INAC du CEA de Grenoble, Examineur

Pr Anne MAITRE

Responsable de l'équipe EPSP et de l'UM Toxicologie Professionnelle du
CHU de Grenoble, directeur de thèse



« ἔν οἶδα ὅτι οὐδέν οἶδα »

Socrate

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Anne Maitre pour avoir dirigé ce travail de bédiclin tout au long de ces quatre dernières années. Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Marie-Thérèse Leccia, pour la présidence de ce jury, ainsi que pour l'expertise en dermatologie apportée durant ce projet. Nancy Hopf et Henri Schroeder, pour avoir accepté le rôle de rapporteur et apporter leurs visions d'expert sur mes recherches. Christophe Rousselle, qui malgré ses responsabilités à l'ANSES, a accepté de faire le déplacement. Thierry Douki, pour cette collaboration fructueuse au cours du dît projet cutané.

Je remercie l'ANSES et l'INSERM pour le financement des projets qui ont permis le développement du modèle d'exposition, l'acquisition du matériel analytique adéquat et de mener ce nombre colossal d'expériences.

Je remercie l'ensemble de l'équipe EPSP de m'avoir accueilli durant ces quatre années passées.

A la clique du deuxième étage de l'IBP, merci pour ces festins au cours desquels nous envahissions la salle de pause avec force mets délicieux qui ont sûrement fait de multiples envieux... Claire, pour les fous rires, ta passion indéniable pour les acteurs dont on taira le nom et les longues discussions nostalgiques sur la Bretagne. Un jour, tu découvriras également l'attrait du nord de ce pays ! Sarah, je ne pourrais jamais oublier la saveur de tes tartes au citron, à côté desquelles toutes les autres font pâle figure. Merci aussi pour le soutien mutuel lors des longues journées passées à pipeter au laboratoire. Aurélie, merci pour ton aide et ta célérité face aux affres subies lors des déboires avec l'administration, ta bonne humeur et tes nombreuses blagues rafraichissantes. Renaud, merci pour nos multiples discussions. Je dois avouer que j'admire toujours la détermination que tu mets dans la quête de l'analyse de la fameuse molécule dont on ne doit pas prononcer le nom. Marie, vénérable gardienne du parc analytique, que dire... « On ne va pas s'exciter », mais on sera finalement venu à bout de cette extraction harassante, de ces mises au point et de ces longues séries de manip'. On a bien fait de garder espoir, un espoir de fou tel que le clamait un célèbre sage à la bien longue barbe. Je n'oublie pas nos franches rigolades, nos conversations copieuses et éclectiques passées au coin de l'HPLC.

A Christine, Charlotte, Pascal et Sylvette, merci pour les nombreux et précieux tuyaux, les pauses repas, café et votre soutien au cours de ces derniers mois. Franck, merci pour ta patience infinie dans mon apprentissage des statistiques, le récit de tes aventures fantastiques de baroudeur

récidiviste, ta passion immodérée pour les bonnes choses de la vie, tes innombrables jeux de mots et calembours.

Au Laboratoire des Acides Nucléiques, merci pour votre aide et votre dévouement envers ce projet.

Merci aussi à Claire, Elsa, Orélie et à l'ensemble des équipes administratives qui m'ont bien souvent patiemment retiré de multiples épines du pied lors de mes épopées avec l'administration.

A l'équipe BHN, Dominique, Nicole, Mickael et Julien pour toutes ces discussions, ces épisodes cocasses, votre bonne humeur, et les blagues qui fusent. Il fait bon vivre à vos côtés.

Simon, quelques lignes ne suffiront en cas à résumer l'ensemble de nos épopées, délires et de ces années... « I shot the sheriff », tu ne l'auras pas volée celle-là ! Notre version du ball-trap passera sans nul doute à la postérité, avec le slack-rugby, d'ailleurs. A bientôt, pour un épisode inimitable du breton à la neige !

Delphine, Anthony, merci pour tous ces fabuleux moments, votre gentillesse et votre accueil, les pauses midis endiablées plus que salvatrices à l'ombre des arbres, les partages musicaux qui ont judicieusement rythmé mes journées et j'en passe des meilleures. Promis, j'ai finalement retenu les règles de la coinche si sacrée à vos yeux. Antho, le concert d'Arch Enemy, magistral ! A notre prochain headbang. Métalleusement votre.

Marie, pour ta bonne humeur, tes blagues et ta personne, j'espère que nos chemins se recroiseront bientôt.

Alice, Damien, les mots me semblent bien futiles... Vous êtes décidément uniques et nombre d'entre nous gagnerait à emprunter votre voie.

Au Crew grenoblois. Oriane, Julien, Sylvain, Emilie, Benjamin, Justin, Lucie, Laurent, Romain. Un manuscrit ne suffirait pas à narrer nos aventures, les rebondissements, tous ces moments, tantôt chaleureux, comiques, intimes, durs, toujours forts. Quelle fortune de vous avoir rencontré ! Je ne serai au grand jamais capable de vous exprimer toute ma gratitude, de vous avoir près de moi, de m'avoir épaulé, supporté.

Mes pensées se dirigent également vers tous les amis, copains, originaires de Grenoble et d'autres contrées, vers mes compagnons de cordée avec qui les galères ne se comptent guère sur les doigts des deux mains. Au GUCEM, une véritable leçon de vie.

Une vive pensée aux colocataires du 24, Emilie, Galil, Kinou, Eric et Erika. Les fondues, les crises de rire, à tous ces moments joyeux et forts. La vie en communauté est pleine de rebondissements.

Erika, comment oublier ta volonté, ton énergie, nos débats sur la société au petit matin autour d'une tartine et tes mots de révision tapissant les murs, « le conseil constitutionnel ne doit pas devenir le symbole du temps qui passe ». Je suis à peu près sûr que la citation n'est pas exacte...

A tous les amis brestois, je ne vous oublie pas. Jordan, vieux frère, compagnon d'aventure, confident inestimable, la vie ne serait pas la même sans toi. Aux amis du cru, Juliette, Louise, JB, Cécile, Marina, Mael et tous les autres qui me connaissent depuis si longtemps.

A ma famille, mes parents, mes sœurs et mes neveux à qui je dois considérablement plus que je ne le comprends et que j'ai hâte de retrouver.

A toi, Pauline, qui a eu raison de ma carapace... Aux rêves, à l'aventure, à l'avenir.

Table des matières

Remerciements.....	1
Table des matières.....	5
Liste des abréviations.....	9
Liste des Figures	15
Liste des Tableaux	19
Chapitre 1 : Etat de l'art.....	20
I. Contexte du projet de recherche.....	22
II. La peau	25
II.1. La structure du tissu cutané.....	25
II.2. La peau, une barrière contre l'entrée des xénobiotiques.....	34
II.3. Les modèles <i>in vitro</i> d'étude de l'absorption cutanée.....	43
II.4. Les systèmes d'étude <i>in vitro</i> de l'absorption cutanée	47
III. Les rayonnements ultraviolets solaires.....	51
III.1. Généralités	51
III.2. L'exposition aux UV.....	52
III.3. Impact des UV sur l'absorption cutanée	55
IV. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	59
IV.1. Structure et caractéristiques physicochimiques	59
IV.2. Nomenclature	61
IV.3. Sources et exposition des populations	62
IV.4. Effets sanitaires des HAP : cancérogénicité	68
V. Absorption cutanée, cancérogénèse, UV, élimination des HAP	73
V.1. L'absorption cutanée des HAP, un phénomène multifactoriel complexe.....	73
V.2. Métabolisme, cancérogénicité des HAP et impact des UV	76
V.3. Distribution des HAP	102
V.4. Elimination.....	102

VI.	Suivi de l'exposition aux HAP et biomarqueurs d'exposition.....	104
VI.1.	De l'importance de la surveillance de l'exposition.....	104
VI.2.	La surveillance biologique de l'exposition professionnelle aux HAP.....	104
VII.	Synthèse, objectifs et organisation du travail de thèse.....	107
Chapitre 2 : Etude de l'absorption cutanée et du métabolisme du benzo[<i>a</i>]pyrène.....		110
I.	Contexte scientifique.....	112
II.	Développement du modèle d'exposition cutanée.....	112
III.	Exposition de la peau au B[<i>a</i>]P.....	113
IV.	Article scientifique.....	114
V.	Principaux résultats.....	130
VI.	Conclusion.....	131
Chapitre 3 : Métabolisme des HAP particuliers autres que le benzo[<i>a</i>]pyrène.....		132
I.	Contexte scientifique.....	134
II.	Synthèse de la littérature.....	136
II.1.	Le benzo[<i>a</i>]anthracène.....	136
II.2.	Le chrysène.....	140
II.3.	Le benzo[<i>b</i>]fluoranthène.....	144
II.4.	Le benzo[<i>k</i>]fluoranthène.....	148
II.5.	Le benzo[<i>j</i>]fluoranthène.....	150
II.6.	Le benzo[<i>e</i>]pyrène.....	152
II.7.	Le dibenzo[<i>a,h</i>]anthracène.....	155
II.8.	Conclusion.....	159
III.	Sélection de composés purs et commercialisés.....	160
IV.	Choix de l'étalon interne.....	163
V.	Conclusion.....	164
Chapitre 4 : Etude de l'absorption cutanée et du métabolisme des HAP particuliers en conditions d'expositions professionnelles.....		166
I.	Contexte scientifique.....	168

II.	Développement analytique	168
III.	Matériel et Méthodes	169
IV.	Article scientifique	170
V.	Principaux résultats	201
VI.	Conclusion.....	202
Chapitre 5 : Conclusion générale et perspectives		204
Références bibliographiques		216
Valorisation des travaux de thèse.....		258

Liste des abréviations

Σ F+P : moyenne du FluA et du Pyr

Σ HAPP : moyenne des HAP particuliers excepté le benzo[*a*]pyrène

1-OHP : 1-hydroxypyrrène

1-OHP ¹³C₆° : 1-hydroxy[¹³C₆]pyrène

1-OHB[*a*]A° : 1-hydroxybenzo[*a*]anthracène

3-OHB[*a*]A° : 3-hydroxybenzo[*a*]anthracène

3-OHB[*a*]P : 3-hydroxybenzo[*a*]pyrène

3-OHB[*c*]P ¹³C₆° : 3-hydroxy[¹³C₆]benzo[*c*]phénanthrène

3-OHB[*e*]P° : 3-hydroxybenzo[*e*]pyrène

3-OHB[*k*]F° : 3-hydroxybenzo[*k*]fluoranthène

3-OHChr° : 3-hydroxychrysène

3-OHDB[*a,h*]A° : 3-hydroxydibenzo[*a,h*]anthracène

4-OHB[*j*]F : 4-hydroxybenzo[*j*]fluoranthène

4-OHDB[*a,h*]A° : 4-hydroxydibenzo[*a,h*]anthracène

6-OHB[*a*]P° : 6-hydroxybenzo[*a*]pyrène

6-OHChr° : 6-hydroxychrysène

6-OHChr ¹³C₆ : 6-hydroxy[¹³C₆]chrysène

8-OHB[*k*]F° : 8-hydroxybenzo[*k*]fluoranthène

8-oxo-dG : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine

9-OHB[*k*]F° : 9-hydroxybenzo[*k*]fluoranthène

10-OHB[*b*]F° : 10-hydroxybenzo[*b*]fluoranthène

10-OHB[*j*]F° : 10-hydroxybenzo[*j*]fluoranthène

ABC : ATP binding cassette

ADN : acide désoxyribonucléique

AhR : aryl hydrocarbon receptor

AIP : AhR interacting protein

AKR : aldo-keto réductase

Ant : anthracène

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

ATSDR : Agence pour les substances toxiques et les maladies

ATP : adénosine triphosphate

B[a]A^o : benzo[a]anthracene

B[a]A-3,4-diol^o : benzo[a]anthracène-3,4-*trans*-dihydrodiol

B[a]A-8,9-diol^o : benzo[a]anthracene-8,9-*trans*-dihydrodiol

B[a]P : benzo[a]pyrène

B[a]P-7,8-diol : benzo[a]pyrène-7,8-*trans*-dihydrodiol

B[a]P-tétraol : 7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrène

B[b]F : benzo[b]fluoranthène

B[b]F-9,10-diol^o : benzo[b]fluoranthène-9,10-*trans*-dihydrodiol

BCRP : breast cancer resistance protein

B[e]P^o : benzo[e]pyrene

B[e]P-4,5-diol^o : benzo[e]pyrène-4,5-*trans*-dihydrodiol

B[e]P-9,10-diol^o : benzo[e]pyrène-9,10-*trans*-dihydrodiol

B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène

B[j]F^o : benzo[j]fluoranthène

B[j]F-2,3-diol : benzo[j]fluoranthène-2,3-*trans*-dihydrodiol

B[j]F-4,5-diol° : benzo[j]fluoranthène-4,5-*trans*-dihydrodiol

B[j]F-9,10-diol° : benzo[j]fluoranthène-9,10-*trans*-dihydrodiol

B[k]F : benzo[k]fluoranthène

B[k]F-8,9-diol° : benzo[k]fluoranthène-8,9-*trans*-dihydrodiol

BPDE : benzo[a]pyrène-7,8-*trans*-dihydrodiol-9,10-époxyde

CAR : constitutive androstane receptor

CBR : carbonyl réductases

Chr : chrysène

Chr-1,2-diol : chrysène-1,2-*trans*-dihydrodiol

Chr-3,4-diol : chrysène-3,4-*trans*-dihydrodiol

CIPRNI : commission internationale pour la protection contre les rayonnements non-ionisants

CIRC : centre internationale de recherche sur le cancer

CTP : brai de houille

CTP-I-1 : extrait de brai de houille ajusté à 1 nmol de benzo[a]pyrène

CTP-I-10 : extrait de brai de houille ajusté à 10 nmol de benzo[a]pyrène

CYP450 : cytochrome P450

dA : désoxyadénosine

DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène

DB[a,h]A-1,2-diol° : dibenzo[a,h]anthracène-1,2-*trans*-dihydrodiol

DB[a,h]A-3,4-diol° : dibenzo[a,h]anthracène-3,4-*trans*-dihydrodiol

dG : désoxyguanosine

DEM : dose érythémateuse minimale

DES : dose érythémateuse standard

DMSO : diméthylsulfoxyde

EH : époxyde hydrolase

EPI : équipements de protection individuels

ERO : espèce réactive à l'oxygène

EROD : éthoxyrésorufin-O-dééthylase

FluA : fluoranthène

GC-MS/MS : chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de masse en tandem

GST : glutathion S-transférase

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

hsp90 : heat shock protein 90

I[1,2,3-*c,d*]P° : Indéno[1,2,3-*c,d*]pyrene

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

LD : limite de détection

LQ : limite de quantification

LSS : lumière solaire simulée

MDR : multi drug resistance

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MRP : multidrug resistance protein

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Naph : naphthalène

NQO : (NAPDH):quinone oxydoréductase

OHB[*a*]A° : hydroxybenzo[*a*]anthracène

OHB[*b*]F° : hydroxybenzo[*b*]fluoranthène

OHB[*e*]P° : hydroxybenzo[*e*]pyrène

OHBJF° : hydroxybenzo[j]fluoranthène

OHChr : hydroxychrysène

OHDB[a,h]A° : hydroxydibenzo[a,h]anthracène

PAPPα : peroxysome proliferator activated receptor

PC : coke de pétrole

Phe : phénanthrène

Pyr : pyrène

QSAR : quantitative structure activity relationship

RPF : Relative Potency Factors

RT-qPCR : retrotranscription-polymerase chain reaction quantitative

SAB : sérum albumine bovine

SBE : surveillance biologique de l'exposition

SULT : sulfotransférase

TEF : Toxic Equivalency Factors

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TIPARP : TCDD-inducible poly-ADP-ribose polymerase

TRP : transient receptor potential

UGT : UDP glucuronidetransférase

UICPA : union internationale de chimie pure et appliquée

US-EPA : agence américaine de protection de l'environnement

UV : ultraviolets

XRE : xenobiotic response element

Liste des Figures

Figure 1 : Structure générale du tissu cutané.	25
Figure 2. Architecture de l'épiderme humain et marqueurs cellulaires du processus de cornéification des kératinocytes. D'après (Natarajan et al. 2014).	28
Figure 3 : Organisation de la membrane basale.	30
Figure 4. Représentation schématique de l'anatomie cutanée, de la structure du derme et du réseau vasculaire. D'après (Kolarsick et al. 2011).	32
Figure 5. Structure d'un follicule pilosébacé: (a) schéma d'un follicule pileux, (b) coupe d'un bulbe pileux. D'après (Celleno and Tamburi 2009).	33
Figure 6. Représentation schématique de l'organisation lipidique d'un <i>stratum corneum</i> humain. 1 : Le <i>stratum corneum</i> , la couche externe de l'épiderme, est constitué de cornéocytes intégré dans une matrice lipidique riche. 2 : Il est fréquemment représenté en tant qu'un mur de briques (les cornéocytes) entouré de ciment (la matrice lipidique). 3 : La matrice lipidique est arrangée en lamelles pouvant avoir une courte (SPP) ou une grande (LPP) distance de répétition. L'organisation latérale des lipides peut se faire selon trois arrangements possibles : l'état orthorhombique, l'état hexagonal ou l'état liquide. D'après (van Smeden et al. 2014).	36
Figure 7. Représentation schématique des trois voies de diffusion à travers le <i>stratum corneum</i> . D'après (Beriro et al. 2016).	38
Figure 8. Coupe histologique d'un modèle de peau de peau reconstruit (Episkin modèle T-skin TM). Il intègre l'ensemble des structures macroscopiques de la peau : l'épiderme (1) dont le stratum corneum (2), et le derme (3). D'après http://www.episkin.com/T-Skin	45
Figure 9. Schéma d'une cellule de diffusion de Franz.	48
Figure 10. Schéma d'une cellule de diffusion dynamique.	49
Figure 11. Photographie du système d'inserts et de puits. D'après (Jacques et al. 2010a).	50
Figure 12. Représentation de la place des UV dans le spectre électromagnétique global. D'après (Morison 2005).	51

- Figure 13.** Exemple d'orientation et de numérotation des carbones périphériques du benzo[*a*]pyrène pour la nomenclature des cycles substitués d'après l'UICPA. Adapté de (Harvey 2011). 61
- Figure 14.** Illustration des différentes régions K, L et M. Adapté d'après (Vijayalakshmi and Suresh 2008). 61
- Figure 15.** Représentation des régions de (a) Bay et (b) Fjord selon (J. Carrell et al. 1995) et régions de (b) Bay et (c) Fjord d'après (Ehrenhauser 2015). 62
- Figure 16.** Représentation graphique de la variabilité géographique des émissions de HAP et des sources d'émissions ainsi que de la contribution de chaque source aux émissions de HAP, d'après (Zhang and Tao 2009). 64
- Figure 17.** Composition des profils d'émissions en HAP des sept sources majoritaires en 2007 pour A) les émissions globales, B) les pays en voie de développement et C) les pays développés (Shen et al. 2013). NAP : Naphtalène, ACY : acénaphylène, ACE : Acénaphène, FLO : Fluorène, PHE : Phénanthrène, ANT : Anthracène, FLA ; Fluoranthène, PYR : Pyrène, BaA : Benzo[*a*]anthracène, CHR : Chrysène, BbF : Benzo[*b*]fluoranthène, BkF : Benzo[*k*]fluoranthène, BaP : Benzo[*a*]pyrène, IcdP (Indo[*1,2,3-c,d*]pyrène, DahA : Dibenzo[*a,h*]anthracène, BghiP : Benzo[*g,h,i*]pérylène. D'après (Shen et al. 2013). 65
- Figure 18.** Schéma simplifié du processus d'absorption cutanée des HAP. 1 : pénétration des HAP dans le stratum corneum en fonction de la biodisponibilité depuis le véhicule (huiles, bitumes...). Les HAP, lipophiles, diffusent difficilement à travers les autres couches épidermiques, hydrophiles, et s'accumulent dans le *stratum corneum*, formant un réservoir cutané (2). Leur absorption dépend largement de leur métabolisme au sein des kératinocytes (3). 4 : La fraction de HAP non-métabolisée et les métabolites atteignent la circulation sanguine au niveau du derme papillaire, vascularisé. 73
- Figure 19.** Cascade simplifiée de la biotransformation du B[*a*]P en BPDE (benzo[*a*]pyrène-7,8-trans-dihydrodiol-9,10-époxyde) et en reverse-BPDE. Adapté d'après (Hecht et al. 2010). B[*a*]P : benzo[*a*]pyrène. CYP450 : cytochrome P450. EH : époxyde hydrolase..... 78
- Figure 20.** Schéma récapitulatif de la formation des 4 stéréoisomères du BPDE (Benzo[*a*]pyrène-7,8-trans-dihydrodiol-9,10-époxyde). Adapté d'après (Baird et al. 2005). B[*a*]P : benzo[*a*]pyrène. CYP450 : cytochrome P450. EH : époxyde hydrolase..... 79
- Figure 21.** Exemple de la voie métabolique du radical cation pour le B[*a*]P (benzo[*a*]pyrène). Adapté d'après (Xue and Warshawsky 2005). CYP450 : cytochrome P450..... 80

- Figure 22.** Schéma simplifié de la voie métabolique de l'ortho-quinone. Adapté d'après (Burczynski and Penning 2000). CYP450 : cytochrome P450. EH : époxyde hydrolase. AKR : aldo-kéto réductase. CBR : carbonyl réductase. NQO : (NAPDH):quinone oxydoréductase. GST : glutathion S-transférase . UGT : UDP glucuronidetransférase. 82
- Figure 23.** Schéma d'illustration de la voie des métabolites hydroxylés du benzo[*a*]pyrène. D'après (Barbeau 2013)..... 84
- Figure 24.** Structure des transporteurs membranaires de la famille ABC (ATP binding cassette). D'après (Schinkel and Jonker 2003). P-glycoprotein^o: Multi Drug Resistance 1 (MDR1). MRP : multidrug resistance protein. BDRP : breast cancer resistance protein..... 86
- Figure 25.** Modulation de l'expression enzymatique par les HAP via la voie du facteur de transcription AhR (aryl hydrocarbon receptor). Adapté d'après (James P. Whitlock 1999). Hsp90: heat shock protein 90. AIP: AhR interacting protein. Arnt: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. CYP1A1: cytochrome P450 1A1. 88
- Figure 26.** Etats de photoexcitation et photochimie des HAP. PAH⁰ : état énergétique basal. PAH¹ : état énergétique singulet. PAH³ : état énergétique triplet (= T₁). ISC : inter system crossing (= transfert d'énergie ou d'électron à une autre molécule). D'après (Yu 2002). 97
- Figure 27.** Produits issus de la photodégradation du benzo[*a*]pyrène. D'après (Fu et al. 2012).99
- Figure 28.** Schéma simplifié du métabolisme du B[*a*]A. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[*a*]A. 139
- Figure 29.** Schéma simplifié du métabolisme du Chr. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. Flèche hachurée : voie métabolique hypothétique. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du Chr.144
- Figure 30.** Schéma simplifié du métabolisme du B[*b*]F. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[*b*]F. 148
- Figure 31.** Schéma simplifié du métabolisme du B[*k*]F. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[*k*]F. 150

Figure 32. Schéma simplifié du métabolisme du B[j]F. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[j]F. 152

Figure 33. Schéma simplifié du métabolisme du B[e]P. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Flèche hachurée : voie métabolique hypothétique. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[e]P..... 155

Figure 34. Schéma simplifié du métabolisme du DB[a,h]A. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du DB[a,h]A. 158

Figure 35 : Chromatogramme HPLC-UV à 254 nm pour l'ensemble des dihydrodiols ; A : B[a]A-3,4-diol, B : B[a]A-8,9-diol, C : B[b]F-9,10-diol, D : B[b]F-11,12-diol, E : B[k]F[8,9-diol, F : Chr-1,2-diol, G : B[j]F-2,3-diol, H : B[e]P-4,5-diol, I : B[e]P-9,10-diol. 162

Liste des Tableaux

- Tableau 1.** Dénomination, numéro CAS, formule et caractéristiques des 16 HAP listés prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA). Les valeurs de Log K_{ow} proviennent du rapport de l'Agence pour les substances toxiques et les maladies (ATSDR) (ATSDR 1995). D'après (Lutier 2017). 60
- Tableau 2.** Classification individuelle des HAP par le CIRC et l'Union Européenne quant à leur cancérogénicité..... 69
- Tableau 3.** Classification par le CIRC et l'Union Européenne de certains mélanges complexes émis en milieu professionnel. 70
- Tableau 4.** Résumé des biomarqueurs d'intérêts d'après revue de la littérature. Vert : degré de confiance élevé; Orange : degré de confiance moyen; Rouge : degré de confiance faible.159
- Tableau 5.** Liste des métabolites obtenus suite à la synthèse de la littérature et la disponibilité chez MRIGlobal, pureté des standards acquis, âge des standards au moment de l'achat. Vert : dihydrodiols sans impuretés ; Rouge : dihydrodiols avec impuretés..... 161
- Tableau 6.** Liste finale des métabolites sélectionnés après étude de la littérature et vérification de leur pureté. 164
- Tableau 7.** Liste des étalons internes et leurs formules développées..... 165

Chapitre 1 : Etat de l'art

I. Contexte du projet de recherche

La peau, enveloppe ou tégument du corps humain, dessine la limite séparant l'organisme de l'environnement. Mesurant en moyenne 2 m² chez l'adulte, cet organe complexe recouvre les os, muscles et organes internes (Celleno and Tamburi 2009). Interface active protégeant des agressions constantes de l'environnement, la peau procure une identité unique essentielle à la communication entre individus et joue de nombreux rôles essentiels à la vie (Celleno and Tamburi 2009; Monteiro-Riviere et al. 2010). Voie d'entrée des microorganismes et des substances exogènes, elle intègre de nombreux acteurs du système immunitaire capables d'induire une réponse adaptée à ces agresseurs tout en maintenant la tolérance périphérique du soi afin de prévenir l'auto-immunité (Celleno and Tamburi 2009; Kolarsick et al. 2011; Pivarsci et al. 2004; Sparber 2014). La peau est parcourue par de multiples structures nerveuses lui conférant le rôle de premier système sensoriel de l'organisme. Sensible à de nombreux stimuli environnementaux (température, pression, humidité, lumière...), elle relaie et transmet l'information au système nerveux central (Denda 2015; Kolarsick et al. 2011). Elle est également essentielle au maintien la température corporelle à 37°C grâce à plusieurs mécanismes tels que la sudation ou la régulation de l'afflux sanguin (Celleno and Tamburi 2009; Kolarsick et al. 2011). La peau est un organe endocrine périphérique indépendant capable de synthétiser une grande variété d'hormones, la vitamine D ainsi que des endorphines (Celleno and Tamburi 2009; Dréno 2009; Zouboulis 2000). Le potentiel de la peau à influencer l'état général et émotionnel du corps humain est tel que certains chercheurs la considère comme le troisième cerveau humain (Denda 2015).

Parmi l'ensemble des fonctions cutanées, le rôle de barrière est primordial dans le maintien de la vie. Si l'organisation tissulaire et la composition de la peau lui confère une résistance à la pénétration de pathogènes, son implication dans la régulation des pertes hydriques est vitale (Celleno and Tamburi 2009; Svoboda et al. 2016). Ces propriétés de barrière protègent également l'organisme humain des agressions chimiques infligées par l'environnement en limitant la diffusion de xénobiotiques à travers la peau. Le tissu cutané n'est cependant pas totalement imperméable aux molécules chimiques, et l'absorption cutanée est une thématique d'étude fondamentale en dermatologie, pharmacologie, cosmétologie mais aussi en toxicologie (Monteiro-Riviere et al. 2010). Tandis que certaines recherches visent à développer des systèmes améliorant l'absorption cutanée de molécules thérapeutiques (Farahmand and Maibach 2009), d'autres études se focalisent sur la capacité de divers xénobiotiques, à l'instar des pesticides, à traverser la peau et leur toxicité locale (irritants, allergènes, cancérigènes...) (Karan et al. 2009).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des cancérogènes majeurs en milieu professionnel, connus depuis l'attribution de l'origine des cancers du scrotum de ramoneurs à l'exposition à la suie par Sir Percivall Pott en 1775 (IARC 2010). Les connaissances scientifiques ont depuis démontré l'induction de cancers du poumon, de la vessie et de la peau par les HAP (Boffetta et al. 1997). L'exposition à ces toxiques représente toujours un enjeu sanitaire car leur absorption par voie respiratoire et cutanée induit une contamination corporelle considérable dans certains secteurs industriels (IARC 2010). Tandis que l'exposition par inhalation est généralement bien caractérisée, la voie cutanée n'est souvent pas considérée alors qu'elle constitue une voie d'exposition non-négligeable (McClellan et al. 2004; VanRooij et al. 1992), pouvant être majoritaire lors de certaines activités professionnelles (VanRooij et al. 1993b). De plus, dans certaines situations, tels que les travaux de voirie, la peau des salariés est exposée simultanément aux HAP et aux rayonnements ultraviolets (UV), pouvant moduler à la fois l'absorption et la génotoxicité des HAP (Hopf et al. 2018).

D'après les articles L-4121-1 et L4121-5 du code du travail, l'employeur est dans l'obligation de veiller à la santé et à la sécurité de ses employés dans le cadre professionnel. Afin de déployer des moyens de protection adaptés (procédures, protections individuelles ou collectives) et d'en évaluer leur efficacité, il est primordial d'être en mesure de quantifier l'exposition aux toxiques résultant des processus industriels ou des tâches effectuées. La surveillance biologique de l'exposition (SBE) ou biomonitoring, *i.e.* quantification d'un ou de plusieurs biomarqueurs spécifiques du xénobiotique dans une matrice biologique, permet d'évaluer de manière pertinente les niveaux d'exposition des salariés en tenant compte des moyens de protection et de l'ensemble des voies d'absorption (Jongeneelen 2001). Une difficulté liée au biomonitoring des HAP est l'insuffisance du nombre de biomarqueurs validés pour caractériser convenablement l'exposition professionnelle aux mélanges complexes de HAP génotoxiques dont la composition est à la fois complexe et variable en fonction des sources d'émission (Boström et al. 2002).

Le développement de nouveaux biomarqueurs des HAP constitue un axe au cœur des activités de l'équipe de recherche Environnement et Prédiction de la Santé des Populations (équipe EPSP, laboratoire TIMC-IMAG, UMR 5525 UGA-CNRS, Université Grenoble Alpes, Faculté de Médecine, 38706 La Tronche) et a fait l'objet de plusieurs travaux de thèse au sein de l'équipe (Barbeau 2013; Lutier 2017). Le travail de recherche détaillé dans le présent manuscrit a pour objectif d'aborder la compréhension des mécanismes d'absorption et de métabolisation des mélanges complexes de HAP au niveau de la peau, ainsi que leurs modulations par l'exposition combinée aux UV. *In fine*, le but est d'étudier la pertinence de biomarqueurs d'exposition aux HAP afin d'améliorer l'évaluation de l'exposition cutanée et donc du risque cancérogène en milieu

professionnel. De plus, ce travail apportera des éléments pour comprendre la génotoxicité cutanée des HAP du fait d'une collaboration avec le Centre d'Etude Atomique, dont les sujets d'étude s'intéressent notamment aux mécanismes d'action des HAP.

Afin d'exposer le contexte et les enjeux du sujet, ce premier chapitre du manuscrit est divisé en plusieurs parties correspondant à la synthèse des connaissances scientifiques sur :

- 1- La structure et la physiologie de la peau en relation avec la fonction barrière de la peau, ainsi que les modèles d'études utilisés dans ce type de travaux,
- 2- La composition des rayonnements UV, l'exposition aux UV et l'impact sur l'absorption des xénobiotiques par la peau,
- 3- Les caractéristiques physicochimiques, les expositions et la cancérogénicité des HAP,
- 4- L'absorption cutanée des HAP, les mécanismes cancérogènes et l'influence des UV sur ces processus,
- 5- Une brève introduction à la SBE.

II. La peau

II.1. La structure du tissu cutané

La peau est constituée de trois tissus superposés de composition et de fonctions différentes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme, parmi lesquels s'intègrent les annexes cutanées (glandes sébacées, glande sudoripare et follicule pileux) (Figure 1) (Celleno and Tamburi 2009).

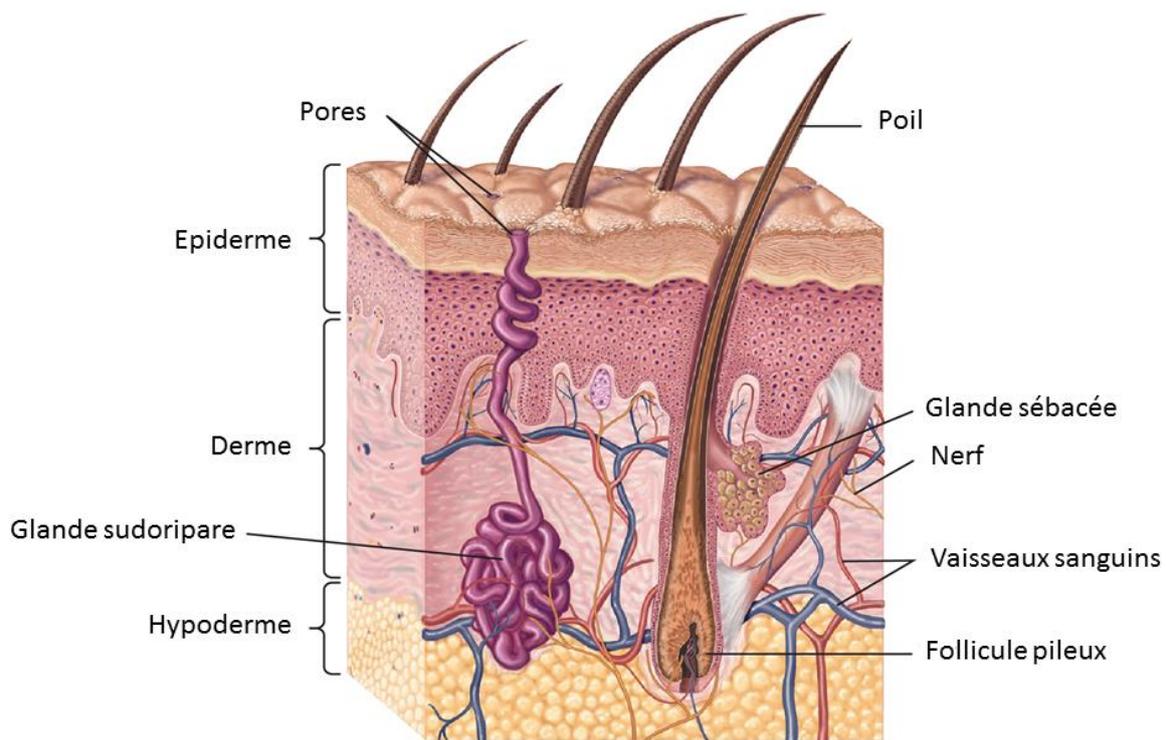


Figure 1 : Structure générale du tissu cutané.

II.1.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau, en contact direct avec l'environnement. L'épaisseur et le nombre de strates cellulaires varient considérablement en fonction de la zone anatomique. L'épiderme mesure ainsi 0,5 mm au niveau des paupières et de 4 à 6 mm sous les talons. Cet épithélium stratifié kératinisé squameux est constitué de plusieurs types cellulaires, dont les kératinocytes et les mélanocytes, et confère à la peau la fonction de barrière face aux xénobiotiques, aux UV et à la déshydratation (Celleno and Tamburi 2009).

II.1.1.1. Les cellules épidermiques impliquées dans la barrière cutanée

○ Les kératinocytes :

Les kératinocytes représentent 90% des cellules de l'épiderme (Natarajan et al. 2014). Ils sont responsables de la formation, de la régulation et du maintien de la barrière que constitue la peau face aux xénobiotiques, aux agressions de l'environnement et à la déshydratation. Ils synthétisent les lipides intracellulaires imprégnant la couche cornée ainsi que les protéines filamentaires (kératine, filaggrine...) donnant à la peau sa résistance face aux attaques environnementales et son imperméabilité (Natarajan et al. 2014). Les kératinocytes expriment à leur surface de nombreuses jonctions cellulaires dont les desmosomes, les jonctions serrées et des jonctions communicantes gap (excepté au niveau de la couche cornée) (Raja et al. 2007; Scott and Kelsell 2011; Svoboda et al. 2016). Ces jonctions sont essentielles à l'homéostasie de l'épiderme, la barrière cutanée, la polarité cellulaire et la différenciation des kératinocytes (Scott and Kelsell 2011; Svoboda et al. 2016). Les jonctions gap permettent le transfert d'ions ou de molécules de masse moléculaire inférieure à 1 kiloDalton entre cellules adjacentes (Scott and Kelsell 2011).

Les kératinocytes expriment également une grande variété de récepteurs appartenant à la famille des transient receptor potential (TRP), des récepteurs à l'adénosine triphosphate (ATP), des canaux ioniques, des récepteurs hormonaux ou encore certains récepteurs encéphaliques. Ces récepteurs seraient impliqués dans la détection des flux d'eau depuis la surface de la peau et dans le maintien de l'homéostasie de l'épiderme (Denda et al. 2007).

Les kératinocytes sont des sentinelles contribuant à la défense de la peau grâce à leurs fonctions immunitaires. Ils intègrent des mécanismes de l'immunité innée et acquise, et protègent activement l'intégrité du tissu cutané face aux microorganismes pathogènes. Ils expriment notamment à la surface de leur membrane cellulaire des récepteurs de reconnaissance de pathogènes dont les récepteurs aux mannoses ou les Toll-like récepteurs. Après reconnaissance et liaison aux agents pathogènes, les kératinocytes sont capables de lyser et de détruire les champignons, virus et bactéries en émettant des peptides antimicrobiens ou en générant des radicaux libres tels que l'oxyde nitrique (Pivarcsi et al. 2004). En parallèle, les kératinocytes sont également capables de stimuler et de recruter d'autres cellules de l'immunité via la présentation d'antigènes ou la sécrétion de cytokines (Dréno 2009). Les kératinocytes peuvent en effet synthétiser un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines, dont les interleukines impliqués dans les processus immunitaires et inflammatoires (Shirakata 2010).

Les kératinocytes expriment de multiples d'enzymes impliquées dans le métabolisme de substances endogènes et de xénobiotiques, constituant de fait le site principal du métabolisme cutané (Oesch et al. 2018), dont la diversité sera détaillée dans le paragraphe II.2.3.

- Les mélanocytes :

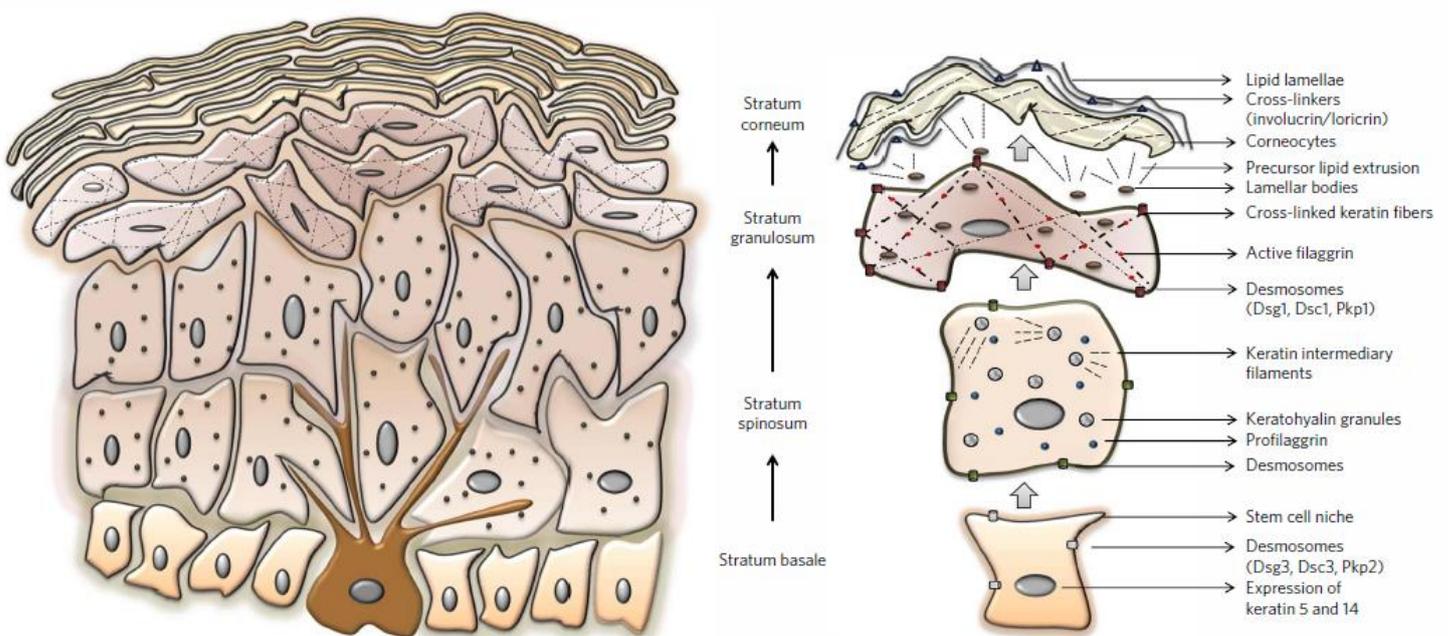
Les mélanocytes jouent un rôle essentiel dans la protection de la peau et de l'organisme face aux rayonnements UV. Ces cellules dendritiques, au nombre de 1 mélanocyte pour 5 à 10 kératinocytes, sont intercalées entre les cellules de la couche basale (Celleno and Tamburi 2009). Sous l'action des UV, les mélanocytes produisent la mélanine qui s'accumule dans des vésicules cytoplasmiques, les mélanosomes. Ceux-ci sont alors distribués à un groupe de kératinocytes adjacents, pouvant compter jusqu'à 36 cellules, au moyen de dendrites infiltrés entre les membranes plasmiques de la couche basale et épineuse (Celleno and Tamburi 2009; Natarajan et al. 2014). Une fois transmises, ces vésicules se positionnent en forme de parapluie autour du noyau afin de protéger l'information génétique des effets délétères des rayonnements UV (Celleno and Tamburi 2009).

II.1.1.2. Structure et physiologie de l'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié kératinisé squameux résilient s'entretenant grâce à un auto-renouvellement constant en conditions physiologiques comme en conditions de stress (Natarajan et al. 2014). Ce processus de 21 jours, appelé cornéification, débute au niveau de la couche basale de l'épiderme et se termine au niveau de la couche cornée. Les kératinocytes se différencient progressivement, s'aplatissent et migrent vers l'extérieur de la peau, divisant l'épiderme en couches cellulaires distinctes (Figure 2) (Celleno and Tamburi 2009; Eckhart et al. 2013). Au niveau de la dernière couche épidermique, appelée couche cornée, les kératinocytes atteignent le dernier stade de différenciation. Ils forment alors une couche cellulaire morte, résistante et étanche considérée comme la principale barrière à l'absorption cutanée de substances chimiques, à la pénétration de microorganismes et à la perte d'eau depuis l'organisme (Natarajan et al. 2014).

L'épiderme repose sur la membrane basale qui le sépare du derme. Il ne possède ni système vasculaire, ni système nerveux et survit grâce aux apports en oxygène et nutriments délivrés par le derme (Celleno and Tamburi 2009). La couche basale (ou *stratum basale*) est solidement ancrée à la matrice extracellulaire constituant la membrane basale par des hémidesmosomes et des intégrines (Raja et al. 2007). La couche basale est composée de trois populations de kératinocytes cubiques ou cylindriques compactés en une rangée unique organisée en palissade : les cellules souches de l'épiderme, les cellules amplificatrices et les cellules post-mitotiques n'ayant pas encore débuté leur migration (Celleno and Tamburi 2009; Dréno 2009). Les cellules amplificatrices ont une activité métabolique intense. Elles se divisent rapidement et continuellement pour remplacer les kératinocytes de surface régulièrement perdus par exfoliation (Celleno and Tamburi 2009). Il est estimé que 15% des cellules basales participent à la cornéification, tandis que les autres cellules sont en quiescence (Baroni et al. 2012; Blanpain and Fuchs 2006).

Figure 2. Architecture de l'épiderme humain et marqueurs cellulaires du processus de cornéification des kératinocytes.



D'après (Natarajan et al. 2014).

Après division cellulaire, les cellules filles issues des cellules amplificatrices débutent leur migration vers l'extrémité de l'épiderme. Elles ne sont plus attachées à la membrane basale et leur profil d'expression génique est modifié sous le contrôle de plusieurs acteurs cellulaires et facteurs de transcription (Eckhart et al. 2013). Dans la couche épineuse (ou *stratum spinosum*), constituée de plusieurs strates de kératinocytes, les cellules deviennent polygonales et sont solidement ancrées les unes aux autres. A ce stade, les kératinocytes ré-établissent les contacts intercellulaires perdus au moment de la division par formation de desmosomes et autres ponts cellulaires. Les kératinocytes développent également les organites cytoplasmiques nécessaires à la synthèse de nombreuses

substances (Celleno and Tamburi 2009; Tsakovska et al. 2017). Les kératinocytes produisent et accumulent ainsi des stocks de précurseurs protéiques dont la profilaggrine et la kératohyaline regroupant les filaments intermédiaires de kératine, mais aussi des lipides (Celleno and Tamburi 2009; Natarajan et al. 2014; Tsakovska et al. 2017).

Au niveau de la couche granuleuse (ou *stratum granulosum*), les kératinocytes s'aplatissent et perdent leur activité cellulaire en accumulant des granules de kératohyaline (Celleno and Tamburi 2009). Ils contiennent aussi une lourde machinerie cellulaire constituée de polyribosomes, de grands corps de Golgi, de réticulums endoplasmiques rugueux. Ces acteurs cellulaires sont impliqués dans la synthèse de macromolécules qui s'accumulent dans des granules intracellulaires dont les kératinosomes (Celleno and Tamburi 2009; Tsakovska et al. 2017). Les kératinosomes, aussi appelés corps d'Odland ou corps lamellaires, contiennent une variété de précurseurs lipidiques et d'enzymes. La profilaggrine, activée en filaggrine, forme des faisceaux protéiques attachant les cellules les unes aux autres à travers les desmosomes (Celleno and Tamburi 2009; Natarajan et al. 2014). De nombreux événements se déroulent dans les couches cellulaires supérieures du *stratum granulosum*, au cours desquels le noyau est expulsé hors des kératinocytes. La kératohyaline est convertie en kératine et s'accumule au niveau de la membrane cytoplasmique formant une épaisse enveloppe protéique contenant des résidus cellulaires (Celleno and Tamburi 2009). Les corps d'Odland sont expulsés dans l'espace intercellulaire et établissent la barrière neutre lipidique. Ces lipides intercellulaires sont composés de céramides (45-50%), de cholestérol (25%), d'acide gras à longue chaîne carbonée (15%) et d'autres lipides (5%) (Tsakovska et al. 2017).

Mesurant de 10 à 50 μm d'épaisseur selon la zone anatomique, la couche cornée (ou *stratum corneum*) est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Les kératinocytes, hexagonaux et devenus métaboliquement inactifs, sont dorénavant appelés cornéocytes. Ils sont essentiellement composés de kératine, représentant 60% du poids sec du *stratum corneum*. Les filaments protéiques de kératines renforcent les cornéocytes et aplanissent la surface de la peau. La membrane cytoplasmique des cornéocytes composée de feuilletts phospholipidiques, trop fragile et perméable à l'eau, est consolidée par des protéines réticulées provenant des granules de keratohyaline, formant une enveloppe cellulaire dite cornéifiée. Ils sont solidement reliés les uns aux autres par des jonctions cellulaires, les cornéodesmosomes qui confèrent sa résistance physique au *stratum corneum*, et à la barrière lipidique grâce aux protéines d'ancrage, l'involucrine et la loricrine (Natarajan et al. 2014; Tsakovska et al. 2017; Wickett and Visscher 2006).

Au niveau de la couche cornée, les lipides intercellulaires s'arrangent sous forme de feuilletts lipidiques bistratifiés. Cette barrière lipidique intercellulaire joue un rôle essentiel dans le maintien

de l'hydratation de la peau et donne à la couche cornée sa fonction de barrière. Poussés par les kératinocytes provenant des couches épidermiques inférieures, les cornéocytes perdent graduellement leur cohésion et desquament (Celleno and Tamburi 2009). Ce processus dépend de protéases et de lipases inhibées par le calcium et par le pH de la peau, dont l'activation participe au maintien de l'homéostasie de l'épiderme (Natarajan et al. 2014).

Entre le *stratum granulosum* et le *stratum corneum*, il existe une couche cellulaire intermédiaire, le *stratum lucidum*, qui est uniquement retrouvée au niveau des paumes et de la plante des pieds. Elle n'est composée que de deux strates de kératinocytes plats ayant perdus leur noyaux et organites cytoplasmiques (Celleno and Tamburi 2009).

II.1.2. Le derme

Au niveau de la partie superficielle du derme papillaire, l'épiderme est séparé du derme par la jonction dermo-épidermique constituée d'invaginations de l'épiderme et du derme. Elle est parcourue sur toute sa longueur par la membrane basale (Figure 3). Cette jonction essentielle régule la diffusion d'oxygène et de nutriments du derme vascularisé vers l'épiderme non-vascularisé (Celleno and Tamburi 2009).

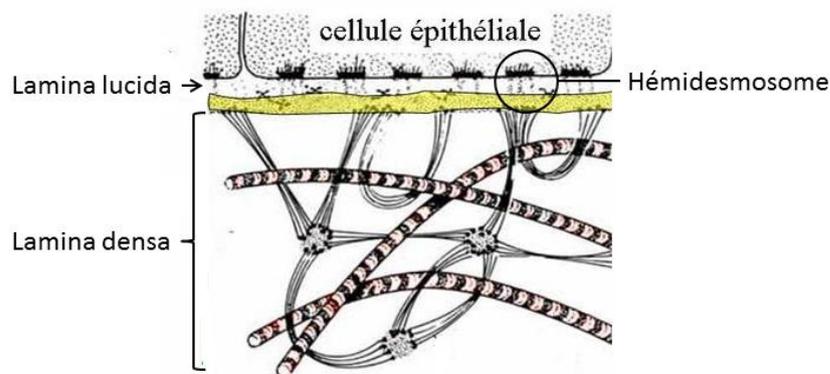


Figure 3 : Organisation de la membrane basale.

D'épaisseur variable selon la zone anatomique, le derme est le tissu de support de l'épiderme et des annexes cutanées. Fortement innervé et vascularisé, le derme est majoritairement composé de fibres et de substance fondamentale mais contient également une population cellulaire de faible densité : les fibroblastes et des cellules de l'immunité (mastocytes, des lymphocytes et des histiocytes). Les fibroblastes maintiennent la charpente du derme en synthétisant différentes variétés de fibres (collagène et fibres élastiques) et la substance fondamentale.

Les fibres de collagène sont les principales fibres du derme. Elles sont organisées en faisceaux d'orientation variable dont la fonction est de soutenir la structure interne de la peau. Les fibres élastiques sont principalement composées d'une protéine appelée élastine et structurées en un filet lâche donnant à la peau son élasticité. L'ensemble de ces différents constituants sont maintenus ensemble par la substance fondamentale qui compacte la structure du derme. Elle est composée de glycosaminoglycane, dont l'acide hyaluronique, le dermatane sulfate, la kératine sulfate et le chondroïtine sulfate, mais aussi de glycoprotéines. Ces différentes macromolécules sont agrégées sous forme de protéoglycanes accumulant les liaisons avec de nombreuses molécules d'eau. Cet assemblage de macromolécules forme ainsi un gel permettant d'apporter les nutriments et l'oxygène aux tissus, mais aussi de protéger la structure du derme.

Le derme se divise en deux parties distinctes : le derme papillaire situé contre l'épiderme et le derme réticulé situé en profondeur (Figure 4). Le derme papillaire contient un riche réseau de capillaires destiné à la nutrition de l'épiderme et des annexes cutanés. Il est composé d'un réseau de fibres dont l'orientation est irrégulière et de grandes proportions de substance fondamentale. Inversement, les larges faisceaux de fibres de collagène façonnant le derme réticulé sont distribués parallèlement à la surface de la peau. Il contient également moins de cellules et de substance fondamentale que le derme papillaire. Le réseau capillaire y est également moins dense, son rôle étant d'être la charpente de la peau (Celleno and Tamburi 2009).

La vascularisation du derme intègre deux plexus vasculaires communiquant par le biais d'artérioles et de veinules : le plexus vasculaire sous papillaire composé de capillaires localisés à la jonction du derme papillaire et du derme réticulée, et le plexus vasculaire profond situé à l'interface avec le tissu sous-cutané. Le derme papillaire est approvisionné en sang par des artérioles, des capillaires et des veinules originaires du plexus superficiel tandis l'afflux sanguin irriguant le plexus profond provient de la circulation systémique (Kolarsick et al. 2011).

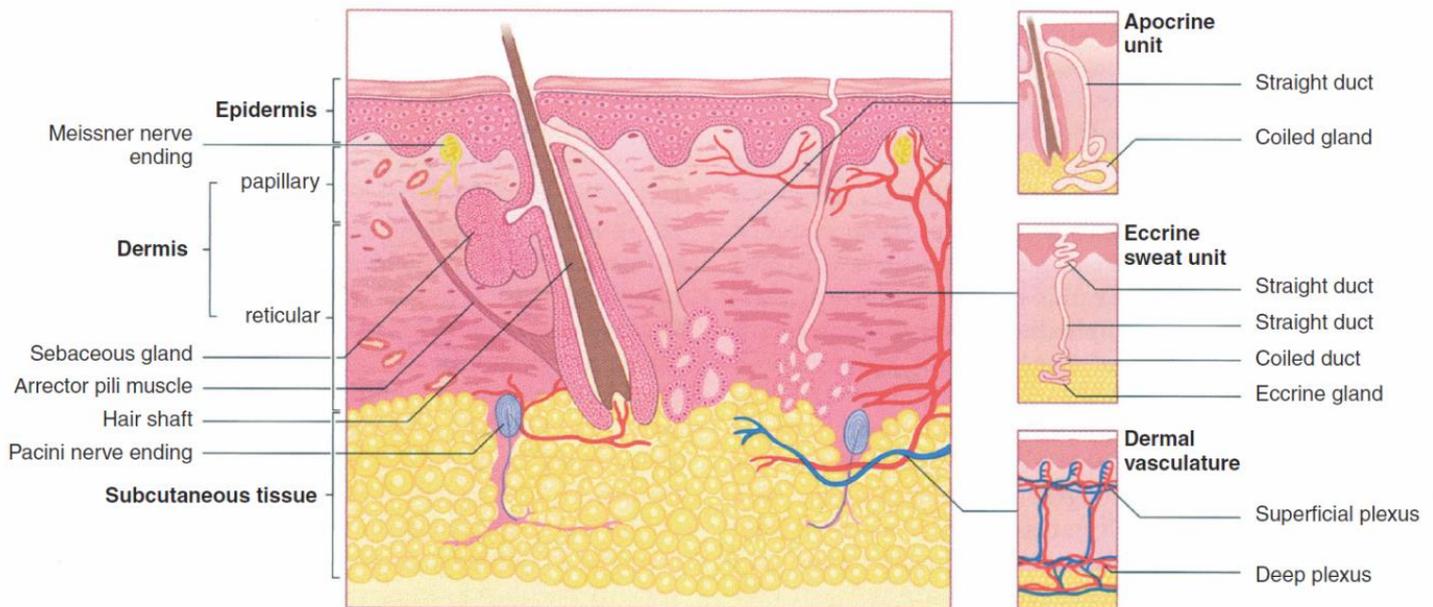


Figure 4. Représentation schématique de l'anatomie cutanée, de la structure du derme et du réseau vasculaire. D'après (Kolarsick et al. 2011).

II.1.3. L'hypoderme

Localisé sous le derme, l'hypoderme forme un coussin de gras séparant la peau des organes internes, assurant à la fois un rôle de protection et de réserve pour l'organisme (Celleno and Tamburi 2009). Chez l'homme, ce tissu participe également à des fonctions physiologiques complexes dont certaines fonctions endocrines impliquées dans l'assimilation de nourriture, l'homéostasie du glucose, le métabolisme lipidique, l'inflammation et l'angiogenèse (Driskell et al. 2014). Son épaisseur dépend du site anatomique, de l'état nutritionnel et du sexe de l'individu. Il est composé d'adipocytes regroupés en lobes reliés par un tissu connectif. Il est parcouru par un réseau d'artérioles et de veinules permettant sa nutrition. L'architecture cellulaire des adipocytes intègre un noyau périphérique et un globule unique concentrant les réserves d'énergie sous forme d'acide gras (Celleno and Tamburi 2009; Driskell et al. 2014).

II.1.4. Les annexes cutanées

Loin d'être lisse, la surface de la peau est constellée d'orifices correspondants aux pores des glandes cutanées et aux ostium pileux (Celleno and Tamburi 2009). Ces structures, appelées annexes cutanées, regroupent les glandes cutanées (glandes sudoripares eccrine ou apocrine et glandes sébacées) et les phanères (système pileux et ongles) (Dréno 2009), dont la répartition est inégale entre les zones anatomiques (Celleno and Tamburi 2009).

Recouvrant l'ensemble de la peau, les poils sont toujours associés aux glandes sébacées et forment les follicules pilosébacés (Figure 5). Les glandes sébacées excrètent le sébum dans le follicule

pileux de manière à ce que le poil en soit recouvert en atteignant la surface de la peau. Le follicule pilosébacé est formé par invagination de l'épiderme dans le derme qui produit une gaine constituée de derme papillaire et de membrane basale (Celleno and Tamburi 2009).

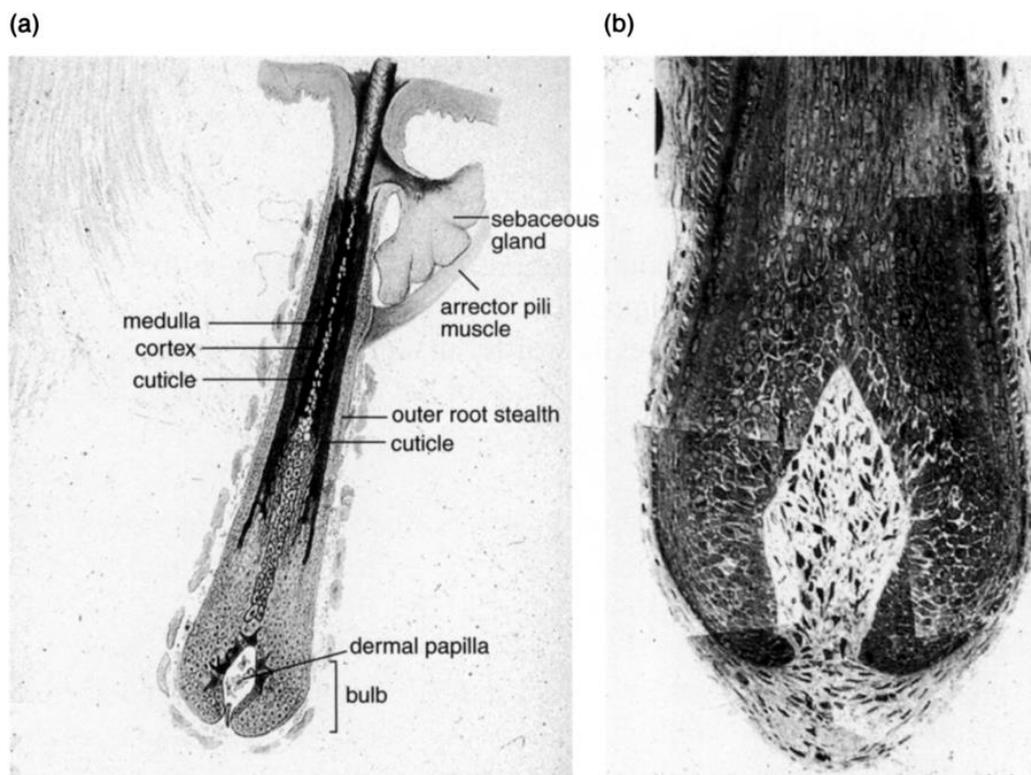


Figure 5. Structure d'un follicule pilosébacé: (a) schéma d'un follicule pileux, (b) coupe d'un bulbe pileux. D'après (Celleno and Tamburi 2009).

Les glandes sébacées localisées au niveau de l'anus, des organes génitaux, des lèvres et des paupières constituent un cas particulier car elles sont directement reliées à la surface de la peau afin de garantir une lubrification et une protection adéquate de la peau par le sébum. Représentant 95% des lipides cutanés, le sébum est composé à 20% d'acide gras libres, 40% de triglycérides, 15% de squalène, 20% de cérides, ainsi que de 5% de stérols et de glycophospholipides (Celleno and Tamburi 2009). Les sécrétions de sébum sont sous régulation hormonale et sont impliquées dans le développement de la structure épidermique, le maintien de la barrière cutanée, l'apport en antioxydant à la structure de la peau, la protection contre la colonisation par les micro-organismes et l'odeur corporelle (Ro and Dawson 2005).

Les glandes sudoripares se différencient entre les glandes sudoripares apocrines et les glandes sudoripares eccrines (Celleno and Tamburi 2009). Les glandes sudoripares apocrines sont uniquement localisées au niveau des plis inter-fessiers, des aisselles et des organes génitaux où elles sont associées aux follicules pilosébacés (Dréno 2009). Leurs sécrétions sont riches en substances organiques et comprend de larges proportions de protéines et de stéroïdes. Inversement aux glandes

apocrines, les glandes sudoripares eccrines sont réparties sur l'ensemble de la surface corporelle et participent activement à la régulation thermique corporelle. Lorsque la température environnementale dépasse la limite physiologique de 18 à 20°C et que les autres mécanismes de thermorégulation deviennent insuffisants, ces glandes produisent un liquide aqueux contenant des acides aminés, des sels, des produits organiques et certains des toxiques. L'évaporation de l'eau émise à la surface de la peau refroidit le corps. La sécrétion d'eau émulsifie le sébum présent à la surface de la peau en film hydrolipidique, ce qui constitue une des protections maintenant une physiologie normale de la peau (Celleno and Tamburi 2009).

II.2. La peau, une barrière contre l'entrée des xénobiotiques

II.2.1. La barrière cutanée

La peau est une barrière structurée protégeant l'intégrité du corps humains face aux diverses agressions physiques, chimiques ou biologiques imposées par l'environnement. Certains xénobiotiques présents dans l'environnement sont des toxiques de contact dont l'action s'exprime au niveau de la zone de contamination. Toutefois, la peau présente des mécanismes de défenses capables d'endiguer les altérations subites. Par exemple, les substances alcalines dénaturant les structures biologiques sont neutralisées par le film hydrolipidique tamponnant la peau à un pH compris entre 4,5 et 6,5, ainsi que par la couche cornée (Celleno and Tamburi 2009).

De nombreux autres xénobiotiques sont des toxiques dont la toxicité est systémique et se manifeste après pénétration au sein de l'organisme. L'organisation tissulaire de la peau constitue une barrière cutanée entravant ou limitant la pénétration de ces substances. Si la composition et l'organisation du *stratum corneum* est majoritairement responsable de la barrière cutanée (Hwa et al. 2011), l'ensemble des structures épidermiques sont impliquées dans la constitution de la barrière cutanée (Baroni et al. 2012). Des études récentes ont démontré l'implication des jonctions serrées scellant l'espace intercellulaire dans le maintien de la barrière cutanée et la régulation des flux moléculaires au niveau de la peau. La mutation de la claudine et de l'occludine, protéines extracellulaires clefs dans la structure des jonctions serrées, est associée à une augmentation de la perméabilité du tissu cutané (Svoboda et al. 2016). La membrane basale, barrière semi-perméable, pourrait réguler le transfert des xénobiotiques de l'épiderme vers le derme. Le film hydrolipidique participe également à la régulation de la pénétration des xénobiotiques depuis la surface de la peau (Celleno and Tamburi 2009).

L'architecture du *stratum corneum* est classiquement dépeinte comme un « mur de brique » (Hwa et al. 2011). D'épaisseur comprise entre 0,5 et 1 μm , les cornéocytes forment les briques maintenant la structure du *stratum corneum* (Wickett and Visscher 2006).

Représentant le mortier soudant le mur de brique, la phase lipidique occupant l'espace intercornéocytaire compte pour 10% de la masse du *stratum corneum* (Figure 6) (Feingold and Elias 2014). Les lipides extracellulaires du *stratum corneum* sont organisés en bicouches lamellaires empilées entre cornéocytes adjacents. Au sein des feuillettes lipidiques du *stratum corneum*, les lipides intercellulaires peuvent être compactés de manière extrêmement dense, appelé état orthorhombique, selon l'état hexagonal, moins dense, ou être dans un état désorganisé dit état fluide ou liquide (van Smeden et al. 2014). En conditions physiologiques d'hydratation et de température, les lipides intercellulaires sont classiquement arrangés selon l'état orthorhombique (Bouwstra et al. 1992; Sparr and Wennerström 2001), tandis que seule une minorité des lipides sont à l'état fluide (Silva et al. 2007). L'organisation lipidique orthorhombique confère à la peau les propriétés de barrière optimale. Elle est altérée au cours du processus de desquamation et les lipides sont désorganisés au niveau des couches plus superficielles du *stratum corneum* (Berry et al. 2001). Le passage de l'arrangement orthorhombique à l'état fluide, ou désorganisation des lipides intercellulaires, est associé à une défection de la barrière cutanée et à une augmentation du flux d'eau trans-épidermique (Grubauer et al. 1987). Au sein du *stratum corneum*, l'activité enzymatique des lipides synthétases et hydrolases, des kallikréines, des élongases, lipoxygénases et de nombreuses autres enzymes est essentielle à la préservation et à la réparation de la structure de la barrière cutanée, nécessitant la synthèse, le transfert et la sécrétion continue de lipides (Cui et al. 2016).

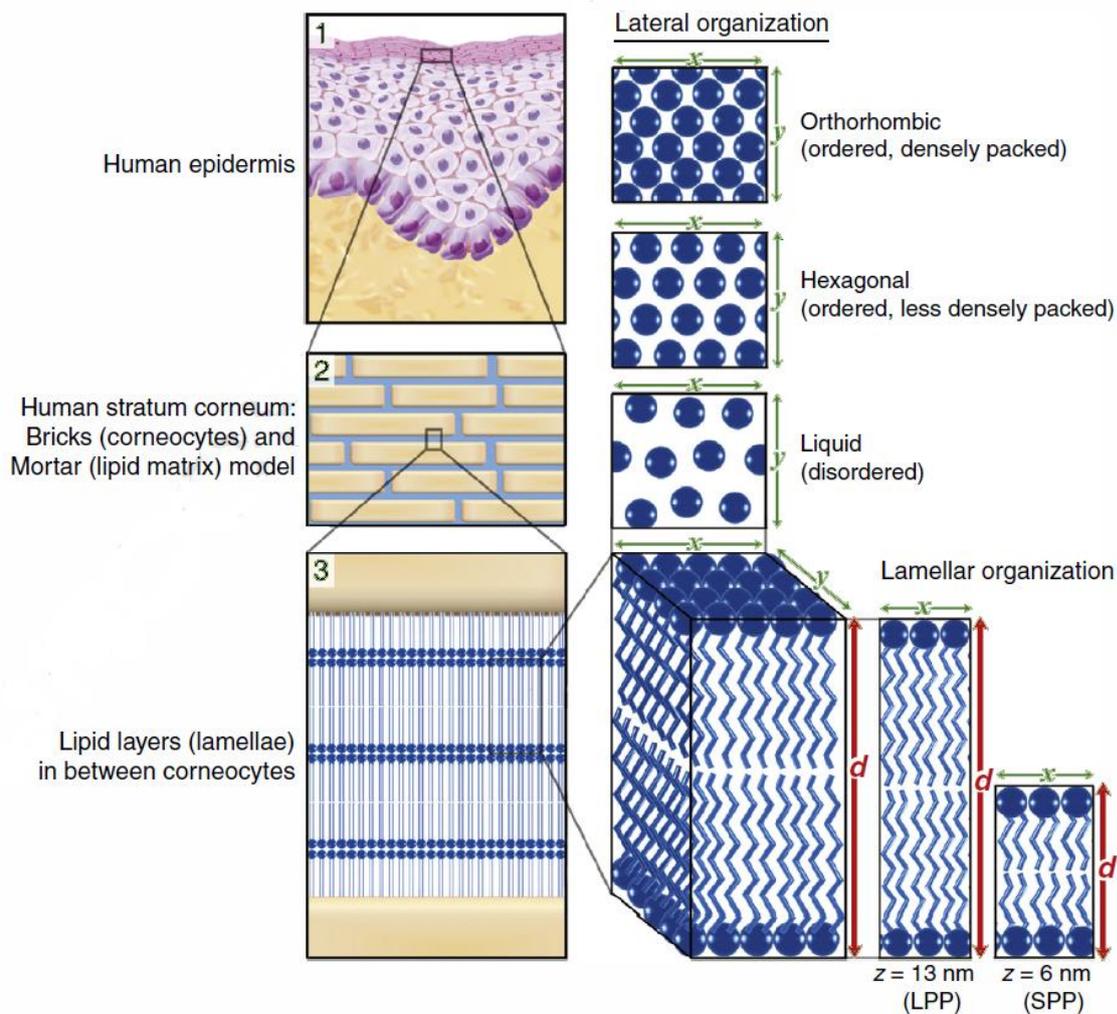


Figure 6. Représentation schématique de l'organisation lipidique d'un *stratum corneum* humain. 1 : Le *stratum corneum*, la couche externe de l'épiderme, est constitué de cornéocytes intégré dans une matrice lipidique riche. 2 : Il est fréquemment représenté en tant qu'un mur de briques (les cornéocytes) entouré de ciment (la matrice lipidique). 3 : La matrice lipidique est arrangée en lamelles pouvant avoir une courte (SPP) ou une grande (LPP) distance de répétition. L'organisation latérale des lipides peut se faire selon trois arrangements possibles : l'état orthorhombique, l'état hexagonal ou l'état liquide. D'après (van Smeden et al. 2014).

Les glandes sébacées sécrètent perpétuellement le sébum qui recouvre la peau sont également impliquées dans le maintien de la barrière cutanée. Parmi les lipides du sébum, le squalène, composé de 6 isoprènes connectés par des liaisons covalentes, possède un fort pouvoir hydratant et antioxydant (Cui et al. 2016).

II.2.2.L'absorption cutanée des xénobiotiques

II.2.2.1. Les différentes voies d'absorption cutanée

Si la peau limite la pénétration d'un grand nombre de substances, la barrière cutanée est imparfaite et constitue une voie d'administration médicamenteuse connue depuis plusieurs millénaires. Des écrits de médecine Babylonien et Egyptien font état de l'utilisation d'onguent, de baume et de pommades. L'emploi de ces remèdes reste néanmoins largement empirique jusqu'aux années 1940-

1980 où les connaissances scientifiques sur l'absorption cutanée se précisent (Hadgraft and Lane 2005).

L'absorption cutanée se définit comme le processus de transfert d'une molécule depuis l'extérieur de l'organisme jusqu'à la circulation sanguine. L'absorption cutanée se découpe en une succession de trois évènements. (1) La pénétration correspond à l'entrée d'une substance dans une couche ou organe particulier. (2) La « permeation » ou infiltration, phase pendant laquelle un xénobiotique traverse une première couche et diffuse dans une seconde couche structurellement et fonctionnellement différente. (3) La résorption au cours de laquelle la substance entre dans la circulation systémique par pénétration dans un vaisseau sanguin ou lymphatique (Schaefer et al. 1982).

Le passage d'un produit chimique à travers le *stratum corneum* est un mécanisme passif, par diffusion successive à travers l'empilement de bicouches lamellaires lipidiques et de cornéocytes. L'absorption cutanée peut se faire par deux voies anatomiques distinctes : la voie transépidermique et la voie transfolliculaire. Lors de la diffusion par voie transépidermique, un xénobiotique peut emprunter le chemin transcellulaire ou paracellulaire (intercellulaire), en fonction de ses caractéristiques physicochimiques (Figure 7). Les composés lipophiles traversent le *stratum corneum* par le chemin intercellulaire en se solubilisant dans les lamelles lipidiques compactés dans les espaces intercornéocytaires. Il est supposé que les molécules à dominante hydrophile pénètrent majoritairement l'organisme par la voie transcellulaire, en franchissant les cornéocytes qui contiennent d'abondantes proportions de protéines polaires (Hwa et al. 2011). Il est cependant admis que la voie intercellulaire est la voie de diffusion majoritaire car l'enveloppe cornifiée et lourdement réticulée entourant les cornéocytes limite l'entrée cellulaire des molécules chimiques. La voie transfolliculaire, ou shunt, exploite les annexes cutanées (follicules pileux ou glandes sudoripares eccrines) s'enfonçant au sein du derme. Ne comptant que pour 0,1% de la surface cutanée humaine, la participation de la voie transfolliculaire à l'absorption cutanée est considérée minoritaire et limitée à la phase initiale de l'absorption cutanée (Bronaugh and Maibach 2005).

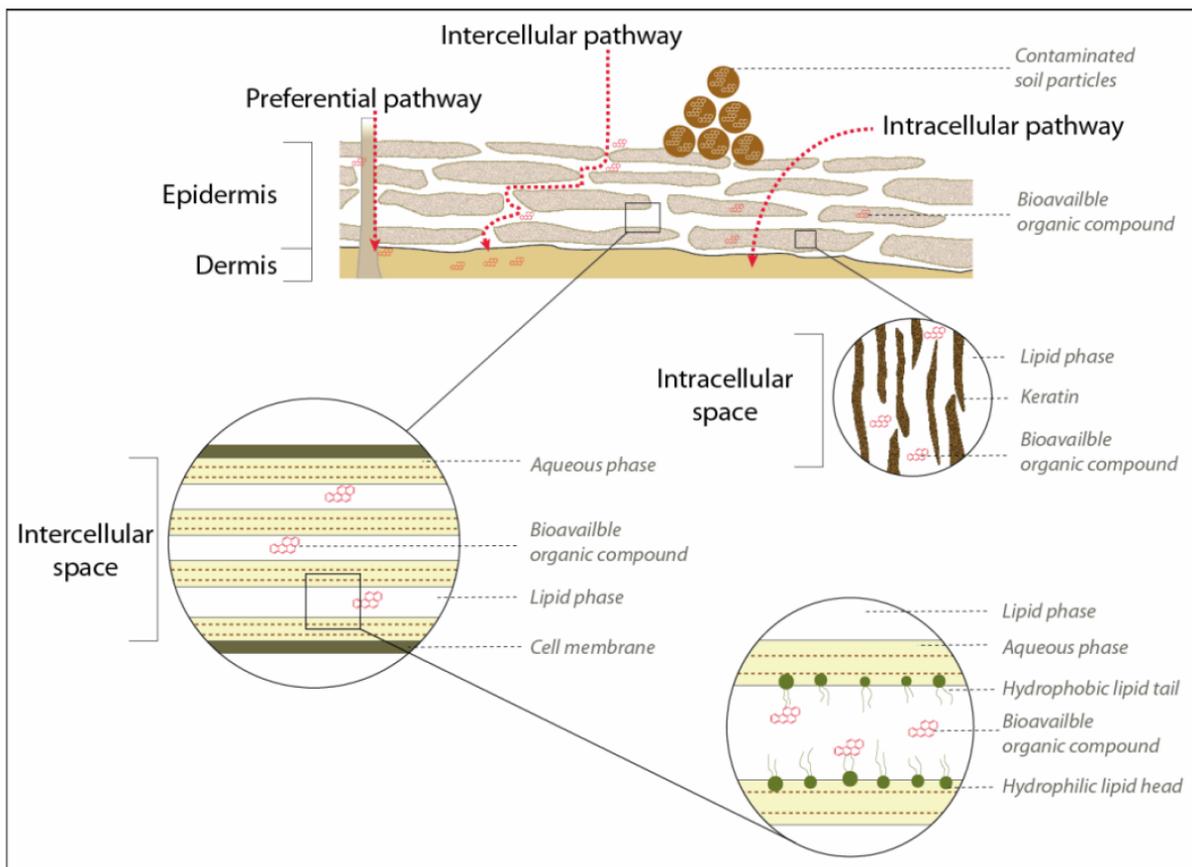


Figure 7. Représentation schématique des trois voies de diffusion à travers le *stratum corneum*. D'après (Beriro et al. 2016).

Après diffusion à travers le *stratum corneum*, les jonctions cellulaires (desmosomes, jonctions serrées) entravent la voie paracellulaire et forcent les xénobiotiques à traverser le reste de l'épiderme en franchissant les membranes cellulaires et cytosols des kératinocytes (Hwa et al. 2011). Au niveau du derme papillaire, réseau dense de protéines hydrophiles, les xénobiotiques s'introduisent dans les capillaires sanguins superficiels localisés à 200 μm de profondeur et rejoignent la circulation systémique (Bronaugh and Maibach 2005; Hwa et al. 2011). L'absorption cutanée des molécules hautement lipophiles ou hydrophiles peut être largement ralentie par une couche cutanée distincte, formant un réservoir résultant d'une accumulation dans le compartiment cutané (Bronaugh and Maibach 2005).

II.2.2.2. Les facteurs de variabilité de l'absorption cutanée

L'étendue de l'absorption d'un xénobiotique par la peau dépend de plusieurs facteurs biologiques responsables d'une variabilité intra et interindividuelle. L'épaisseur du *stratum corneum* et de l'épiderme est différente en fonction de la zone anatomique considérée, ce qui influence considérablement le passage des xénobiotiques à travers la peau. Ainsi, l'absorption de l'hydrocortisone est 42 fois supérieure au niveau du scrotum que de la face ventrale de l'avant-bras et environ 7 fois moindre au niveau de la voûte plantaire (Feldmann and Maibach 1967).

Certains facteurs tels que l'âge (hydratation, teneur en lipides, épaisseur de la peau), l'ethnie, le genre et l'état de santé conditionnent la structure de la peau et sont donc une source de variabilité interindividuelle dans l'absorption cutanée de xénobiotiques (Berardesca and Maibach 2003; Farage et al. 2007; Farahmand and Maibach 2009). L'état hydrique du tissu cutané joue un rôle important car une forte hydratation du *stratum corneum* facilite la diffusion des composés à travers la peau (Hadgraft and Lane 2005). La présence d'atteintes (mécaniques ou chimiques) à la surface de la peau et/ou de désorganisation des lipides du *stratum corneum* augmente l'absorption cutanée (Gattu and Maibach 2010). De plus, certaines pathologies telles que l'eczéma ou le psoriasis affecte l'organisation tissulaire cutanée et diminue l'efficacité de la barrière cutanée (Motta et al. 1994; van Smeden and Bouwstra 2016). La perméabilité cutanée varie considérablement entre espèces animales : la peau de souris est 1,5 fois plus perméable à la testostérone que la peau humaine (Kao et al. 1985). Cette variabilité inter-espèce s'explique par des différences structurelles telle que la densité des follicules pileux mais aussi le nombre de couches cellulaires composant l'épiderme (Kao et al. 1988; Montagna and Parakkal 1974). Bien que la voie transfolliculaire soit limitée chez l'homme, la disparité de la distribution des annexes cutanées pourrait impacter l'absorption cutanée entre zones anatomiques distinctes, à l'instar du rat (Kao et al. 1988).

L'absorption cutanée dépend également des caractéristiques physico-chimiques du xénobiotique étudié. Alors que les molécules volatiles diffusent facilement à travers la peau, l'absorption cutanée des composés de haut poids moléculaire est plus restreinte (Marzulli et al. 1965; O. Potts and Guy 1992). Le poids moléculaire maximal d'un xénobiotique pour diffuser à travers la peau est estimé à 500 Dalton (Bos and Meinardi 2000). La capacité d'un xénobiotique à diffuser dépend également de sa lipophilie (optimale lorsque $1 \leq \text{Log } K_{ow} \leq 3$), de sa température de fusion et de sa solubilité à la fois dans l'huile et dans l'eau, liée aux fonctions chimiques de la molécule (-OH, -COOH...) (Korting and Schäfer-Korting 2010; Magnusson et al. 2004).

Les xénobiotiques entrant en contact avec la surface cutanée sont généralement incorporés dans un véhicule dont l'impact sur la pénétration cutanée peut s'avérer considérable (Bronaugh and Maibach 2005). Le design du véhicule d'administration est d'ailleurs un enjeu en dermatologie. Les solvants sont des exhausteurs couramment utilisés pour augmenter l'absorption cutanée des molécules pharmaceutiques (Ibrahim and Li 2009). Des études récentes ont montré la corrélation entre la vitesse d'évaporation du solvant et l'absorption du soluté (Intarakumhaeng and Li 2014). Cependant, certains solvants perturbent l'intégrité physique de la barrière cutanée. L'éthanol, l'acétone, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le toluène et le cyclohexane affectent la viabilité de la peau. Le DMSO déclenche également des changements morphologiques du tissu cutané en provoquant des modifications biochimiques dont un œdème intracellulaire et un gonflement de

l'enveloppe nucléaire (Randall King and Monteiro-Riviere 1991). D'autres solvants interagissent de différentes manières avec les lipides intercellulaires du *stratum corneum* et perturbent la barrière cutanée. Le mélange éthanol/chloroforme extrait les lipides intercellulaires (céramides, acides gras libres, mais surtout le cholestérol et les lipides polaires). En revanche, l'acétone ne possède qu'un faible pouvoir d'extraction et semble plutôt perturber l'arrangement des lipides du *stratum corneum* (Barba et al. 2016). Par ailleurs, la viscosité du véhicule est inversement corrélée à la pénétration des solutés (Ingram et al. 1995). La solubilité et la stabilité d'un xénobiotique dans le véhicule influencent fortement l'absorption cutanée (Korting and Schäfer-Korting 2010).

Bien qu'encore peu caractérisée, la contamination de la peau par des mélanges complexes plutôt que par un xénobiotique seul pourrait influencer de manière conséquente la vitesse d'absorption et la quantité absorbée, par interaction moléculaire à la surface ou au sein de la peau (Bronaugh and Maibach 2005).

II.2.3. Le métabolisme cutané des xénobiotiques

II.2.3.1. Généralités

Le corps humain possède de nombreuses protections développées et structurées pour prévenir l'entrée de xénobiotiques au sein de l'organisme. Cependant, ces barrières sont imparfaites et ne préviennent pas la pénétration de l'ensemble des molécules (variant en poids moléculaire, volatilité, lipophilie, structure, ionisation...) présentes dans l'environnement. Après pénétration (cutanée, respiratoire ou intestinale), le comportement d'une molécule exogène va dépendre de ses caractéristiques physicochimiques. Elle peut être excrétée de l'organisme de manière inchangée, s'accumuler dans un tissu ou un organe, ou encore être modifiée pour faciliter son élimination.

Afin de prévenir la toxicité ou la cytotoxicité d'un xénobiotique médiés par une accumulation cytoplasmique, les cellules eucaryotes sont dotées d'un bagage enzymatique riche appelé système de détoxification. Les diverses enzymes catalytiques composant ce système sont cytosoliques, mitochondriales, microsomaux (localisées sur le réticulum endoplasmique) ou intégrées à l'enveloppe nucléaire. Elles catalysent la biotransformation des xénobiotiques en les rendant plus hydrophiles, dans le but de favoriser l'élimination des composés réactifs de la cellule. Le métabolisme des xénobiotiques se découpe en 3 phases successives. Premièrement, la phase de fonctionnalisation mène à la formation de composés électrophiles intermédiaires (métabolites primaires) par oxydo-réduction et/ou hydrolyse aboutissant à l'implémentation de fonctions chimiques (-OH, -NH₂, -COOH, -SH) sur la molécule mère. Puis, ces composés électrophiles réactifs sont désactivés grâce à la greffe de groupements lourds et polaires (métabolites secondaires)

lors de la phase de conjugaison. Enfin, les métabolites sont expulsés depuis la cellule vers l'environnement extracellulaire par transport actif au cours de la phase d'élimination (Boström et al. 2002).

II.2.3.2. Importance du métabolisme cutané

Bien que le foie soit le organe principal du métabolisme, la peau est l'organe le plus large du corps humain et constitue une porte d'entrée pour de nombreux xénobiotiques (Bronaugh and Maibach 2005). Il s'agit d'un organe endocrine indépendant produisant de nombreuses hormones (stéroïdes, catécholamines, prolactine...), dont la synthèse implique une grande variété d'enzymes du métabolisme (Guéguen et al. 2006; Zouboulis 2000). Si la peau a longtemps été considérée comme une simple enveloppe, les recherches révèlent aujourd'hui l'importance de l'effet de premier passage lors de l'absorption des xénobiotiques par voie cutanée. L'activité enzymatique mesurée dans la peau est inférieure à celle observée dans le foie, mais elle suffit à activer un cancérigène ou un composé toxique (Bronaugh et al. 1989). La formation d'intermédiaires métaboliques toxiques a ainsi été démontrée il y a plus de 20 ans (Ademola et al. 1993a; Ademola et al. 1993b). Plus récemment, des métabolites génotoxiques ou impliqués dans la formation d'espèce réactives à l'oxygène (ERO) ont été identifiés après exposition de peau humaine *ex vivo* (Brinkmann et al. 2013). Ceci souligne l'importance des recherches sur le métabolisme cutané afin d'évaluer le risque de toxicité locale.

En outre, le métabolisme peut influencer la diffusion d'une substance à travers la peau. L'importance du métabolisme cutané des xénobiotiques dépend des caractéristiques physico-chimiques du xénobiotique et notamment de sa lipophilie ($\text{Log } K_{ow}$) (Bronaugh et al. 1989). A titre d'exemple, 70 à 95% de la testostérone ($\text{Log } K_{ow} = 3,3$) appliquée sur des explants de peau de porc est métabolisée, tandis que seulement 16% de la 7-éthoxycoumarine ($\text{Log } K_{ow} = 2,3$) est biotransformée (Jacques et al. 2010a; Jacques et al. 2014). La limitation des molécules lipophiles est due au *stratum corneum* qui constitue alors un réservoir au sein de la peau. La conversion métabolique de ces xénobiotiques par les kératinocytes en composés plus hydrophiles est progressive facilitant ainsi leur passage à travers la peau (Bronaugh and Maibach 2005).

Le métabolisme cutané dépend également de la quantité de xénobiotique entrant en contact avec la peau. Alors que 16% de 7-éthoxycoumarine est métabolisé après application de 10 nmol sur des explants de peau de porc *ex vivo*, cette proportion diminue à 4% après application respective de 400 nmol (Jacques et al. 2010a), possiblement du fait d'une saturation enzymatique (Jacques et al. 2010b).

II.2.3.3. Les enzymes du métabolisme

La peau est catalyse une grande diversité de réactions de fonctionnalisation (hydroxylation, méthylation...) et l'ensemble des réactions de conjugaison connues à ce jour (Manevski et al. 2015; Pannatier et al. 1978). Globalement, la peau exprime l'ensemble des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. L'expression constitutive est toutefois moins forte que dans le tissu hépatique et dépend fréquemment d'une induction par les xénobiotiques (Oesch et al. 2014; Oesch et al. 2018; Oesch et al. 2007).

Catalysant de nombreuses réactions biochimiques, les cytochromes P450 (CYP450) sont des enzymes centrales dans le métabolisme des xénobiotiques et des molécules endogènes (Zanger and Schwab 2013). Chez l'homme, la mesure des transcrits ou acides ribonucléiques messagers (ARNm), le dosage protéique et l'activité enzymatique sur des biopsies de peau humaine montrent l'expression constitutive des CYP1A1, CYP1A2, 1B1 mais aussi des familles CYP2 et CYP3. L'expression basale des CYP450, limitée dans la peau, augmente de manière considérable après induction par divers xénobiotiques (HAP, dioxines...). La répartition des CYP450 est amplement supérieure au sein de l'épiderme et des glandes sébacées que du derme. L'expression des CYP450 n'est pas homogène selon les couches épidermiques. Ainsi, le CYP1A1 est majoritairement exprimé dans les kératinocytes de la couche basale, tandis que le CYP1B1 est mesuré dans les autres strates épidermiques.

L'expression (ARNm) de l'époxyde hydrolase (EH) cytoplasmique (EH1 et EHPX1) et microsomale (EH2 et EHPX2) est démontrée dans la peau humaine. De plus, des marquages immunochimiques révèlent la présence de la protéine EH au sein de l'épiderme. L'EH catalyse l'ouverture des groupements époxydes par addition de H₂O et détoxifie de nombreux xénobiotiques rendus nucléophiles après biotransformation.

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH):quinone oxydoréductase (NQO) détoxifie les quinones en radicaux semiquinones par réduction directe de deux électrons des quinones. L'identification des transcrits des isoformes NQO1 et NQO2 dans la peau humaine et les mesures d'activité enzymatique indiquent la présence de la NQO dans la peau humaine. De plus, l'activité cutanée de la NQO, similaire à l'activité hépatique, est fortement induite par le coal tar et d'autres xénobiotiques.

La peau humaine exprime également les enzymes de conjugaison telles que la glutathion S-transférase (GST) dont l'ARNm de 9 isoformes est identifié sur peau entière et la protéine est identifié dans l'épiderme et les glandes sébacées. De manière similaire, la présence des UDP

glucuronidetransférase (UGT) et sulfotransférase (SULT) dans la peau humaine a été rapporté par mesurage des activités enzymatiques et des ARNm (Oesch et al. 2014; Oesch et al. 2018; Oesch et al. 2007).

Les connaissances scientifiques sur les capacités métaboliques de la peau humaine sont en constante évolution et les recherches indiquent la présence de nombreuses autres enzymes du métabolisme telles que les flavines monooxygénases, les aldéhydes oxydases ou encore les N-acétyltransférases (Oesch et al. 2014; Oesch et al. 2018; Oesch et al. 2007).

II.3. Les modèles *in vitro* d'étude de l'absorption cutanée

En 1959, William Russell et Rex Burch publient « The Principles of Humane Experimental Technique ». A travers le principe des 3R, « Reduce, Refine, Replace », les deux auteurs proposent la réduction de l'utilisation systématique d'animaux de laboratoire et le raffinement des protocoles expérimentaux afin d'améliorer non-seulement la qualité scientifique des projets de recherche, mais aussi de limiter le nombre d'animaux par expérience ainsi que la douleur ou la détresse animale causée au cours du protocole expérimental. L'objectif est à terme de remplacer l'utilisation d'animaux de laboratoire par des techniques, des méthodes et des modèles alternatifs (Flecknell 2002).

N'ayant récolté qu'une attention limitée à ses débuts, ce dogme reçut au fur et à mesure un intérêt grandissant de la part de l'opinion publique et de la communauté scientifique si bien qu'il influença la réglementation. Un exemple concret de cette avancée est la directive européenne 2010/63/UE visant l'amélioration de la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et de l'attention portée par un éditeur scientifique au respect des réglementations en vigueur lors de la soumission d'une communication écrite.

Dans le domaine de l'absorption cutanée, Robert L. Bronaugh initia le développement de modèles d'études alternatifs *in vitro* dès les années 1980 (Bronaugh and Stewart 1985a). Au-delà de la réduction des coups expérimentaux, ces nouveaux modèles sont simples à mettre en œuvre et complètent les informations obtenues *in vivo*. Il devient alors aisé de calculer des constantes de perméabilité, d'apprécier un profil de diffusion ainsi qu'un profil métabolique, d'identifier des enzymes fonctionnelles dans le tissu cutané ou encore de décomposer les mécanismes d'absorption d'un xénobiotique en l'extrayant des différentes strates de la peau.

II.3.1. Les membranes artificielles

Une des principales difficultés liées à l'utilisation de *stratum corneum* ou d'épiderme isolé d'explants de peau humaine ou animale est la variabilité intra- ou interindividuelle. L'objectif du développement des membranes artificielles est d'offrir une alternative simple et reproductible pour étudier les mécanismes physicochimiques de l'absorption cutanée en imitant les propriétés d'une peau saine. Deux classes de membranes se distinguent : les membranes non-lipidiques et les membranes lipidiques.

La première classe de membrane artificielle comprend les membranes en silicone ou membranes poly(diméthylsiloxane) dont l'utilisation remonte aux années 1970. Ces modèles ont été utilisés avec succès dans la sélection de véhicules pertinents pour optimiser la perméabilité cutanée de la caféine et de diverses molécules à visée thérapeutique. Leur justesse pour les molécules hydrophiles est cependant remise en question et leur potentiel pour le développement de formulations doit encore être élucidé. D'autres membranes artificielles, tels que les modèles micellaires, sont composés de 70% d'huile de silicone et de 30% d'isopropyl myristate coâté sur un filtre hydrophobe de polyvinylidène fluoride. Ces membranes sont capables de discriminer les molécules piégées par la barrière cutanée des substances franchissant par la peau. Le modèle commercial Strat-M™, composé de plusieurs couches de polyéther sulfone recouvertes d'une fine strate de surface, reproduit la morphologie de la peau.

Les modèles lipidiques regroupent les membranes « parallel artificial membrane permeability assay » (PAMPA) et « phospholipid vesicle-based permeation assay » (PVPA). Le système PAMPA, originellement créé pour évaluer la perméabilité intestinale, fut ensuite adapté à la peau. Il est composé de ceramides (céramides artificiels de masse moléculaire et de capacités accepteur/donneur d'atomes d'hydrogène similaires) utilisés en combinaison avec le cholestérol, l'acide stéarique et l'huile de silicone pour constituer les lipides de la membrane PAMPA. Le modèle PVPA, plus récent, imite la capacité de barrière du *stratum corneum*. Il consiste au dépôt de liposomes sur un filtre reproduisant les cellules des barrières biologiques.

Toutefois, bien que présentant des avantages certains (durée de conservation, coûts, facilité d'utilisation), les membranes artificielles présentent encore des incohérences dans la prédiction de la perméabilité cutanée et nécessitent à ce jour des améliorations (Flaten et al. 2015).

II.3.2. Les modèles de peau reconstruite

Au cours des 10 dernières années, les modèles d'épiderme reconstruit humain (Episkin[®], SkinEthic[®], Epiderm[®]) et des équivalents de peau humaine (GraftSkin[®], EpidermFT[®], Pheninon[®]) (Figure 8) sont apparus sur le marché. Ils sont assemblés à partir de cultures de cellules humaines (cultures primaires ou lignées cellulaires) et d'équivalent de matrices présentes dans la peau. Ces outils sont largement utilisés lors des tests de phototoxicité, d'irritation, de corrosion et de perméabilité cutanée. Les différents modèles de peau présentent des disparités morphologiques, de composition et biochimiques. Par exemple, le modèle Episkin[®] exprime la lorïcricine tandis que les modèles SkinEthic[®] et Epiderm[®] ne l'expriment pas. Ces modèles présentent une variabilité moindre que les explants, mais sont néanmoins plus perméables que la peau. La perméabilité aux substances lipophiles est 800 fois supérieure à celle de la peau humaine, cependant le flux transdermique d'acide salicylique est identique.

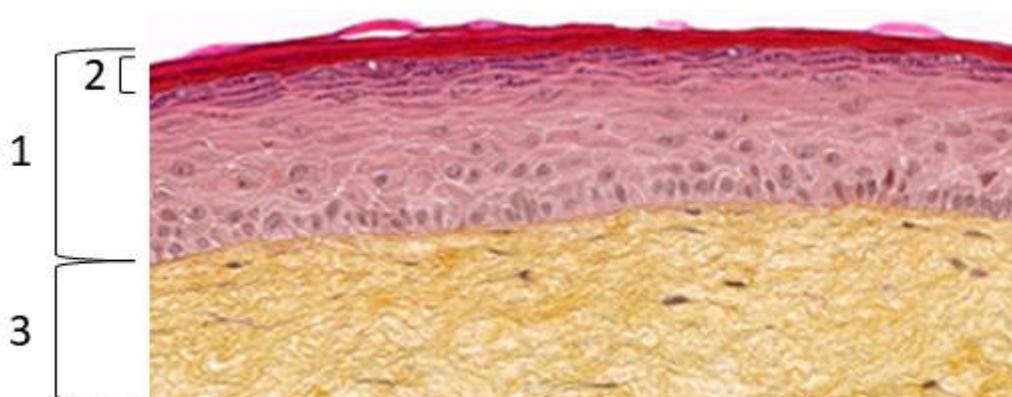


Figure 8. Coupe histologique d'un modèle de peau reconstruite (Episkin modèle T-skinTM). Il intègre l'ensemble des structures macroscopiques de la peau : l'épiderme (1) dont le stratum corneum (2), et le derme (3). D'après <http://www.episkin.com/T-Skin>.

Si la perméabilité absolue des modèles de peau reconstruite diffère donc de celle des explants de peau, leurs perméabilités respectives mesurées lors de l'évaluation de l'absorption de xénobiotiques avec différentes formulations de véhicules sont corrélées. Ainsi, avec une méthodologie standardisée, ces différents modèles pourraient être utilisés pour le criblage du comportement dans la peau de diverses substances chimiques et leur extrapolation à la peau humaine (Flaten et al. 2015).

II.3.3. Les explants de peau

Les explants de peau utilisés *ex vivo* constituent le modèle d'étude de choix puisqu'ils contiennent l'ensemble des structures cutanées depuis l'hypoderme jusqu'au *stratum corneum*, ainsi que les

annexes cutanées. L'utilisation de ces explants peut néanmoins s'avérer délicate et requiert une attention particulière quant à la conservation des échantillons et la préparation des membranes.

Plusieurs études sur peau de rongeur et de porc montrent une augmentation de la perméabilité après stockage des échantillons de peau à -20°C et décongélation préalable aux expérimentations. Plusieurs méthodes de préparation des explants de peau sont décrites dans la littérature : la peau de rongeur, plus perméable, est fréquemment employée entière ; la peau humaine et la peau de porc sont respectivement découpées à des épaisseurs de 200 à 400 µm ou 400 à 700 µm à l'aide d'un dermatome ; enfin, le *stratum corneum* peut être isolé par traitement enzymatique à la trypsine et l'épiderme entier peut être décollé du derme après un traitement thermique à 60°C. Cependant, ces deux derniers modèles ne permettent pas l'étude du métabolisme cutané.

L'obtention de peau humaine, considérée comme le « golden standard », n'est pas toujours possible et requiert parfois des autorisations éthiques. Des explants de peau de différents animaux sont par conséquent régulièrement utilisés dans les études d'absorption cutanée. Structuellement, histologiquement et physiologiquement similaire à la peau humaine, la peau de porc, dont les oreilles sont collectées dans les abattoirs, présente certains avantages tels que le maintien structurel après ablation ou après conservation à -20°C, tandis que la peau humaine se rétracte lors du prélèvement. Les études comparatives montrent une bonne corrélation de la pénétration cutanée des xénobiotiques entre les tissus de porc et les tissus humains. Les rongeurs, de petite taille, représentent un faible coût, une facilité d'utilisation en laboratoire et les nombreuses espèces existantes permettent un large panel d'étude. Cependant, de même que les primates, leur emploi est soumis à de nombreuses restrictions éthiques. De plus, de multiples études montrent que leur tégument est plus perméable que la peau humaine et donc inadéquate pour l'extrapolation à l'homme. La mue de serpent est obsolète pour l'étude de certains composés de par l'absence de follicule pileux. En revanche, la peau de pis bovin est considérée comme la plus adaptée après les explants de peau humains. Elle génère en outre moins de variabilité que la peau humaine lors de l'application de xénobiotiques tels que la caféine, la testostérone, l'acide benzoïque et l'acide flufénamique (Flaten et al. 2015).

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques ont successivement été identifiées dans la peau des différentes espèces (homme, rat, souris, porc) (Oesch et al. 2014; Oesch et al. 2018; Oesch et al. 2007), cependant les profils métaboliques produits par des explants de peau d'espèces différentes peuvent différer. Par exemple, la peau de porc, fréquemment décrite comme histologiquement similaire à celle de l'homme (Jacobi et al. 2007), génère essentiellement 30 nmol de bisphénol A glucuronidé après application de 50 nmol de bisphénol A pendant 72h, tandis que la peau humaine

forme respectivement 3,5 nmol de bisphénol A glucuronidé et 3,0 nmol de bisphénol A sulfaté (Zalko et al. 2011).

La littérature établit distinctement que la peau humaine représente le matériel le plus pertinent pour l'évaluation de la pénétration cutanée de substances contenues dans diverses formulations. Néanmoins, les données montrent également la forte variabilité existante entre individus, de même qu'entre explants de peau prélevés sur le même donneur mais de zones anatomiques distinctes. L'emploi de la peau humaine et l'interprétation des données peuvent ainsi s'avérer délicats (Flaten et al. 2015).

II.4. Les systèmes d'étude *in vitro* de l'absorption cutanée

II.4.1. La cellule de Franz (statique)

Une membrane (explant de peau viable, membrane artificielle, modèle de peau reconstruite ou encore peau cadavérique) est placée dans une chambre de diffusion (verre ou Teflon[®]) (Figure 9). Cette membrane sépare un compartiment donneur, contenant la substance à tester, du compartiment récepteur rempli de liquide « récepteur » (de capacité comprise entre 3,8 et 5,4 mL). La fonction du liquide récepteur est d'hydrater la membrane ainsi que d'apporter les nutriments nécessaires au maintien de son intégrité physiologique. Lors de l'utilisation d'explants de peau, la face dermique est en contact direct avec le liquide récepteur thermostaté pour maintenir la peau à température physiologique. L'herméticité des compartiments donneur et récepteur est maintenue grâce à un joint délimitant la surface exposée (généralement 0,64 cm²) et à des clamps fixant les compartiments l'un à l'autre. Au fond du compartiment donneur, le barreau d'agitation homogénéise constamment le liquide récepteur. Le port de prélèvement situé sur le compartiment récepteur permet l'aliquotage régulier du liquide receveur (Schaefer et al. 1982).

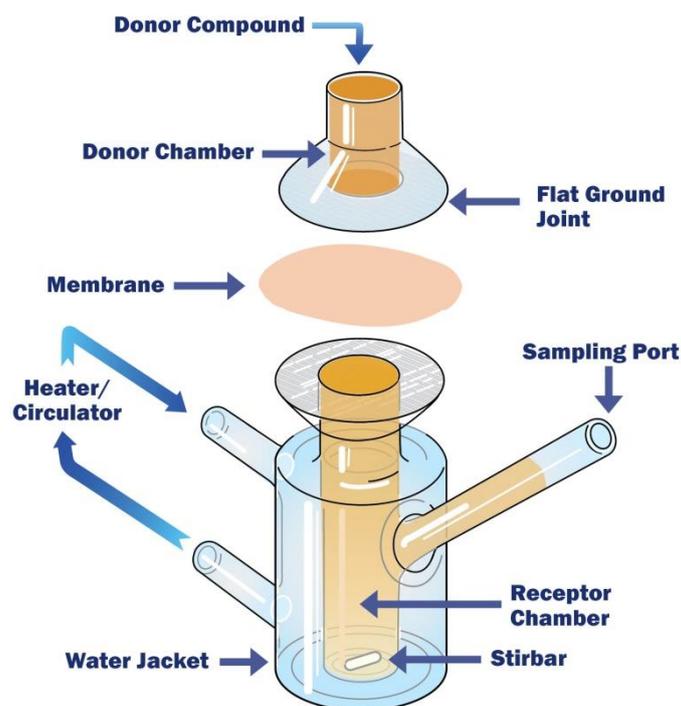


Figure 9. Schéma d'une cellule de diffusion de Franz.

Le design du liquide récepteur est crucial pour l'étude d'absorption cutanée. Il doit être adapté aux caractéristiques physicochimiques de la substance à étudier afin d'éviter toute rétention dans la peau et de solubiliser le composé d'intérêt (OECD 2004). Du sérum de veau fœtal (Kao et al. 1985), de la sérum albumine bovine (SAB) (Jacques et al. 2010b), ou des surfactants non-ioniques (volpo-20) (Yang et al. 1986) sont généralement utilisés pour faciliter la partition des molécules lipophiles dans le liquide récepteur, car elles tendent à s'accumuler dans la membrane. Certaines études décrivent cependant une altération de la viabilité des explants de peau lors de l'utilisation des surfactant non-ioniques (Bronaugh et al. 1989). Lors des études de métabolisme, un milieu de culture est fréquemment employé afin d'apporter les nutriments nécessaires au fonctionnement cellulaire et maintenir la viabilité du tissu (Jacques et al. 2010b; Payan et al. 2009).

Lors de l'étude d'une molécule volatile, il arrive que le compartiment donneur soit scellé (condition occlusives) afin d'éviter l'évaporation du composé. Le contenu en eau du *stratum corneum* situé entre les lamelles lipidiques peut augmenter de 5-15% jusqu'à 50% entraînant une augmentation de 37% de la surface cutanée, un gonflement du *stratum corneum* et un épaissement de la peau. Il en résulte une diminution de la barrière cutanée favorisant ainsi la diffusion des composés (Schaefer et al. 1982).

II.4.2. La cellule de diffusion dynamique

L'objectif de la cellule de diffusion dynamique est de se rapprocher des conditions d'absorption cutanée *in vivo*. Le liquide récepteur du compartiment récepteur d'une cellule dynamique, d'une capacité de 0,5 mL, est constamment renouvelé afin de limiter le gradient de concentration lié à l'apparition de la substance dans le compartiment récepteur et aliquote par un collecteur de fraction (Figure 10). De manière générale, le débit doit être réglé de manière à être de 5 à 10 fois supérieur à celui du volume du compartiment récepteur afin d'obtenir un renouvellement correct (*i.e.* au moins 2,5 mL/h pour un volume de 0,5 mL) (Schaefer et al. 1982).

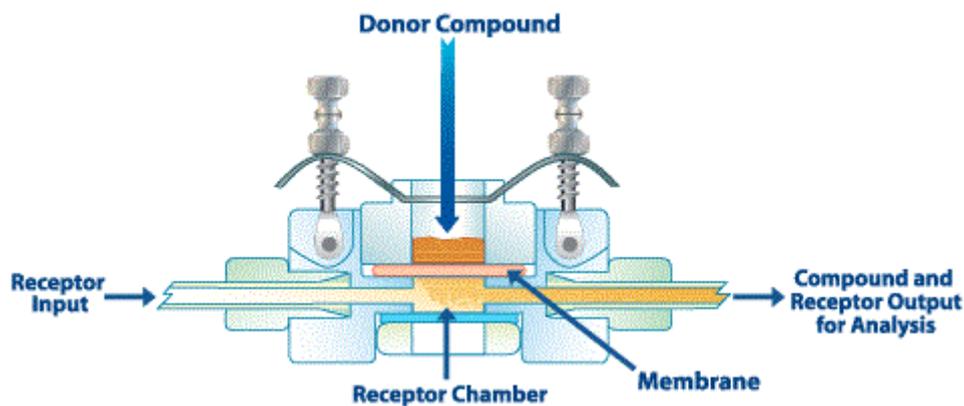


Figure 10. Schéma d'une cellule de diffusion dynamique.

II.4.3. Système d'insert/puits

Plus récemment, Jacques *et al.* ont développé une nouvelle cellule de diffusion correspondant à une miniaturisation des cellules statique de Franz (Figure 11) (Jacques et al. 2010b). Le compartiment récepteur est constitué de plaques de culture cellulaire de 6 puits au diamètre de 35 mm recevant 1,5 mL de milieu de survie. Les explants de peau sont déposés sur la membrane de l'insert (compartiment donneur) en contact avec l'air. Ce système permet de placer l'explant à l'interface air-liquide, le derme est ainsi en contact avec le milieu dont les nutriments remontent par capillarité à travers la membrane de l'insert.

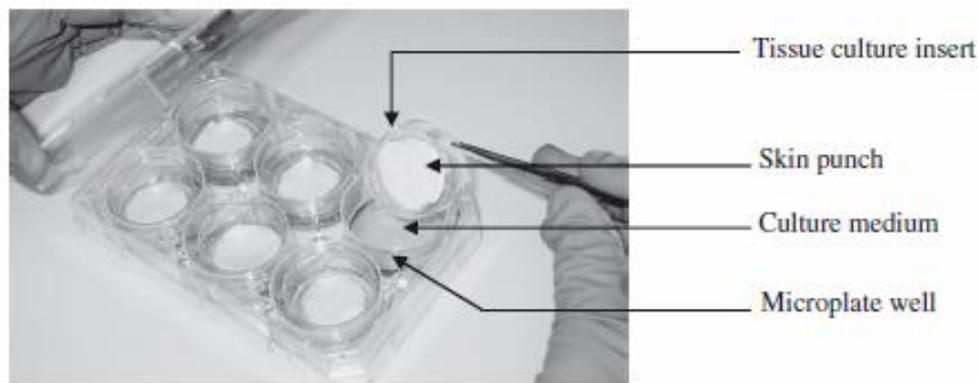


Figure 11. Photographie du système d'inserts et de puits. D'après (Jacques et al. 2010a).

II.4.4. Pertinence des systèmes de diffusion

D'après plusieurs études comparatives, les résultats obtenus avec les cellules de diffusion *in vitro* sont bien corrélés à ceux des études *in vivo* lorsque les protocoles sont appropriés (Bronaugh et al. 1982; Lehman et al. 2011). De plus, les cellules statiques et les cellules dynamiques donnent des résultats similaires (Bronaugh and Stewart 1985a; van de Sandt et al. 2004).

L'approche d'insert/puits développé par Jacques *et al.* présente plusieurs avantages. Peu onéreux, il permet de mener de nombreuses expériences en parallèle et de concentrer les dérivés métaboliques produits par la peau dans un volume de liquide récepteur limité. Enfin, une perspective est l'automatisation des procédures de prélèvement et de dosage en plaque 96 puits afin de travailler à haut débit (Beriro et al. 2016).

III. Les rayonnements ultraviolets solaires

III.1. Généralités

Le spectre solaire se décompose globalement en trois régions électromagnétiques distinctes : les UV (200-400 nm), la lumière visible (400-780 nm) et les infrarouges (780-1000 nm). Collectivement, ils composent le rayonnement optique dont les UV constituent environ 5% de la lumière solaire terrestre. Le spectre UV solaire est sous-divisé en 3 régions dont les limites précises sont controversées et diffèrent selon les domaines d'études scientifiques (Figure 12). En photobiologie environnementale et en dermatologie, les 3 régions sont délimitées de la manière suivante : UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) et UVC (200-290 nm) (Diffey 2002).

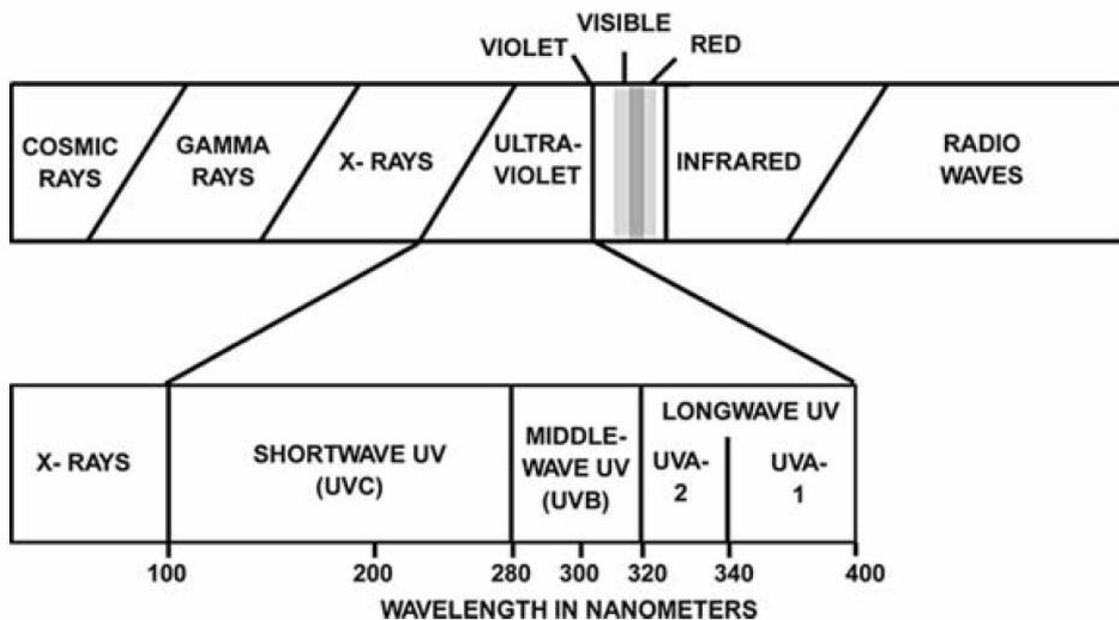


Figure 12. Représentation de la place des UV dans le spectre électromagnétique global. D'après (Morison 2005).

Lors de la traversée de l'atmosphère terrestre, le rayonnement optique émis par le soleil subit de lourdes modifications : uniquement deux tiers du rayonnement initial atteignent la surface terrestre. Les rayonnements solaires sont absorbés et dispersés par l'oxygène et le nitrogène de l'air (dispersion de Rayleigh) donnant au ciel sa couleur bleutée. Si la réflexion de la lumière sur certaines surfaces pourrait grandement participer à la dispersion des UV, l'ozone stratosphérique intercepte la plupart des UV extraterrestres et élimine la majorité des UVB ainsi que la totalité des UVC. Par conséquent, 95% des rayons UV frappant la surface terrestre correspondent à des UVA, tandis que les UVB comptent pour environ 5% du total des rayonnements UV (290-400 nm). Toutefois, les UVB, plus énergétiques, sont considérés responsables des effets biologiques des UV. La classification des UV solaires en tant qu'agents cancérogènes pour l'homme par le CIRC en

1992 est confirmée lors d'une réévaluation en 2012 (IARC 1992; IARC 2012). L'exposition aux rayonnements solaires provoque notamment des mélanomes malins, des carcinomes cutanés des cellules basales et squameuses, mais aussi des cancers de la lèvre et des mélanomes oculaires (IARC 2012).

Les UVA et les UVB ne pénètrent que peu profondément dans l'organisme humain (Natarajan et al. 2014). De longueur d'onde courte, les UVB, très énergétiques, sont principalement arrêtés par l'épiderme, tandis que 50% des UVA, moins énergétiques, atteignent le derme (Svoboda et al. 2016). Bien qu'ils n'interagissent que superficiellement avec le corps humain, les UV déclenchent de nombreuses réponses biologiques, des réactions toxiques et peuvent induire un vieillissement précoce de la peau en cas d'exposition régulière. Certaines de ces réponses biologiques sont bénignes et disparaissent à court terme : épaissement cutané, pigmentations immédiates ou adaptatives. D'autres réactions sont toxiques et portent atteinte aux macrostructures cellulaires essentielles telles que l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les UVB, directement absorbés par l'ADN, induisent des modifications directes des bases nucléiques dont la dimérisation de deux bases pyrimidiques adjacentes, ensuite mutés en dimères de thymines lors des processus de réplication de l'ADN. A l'inverse, les UVA et la lumière visible ne sont pas absorbés par l'ADN mais peuvent activer des chromophores endogènes ou exogènes par photosensibilisation et générer des ERO (AFSSE et al. 2005; Natarajan et al. 2014). Après activation par les UV, ces photosensibilisants endogènes forment de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) par transfert direct d'énergie à une molécule d'oxygène moléculaire, ou des anions superoxydes (O_2^-) par transfert d'électron pouvant aboutir à la formation d'eau oxygénée H_2O_2 . Les UV peuvent également induire la formation de NO^\cdot et d'autres espèces réactives nitrogénées par décomposition de nitrate endogène. Ces différentes espèces chimiques, très réactives, provoquent une peroxydation protéique et lipidique ainsi que des dommages oxydatifs à l'ADN (Natarajan et al. 2014).

III.2. L'exposition aux UV

III.2.1. Définitions

La quantité de rayonnement UV peut être exprimée selon plusieurs terminologies. Ainsi, le flux énergétique ou flux de rayonnement correspond au faisceau lumineux traversant un espace. En photobiologie, le terme irradiance ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) définit la quantité de rayonnement atteignant un sujet. L'exposition énergétique ou dose d'exposition en photobiologie, analogue au flux d'énergie en radiobiologie, est obtenue par l'intégrale temps de l'irradiance ($\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ ou $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$).

Déterminer la dose provoquant un érythème cutané est une des difficultés en photodermatologie. La dose érythémateuse minimale (DEM) était anciennement couramment utilisée dans la littérature scientifique. Elle se définissait telle que la dose minimale nécessaire à l'apparition d'un érythème. La DEM est cependant propre à chaque individu et ne permet pas la caractérisation d'une exposition. La dose érythémateuse standard (DES) correspond à une dose d'exposition cutanée effective de 100 J.m^{-2} . Il est considéré qu'une journée d'été en Europe par temps clair est équivalent à 30-40 DES et que 4 DES provoquent un érythème cutané modéré sur une peau non-acclimatée (Diffey 2002).

III.2.2. Généralités sur l'exposition aux UV

La mesure de l'exposition aux UV naturels est une science complexe car elle dépend de nombreux facteurs. Premièrement, l'énergie du rayonnement UV frappant le sol terrestre dépend de la latitude. L'énergie des UV, diminuant lorsque la distance géographique à l'équateur augmente, est moyenne en France.

L'intensité du rayonnement solaire et la proportion en UVB augmentent avec l'altitude du fait de la diminution de l'épaisseur atmosphérique. En un lieu donné, l'intensité des radiations solaires dépend également de la réflexion et la diffraction médiées par certains sols (neige, eau, sable) (AFSSE et al. 2005). Depuis quelques décennies, l'épaisseur de la couche d'ozone stratosphérique, barrière naturelle contre les UV, subit un amincissement susceptible d'accroître l'intensité du rayonnement solaire au sol et la proportion d'UVB (Henriksen et al. 1990).

L'intensité des radiations UV varie en fonction de la hauteur du soleil sur l'horizon, autrement dit en fonction de l'heure et de la saison. Le maximum d'irradiation est observé au zénith durant le solstice d'été (AFSSE et al. 2005). D'ailleurs, environ 75% des UVR sont reçus entre 9 et 15h en été. En Belgique, la dose d'UVB reçu quotidiennement diminue de 10 DEM durant la période estivale à 0,4 en hiver (IARC 1992). Les variations météorologiques saisonnières associées avec les variabilités climatiques actuelles modifient la durée des épisodes nuageux (AFSSE et al. 2005). L'impact des nuages sur l'irradiation UV du sol est extrêmement complexe. La taille des gouttelettes d'eau ($\varnothing = 1-30 \mu\text{m}$) est largement plus grande que les longueurs d'ondes des UV. Par conséquent, la transmission des UV à travers les nuages peut être considérée indépendante de la longueur d'onde (Diffey and Elwood 1994). D'après l'IARC, les rayonnements infrarouges sont néanmoins arrêtés par les nuages, alors qu'une couverture nuageuse complète ne bloque que 50% des UVB. En cas de couverture nuageuse très épaisse, la totalité des UVB est prévenue par les nuages, même lors de la période estivale (IARC 1992). D'autre part, les poussières, les aérosols et la pollution sont des facteurs de dispersion du rayonnement solaire (AFSSE et al. 2005).

Enfin, l'exposition aux UV dépend vivement des comportements humains. Au début du 19^e siècle, les mœurs et la mode dictaient une protection totale envers les rayons lumineux afin d'éviter toute altération de la pâleur du teint par des érythèmes ou le bronzage (Albert and Ostheimer 2002). L'identification du rôle des UV dans la synthèse de la vitamine D, ainsi que d'autres bénéfices médicaux prétendus participent dès la période 1900-1930 à la modification de la vision de l'exposition solaire par les populations et conséquemment de leurs comportements envers l'exposition solaire (Albert and Ostheimer 2003a; Albert and Ostheimer 2003b). Les études actuelles montrent une grande disparité des comportements envers l'exposition aux rayonnements solaires, en terme de mesures de protection (produits cosmétiques ou port de vêtements) et de temps d'exposition (AFSSE et al. 2005).

III.2.3. L'exposition professionnelle

La commission internationale pour la protection contre les rayonnements non ionisants (CIPRNI) établit en 2004 la dose de 30 J.m^{-2} (3 mJ.cm^{-2}) comme étant la dose limite à ne pas dépasser pour les yeux ou la peau non-protégée sur une période de travail de 8 heures (ICNIRP 2004).

Les données sur l'exposition professionnelle aux UV sont globalement très limitées, mais montrent une grande disparité entre professions. Les marins pêcheurs, les guides de haute montagne et les cyclistes professionnels constituent des catégories professionnelles fréquemment et intensément exposées. L'évaluation aux UV est régulièrement faite en absence de données météorologiques utilisables et repose le plus fréquemment sur l'appréciation qualitative d'un expert hygiéniste ou une analyse de données satellites (AFSSE et al. 2005). En milieu professionnel, l'exposition individuelle dépend de 4 facteurs : les UV solaires ambiants, la fraction de l'exposition ambiante reçue par les différents sites anatomiques, le comportement individuel (respect des mesures de protections...) et la durée passée en plein air (ICNIRP 2010).

A Brisbane, l'exposition journalière moyenne d'enseignants d'éducation physique et de jardiniers aux UV atteint environ 10 DES au niveau des épaules et 5 DES au niveau du torse. En revanche, l'exposition de maîtres-nageurs, approximativement de 5 DES, est équivalente sur les deux zones anatomiques (Gies et al. 1995).

En France, une étude portant sur une population (N = 889) d'individus âgés de 25 à 69 ans estime que les professionnels les plus exposés aux UV sont les jardiniers (1,19 DES), les employés du secteur de la construction (1,13 DES), les agriculteurs (0,95 DES) et les guides touristiques et les travailleurs en sciences sociales ou en art (0,93 DES) (Boniol et al. 2015). Parmi ces professions, l'exposition aux UV varie fortement entre zones anatomiques distinctes et le profil d'exposition

dépend de la profession effectuée. Chez les agriculteurs, les employés du secteur de la construction et les jardiniers, la zone anatomique la plus exposée est la nuque (Vernez et al. 2015).

III.3. Impact des UV sur l'absorption cutanée

Le tissu cutané possède plusieurs mécanismes de défense afin de se prémunir de l'agression engendrée par les UV. Certaines de ces protections sont structurelles. Ainsi, les cornéocytes sont encerclés par une ceinture lipidique composée de céramides, cholestérol et d'acide gras insensibles aux UVA (Natarajan et al. 2014). De plus, le sébum excrété à la surface de la peau par les glandes sébacées contient des lipides essentiels dans la lutte contre les UV. Le squalène inhibe la peroxydation lipidique en bloquant la formation de radicaux libres, protégeant ainsi la peau du stress oxydant déclenché par les UV. Les triglycérides semblent jouer un rôle dans la limitation de l'inflammation et du vieillissement en inhibant l'expression de certaines enzymes (métalloprotéinases, cyclooxygénases...) et d'acteurs de l'inflammation (interleukine-1 β) (Cui et al. 2016). Outre les molécules photoprotectrices contenues dans le *stratum corneum* (mélanine, acide uronique), les UV activent différents mécanismes de défense et voies de signalisation cellulaires activant *in fine* l'expression d'enzymes neutralisant les ERO (superoxyde dismutase, hème oxygénase) et d'enzymes de phase 2 (GST...), ainsi que la réponse pro-inflammatoire. Enfin, les UV activent la synthèse de mélanine par les mélanocytes ce qui induit la pigmentation de la peau (Natarajan et al. 2014).

L'ensemble de ces mécanismes permettent à la peau de se prémunir des effets toxiques des UV. Cependant, en cas d'exposition intense, fréquente ou prolongée aux rayonnements UV, ces protections s'avèrent insuffisantes et les UV catalysent des modifications structurelles et fonctionnelles au sein de la peau notamment à travers la production d'ERO (Natarajan et al. 2014).

III.3.1. Atteinte de la barrière cutanée

Plusieurs études expérimentales révèlent une atteinte de la barrière cutanée après irradiation par les UVB. L'application de 0,15 J/cm² d'UVB sur la peau de souris provoque une altération du *stratum corneum* de manière temps-dépendant. Le flux d'eau trans-épidermique augmente 3 jours après l'irradiation tandis que le tissu cutané amorce un recouvrement après 5 jours. L'analyse au microscope électronique et en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des échantillons cutanés montre des modifications de la structure du *stratum corneum* 3 jours après l'irradiation : fragmentation et anomalie de distribution des lamelles lipidiques, anomalie du profil lipidique des granules lamellaires à l'interface *stratum granulosum/stratum corneum*, présence de substance amorphe formant des lacunes intercellulaires, perte de l'agencement lipidique orthorhombique

(augmentation de la phase liquide) (Jiang et al. 2006). De plus, cette dérégulation de la barrière cutanée est associée avec une hyperplasie et une perte du gradient calcique épidermique, essentiel à l'homéostasie de l'épiderme (Jiang et al. 2007). Biniek *et al.* constatent également une fluidification de l'arrangement lipidique à la surface de la peau, mais aussi une modification de la structure de la kératine et une perte de cohésion des lipides intercellulaires après irradiation de peau cadavérique humaine à des doses croissantes d'UVB (160, 320, 800 J/cm²) (Biniek et al. 2012).

Additionnellement à l'altération de la structure du *stratum corneum*, l'irradiation aux UV induit une dégradation de la matrice extracellulaire du derme (Rittie and Fisher 2015). Bien que la synthèse du collagène ne soit pas affectée par l'exposition aux UVA, la transcription d'ARNm codant pour la collagénase, dégradant le collagène interstitiel, est induite dans les fibroblastes *in vitro* (5, 15, 35 ou 60 J/cm²) et *in vivo* (50-60 J/cm²) (Scharffetter et al. 1991). Cependant, d'autres études plus récentes montre une diminution du niveau de transcrits codant pour les fibres de collagène, indiquant une possible atteinte de la synthèse des fibres de collagène (Rittie and Fisher 2015). De plus, l'irradiation de volontaires à la lumière solaire simulée (LSS) (UV de 290-400 nm) (0,5-4 DEM ; 1 DEM = 2,3 à 5,4 J/cm² selon les volontaires) montre une induction temps- et dose-dépendante de la transcription de l'ARNm des collagénases (matrice métalloprotéase 1) (Lahmann et al. 2001).

Au niveau macroscopique, les symptômes cliniques d'une exposition aiguë aux UV sont la douleur, mais également l'érythème et l'œdème caractéristiques de l'inflammation (Nicolaou et al. 2011). Ces deux derniers symptômes proviennent de la dilatation locale et de l'hyperperméabilité des vaisseaux sanguins, ainsi que de l'afflux sanguin accru (Huggenberger and Detmar 2011), pouvant théoriquement faciliter l'absorption des xénobiotiques.

Ainsi, plusieurs études démontrent une modification de la diffusion, de la pénétration ou de l'absorption cutanée de certains xénobiotiques par les UV. Les deux premières datant de 1979 et 1985 montrent l'augmentation de la pénétration de la cortisone et de l'hydrocortisone chez le rat après irradiation par un mélange d'UVA/UVB (55/45) ou aux UVC (Bronaugh and Stewart 1985b; Solomon and Lowe 1979). Après exposition à 20 J/cm² d'UVA, la diffusion de méthanol et d'éthanol à travers l'épiderme isolé d'abdomen cadavérique humain est également plus élevée, alors que celle des alcools de plus haut poids moléculaire reste inchangée (McAuliffe and Blank 1991).

Plus récemment, une augmentation de la pénétration de quantum dots appliqué sur la peau de souris a été rapportée 3,5 à 4,5 jours après irradiation aux UVB (360 mJ/cm²) (Mortensen et al. 2013). De la même manière, la diffusion de caféine à travers la peau de rat est significativement accrue après exposition aux UVB (420 mJ/cm²) d'explants placés sur une cellule de diffusion dynamique (Gelis

et al. 2002). Après irradiation de peau dorsale de rat *in vivo* pendant 5 jours aux UVA (dose totale = 24 ou 39 J/cm²) ou des UVB (150, 200 ou 250 mJ/cm²), Hung *et al.* ont mesuré la pénétration *in vivo* ou la diffusion *in vitro* de tétracycline (antibiotique), de quercétine (anti-oxydant naturel) ou d'oxybenzone (filtre UV ajouté aux crèmes solaires). Globalement, les résultats montrent une augmentation de la diffusion transcutanée lors de l'irradiation aux UVA et une diminution lors de l'irradiation aux UVB, excepté pour l'oxybenzone dont les résultats sont extrêmement variables selon les conditions expérimentales. Ces résultats sont par ailleurs associés à une modification du profil lipidique du *stratum corneum*, une hyperplasie, une diminution de la quantité de protéine du *stratum corneum*, l'expression de la cyclooxygénase-2 et une diminution de l'expression de claudine-1, essentielle aux jonctions serrées (Hung et al. 2012).

III.3.2. Induction des capacités métaboliques cutanées

Dans la littérature, peu de recherches détaillent l'effet des UV sur l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques chez l'homme. Globalement, les recherches réalisées démontrent une induction de l'expression des CYP450, enzymes centrales du métabolisme des xénobiotiques. Si le mécanisme d'induction est encore mal connu, une hypothèse repose sur l'activation de l'aryl hydrocarbure receptor (AhR), un facteur de transcription régulant l'activation de l'expression des CYP1A1 et 1B1, par les UV. Pour certains chercheurs, l'induction se ferait par liaison de photoproduits du tryptophane à l'AhR (Ma 2011).

In vitro, l'induction de la transcription du CYP1B1 par des kératinocytes primaires est maximale entre 4 et 6 heures après irradiation aux UVB (20 mJ/cm²) et après 6 heures d'incubation avec une lignée cellulaire de kératinocytes immortalisés (HaCaT). L'expression du CYP1B1 par les kératinocytes primaires redescend à un niveau d'expression basal après 10 heures d'incubation (Villard et al. 2002). De manière similaire, la transcription des CYP1A1 par les cellules HaCaT est induite 3 heures après irradiation aux UVB (10-40 mJ/cm²) (Wei et al. 1999). Sur cultures primaires de kératinocytes, une induction de la transcription et de l'expression protéique du CYP4A11 est rapportée 24 heures après irradiation par les UVA (17,5 J/cm²) ou par un traitement combinant UVA et UVB (24 mJ/cm²). Cependant, l'expression constitutive du CYP1A1 n'est pas modulée après 24 heures d'incubation par les différents traitements aux UV (Gonzalez et al. 2008), ce qui pourrait être expliqué par une mesure tardive de l'expression du CYP450.

Sur des biopsies de peau humaine, le CYP26A1 est plus exprimé dans les zones anatomiques exposées à la lumière solaire (Osanai and Lee 2011). Chez des volontaires atteints de psoriasis, le traitement à la LSS (1-4 DEM, 290-400 nm) induit une expression plus grande de l'ARNm du CYP2S1 au niveau des zones lésées que des zones saines (Smith et al. 2003). L'analyse de la

transcription et de l'expression des CYP1A1 et CYP1B1 dans des biopsies de 9 volontaires sains montrent l'induction de l'expression du CYP1A1 dans la couche basale de l'épiderme après irradiation aux UVB (1-4 DEM ; détermination de la DEM pour chaque individu) tandis que le CYP1B1 est exprimé dans les autres couches épidermiques. L'induction des CYP450 est maximale à 48 heures après un traitement aux UVB (4 DEM), démontrant le caractère dose- et temps-dépendant de cette induction (Katiyar et al. 2000).

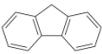
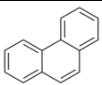
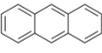
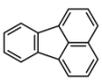
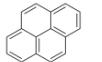
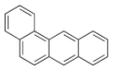
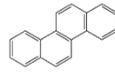
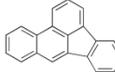
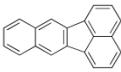
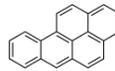
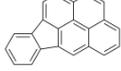
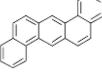
IV. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

IV.1. Structure et caractéristiques physicochimiques

Les HAP sont une large famille comprenant plus d'une centaine de molécules carbonées constituées au minimum de 2 cycles aromatiques fusionnés. Ils revêtissent une grande diversité de structures, pouvant être complexes, dont la lipophilie augmente avec le poids moléculaire. Par exemple, le Log K_{ow} du naphthalène (Naph), composé de 2 cycles aromatiques fusionnés, est de 3,30 tandis que celui du dibenzo[*a,h*]anthracène (DB[*a,h*]A), comprenant 5 cycles, est de 6,84 (Tableau 1). Les HAP peuvent être également substitués par divers groupements chimiques : alkyl, amino, nitro ou encore halogènes (-Cl, -Br, -F, -I, -At) (Boström et al. 2002).

Le partage des HAP entre la phase gazeuse et la phase particulaire de l'atmosphère est déterminé par leur tension de vapeur, dépendante de leur poids moléculaire. Lorsque celui-ci est élevé, la tension de vapeur est faible et le HAP est par conséquent peu volatil (Abdel-Shafy and Mansour 2016). Les HAP possédant jusqu'à 4 cycles aromatiques, de poids moléculaire compris entre 128 à 178 g/mol, sont gazeux. Au-delà de 228 g/mol, les HAP sont adsorbés sur les particules fines atmosphériques. Le fluoranthène (FluA) et le pyrène (Pyr), composés de 3 et 4 cycles aromatiques et pesant 202 g/mol, se distinguent par leur partition à la fois dans la phase gazeuse et dans la phase particulaire. (Baek et al. 1991; Rehwagen et al. 2005).

Tableau 1. Dénomination, numéro CAS, formule et caractéristiques des 16 HAP listés prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA). Les valeurs de Log K_{ow} proviennent du rapport de l'Agence pour les substances toxiques et les maladies (ATSDR) (ATSDR 1995). D'après (Lutier 2017).

	N°CAS	Formule brute	Structure chimique	MW (g/mol)	Log K_{ow}
Naphtalène	91-20-3	C ₁₀ H ₈		128	3,30
Acénaphylène	208-96-8	C ₁₂ H ₈		152	4,07
Acénaphène	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀		154	3,98
Fluorène	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀		166	4,18
Phénanthrène	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀		178	4,45
Anthracène	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀		178	4,45
Fluoranthène	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀		202	4,90
Pyrène	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀		202	4,88
Benz[a]anthracène	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂		228	5,61
Chrysène	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂		228	5,16
Benzo[b]fluoranthène	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂		252	6,04
Benzo[k]fluoranthène	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂		252	6,06
Benzo[a]pyrène	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂		252	6,06
Benzo[g,h,i]pérylène	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂		276	6,50
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂		276	6,58
Dibenzo[a,h]anthracène	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄		278	6,84

IV.2. Nomenclature

Afin d'obtenir la numérotation correcte des carbones extérieurs, les HAP parents sont orientés et les carbones périphériques sont numérotés selon un protocole précis : la plus longue chaîne de cycles aromatiques doit être orientée selon l'axe horizontale tandis que le plus grand nombre de cycles aromatique doit être situé en haut à droite de l'axe verticale. Le carbone périphérique le plus à droite est le premier carbone et la numérotation continue dans le sens des aiguilles d'une montre (Figure 13) (Ehrenhauser 2015).

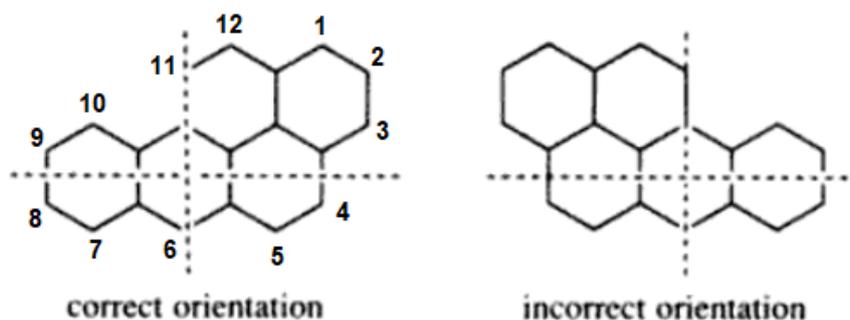


Figure 13. Exemple d'orientation et de numérotation des carbones périphériques du benzo[*a*]pyrène pour la nomenclature des cycles substitués d'après l'UICPA. Adapté de (Harvey 2011).

Les HAP présentent une diversité de taille et d'agencement structuraux amenant à la distinction de régions moléculaires : il existe des HAP linéaires, d'autres angulaires ou en cluster (Abdel-Shafy and Mansour 2016). Les régions K, L et M sont fréquemment décrites telles que (Figure 14) :

- La région K correspond à un « coude » formé par la fusion angulaire de deux cycles aromatiques sur un troisième noyau benzénique.
- La région L est située au niveau de l'enchaînement de cycles aromatiques.
- La région M est une région moléculaire préférentielle pour les réactions d'oxydation (Barbeau 2013).

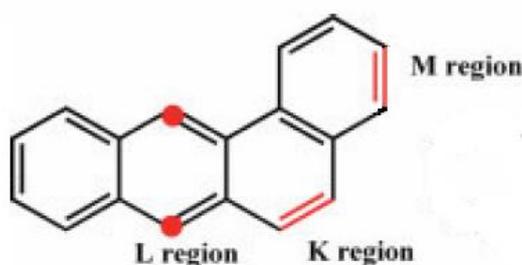


Figure 14. Illustration des différentes régions K, L et M. Adapté d'après (Vijayalakshmi and Suresh 2008).

Certains HAP sont planaires, c'est-à-dire plat dans l'espace, tandis que d'autres sont non-planaires car ils intègrent des régions moléculaires d'encombrement stérique important qui génèrent une torsion de la molécule dans l'espace. Dans la littérature, les auteurs distinguent les régions de Bay, de Crique et de Fjord, bien que les désignations ne soient pas forcément cohérentes entre les différentes publications (Figure 15) (Ehrenhauser 2015; J. Carrell et al. 1995). Le terme de région de Bay est cependant fréquemment utilisé pour la région (a) et le terme région de Fjord pour la région (b). La région de Bay n'effectue naturellement qu'une faible torsion sur la molécule, néanmoins la substitution de l'un de ses carbones engendre un encombrement stérique conséquent. Les HAP comptant un cyclopentane au sein de leur structure sont appelés HAP non-alternants, à l'exemple du benzo[*k*]fluoranthène (B[*k*]F) ou du benzo[*b*]fluoranthène (B[*b*]F) (Tableau 1) (Ehrenhauser 2015). Certaines régions moléculaires intégrant ces cyclopentanes présentent une forte ressemblance avec les régions de Bay. Ces régions observables chez le FluA, le B[*k*]F et le B[*b*]F (Tableau 1) sont nommées pseudo-régions de Bay (Perin-Roussel et al. 1983).

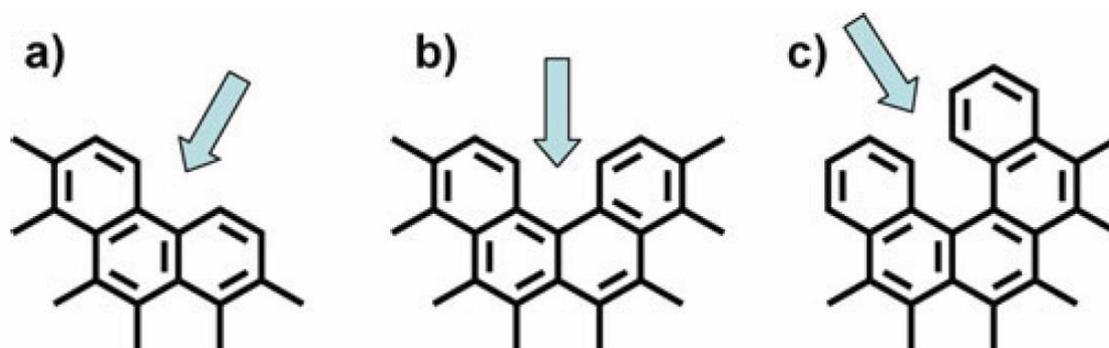


Figure 15. Représentation des régions de (a) Bay et (b) Fjord selon (J. Carrell et al. 1995) et régions de (b) Bay et (c) Fjord d'après (Ehrenhauser 2015).

IV.3. Sources et exposition des populations

IV.3.1. Sources de HAP

Les HAP peuvent être générés par altération de matière organique suivant trois phénomènes physico-chimiques distincts : la pyrolyse, la pétrogenèse et la biogenèse. Lors de la pyrolyse, la combustion incomplète de la matière organique, portée à des températures comprises entre 350 et 1200°C dans un environnement anoxique, est à l'origine de la formation des HAP pyrogéniques. Durant la pétrogenèse, les HAP pétrogéniques sont produits à des températures inférieures comprises entre 100 et 150°C, mais contrairement à la pyrolyse ce phénomène se déroule sur une échelle de temps de l'ordre de plusieurs millions d'années. Enfin, certains organismes vivants, tels que des algues ou des bactéries, sont dotés de voies métaboliques particulières aboutissant à la synthèse biologique de HAP, ou biogenèse (Abdel-Shafy and Mansour 2016).

Les HAP formés par pyrolyse ou biogénèse sont émis en mélanges complexes dont le profil est dépendant du procédé de production, au point de former une signature moléculaire. Les produits pétroliers et leurs dérivés contiennent majoritairement des HAP de faibles poids moléculaires comprenant 2 à 3 cycles. Seuls les produits pétroliers les plus lourds sont composés de quantités non-négligeables de HAP de 4 cycles, tandis que les HAP haut poids moléculaires (5 cycles et plus) ne constituent qu'une infime fraction des HAP et restent le plus fréquemment non-détectés. Inversement, les HAP de 4 à 6 cycles sont plus abondants que les HAP de faibles poids moléculaires lors d'une pyrolyse, et leur teneur dans les mélanges est proportionnelle à la température de combustion (Stogiannidis and Laane 2015). La composition d'un mélange complexe de HAP dépend à la fois de la source d'émission et du substrat de combustion (Ravindra et al. 2008).

Les sources d'émission de HAP sont généralement classifiées entre les sources naturelles et les sources anthropiques. Les sources naturelles incluent des procédés pyrolytiques à haute température tel que les feux de forêts, les feux de brousse et les éruptions volcaniques, mais aussi les procédés de diagenèse à température modérée menant à des phénomènes de pétrogenèse, ainsi que la biogénèse par les algues et les bactéries (Abdel-Shafy and Mansour 2016; Ravindra et al. 2008). Elles comptent également les fuites naturelles de pétrole, l'érosion de roche contenant des HAP pétrogéniques ou encore la décomposition de la litière forestière (Abdel-Shafy and Mansour 2016). Les sources anthropogéniques sont innombrables et se différencient entre les sources domestiques (chauffage, procédés de cuisson...), les sources mobiles correspondant au secteur des transports, les sources industrielles (production d'aluminium...) et les sources agricoles (combustion biomasse tels que des déchets de culture ou des résidus de forêts pour préparer des terres cultivables) (Ravindra et al. 2008).

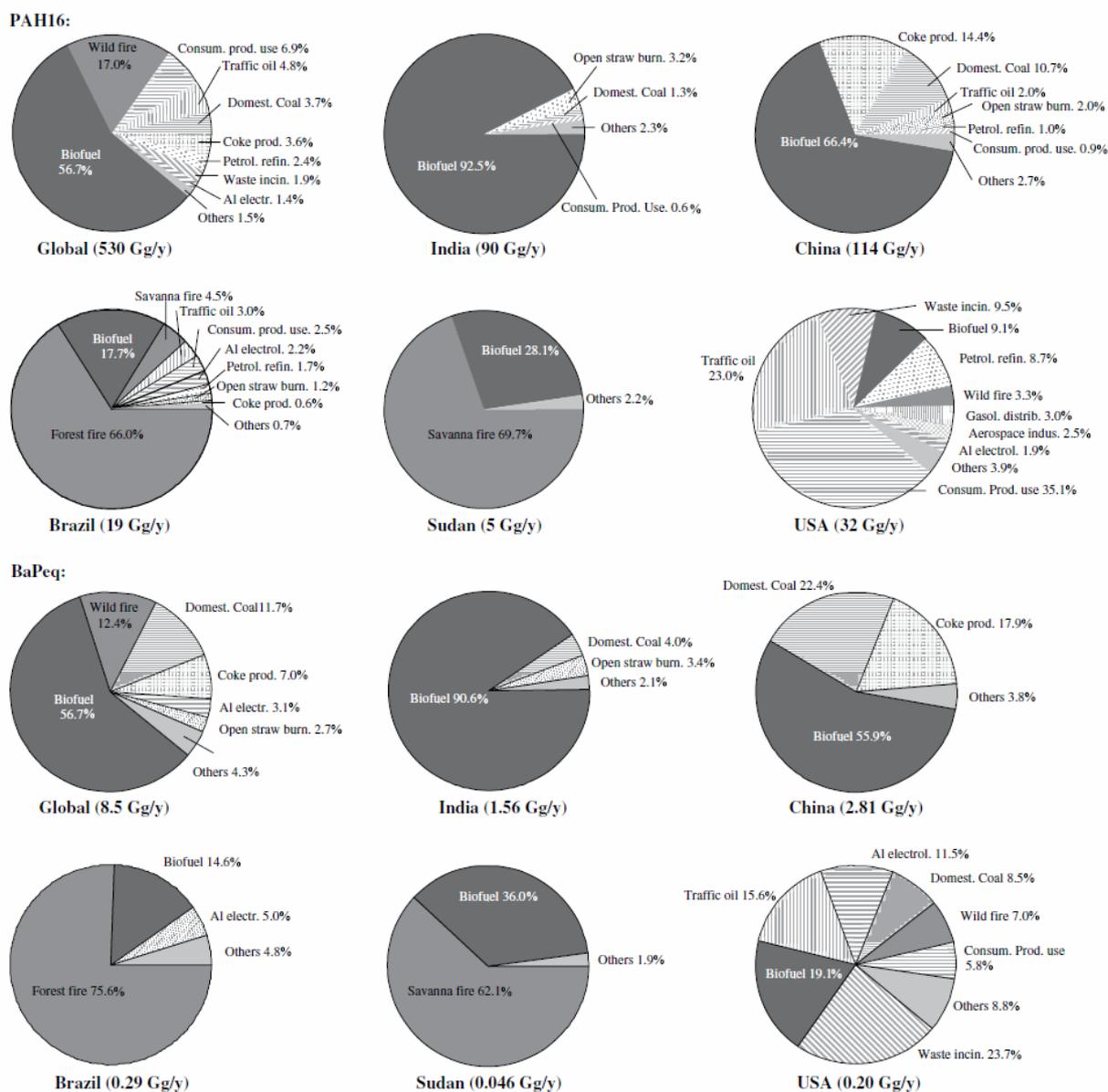


Figure 16. Représentation graphique de la variabilité géographique des émissions de HAP et des sources d'émissions ainsi que de la contribution de chaque source aux émissions de HAP, d'après (Zhang and Tao 2009).

L'analyse de carottes sédimentaires méditerranéennes révèle une augmentation exponentielle des émissions anthropiques de HAP dès le début du 20^e siècle (Tolosa et al. 1996). Au niveau mondial, le total des émissions dépasse les 500 Gg/an dès les années 1970 avant de légèrement redescendre en-deçà de ce seuil au cours des années 2000 (Shen et al. 2013). Au niveau planétaire, les types de sources d'émission sont extrêmement variables en fonction de la région géographique (Figure 16). Ainsi, la consommation de biofuel représente 92,5% des émissions de HAP en Inde en 2004, tandis que les feux de forêts associés à l'agriculture constituent 66,0% des émissions au Brésil (Zhang and Tao 2009). En 2007, environ 60% des émissions mondiales provenaient du feu de bois ou de résidus de récoltes consommés pour le chauffage (Shen et al. 2013). Les HAP majoritairement produits par les activités humaines sont le Naph (45%), l'acénaphtylène (17,1%) et le phénanthrène

(Phe) (10,6%) tandis que les HAP de forts poids moléculaires représente moins de 7% du total des émissions (Figure 17) (Shen et al. 2013). Les HAP émis dans l'air ambiant atteignent des concentrations atmosphériques considérables suscitant des inquiétudes quant à leurs effets sur la santé humaine (Boström et al. 2002).

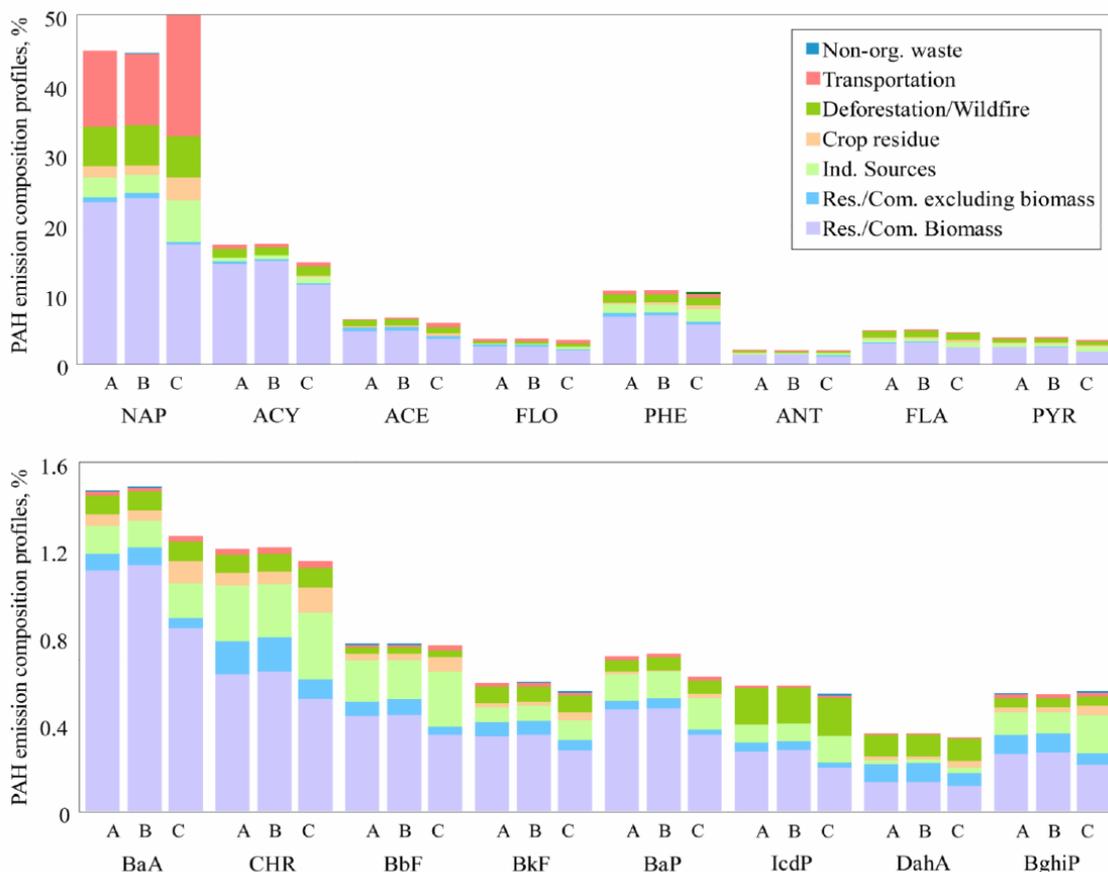


Figure 17. Composition des profils d'émissions en HAP des sept sources majoritaires en 2007 pour A) les émissions globales, B) les pays en voie de développement et C) les pays développés (Shen et al. 2013). NAP : Naphtalène, ACY : acénaphthylène, ACE : Acénaphthène, FLO : Fluorène, PHE : Phénanthrène, ANT : Anthracène, FLA ; Fluoranthène, PYR : Pyrène, BaA : Benzo[a]anthracène, CHR : Chrysène, BbF : Benzo[b]fluoranthène, BkF : Benzo[k]fluoranthène, BaP : Benzo[a]pyrène, IcdP (Indo[1,2,3-c,d]pyrène, DahA : Dibenzo[a,h]anthracène, BghiP : Benzo[g,h,i]pérylène. D'après (Shen et al. 2013).

IV.3.2. Exposition des populations

Les HAP sont des polluants ubiquitaires identifiés dans tous les milieux terrestres, entraînant une exposition de l'ensemble des populations humaines. En milieu professionnel, les niveaux de HAP sont cependant considérablement plus élevés, amenant à différencier l'exposition de la population générale de celle des travailleurs (IARC 2010). A titre de comparaison, la population générale est exposée à des concentrations atmosphériques de HAP de l'ordre du ng/m^3 tandis que les expositions professionnelles sont de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Srogi 2007; Unwin et al. 2006).

IV.3.2.1. La population générale

La population générale est majoritairement exposée aux HAP à travers le tabagisme, l'alimentation et la pollution atmosphérique. Le tabagisme actif et passif constituent une des sources majeures en population générale (Lewtas 2007) et 90% des cancers du poumon seraient dus à la consommation de tabac. En outre, le risque de cancer du poumon est multiplié par 3,5 lorsque l'air d'une maison est pollué par la fumée de tabac (Castro et al. 2011; Moorthy et al. 2015). Des estimations indiquent que 96,2% de l'exposition journalière des non-fumeurs provient de l'alimentation, mais ne compte que pour 30% chez les fumeurs (Paris et al. 2018). La contamination alimentaire varie toutefois de manière considérable en fonction de la culture, du régime alimentaire (viande, fruits et légumes) et du mode de cuisson (Alomirah et al. 2011; IARC 2010; Paris et al. 2018; Stumpe-Vīksna et al. 2008). La pollution de l'air intérieur provenant du chauffage ou des procédés de cuisson participent à l'exposition de la population générale (Lewtas 2007). En milieu urbain, le trafic routier, le chauffage résidentiel, l'incinération de déchets et la restauration génèrent une pollution atmosphérique conséquente associée avec une élévation du risque de cancer variant selon la région géographique (Lewtas 2007; Li et al. 2003; Marr et al. 2006; Mishra et al. 2016; Singh and Gupta 2016; Slezakova et al. 2013).

La contamination cutanée, considérée comme une spécificité du monde professionnel, peut toutefois constituer une voie d'absorption des HAP au sein de la population générale. La pollution atmosphérique, dont les HAP, pénètre au sein de la peau (Rembiesa et al. 2018). La pollution des sols urbains, contenant entre 7 et 10 fois plus de HAP que les sols ruraux, représente un risque pour les populations, puisque les concentrations de HAP possédant de 4 à 6 cycles aromatiques peuvent atteindre jusqu'à 200 000 µg de HAP par kg de sol dans certaines garderies norvégienne (Wang et al. 2017).

Le goudron de houille (coaltar), dérivé du charbon, contient approximativement 10 000 composés chimiques différents dont au moins 100 HAP. Il intègre la composition de produits cosmétiques (shampooings antipelliculaires...) commercialisés de nombreuses régions du monde, excepté en Europe où son usage à des fins cosmétiques est interdit. Appliqué en combinaison avec une irradiation UV, il se révèle être un traitement efficace contre l'hyperplasie symptomatique du psoriasis ainsi que contre d'autres maladies cutanées chroniques telles que l'eczéma (CIR 2008). L'absorption cutanée des HAP résultant de l'application cutanée de goudron de houille sur la peau de volontaires sains ou de patients est non-négligeable. Les niveaux de biomarqueurs urinaires sont multipliés de 56 à 380 fois, en fonction de la quantité de produit appliqué, montrant le passage des HAP dans la circulation systémique (CIR 2008; Veenhuis et al. 2002).

Da manière plus limitée, la contamination de la peau par les HAP pourrait également provenir d'une migration depuis certains objets du quotidien tels que les journaux, des poignées de marteau en caoutchouc ou des jouets pour enfant (Bartsch et al. 2016; Paschke et al. 2015).

IV.3.2.2. En milieu professionnel

Si l'inhalation est une voie de contamination commune en milieu professionnel, la voie cutanée représente une voie d'absorption non-négligeable des HAP dans de nombreux secteurs d'activités (IARC 2010). En milieu industriel, plusieurs études décèlent un dépassement des seuils de risque de cancer cutané établis par l'US-EPA ou par la Cour Suprême des Etats-Unis (Chen et al. 2008; Tsai et al. 2001; Wang et al. 2015).

Globalement, les niveaux d'exposition les plus élevés sont mesurés dans les secteurs industriels nécessitant l'utilisation de charbon ou de produits dérivés. Les procédés industriels impactent fortement l'émission de HAP : à basse température, la distillation de charbon génère en moyenne $12,17 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de HAP en 8 heures, tandis qu'à haute température, la quantité de HAP totaux atteint $278,82 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Unwin et al. 2006).

L'absorption cutanée constitue la voie d'exposition principale aux HAP dans divers secteurs d'activité, tels que la production d'électrodes, ou dans certains postes, à l'exemple d'ouvriers de maintenance (Angerer et al. 1997; Moen et al. 1996). Lors de l'application de revêtements routiers, la contamination cutanée semble également être la voie d'absorption majoritaire des HAP (Sobus et al. 2009), contribuant 8 fois plus que la voie respiratoire à la charge corporelle des travailleurs (McClellan et al. 2004). La contamination de 147 sujets travaillant dans la construction de route était estimée à $85,8 \mu\text{g}$ de HAP, dont respectivement $1,1 \mu\text{g}$ de benzo[*a*]pyrène (B[*a*]P) et $7,4 \mu\text{g}$ de Pyr (Fustinoni et al. 2010). Lors de l'étanchéification de toitures, les niveaux moyens de HAP sur la peau pouvaient atteindre jusqu'à $900 \text{ ng}/\text{cm}^2$ de HAP pour les salariés les plus exposés (McClellan et al. 2006). Toutefois le remplacement du goudron par les bitumes a diminué grandement les expositions actuelles dans ces 2 secteurs. Dans la production de coke, la contamination cutanée totale estimée variait de $4 \mu\text{g}$ à $34 \mu\text{g}$ de Pyr selon le poste, représentant 28 à 95% du Pyr total absorbé (VanRooij et al. 1993a).

L'importance de la contamination cutanée dépend également du port d'équipements de protection individuelle (EPI). Ainsi, la contamination cutanée d'ouvriers, au contact d'huile de créosote, a été réduite d'un facteur 4 après la mise en place de mesures d'hygiènes et le port d'EPI (VanRooij et al. 1993b).

L'ampleur de la contamination et la répartition des HAP à la surface de la peau dépendent aussi du poste de travail et du scénario d'exposition (déposition de HAP à travers les équipements de protection, contact localisé avec une surface contaminée ou un produit contenant des HAP) (Fent et al. 2014; Förster et al. 2008; Sobus et al. 2009; VanRooij et al. 1992). Dans le secteur de l'aluminium, la contamination cutanée (mesurée au poignet, au cou/mâchoire et à l'aîne) par le Pyr de trois groupes des salariés s'occupant du modelage de l'anode (N = 8), de la pré-cuisson de l'anode (N = 5) et du brasquage (nettoyage de la cellule d'électrolyse) (N = 7) est en moyenne supérieure chez les salariés s'occupant du brasquage (225,1 ng/cm²) comparativement aux deux autres groupes de travail (\approx 90 ng/cm²) (VanRooij et al. 1992). Chez les pompiers, la contamination de la peau résultant d'un passage des HAP à travers les vêtements de protection est relativement uniforme (dos, front, cou, poignet et doigts). Toutefois, les quantités retrouvées sur les doigts sont significativement plus élevées du fait d'une contamination par contact direct avec une surface contaminée lors du retrait des équipements de protection (casque...) (Fernando et al. 2016). Lors d'un contact direct, la contamination de la peau est plus localisée, par exemple sur les poignets non protégés parmi des ouvriers imprégnant le bois avec de l'huile de créosote (VanRooij et al. 1993b).

IV.4. Effets sanitaires des HAP : cancérogénicité

IV.4.1. Classification des HAP par le CIRC et l'Union Européenne

Les HAP sont tératogènes, reprotoxiques, immunotoxiques ainsi que cardiotoxiques. La toxicité chronique est toutefois principalement liée à leur cancérogénicité (Abdel-Shafy and Mansour 2016; ATSDR 1995). Les cancers de la peau apparaissent suite à une exposition cutanée massive en milieu professionnel, tandis que les cancers du poumon résultent d'une exposition par inhalation et les cancers de la vessie, liés aux fortes expositions, sont toutefois moins nombreux (Boffetta et al. 1997). De manière plus anecdotique, l'exposition aux HAP en milieu professionnel serait également associée à des cancers des voies aériennes supérieures, du rein, du sang, du rein et du pancréas (IARC 2010).

Le B[a]P est le seul HAP individuellement classé cancérogène par le CIRC. Hormis le benzo[*g,h,i*]pérylène (B[*g,h,i*]P) (groupe 3), les HAP particuliers sont classés cancérogènes possible (groupe 2B) ou probable pour l'homme (groupe 2A). A l'exclusion du Naph catégorisé possiblement cancérogène pour l'homme (groupe 2B), les HAP gazeux, le Pyr et le FluA sont inclassables quant à leur cancérogénicité (groupe 3) (Tableau 2) (IARC 2002; IARC 2010). L'Union Européenne et le CIRC ont également évalué la cancérogénicité de mélanges complexes émis lors de certaines activités professionnelles (Tableau 3) (IARC 2010).

Tableau 2. Classification individuelle des HAP par le CIRC et l'Union Européenne quant à leur cancérogénicité.

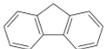
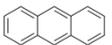
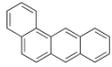
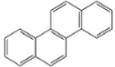
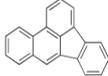
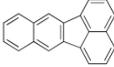
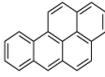
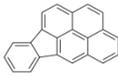
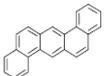
	N°CAS	Structure chimique	Etat atmosphérique	CIRC	UE
Naphtalène	91-20-3		Gazeux	2B	2
Acénaphtylène	208-96-8		Gazeux		
Acénaphtène	83-32-9		Gazeux	3	
Fluorène	86-73-7		Gazeux	3	
Phénanthrène	85-01-8		Gazeux	3	
Anthracène	120-12-7		Gazeux	3	
Fluoranthène	206-44-0		Gazeux + particulaire	3	
Pyrène	129-00-0		Gazeux + particulaire	3	
Benz[a]anthracène	56-55-3		Particulaire	2B	1B
Chrysène	218-01-9		Particulaire	2B	1B
Benzo[b]fluoranthène	205-99-2		Particulaire	2B	1B
Benzo[k]fluoranthène	207-08-9		Particulaire	2B	1B
Benzo[a]pyrène	50-32-8		Particulaire	1	1B
Benzo[g,h,i]pérylène	191-24-2		Particulaire	3	
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	193-39-5		Particulaire	2B	
Dibenzo[a,h]anthracène	53-70-3		Particulaire	2A	1B

Tableau 3. Classification par le CIRC et l'Union Européenne de certains mélanges complexes émis en milieu professionnel.

	CIRC	UE
Gazéification du charbon	1	
Production de coke	1	1A
Distillation de coaltar	1	
Activité de ramonage	1	
Manipulation de bitume	1	
Production d'aluminium	1	1A
Manufacture d'électrode de carbone	2A	
Créosotes	2A	1B
production de carbure de silicium	3	

IV.4.2. Les cancers cutanés en milieu professionnel

Historiquement, le premier cas de cancer attribué aux HAP remonte à 1775, lorsque Sir Percivall Pott observe un excès de cancer du scrotum chez les ramoneurs exposés à la suie, riche en HAP. Par la suite, les HAP sont isolés en laboratoire et leur cancérogénicité est démontrée chez l'animal au début du 19^e siècle (IARC 2010). En milieu professionnel, l'attribution directe du risque de cancer aux HAP est délicate du fait de l'exposition des travailleurs à des mélanges complexes de composés chimiques. Dans la majorité des études épidémiologiques, le risque cancérogène est ainsi imputé à des produits contenant des HAP, constituant des facteurs de risque.

Les huiles minérales, dont la composition en HAP s'enrichit lors de l'échauffement mécanique des appareils de production, provoquaient des cancers cutanés dans les secteurs de l'industrie du métal, du coton et de la production de jute (Tolbert 1997). Dans un rapport de cas, Virich *et al.* exposent l'atteinte par la maladie de Paget extra-mammaire d'un ingénieur caucasien de 64 ans. Ce type d'adénocarcinome intraépithéliale, rare, affecte les individus de 50 à 70 ans et se développe le plus fréquemment autour des organes génitaux (scrotum, aine, vulve) ou à l'aisselle. D'après les auteurs, l'étiologie la plus probable serait l'exposition professionnelle répétée aux HAP contenus dans les huiles minérales pendant plus de 30 ans (Virich et al. 2008). Dans une étude cas-témoins regroupant 376 travailleurs polonais atteints de cancer de la peau, 216 cas étaient professionnellement exposés à 17 produits contenant des HAP (pétrole, coke, huiles minérales, suie, bitume...). Après élimination des situations présentant un biais de confusion, seules les huiles

minérales étaient liées à un excès de cancer de la peau (odds ratio = 1,48 [intervalle de confiance à 95%, 1,09 à 2,00]) (Kubasiewicz and Starzynski 1989; Kubasiewicz et al. 1991).

Dans le secteur du caoutchouc, une étude cas-témoins a été conduite chez 65 hommes atteints de cancer de la peau et 254 témoins, de même catégories d'âge et d'emplois. Les individus furent regroupés par produits d'exposition (caoutchouc, noir de carbone, solvants, huiles de lubrification, huiles d'extension). Tandis que les résultats prouvent une augmentation du risque relatif de cancer cutané avec les niveaux et la durée d'exposition, la quasi-totalité des associations restent non-significatives. Seuls les salariés dont le cancer est diagnostiqué avant 70 ans et fortement exposés aux huiles de lubrification (risque relatif = 28,3, $p = 0,01$) et au caoutchouc (risque relatif = 23,2, $p = 0,05$) présentent une différence significative avec les témoins (Bourguet et al. 1987).

Dans les secteurs du revêtement routier et l'étanchéité des toitures, les activités professionnelles afférentes à l'utilisation des dérivés de houille sont établies en tant que facteur de risque de cancer cutané. Si les goudrons et brais de houille, riches en HAP, ne sont actuellement plus utilisés, l'exposition aux HAP était non-négligeable lors de leur utilisation (IARC 1985; IARC 2013). Dans une méta-analyse, Partanen *et al.* avaient trouvé un risque de cancer de la peau accru mais non significatif chez les étancheurs (4,0 [intervalle de confiance à 95%, 0,8 à 12]). En revanche, l'excès de risque de cancer de la peau était significatif chez les applicateurs de revêtement routier (2,2 [intervalle de confiance à 95%, 1,2 à 3,7]) (Partanen and Boffetta 1994).

Dans les pays nordiques, les registres de maladies professionnelles représentent des bases de données particulièrement intéressantes pour les études épidémiologiques. Sur une cohorte de 24 917 employés norvégiens travaillant sur des plateformes pétrolières offshore, l'excès de risque de cancer de la peau, significatif au niveau des mains et des avant-bras, dépend de la durée d'emploi ($p = 0,005$) et du degré d'exposition au pétrole brut ($p = 0,04$) (Stenehjem et al. 2017). Parmi 16 422 pompiers scandinaves, l'exposition professionnelle aux produits de combustion induit un risque de cancer de la peau significativement plus élevé que dans la population générale (standard incidence ratio = 1,40 [intervalle de confiance à 95%, 1,10 à 1,76]) (Pukkala et al. 2014).

Bien que de nombreux produits (brai de houille, coaltar, huiles minérales, huiles de schiste, suie, créosote, bitumes), ainsi que plusieurs activités professionnelles (ramonage, gazéification du charbon, distillation coaltar, production de coke, extraction huile de schiste), soient reconnus en tant que facteurs de risque chez le travailleur, l'identification de cas de cancer cutané professionnel est limitée (Boffetta et al. 1997; Yang 2011).

IV.4.3. Influence des UV sur la cancérogénicité des HAP chez l'homme

Les expositions combinées aux HAP et aux UV sont courantes lors de certaines activités professionnelles (asphalteurs, étancheurs de toitures, travailleurs sur des plateformes off-shore). Les connaissances sur les effets sanitaires de l'exposition combinée à ces agents sont en revanche extrêmement limitées. L'évaluation du risque du traitement du psoriasis par une combinaison de goudron et d'UV conclut que les données disponibles sont insuffisantes pour prouver son innocuité (CIR 2008; Pittelkow et al. 1981). Le risque de développement de cancers de la peau autres que le mélanome est augmenté chez les fumeurs professionnellement exposés aux UV (Erbagci and Erkiliç 2002), cependant, ces recherches n'incluent pas la possibilité d'une exposition cutanée aux HAP lors de l'activité professionnelle. En revanche, un excès de cas de cancers a été identifié sur les plateformes pétrolières norvégiennes due à l'exposition combinée au pétrole brut et aux UV (Stenehjem et al. 2017). De plus, l'association allemande compétente en matière d'assurance maladie professionnelle a récemment reconnu 4 cas de cancers cutanés en tant que maladie professionnelle liées à une co-exposition aux HAP et aux UV (Dickel et al. 2016).

V. Absorption cutanée, cancérigène, UV, élimination des HAP

V.1. L'absorption cutanée des HAP, un phénomène multifactoriel complexe

V.1.1. L'absorption cutanée

L'absorption cutanée des HAP est un processus complexe intégrant plusieurs étapes (pénétration, métabolisme, diffusion passive) et dépend de nombreux facteurs (dose, scénario d'exposition, mélange) (Figure 18). Cette complexité induit un délai dans l'absorption des HAP comparativement à la voie pulmonaire et à la voie intestinale (Payan et al. 2008; Viau et al. 1995).

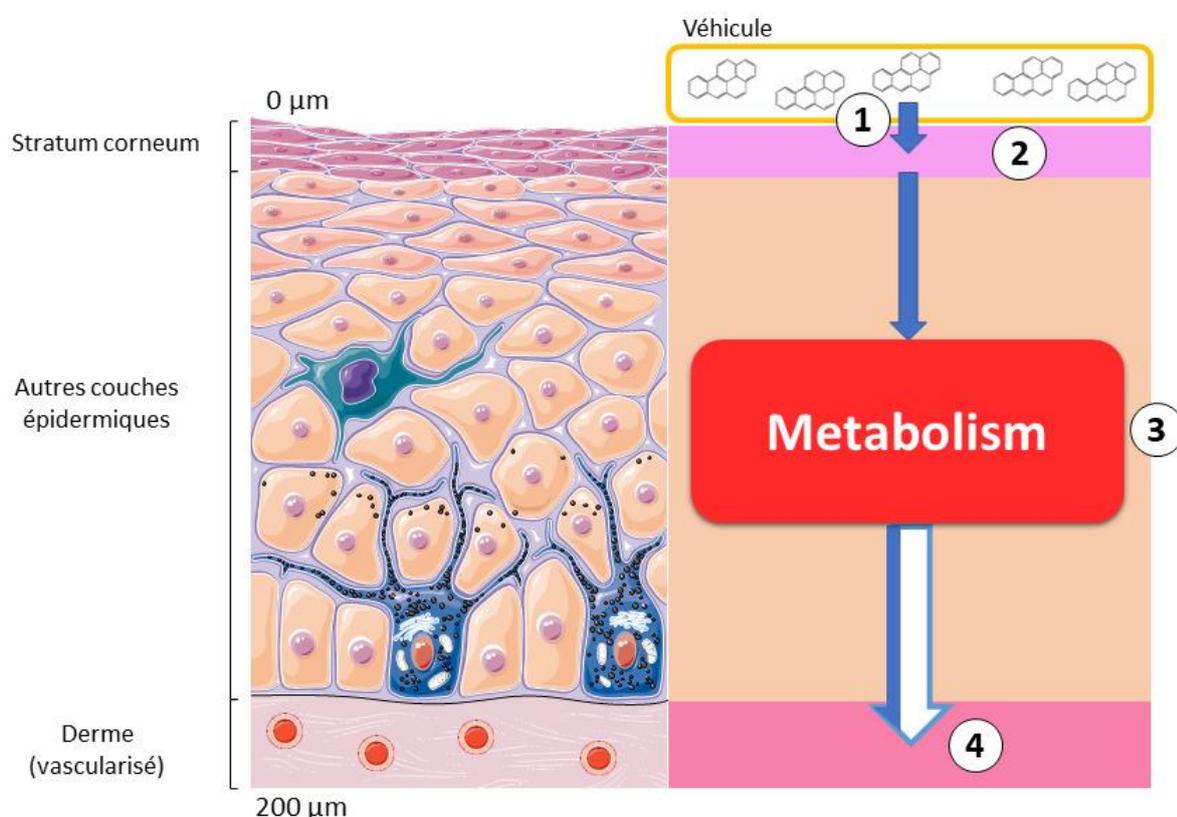


Figure 18. Schéma simplifié du processus d'absorption cutanée des HAP. 1 : pénétration des HAP dans le stratum corneum en fonction de la biodisponibilité depuis le véhicule (huiles, bitumes...). Les HAP, lipophiles, diffusent difficilement à travers les autres couches épidermiques, hydrophiles, et s'accumulent dans le *stratum corneum*, formant un réservoir cutané (2). Leur absorption dépend largement de leur métabolisme au sein des kératinocytes (3). 4 : La fraction de HAP non-métabolisée et les métabolites atteignent la circulation sanguine au niveau du derme papillaire, vascularisé.

Le scénario d'exposition, autrement dit la manière dont les HAP contaminent la peau, influence considérablement l'étape de pénétration. L'exposition peut se faire par déposition et/ou condensation des HAP atmosphériques, mais aussi par contact direct avec des surfaces contaminées et des produits les renfermant (paragraphe IV.3.2.2). Les caractéristiques physicochimiques de ces

produits (huiles, sols, produits pétroliers...), ou de la matrice les contenant, impactent largement la biodisponibilité des HAP (*i.e.* la proportion de HAP pénétrant la peau).

L'adsorption du B[a]P sur des particules de sol divise ainsi par 7 la biodisponibilité du B[a]P comparativement à une application dans l'acétone (Moody et al. 2007). En effet, le B[a]P est lié aux particules de sol de diamètre inférieur à 150 µm et seule la fraction directement au contact du *stratum corneum* pénètre la peau (Yang et al. 1989). L'huile de lubrification utilisée dans l'entretien des machineries industrielles réduit également la biodisponibilité des HAP (Sartorelli et al. 1999), et ce d'autant plus que la viscosité du produit pétrolier augmente (Ingram et al. 1995). La pénétration du B[a]P est déjà réduite d'un facteur 15 à 20 lorsqu'il est appliqué dans un pétrole de faible viscosité comparativement à un dépôt dans l'acétone (Ingram and Phillips 1993). De fait, la biodisponibilité des HAP semble négligeable lorsqu'ils sont contenus dans une matrice solide, telle que du bitume ou de la poussière de charbon (Potter et al. 1999; Sartorelli et al. 2001).

De plus, la pénétration des HAP est fortement impactée par la dose et la complexité des mélanges. Ainsi, la proportion de Pyr et de B[a]P absorbée par la peau *ex vivo* diminue lorsque la dose appliquée augmente (Jacques et al. 2010b; Ng et al. 1992). En mélange organique complexe, le temps de résidence du B[a]P à la surface de la peau augmente lorsque le poids moléculaire des constituants du mélange s'élève. A haut point d'ébullition (>850°F), le temps de résidence du B[a]P est multiplié par 7 (Dankovic et al. 1989).

Après l'étape de pénétration, les HAP s'accumulent dans la peau, formant un réservoir cutané (Chu et al. 1996; Miselnicky et al. 1988). A l'instar de nombreuses autres molécules lipophiles, la diffusion des HAP à travers l'épiderme, hydrophile, est limitée ce qui entraîne leur accumulation dans le *stratum corneum* (Jakasa et al. 2015).

Après formation du réservoir, le processus d'absorption des HAP dépend très largement du métabolisme par les kératinocytes, au sein de l'épiderme (Brinkmann et al. 2013; Jacques et al. 2010b; Kao et al. 1985; Payan et al. 2009; Smith and Holland 1981). Chez le cochon d'inde sans poil, les HAP atteignent progressivement la circulation sanguine au niveau du derme papillaire et ne sont pas éliminés par desquamation graduelle des cornéocytes. (Chu et al. 1996). Chez le porc, les explants *ex vivo* de peau viable absorbent 29,8% (dont 25,3% de métabolites) d'une dose de 200 nmol de B[a]P, tandis que seul 5,6% (non-métabolisés) de la dose diffusent à travers la peau après congélation des explants (Jacques et al. 2010b). La peau effectue ainsi un effet de premier passage lors de l'absorption des HAP, produisant des métabolites issus de l'ensemble des voies de biotransformation dont des intermédiaires métaboliques génotoxiques (Brinkmann et al. 2013; Jacques et al. 2010b). Des expériences menées en laboratoire montrent la sensibilité des enzymes

médiant cet effet de premier passage à la dose de HAP et à la quantité de produits chimiques déposés sur la peau. Lorsque la dose appliquée augmente, l'activité enzymatique est saturée, ralentissant ainsi l'absorption des HAP (Jacques et al. 2010b; Ng et al. 1992). Le même résultat est rapporté pour les mélanges complexes de composés organiques, où il existe une compétition de ces composés envers les enzymes (Dankovic et al. 1989).

L'ensemble des processus d'absorption cutanée diffèrent selon les HAP, en fonction du poids moléculaire et donc de leur lipophilie. D'une manière générale, l'effet matrice augmente avec la lipophilie, diminuant ainsi leur biodisponibilité. L'adsorption des HAP sur les particules de sol est notamment plus forte lorsque pour les HAP de haut poids moléculaire (Moody et al. 2011). La biodisponibilité du Pyr ($\text{Log}_{\text{Kow}} = 4,88$) est réduite d'un facteur 24 par l'huile de lubrification, tandis que la migration de l'acénaphène ($\text{Log}_{\text{Kow}} = 3,98$) est uniquement divisée par 4 (Sartorelli et al. 1999). La capacité des HAP à diffuser passivement à travers la peau diminue lorsque le poids moléculaire augmente (Hopf et al. 2018; Ng et al. 1992; Sartorelli et al. 2001; VanRooij et al. 1995), induisant un effet de premier passage plus important. L'étude de l'absorption du Phe ($\text{Log}_{\text{Kow}} = 4,45$), du Pyr ($\text{Log}_{\text{Kow}} = 4,88$) et du B[a]P ($\text{Log}_{\text{Kow}} = 6,06$) par des explants de peau de cochon d'inde sans poils montre que 78%, 57% et 37% de la dose sont respectivement absorbés après 24h. Environ 10% de la quantité absorbée de Phe et de Pyr correspond à des métabolites, alors que ce chiffre atteint 30% pour le B[a]P (Ng et al. 1992; Ng et al. 1991).

Les procédures de décontamination après une activité professionnelle et l'état de la peau modulent également l'absorption cutanée des HAP. En effet, l'absorption du B[a]P augmente lors du nettoyage de la peau animale avec de l'eau savonnée. Ce phénomène, appelé « washing effect », indique une perturbation du réservoir cutané par l'application de détergent (Moody et al. 1995). Les stress mécaniques environnementaux altèrent la structure de la peau (irritation, plaie, assèchements, griffures...), perturbent la barrière cutanée et augmentent l'absorption cutanée (Jakasa et al. 2015; Surber et al. 1990).

Enfin, l'absorption des HAP par la peau semble relativement homogène entre zones anatomiques (VanRooij et al. 1993c), contrairement à d'autres substances pour lesquelles l'absorption varie de manière considérable (Feldmann and Maibach 1967).

V.1.2. UV et diffusion des HAP à travers la peau

Une seule étude s'est récemment intéressée aux effets des rayonnements UV sur la diffusion passive des HAP (Hopf et al. 2018). Des explants *ex vivo* de peau abdominale de 800 μm d'épaisseur, prélevés sur 5 donneurs, sont placés dans des cellules de Bronaugh perfusées avec une solution

saline supplémentée en Brij (6%), détergent non-ionique. La peau (1,77 cm²) est alors exposée à un mélange synthétique constitué de Naph, anthracène (Ant), Pyr, chrysène (Chr) et B[a]P ([HAP] individuelle = 5000 ng/μL) ou à un extrait de fumée de bitume (50 ≤ [HAP] individuelle ≤ 260 ng/μL) appliqués dans 60 μL d'acétone et irradiés avec 60 mJ/cm² (6 SED) (90,5% d'UVA et 9,5% d'UVB).

Lors de l'exposition au mélange synthétique, la vitesse de pénétration augmente pour l'Ant, le Pyr et le Chr après irradiation, tandis qu'elle est divisée par 2 pour le Naph et le B[a]P. Inversement, la vitesse de pénétration du Naph est multipliée par 4 en cas de traitement simultané à l'extrait de fumée de bitume et d'irradiation. Toutefois, ces résultats ne sont pas significatifs et sont dispersés. De plus, les niveaux mesurés pour les HAP de plus haut poids moléculaire semblent être en limite de détection analytique après application de l'extrait de fumée de bitume. Il sera donc important de confirmer les résultats de cette étude.

V.2. Métabolisme, cancérogénicité des HAP et impact des UV

La phase de distribution des xénobiotiques dans l'organisme précède classiquement le métabolisme lors de la description de la toxicocinétique. De par son important effet de premier passage, l'absorption cutanée des HAP est un cas particulier car elle génère localement des dérivés réactifs toxiques des HAP tandis que seule une faible fraction des HAP parents cancérogènes atteint la circulation systémique. L'irradiation de la peau par les UV antérieure ou concomitante à l'exposition aux HAP pourrait accentuer le métabolisme de manière synergique (paragraphe III.3.2) ou déclencher d'autres réactions toxiques. Après distribution dans l'organisme, une nouvelle phase de biotransformation des HAP ou des métabolites au sein des organes cibles tels que le foie et les reins n'est pas à exclure (IARC 2010).

V.2.1. Métabolisme, bioactivation et génotoxicité des HAP

Hautement lipophiles, les HAP diffusent à travers les membranes cellulaires et s'accumulent dans le cytoplasme sans emprunter les systèmes de transport membranaires. Les HAP natifs ou parents sont chimiquement stables et ne possèdent en réalité qu'une faible réactivité intrinsèque (Boström et al. 2002). Lors du métabolisme (paragraphe II.2.3.1 sur les généralités sur le métabolisme des xénobiotiques), les HAP sont activés en espèces réactives électrophiles capables d'interagir avec les macromolécules cellulaires dont l'ADN ou les protéines et acquièrent ainsi leur pouvoir cancérogène (Xue and Warshawsky 2005). Le métabolisme des HAP, extrêmement complexe, produit une grande variété d'espèces chimiques (diol-époxydes, dihydrodiols, phénols, quinones, hydroquinones, triols, tetraols...). A ce jour, l'ensemble des métabolites des HAP n'ont pas encore

été identifiés, même pour le B[a]P dont la biotransformation a intensivement été étudié sur de nombreux modèles cellulaires et animaux (IARC 2010).

D'après la littérature scientifique, la bioactivation des HAP se déroule majoritairement selon trois principales voies métaboliques : la voie du diol-époxyde, la voie du radical cation et la voie de l'ortho-quinone (Moorthy et al. 2015).

V.2.1.1. Phases de fonctionnalisation

V.2.1.1.1. Voie du diol-époxyde

Etudiée depuis des décennies, l'activation métabolique des HAP en diol-époxydes est la voie de bioactivation la mieux caractérisée car elle génère des intermédiaires électrophiles capables de se lier de manière covalente à l'ADN. Elle est considérée comme la principale voie métabolique cancérogène pour de nombreux HAP (Moorthy et al. 2015; Xue and Warshawsky 2005).

De façon comparable aux autres voies métaboliques, la voie du diol époxyde dépend essentiellement de l'oxydation du squelette carboné des HAP par les CYP450. Les CYP450 constituent la principale catégorie d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et intègrent à ce jour 17 familles (Shimada and Fujii-Kuriyama 2004). Les CYP1A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2W1, 3A4 appartenant aux familles 1, 2 et 3 explicitent une activité métabolique envers les HAP, cependant la bioactivation des HAP repose principalement sur les CYP1A1, 1A2 et 1B1. Comparativement, la vitesse de formation des principaux diols-époxydes des HAP par le CYP1A2 est inférieure à celle par les CYP1A1 et 1B1. Certains résultats contradictoires suggèrent l'implication du CYP1A1 dans la détoxification et la protection contre les HAP, plutôt que dans la bioactivation, mais ces hypothèses nécessitent d'être étayées (Nebert et al. 2004; Shimada 2006). *In vitro*, l'activité catalytique du CYP1B1 est supérieure à celle du CYP1A1 après expression par *Escherichia Coli* et purification, mais inférieure après expression des CYP450 par des cellules eucaryotes (Kim et al. 1999; Shimada et al. 1996).

Trois réactions enzymatiques successives sont nécessaires pour générer un diol-époxyde électrophiles au niveau des régions de Bay, pseudo-régions de Bay ou régions de Fjord (Perin-Roussel et al. 1983; Xue and Warshawsky 2005). Lors de la première étape, un CYP450 catalyse la formation d'un groupement époxyde (ou arène oxyde) par oxydation d'une double liaison carbonée. Instable, l'époxyde produit est ensuite hydrolysé en dihydrodiol (= diol) de conformation *trans* par une EH. Finalement, un deuxième CYP450 oxyde la double liaison adjacente à la fonction *trans*-diol pour former un diol-époxyde vicinal (Xue and Warshawsky 2005).

La voie du diol-époxyde est une voie de bioactivation complexe. Pour chaque diol-époxyde, il existe plusieurs isomères dont la réactivité dépend de la position du groupement époxyde au niveau de la région de Bay, mais également plusieurs stéréoisomères d'activités variables pour chacun des isomères (Xue and Warshawsky 2005). Concernant le B[a]P (Figure 19), la formation de l'époxyde vicinale sur le B[a]P-7,8-*trans*-dihydrodiol (B[a]P-7,8-diol) en position 9,10- donne le B[a]P-7,8-*trans*-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE), l'isomère cancérigène ultime du B[a]P (Boström et al. 2002; IARC 2010; Xue and Warshawsky 2005). Lors de la bioactivation du B[a]P, l'inversion des fonctions diol et époxyde aboutit à la formation du reverse-BPDE. Les reverse-diol-époxydes ne sont généralement pas des cancérigènes puissants. Le reverse-BPDE subit une conjugaison au glutathion par les GST sur culture primaire d'hépatocytes, alors que celle du BPDE est limitée (Upadhyaya et al. 2010).

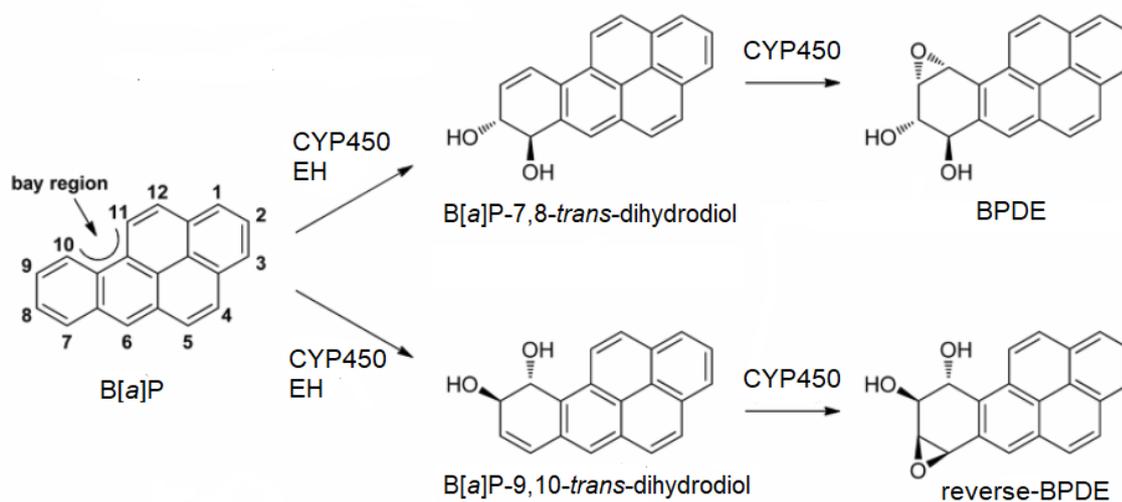


Figure 19. Cascade simplifiée de la biotransformation du B[a]P en BPDE (benzo[a]pyrène-7,8-*trans*-dihydrodiol-9,10-époxyde) et en reverse-BPDE. Adapté d'après (Hecht et al. 2010). B[a]P : benzo[a]pyrène. CYP450 : cytochrome P450. EH : époxyde hydrolase.

Les CYP450 et les EH possèdent une forte stéréosélectivité et génèrent des stéréoisomères des diol-époxydes. Ainsi, la voie du diol-époxyde produit 4 stéréoisomères du BPDE (Figure 20). L'hydrolyse du B[a]P-7,8-époxyde par les EH microsomiales ne forme que du B[a]P-7,8-diol : le B[a]P-7R,8R-dihydrodiol, majoritaire, et le B[a]P-7S,8S-dihydrodiol, minoritaire. Le B[a]P-7R,8R-dihydrodiol est ensuite principalement converti en B[a]P-7R,8S,9S,10R-dihydrodiol-époxyde, le diol-époxyde majoritaire du B[a]P et stéréoisomère du BPDE ayant la cancérigénicité la plus élevée. Le B[a]P-7S,8S-dihydrodiol forme le B[a]P-7S,8R,9S,10R-dihydrodiol-époxyde de manière quasi exclusive (Xue and Warshawsky 2005).

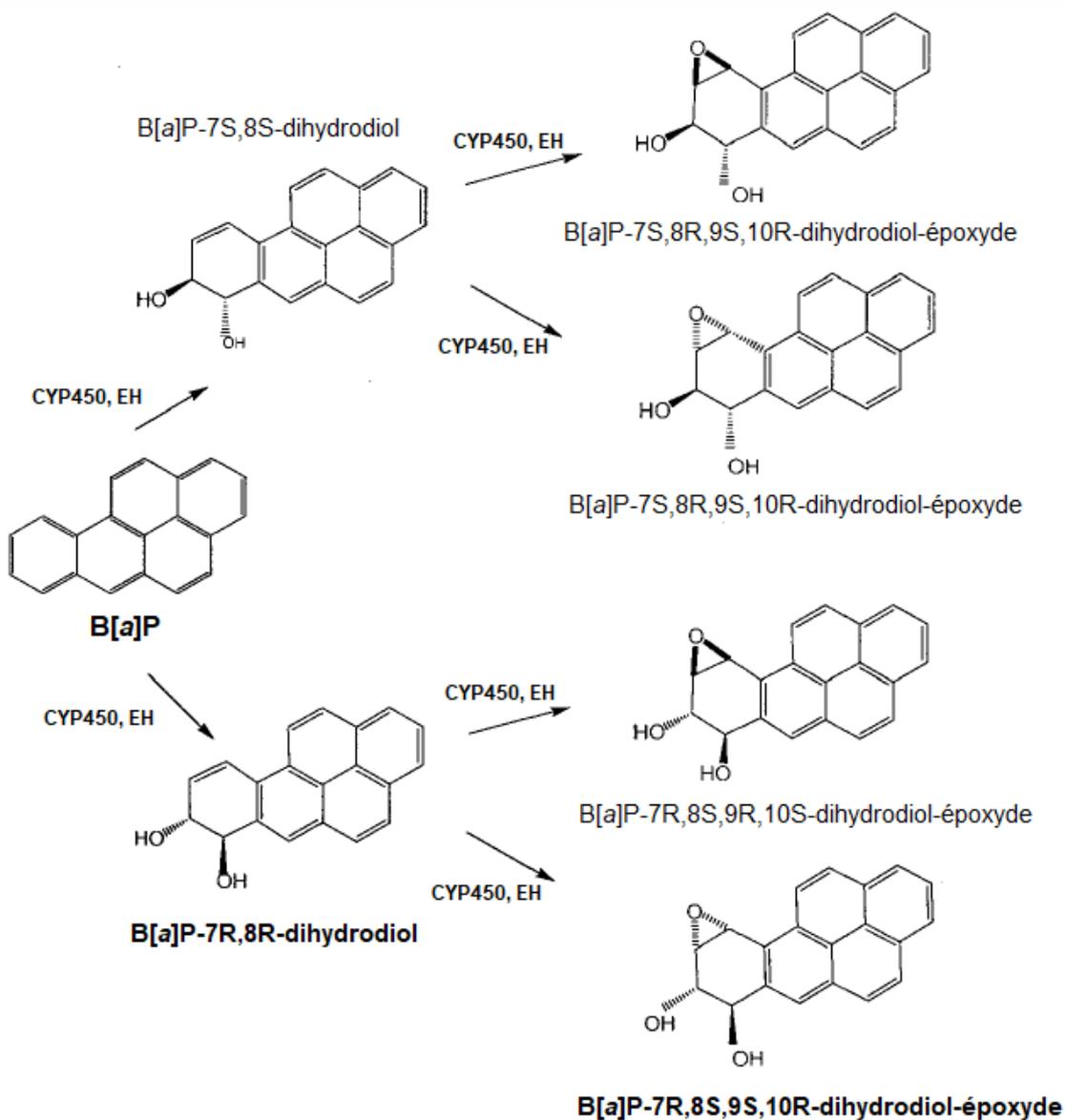


Figure 20. Schéma récapitulatif de la formation des 4 stéréoisomères du BPDE (Benzo[a]pyrène-7,8-*trans*-dihydrodiol-9,10-époxyde). Adapté d'après (Baird et al. 2005). B[a]P : benzo[a]pyrène. CYP450 : cytochrome P450. EH : époxyde hydrolase.

Les diol-époxydes peuvent ensuite réagir avec les résidus exocycliques des guanines ou d'adénines et former des adduits covalents à l'ADN, ou être hydrolysés par hydratation de l'époxyde et former les différents énantiomères du 7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydroB[a]P (B[a]P-tétraol) (Baird et al. 2005; Xue and Warshawsky 2005). La réactivité relative des diol-époxydes avec les deux purines dépend de la structure chimique développée du HAP. Par exemple, les diol-époxydes du B[a]P, de structure relativement plane de par sa région de Bay, se lie préférentiellement à la désoxyguanosine (dG). Inversement, les HAP non planaires interagissent principalement avec la désoxyadénosine (dA). Au moment de la liaison à la dG ou la dA, la fonction époxyde du diol-époxyde peut s'ouvrir en conformation *cis* ou *trans*. Tandis que le B[a]P-7R,8S,9S,10R-dihydrodiol-époxyde produit des adduits en conformation *trans* avec la dG ou la dA, le B[a]P-

7S,8R,9S,10R-dihydrodiol-époxyde se lie conformation *cis* avec la dG et en conformation *trans* avec la dA (Xue and Warshawsky 2005). La conformation des adduits à l'ADN détermine la persistance, la faculté du système enzymatique de réparation de l'ADN à identifier la lésion, soit la capacité de l'adduit à engendrer une mutation (Baird et al. 2005).

V.2.1.1.2. Voie du radical cation

La voie du radical cation repose sur l'activation des HAP par les peroxydases, telle que la prostaglandine H synthase et de certaines CYP450 dotées d'une activité peroxydase (IARC 2010; Moorthy et al. 2015). La première étape consiste à l'extraction d'un électron du système électronique π des HAP par oxydation d'un unique électron (Figure 21).

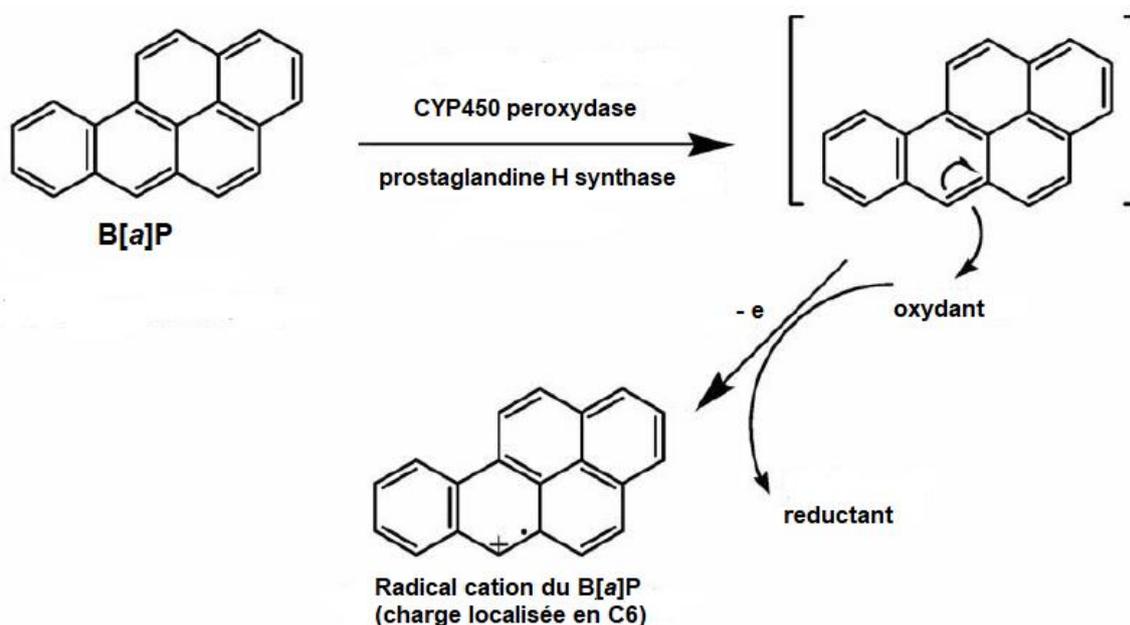


Figure 21. Exemple de la voie métabolique du radical cation pour le B[a]P (benzo[a]pyrène). Adapté d'après (Xue and Warshawsky 2005). CYP450 : cytochrome P450.

La propension d'un HAP parent à subir cet enchaînement de réactions chimiques dépend de plusieurs facteurs ainsi que des conditions de réaction (Xue and Warshawsky 2005). La charge positive du radical cation doit être localisée à une certaine position du squelette carboné pour que l'efficacité réactionnelle et la configuration géométrique de la molécule permette la liaison covalente avec les centres nucléophiles des macromolécules cellulaires (Cavalieri and Rogan 1992). Pour le B[a]P, la charge est majoritairement localisée sur le carbone C₆ (Cremonesi et al. 1989). De plus, il est généralement considéré que le potentiel d'ionisation moléculaire d'un HAP doit être inférieur 7,35 eV pour que l'abstraction d'un électron se fasse en conditions biologiques et forme un radical cation relativement stable (Cavalieri and Rogan 1992; Xue and Warshawsky 2005). A titre

d'exemple, le potentiel d'ionisation du B[a]P et du DB[a,h]A deux HAP cancérigènes, sont respectivement de 6,97 et 7,23 eV (Xue and Warshawsky 2005).

Les radicaux cations des HAP générés sont extrêmement réactifs et génèrent immédiatement des adduits à l'ADN stables et instables. Les adduits à l'ADN instables se forment par liaison du radical cation en position N7 des dG et N3 ou N7 des dA. Chimiquement instables, ces adduits dépurinants rompent la liaison glucosidique des bases formant des sites abasiques qui constituent le principal dommage à l'ADN produit au cours de la voie du radical cation (Xue and Warshawsky 2005). Alors que la voie du radical cation représente 80% des adduits à l'ADN au B[a]P formés par des microsomes de rat *in vitro* (Cavalieri and Rogan 1992), l'abstraction d'un seul électron ne semble être qu'un mécanisme de bioactivation mineur ne comptant que pour une fraction limitée des adduits totaux formés *in vivo* (Xue and Warshawsky 2005).

V.2.1.1.3. Voie de l'ortho-quinone

A l'instar de la voie du diol-époxyde, la voie de l'ortho-quinone débute par l'addition d'un groupement époxyde catalysé par les CYP450 et son hydrolyse en *trans*-dihydrodiol par une EH (Figure 22). Le *trans*-dihydrodiol formé est oxydé en cétole par une dihydrodiol déhydrogénase, et plus précisément les aldo-keto réductases (AKR) dans le cas des HAP, nécessitant le NADP⁺ en tant que cofacteur. Le cétole subit un réarrangement moléculaire pour former un catéchol par tautomérisation (Penning 2014). Du fait de la régiosélectivité des AKR, seuls les *trans*-dihydrodiols n'étant pas localisés sur une région K des HAP intègrent la voie de l'ortho-quinone (Palackal et al. 2001). Le catéchol formé réagit spontanément deux oxydations mono-électroniques successives produisant une o-semiquinone, puis une o-quinone. Ces deux étapes d'oxydation l'oxygène moléculaire et génère des ERO dont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) au cours de la première réaction et l'anion superoxyde (O₂⁻) lors de la seconde (Penning 2014).

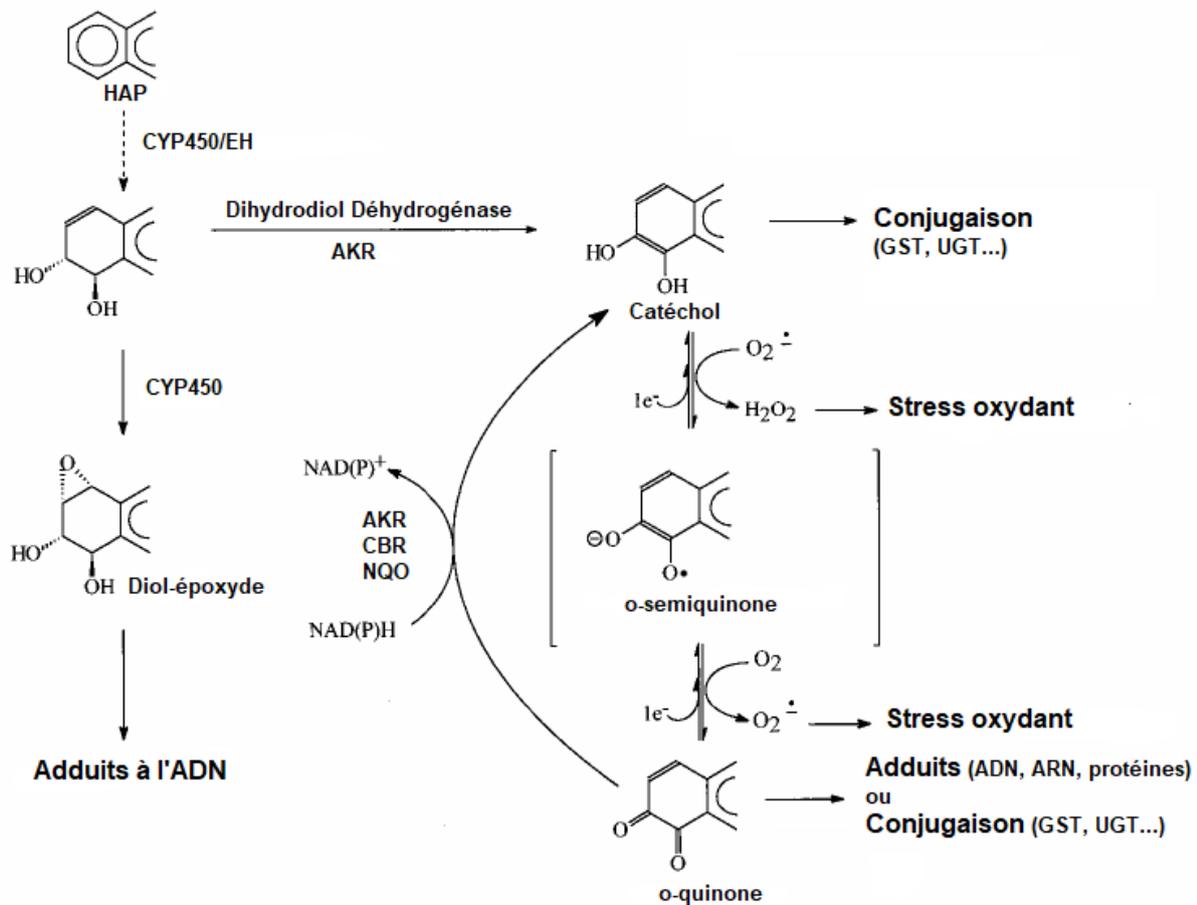


Figure 22. Schéma simplifié de la voie métabolique de l'ortho-quinone. Adapté d'après (Burczynski and Penning 2000). CYP450 : cytochrome P450. EH : époxyde hydrolase. AKR : aldo-kéto réductase. CBR : carbonyl réductase. NQO : (NAPDH):quinone oxydoréductase. GST : glutathion S-transférase. UGT : UDP glucuronidetransférase.

Les ERO sont responsables d'un stress oxydant à l'origine de la peroxydation lipidique dont l'une des conséquences est la déstabilisation des membranes cellulaires (Halliwell and Chirico 1993), mais les ERO sont également responsables de dommages à l'ADN (Park et al. 2006).

Les o-quinones sont électrophiles et extrêmement réactives envers les centres nucléophiles endogènes. Leur conjugaison spontanée avec des groupements thiols cellulaires ou leur interception par les enzymes de phase 2 mènent à leur élimination de la cellule (Zhang et al. 2012). Cependant, leur interaction avec l'ADN induit la formation d'adduits stables et d'adduits instables dépurinants (HAP o-quinone-N7-déguanosine) impliqués dans les processus de mutagénèse (McCoull et al. 1999). En outre, les o-quinones peuvent également de nouveau être réduites en catéchol et ainsi entrer dans un cycle d'oxydo-réduction amplifiant la production d'ERO. La réduction en catéchol est à la fois catalysée par des systèmes non-enzymatiques (CuI/CuII) ou enzymatiques (AKR, NQO...) consommateur de NADPH. A l'origine, la réduction de la quinone en hydroquinone (= catéchol) semble bénéfique car l'hydroquinone peut être pris en charge par les enzymes de phase 2, protégeant ainsi du stress oxydant des quinones (Zhang et al. 2012). Cependant, si les capacités cellulaires de conjugaison sont submergées (Zhang et al. 2012), ces cycles d'oxydo-réduction se

perpétuent jusqu'à déplétion des cofacteurs enzymatiques nécessaires à la physiologie de la cellule ou interception par les systèmes de détoxification (Park et al. 2005; Penning 2014).

La réduction des o-quinones en catéchol implique plusieurs iso-enzymes de différentes familles enzymatiques. Parmi les AKR, AKR1A1 est stéréosélective et ne métabolise que certains stéréoisomères à l'exemple du (-)-B[a]P-7(R),8(R)-dihydrodiol, majoritaire *in vivo*. A l'inverse, AKR1B10, surexprimée dans certains cancers du poumon à larges cellules, n'oxyde que le (+)-B[a]P-7(R),8(R)-dihydrodiol, un isomère mineur. Les sous-familles AKR1C1-AKR1C4 sont moins sélectives et métabolisent des mélanges racémiques de ces stéréoisomères. En plus des AKR, cette étape de transformation des o-quinones en catéchol implique la NQO1 et deux isoenzymes de la famille des carbonyl réductases (CBR), CBR1 et CBR3 (Zhang et al. 2012).

La toxicité intrinsèque des o-quinones décroît lorsque le nombre de cycles aromatiques augmente. La quantité de 8-oxo-dG formée *in vitro* par oxydation d'ADN isolé de plusieurs o-quinone et dépend de la vitesse du cycle d'oxydo-réduction : naphthalène-1,2-dione > benzo[a]anthracène-3,4-dione > diméthylbenzo[a]anthracène-3,4-dione > B[a]P-7,8-dione (Park et al. 2005). *In vitro*, les résultats de McCoull *et al.* suggèrent également que la réactivité des o-quinones avec l'ADN diminue lorsque le nombre de cycles aromatiques augmente (McCoull et al. 1999).

V.2.1.1.4. Voie des métabolites hydroxylés

La voie des phénols est initiée par l'addition d'un époxyde par les CYP50 (Shimada 2006), le devenir de l'époxyde dépend ensuite de sa stabilité chimique. Les époxydes localisés sur les régions moléculaires M sont extrêmement labiles et subissent des réarrangements non-enzymatiques spontanés en phénols se faisant préférentiellement dans une direction, tandis que les autres époxydes peuvent être hydratés en *trans*-dihydrodiols par les EH. Par exemple, les époxydes en positions 1,2- et 2,3- du B[a]P donnent respectivement les 1-hydroxyB[a]P et 3-hydroxyB[a]P (3-OHB[a]P) (Figure 23). Le B[a]P-4,5-époxyde, très stable, est métabolisé en B[a]P-4,5-*trans*-dihydrodiol par les EH. Inversement, les 7,8- et 9,10-époxyde du B[a]P s'hydrolyse en 7- et 9-hydroxyB[a]P, mais forment également les B[a]P-7,8-diol et B[a]P-9,10-*trans*-dihydrodiol (Harvey 1981).

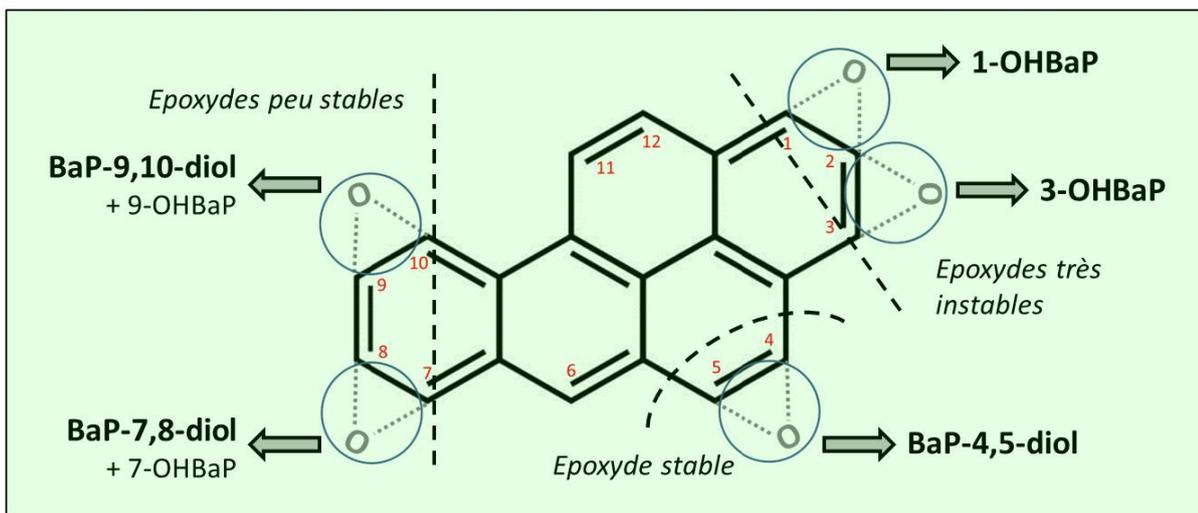


Figure 23. Schéma d'illustration de la voie des métabolites hydroxylés du benzo[a]pyrène. D'après (Barbeau 2013).

Par conséquent, la voie des métabolites hydroxylés est fréquemment considérée comme la voie métabolique de détoxification des HAP. A l'instar des autres voies métaboliques, c'est néanmoins au cours de la conjugaison par les enzymes de phase 2 que ces intermédiaires métaboliques sont définitivement inactivés. *In vitro*, le 9-hydroxyB[a]P est métabolisé en 9-hydroxy-*trans*-4,5-dihydrodiolB[a]P par les systèmes microsomaux et *in fine* se lie à l'ADN de manière covalente en absence d'enzymes de conjugaison (King et al. 1976). Par ailleurs, les triols formés par biotransformation ultérieure des phénols sont impliqués de manière non-négligeable dans l'activation métabolique et la formation des principaux adduits à l'ADN de certains HAP dont le Chr et le B[b]F (Hodgson et al. 1983; Weyand et al. 1993b).

Un autre exemple de l'implication des phénols dans l'activation métabolique des HAP est la voie du radical cation. Le B[a]P est d'abord converti en radical cation par peroxydation en position C₆ par la prostaglandine H synthase ou les CYP450 (IARC 2010; Moorthy et al. 2015). Le radical cation ainsi formé peut interagir avec les cibles cellulaires comme précédemment décrit mais peut également être métabolisé en 6-hydroxyB[a]P (6-OHB[a]P). Cette étape de conversion du radical cation en 6-OHB[a]P est relativement mal connue. Une hypothèse repose sur un mécanisme de transfert d'oxygène activé par les CYP450 en position C₆ du B[a]P (Cavalieri et al. 1988). Le 6-OHB[a]P est ensuite converti en B[a]P-1,6-dione, B[a]P-3,6-dione et B[a]P-6,12-dione par les CYP450 (Cavalieri et al. 1988; Harvey 1981; Lesko et al. 1975). Enfin, ces quinones sont réduites en hydroquinones par la NQO, générant des ERO, ou subissent une conjugaison par les enzymes de phase 2 (IARC 2010).

V.2.1.2. Phase de conjugaison

La phase de fonctionnalisation génère de nombreux intermédiaires métaboliques électrophiles toxiques dont la majorité est inactivée après interception par les enzymes de conjugaison. Les enzymes de détoxification de phase 2, comprenant notamment les UGT, les SULT et les GST (IARC 2010), greffent sur les métabolites activés des groupements (acide glucuronique, sulfate, glutathion...) afin d'en augmenter le caractère hydrosoluble ainsi que le poids moléculaire.

Les composés les plus électrophiles et donc réactifs tels que les quinones, les arènes oxydes ou les diol-époxydes sont rapidement conjugués au glutathion de manière spontanée ou après intervention d'une GST (ATSDR 1995; Jernström et al. 1996; Zhang et al. 2012). Les o-quinones peuvent également se lier spontanément au groupement thiol du glutathion libre, de la L-cystéine ou de la N-acétyl-L-cystéine (Zhang et al. 2012). Au cours de la voie de l'o-quinone, les catéchols subissent un cycle d'oxydo-réduction interrompu par transfert d'un sulfate, acide glucuronique ou méthyl par la SULT, l'UGT ou la catéchol-O-méthyltransférase (Penning 2014).

Les *trans*-dihydrodiols, les phénols et les triols, moins réactifs, sont glucuronidés ou sulfatés (ATSDR 1995; IARC 2010). Après conjugaison, les phénols et les *trans*-dihydrodiols constituent des produits majeurs de détoxification *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* (Harvey 1981; Jacques et al. 2010b; Moreau et al. 2015). Les phénols glucuronidés constituent les métabolites majoritaires lors de l'application du B[a]P sur des explants de peau de porc (Jacques et al. 2010b).

V.2.1.3. Phase d'élimination

A cause de leur poids moléculaire et de leur caractère hydrophile, les métabolites de phase 2 ne peuvent plus diffuser passivement à travers la membrane cytoplasmique. Afin de prévenir des effets toxiques dus à leur accumulation dans le cytoplasme, ils doivent être éliminés de la cellule par transport actif, notamment grâce à la famille de transporteurs membranaires ATP binding cassette (ABC). La famille ABC comprend les transporteurs multi drug resistance (MDR), multidrug resistance protein (MRP) et la breast cancer resistance protein (BCRP) (Figure 24) (Schinkel and Jonker 2003). Sur lignée cellulaire intestinale cancéreuse Caco-2, la BCRP situé au pôle apical reflux les conjugués sulfatés et glucuronidés de 1-hydroxypyrene (1-OHP) et 3-OHB[a]P à l'intérieur de la lumière intestinale (Ebert et al. 2005; Hessel et al. 2013). Après ajout d'inhibiteurs spécifiques des transporteurs MDR1, MRP1 et MRP2, Buesen *et al.* observent toujours le transport des métabolites du B[a]P suggérant l'implication d'une grande diversité de canaux dans le transport des HAP au niveau de la barrière intestinale (Buesen et al. 2003).

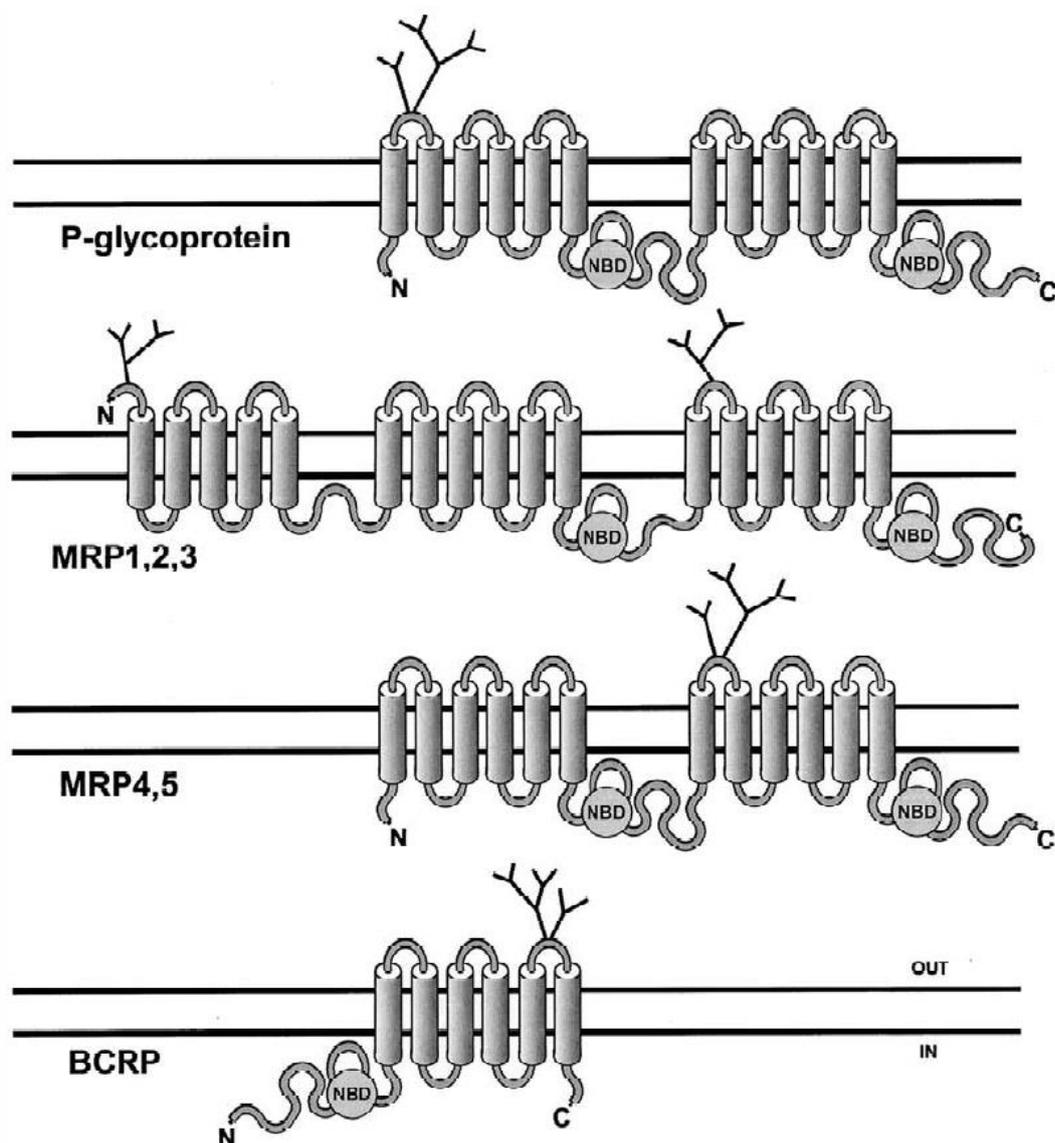


Figure 24. Structure des transporteurs membranaires de la famille ABC (ATP binding cassette). D'après (Schinkel and Jonker 2003). P-glycoprotein°: Multi Drug Resistance 1 (MDR1). MRP : multidrug resistance protein. BDRP : breast cancer resistance protein.

Le rôle de ces transporteurs membranaires ne semble pas s'arrêter à une simple évacuation des métabolites conjugués de la cellule. Lorsque l'élimination des conjugués du BPDE au glutathion par le MRP2 diminue par ajout d'un inhibiteur spécifique, les adduits à l'ADN au BPDE s'accumulent sur lignée épithéliale rénale de canidé (Srivastava et al. 2002). Similairement, le MRP4 élimine le B[a]P-7,8-diol des cellules humaines broncho-alvéolaires H358 avant sa conversion en BPDE ou son entrée dans la voie de l'ortho-quinone (Gelhaus et al. 2012). Les résultats de Myllynen *et al.* sur lignée cancéreuse de sein MCF-7 suggère une implication des transporteurs d'efflux MDR1, MRP1 et MRP2 (Myllynen et al. 2007).

Dans le tissu cutané, les MRP1, MRP2 et MRP4 sont modérément à fortement exprimés, tandis que l'expression des MDR1 et BCRP est faible (Takenaka et al. 2013). L'implication de ces

transporteurs dans l'élimination du cytoplasme des HAP et des métabolites par les kératinocytes reste néanmoins à démontrer.

V.2.2. Modulation de l'expression des systèmes de détoxification par les HAP

Après diffusion passive à travers la membrane plasmique, les HAP se fixent des facteurs de transcription cytoplasmiques, tels que l'AhR, et activent ces « capteurs » cellulaires responsables de la régulation de plusieurs douzaines de gènes. Les indoles et les dérivés de tryptophane sont des ligands endogènes de l'AhR, mais de nombreux xénobiotiques (dioxines...) possèdent également une grande affinité envers ce récepteur cellulaire (Nebert et al. 2004). L'AhR régule l'activation de plusieurs dizaines de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose (la mort cellulaire génétiquement contrôlée et programmée) et les systèmes de détoxification dont les CYP1A1, 1A2, 1B1 et les enzymes de conjugaison (Labib et al. 2016; Nebert et al. 2004). En outre, l'AhR régule l'expression de certains systèmes d'efflux à l'exemple du MRP4 (Xu et al. 2010).

L'AhR réside dans le cytoplasme où il interagit avec la protéine chaperonne heat shock protein 90 (hsp90) et l'AhR interacting protein (AIP). L'association de l'AhR à hsp90 maintiendrait l'AhR dans une conformation permettant la fixation des ligands, tandis que la combinaison à l'AIP pourrait influencer la liaison du ligand et/ou la translocation de l'AhR. Après fixation d'un ligand, l'AhR transloque dans le noyau où il se dimérise avec l'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). Une fois ce facteur de transcription complet, il contient des motifs protéiques (hélices, boucles) particuliers lui permettant de se fixer sur les xenobiotic response elements (XRE) contenus dans la séquence promotrice de nombreux gènes et notamment d'activer les gènes codant pour les enzymes du métabolisme des xénobiotique (Figure 25) (James P. Whitlock 1999).

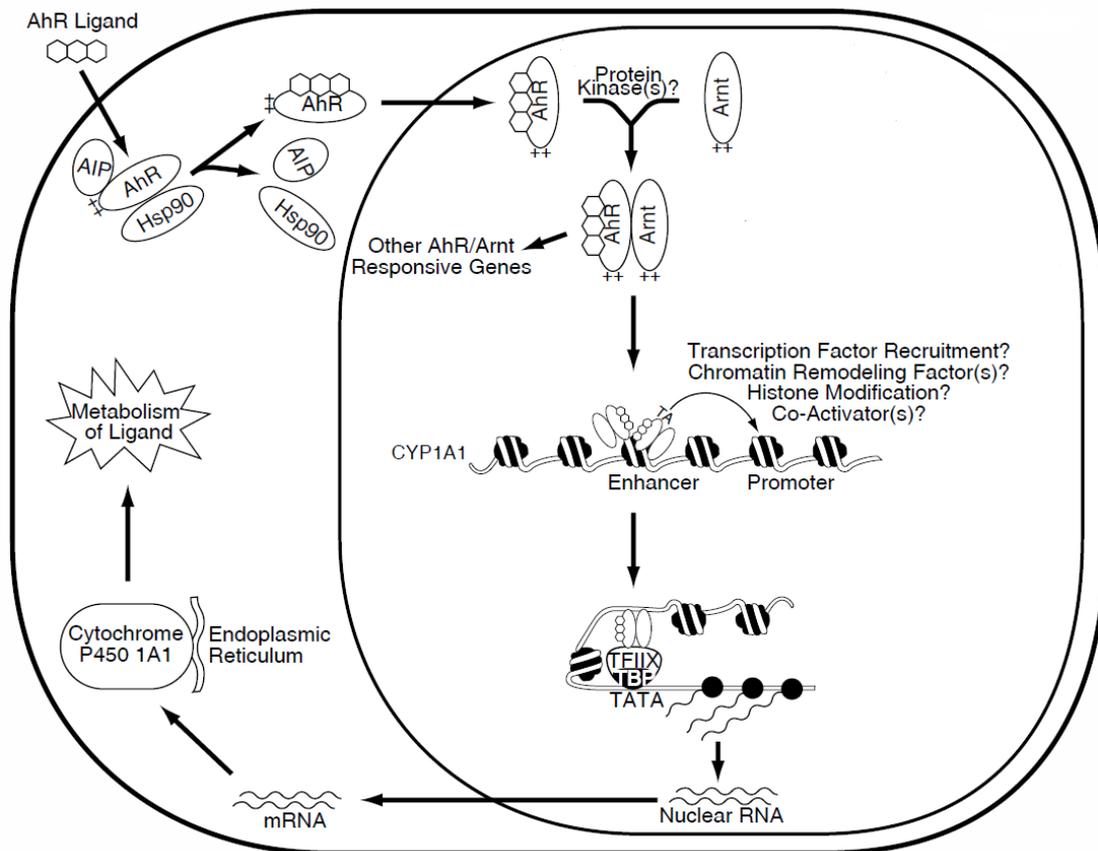


Figure 25. Modulation de l'expression enzymatique par les HAP via la voie du facteur de transcription AhR (aryl hydrocarbon receptor). Adapté d'après (James P. Whitlock 1999). Hsp90: heat shock protein 90. AIP: AhR interacting protein. Arnt: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. CYP1A1: cytochrome P450 1A1.

Après expression de ces enzymes dont les CYP450, les HAP localisés dans le cytoplasme sont biotransformés en intermédiaires métaboliques capables de se lier à l'AhR. Ainsi, le B[a]P-7,8-dione généré par les AKR active l'AhR et induit l'expression du CYP1A1 (Burczynski and Penning 2000). De même, les quinones du benzo[a]anthracène (B[a]A) et du Chr induisent l'expression de CYP1A1 et 1B1 par la lignée de kératinocytes humains HaCaT. Cependant, certains de ces métabolites oxygénés sont également des inhibiteurs de l'activité enzymatique du CYP1A1 (Wincent et al. 2016).

L'activité de l'AhR est soumise au rétrocontrôle d'un répresseur TCDD-inducible poly-ADP-ribose polymérase (TIPARP). Suite à l'activation par les HAP, l'AhR est recruté au niveau du XRE du promoteur de TIPARP et induit l'expression du répresseur dont le mode d'action est encore méconnu (Grimaldi et al. 2018; Líbalová et al. 2014).

L'impact des HAP sur les voies de transduction du signal et l'expression des enzymes de détoxification ne se limite pas à la voie de l'AhR. Au niveau hépatique, le Pyr est capable d'induire l'expression du CYP1A2 et de SULT1A1 par le biais du constitutive androstane receptor (CAR) (Lee et al. 2007). De même, les ROS générées au cours du métabolisme oxydatif des HAP active

une cascade de signalisation encore inconnue aboutissant à l'expression cellulaire des AKR (Burczynski et al. 1999). L'activation de l'Ahr est de plus potentialisée par d'autres facteurs de transcription tels que le peroxyome proliferator activated receptor (PAPP α), montrant que la complexité des voies de signalisation cellulaires déclenchées par les HAP, ainsi que leurs interactions, est à ce jour loin d'être élucidée (Fallone et al. 2005).

V.2.3.Cancérogénèse et HAP

V.2.3.1. Mécanisme cancérogènes des HAP

La cancérogénèse est un processus classiquement décrit en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. Elle implique de nombreux mécanismes, depuis l'évènement génotoxique initial, insuffisant pour prédire l'apparition d'un cancer, jusqu'au développement de la tumeur. Certains HAP sont des cancérogènes complets, impliqués au moins dans l'initiation et la promotion tumorale par exposition répétée (Baird et al. 2005; Boström et al. 2002). L'initiation de la cancérogénèse est fréquemment attribuée aux métabolites réactifs des HAP, tandis que les mécanismes de promotion sont imputés aux HAP parents notamment par liaison à l'Ahr (Sjögren et al. 1996). Néanmoins, certains métabolites tels que les o-quinones sont également des ligands de l'Ahr, et par conséquent pourraient également être impliqués dans les mécanismes de promotion tumorale (Penning 2017).

L'initiation tumorale nécessite le succès de plusieurs évènements clefs successifs. Dans le cas d'une cancérogénèse chimique due aux HAP, les intermédiaires métaboliques causent tout d'abord des lésions à l'ADN (cassures, adduits dommages oxydatifs, sites abasiques...) sans seuil de dose, dont la nature dépend de l'espèce chimique réactive (paragraphes V.2.1.). A l'exception d'une élimination de la cellule de l'organisme par mort cellulaire (apoptose...), les lésions non-réparées causées par ces agents s'inscrivent irréversiblement dans le génome sous la forme de mutations après répllication de l'ADN (Boström et al. 2002).

Après attaque électrophile de l'ADN par les diol-époxydes, les adduits covalents sont repérés et pris en charge par différents mécanismes de réparation de l'ADN. Les adduits covalents à l'ADN tels que ceux formés par le BPDE sont éliminés par exclusion nucléotidique, tandis que les adduits dépurinants du B[a]A et du B[b]F sont réparés par des mécanismes d'excision de base nucléique. La mutagénicité de la lésion induite dépend ainsi de sa persistance au sein du génome, autrement dit d'un équilibre entre la formation et la réparation des lésions (Braithwaite et al. 1998). L'efficacité de la réparation est modulée par la conformation de l'adduit, rigide et planaire en cas de d'adduit issu région de Bay ou entortillé et entravant si l'adduit provient d'une région de Fyord, influençant la faculté des enzymes à identifier la lésion (Wu et al. 2002). Lors de la répllication de l'ADN, les

erreurs de lecture des adduits au BPDE par les ADN polymérases engendrent des transversions $G \rightarrow T$ ou $G \rightarrow C$, de manière tributaire de l'ADN polymérase impliquée et de la stéréochimie de l'adduit (Zhang et al. 2002). Les ERO générées par le métabolisme des HAP au cours de la voie de l'o-quinone provoquent des cassures simples ou doubles brins de la molécule d'ADN. Les ERO proviennent par ailleurs des cycles d'oxydo-réduction des o-semi-quinones ou des o-quinones intercalées entre les bases de l'ADN. Après attaque des nucléotides par les ERO, les réarrangements moléculaires engendrés aboutissent à la rupture de la liaison phosphodiester et la cassure de l'un ou des brins d'ADN (Penning 2017). La cellule met alors en œuvre des mécanismes de réparation par recombinaison homologue ou non-homologue, pouvant être des sources d'erreur (Iliakis et al. 2004; Muñoz and Albores 2011; Tung et al. 2014).

Les ERO sont également responsables d'autres dommages oxydatifs de la liaison d'ADN, dont 22 bases oxydées identifiées à ce jour, parmi lesquelles la 8-oxo-dG constitue le produit d'oxydation majoritaire. En fonction du mécanisme de réparation mis en œuvre, la 8-oxodG peut produire des sites abasiques générant des mutations (transversions $C \rightarrow T$ ou transversions $G \rightarrow T$). L'o-quinone forme également des adduits dépurinants par liaisons covalentes à l'ADN. Après fixation en N7 d'une guanine ou N3 d'une adénine, les sites abasiques résultants provoquent respectivement des transversions $G \rightarrow T$ ou $A \rightarrow T$. Le B[a]P-7,8-dione produit en outre des adduits stables à l'ADN. Pour les quinones, les dommages oxydatifs semblent cependant être responsables de la plupart des dommages à l'ADN et le rôle des adduits covalents reste encore à éclaircir (Penning 2017). Pour l'ensemble des HAP, l'initiation tumorale proviendrait plutôt des adduits stables que des sites abasiques (Melendez-Colon et al. 1999).

La cancérogénicité de la mutation dépend de sa localisation dans la molécule d'ADN. Si la mutation est localisée au niveau de gènes proto-oncogènes et suppresseurs de tumeurs impliqués dans la transduction du signal, alors la mutation constitue un évènement clef dans la cancérogénèse (Boström et al. 2002). Les études montrent que les hotspots de la séquence d'ADN de p53, sont des cibles privilégiées des espèces réactives produites par la biotransformation des HAP. Cet acteur protéique est essentiel dans la suppression de tumeur, car il induit l'apoptose ou les mécanismes de réparation en fonction de la gravité des dommages cellulaires. Les adduits au BPDE se forment préférentiellement au niveau des guanines des codons 157, 248 et 273, hotspots majeurs des mutations majeures identifiées dans les cancers du poumon (Denissenko et al. 1996). De même, 25% des mutations provoquées par les ERO sur la séquence d'ADN sont situées au niveau de hotspots, associés à l'inactivation de p53 (Yu et al. 2002). La formation de 8-oxo-dG causée par les ROS contribue aux transversions $G \rightarrow T$ dans les séquences des oncogènes K-ras et p53 (Zhang et al. 2012).

La promotion tumorale, postérieure à l'initiation, correspond à la reprogrammation conférant à la cellule une capacité de prolifération échappant à tout rétrocontrôle. En tant que cancérogènes complets, les HAP ou leurs métabolites sont capables de modifier l'expression génique au niveau de la traduction, de la transcription ou au niveau épigénétique (Boström et al. 2002). Les HAP inhibent notamment la communication intercellulaire via les jonctions gap, essentielles au contrôle de la prolifération cellulaire. Les HAP de bas poids moléculaire tels que le FluA ou le Pyr sont les inhibiteurs les plus puissants, tandis que les HAP de haut poids moléculaire à l'instar du B[a]P ne possèdent qu'au plus un modeste potentiel d'inhibition (Bláha et al. 2002; Weis et al. 1998). Les HAP créent un environnement inflammatoire favorable à l'initiation, la promotion et la progression tumorale. Pour le B[a]P, l'inflammation pourrait être en partie liée à l'activation de la voie de signalisation cellulaire c-Jun N-terminal Kinase (JNK) et de p53 (Dreij et al. 2010). Par ailleurs, le développement spontané de lésions inflammatoires chez des souris transgéniques, modifiées pour exprimer de manière constitutive une forme active de l'AhR, montre l'implication du facteur de transcription dans les processus inflammatoires induits par les HAP (Tauchi et al. 2005). De plus, le traitement de cellules épidermiques de souris C141 avec du BPDE montre une activation de nombreux acteurs cellulaires impliqués dans la division, la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire (Li et al. 2004).

Plus récemment, l'analyse du transcriptome de poumon, le foie et l'estomac de souris exposées par gavage au B[a]P et à 6 autres HAP (B[a]A, B[b]F, B[g,h,i]P, B[k]F, DB[a,h]A, indéno[1,2,3-c,d]pyrène (I[1,2,3-c,d]P), Chr) révèle la modulation de 5 catégories de voies de régulation et de processus impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN, la signalisation cellulaire, la réponse immune et inflammatoire, le métabolisme et l'organisation du cytosquelette. Bien qu'il y ait des similitudes entre HAP, les voies de régulation altérées ainsi que la magnitude de la modification est propre à chaque HAP. Par exemple, le B[a]P altère spécifiquement la signalisation cellulaire dont la voie de l'AhR, l'endocytose, la différenciation, l'ubiquitination (voie de dégradation des protéines cytosoliques), mais aussi des voies de régulation impliquées dans l'échappement à la réponse immunitaire, l'inflammation, la résistance à l'apoptose, l'immortalité répliquative, le métabolisme énergétique ou une prolifération cellulaire soutenue (Labib et al. 2016).

Les HAP semblent également être impliqués dans des processus liés à la progression tumorale, considérée irréversible. L'instabilité du génome s'accroît et évolue vers une croissance maligne autonome échappant à tout contrôle externe et envahissant les tissus environnants. Les HAP activent notamment des voies de signalisation impliquées dans l'invasion, la formation de métastases ou l'angiogénèse (Boström et al. 2002; Labib et al. 2016).

V.2.3.2. Susceptibilité individuelle

La cancérogénicité des HAP repose sur leur activation métabolique en espèce chimique réactive capable de se lier à l'ADN, des processus mutagènes ainsi qu'une réponse tumorale. Pour chaque individu, le risque cancérogène dépend donc d'une balance entre la bioactivation et la détoxification des HAP, de la quantité d'adduit à l'ADN formés et de leur distribution, mais aussi de l'efficacité des processus de réparation de l'ADN. Ainsi, le risque cancérogène de chaque individu face aux HAP, autrement dit la susceptibilité individuelle, dépend de l'efficacité de ces différents processus, entre autre liée au polymorphisme génétique. Au sein d'un individu ou d'une population, les combinaisons d'allèles semblent être des déterminants importants de la susceptibilité individuelle (Boström et al. 2002).

Concernant les enzymes de fonctionnalisation, le risque de cancer du poumon augmente de 53% avec l'allèle de l'EH sur l'exon 4, avec une augmentation significative chez les individus de moins de 64 ans et les fumeurs (Zhao et al. 2002). De même, le risque de cancer du poumon est multiplié par 1,84 chez les porteurs du génotype AKR1C3 Gln-Gln exposés aux émissions de combustion de charbon (Lan et al. 2004). L'allèle CYP1B1*7, intégrant 4 substitutions (Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val et Ala443Gly), se caractérise par une plus faible conversion du B[a]P en B[a]P-7,8-diol comparativement aux variants *1, *2, *3, *4 et *6 (Aklillu et al. 2005). Cependant, le polymorphisme du CYP1B1 n'est pas associé avec une augmentation du risque de cancer de la vessie au sein d'une population italienne fortement exposée aux HAP (Hung et al. 2004). Le risque de carcinome pulmonaire à petites cellules est multiplié par 2,4 lorsqu'au moins un des allèles correspond au variant CYP1A1 Msp1 chez les fumeurs (Marchand et al. 1998).

D'après Bartsch *et al.*, le risque relatif lié au polymorphisme des CYP450 seul est modéré. En revanche, la combinaison de polymorphisme CYP1A1/GSTM1 susciterait un risque de cancer plus élevé (Bartsch et al. 2000). Chez les fumeurs, la combinaison d'une délétion en GSTM1 et du variant CYP1A1 Msp1 génère un risque de cancer du poumon plus élevé que lorsque le polymorphisme du CYP1A1 seul est considéré (Marchand et al. 1998).

Pour les enzymes de phase 2, le risque de cancer de la vessie augmente significativement pour les individus possédant un (odds ratio = 1,82 ; intervalle de confiance à 95% : 1,16 - 2,85) ou deux allèles (odds ratio = 2,58 ; intervalle de confiance à 95% : 1,27 - 5,23) non-fonctionnels des GSTM1 ou GSTT1 comparés aux sujets normaux. Le polymorphisme SULT1A1 Arg213His semble à associé à un effet protecteur modéré (Hung et al. 2004). En outre, le polymorphisme sur l'exon 6 du système de réparation de l'ADN par excision de nucléotide XPD est corrélé avec le nombre d'adduit à l'ADN type « B[a]P » (Binkova et al. 2007).

V.2.4. Problématique des mélanges complexes de HAP

Historiquement, la toxicologie s'est longtemps focalisée sur la caractérisation du risque des xénobiotiques, individuellement ou en combinaisons simples (binaires). Plus aisé dans sa mise en œuvre, cette approche est aujourd'hui supplantée par la considération des effets des mélanges complexes et des interactions entre toxiques, plus proche du risque sanitaire réel. L'étude des mélanges est particulièrement primordiale dans la caractérisation du risque résultant de l'exposition aux HAP, toujours émis en mélanges complexes de compositions et donc de toxicités variables. La cancérogénicité des HAP est un processus comportant de multiples étapes dont l'absorption, la distribution, le métabolisme, la détoxification, l'élimination, les dommages aux macromolécules, les mutations ou les dommages chromosomiques, la réparation à l'ADN, l'altération de l'expression des gènes, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Nesnow et al. 1998). La compréhension et la prédiction de la toxicité des mélanges se révèle donc être un défi conséquent devant la diversité des processus biologiques impliquées, des compositions des mélanges et des interactions possibles entre xénobiotiques (antagonisme, additivité et synergisme) (Jarvis et al. 2014).

De manière théorique, l'additivité de l'action combinée de deux xénobiotiques se définit telle que l'effet toxique final correspond à la somme des effets que ces deux substances auraient indépendamment l'une de l'autre. L'antagonisme se caractérise par un effet toxique combiné plus faible que la somme des effets de deux xénobiotiques pris séparément alors que le synergisme se définit comme un effet plus grand (Reif 1984). Ce dernier effet se produit lorsque chaque cancérogène agit sur une phase différente de la cancérogénèse (Gibb and Chen 1986). Autrement dit, le synergisme apparaît lorsque l'étape limitante dans l'apparition d'un type de tumeur diffère entre deux carcinogènes (Reif 1984).

Pour l'évaluation des risques sanitaires, des approches réglementaires telles que les Relative Potency Factors (RPF) ou les Toxic Equivalency Factors (TEF) sont utilisées afin de caractériser le risque cancérogène relatif aux mélanges complexes de HAP dans diverses matrices (atmosphériques, alimentaires, eaux de surface...) (SCHER et al. 2012). Les TEF constituent un cas particulier de RPF (Backhaus et al. 2010). En pratique, un facteur de pondération théorique est attribué à chaque HAP en fonction de sa toxicité par rapport à celle du B[a]P. Cette approche permet d'estimer et de caractériser la toxicité d'un mélange de HAP par calcul d'une concentration équivalente en B[a]P, également appelé B[a]P équivalent. L'application des TEF nécessite cependant plusieurs conditions : (1) un composé de toxicité relativement bien caractérisée est utilisé comme référence pour l'ensemble de la famille chimique, (2) l'effet toxique doit être qualitativement similaire entre le composé de référence et l'ensemble de la famille toxique, (3) les

TEF sont similaires pour les différents critères de toxicité afin d'assigner les TEF à partir d'un nombre limité de mesures, (4) les effets toxiques combinés des différents composés présents dans le mélange sont additifs (Nisbet and LaGoy 1992).

Ainsi, il est en principe possible d'estimer la cancérogénicité d'un mélange de HAP en quantifiant quelques HAP cancérogènes servant de biomarqueurs. Néanmoins, ces approches sont lourdement remises en question car la représentativité de quelques HAP face à la composition, complexe et extrêmement variable (saison, source...), des mélanges réels est limitée (Jarvis et al. 2014). Toutefois, la caractérisation de la composition des mélanges complexes constitue toujours un challenge en chimie analytique à l'heure actuelle. Il est rare que des HAP substitués, dont la toxicité est parfois très supérieure à celle du B[a]P, soient intégrés à ces biomarqueurs (Andersson and Achten 2015).

En outre, aucune TEF n'est attribué à la majorité des HAP, du fait d'une méconnaissance de leur potentiel cancérogène. De plus, les TEF sont extrêmement disparates pour un même HAP en fonction du système expérimental à partir duquel ils sont calculés. A titre d'exemple, le TEF du DB[a,h]A varie entre 0,1 et 10 suggérant une toxicité 10 fois supérieure ou 10 fois inférieure à celle du B[a]P (Jarvis et al. 2014).

De plus, les critères d'applicabilité de ces approches sont remis en question (Jarvis et al. 2014) :

- **Absence de mécanisme d'action toxique commun à l'ensemble des HAP.** La cancérogénicité des HAP est phénomène complexe impliquant l'initiation et la promotion tumorale. Premièrement, la génotoxicité des HAP provient d'une pluralité de voies de bioactivation et de mécanismes d'action (paragraphe V.2.1 et V.2.3.1) (Boström et al. 2002; IARC 2010; Xue and Warshawsky 2005). Deuxièmement, les mécanismes d'induction de l'expression des enzymes du métabolisme (CYP450, AKR...) diffèrent selon les HAP (Paragraphe V.2.2). De plus, le profil d'expression génique diffère selon les HAP, indiquant des mécanismes de promotion différents (Labib et al. 2016). D'autre part, la génotoxicité des HAP, à l'instar de la quantité d'adduits à l'ADN, n'est pas nécessairement corrélée à la cancérogénicité (Siddens et al. 2012).
- **L'utilisation des TEF ne tient pas compte des interactions toxicologiques entre HAP ou xénobiotiques.** Les TEF reflètent la cancérogénicité relative d'un HAP en rapport au B[a]P, mais ignore d'autres mécanismes tels que la modulation de l'expression des CYP450. Ainsi, la valeur des TEF des HAP de trois cycles aromatiques, notamment de l'Ant (groupe 3 d'après le CIRC (IARC 2010)) est faible et ne participent que faiblement à la valeur du B[a]P équivalent calculé (Jarvis et al. 2014). Pourtant ces HAP, très abondants dans les mélanges, sont de

puissant inducteur des CYP450. Chez la souris, la surexpression hépatique du CYP1A2 après injection par voie intrapéritonéale d'un mélange de standard de HAP dépend majoritairement de la fraction de HAP de 3 cycles aromatiques (Chaloupka et al. 1995). L'expression des CYP450 est donc généralement beaucoup plus forte avec un mélange de HAP que pour un HAP individuel, ce qui pourrait moduler la bioactivation des HAP cancérogènes dont le B[a]P. *In vivo*, l'induction de l'expression des CYP1A1 et CYP1B1 dans l'épiderme de souris par un extrait de goudron de houille est plus forte que pour le B[a]P ou le dibenzo[*a,l*]pyrène (Marston et al. 2001). Sur lignée de cellule pulmonaire humaine A549, les extraits de pollution atmosphérique urbaine induisent une expression du CYP1A1 6 fois supérieure à la concentration équivalente de B[a]P seul. Parmi l'ensemble des HAP contenus dans le mélange, le B[k]F, moins cancérogène que le B[a]P, serait responsable de la plupart de l'induction mesurée du CYP1A1 (Líbalová et al. 2014). De plus, les cocarcinogènes et autres éléments contenus dans les mélanges complexes peuvent également influencer l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Par exemple, les métaux lourds réduisent la bioactivation des HAP par inhibition l'activité des CYP50 (Vakharia et al. 2001).

- **Remise en question du principe d'additivité des mélanges.** Globalement, les effets des mélanges de HAP sont encore mal définis. Néanmoins, de nombreuses études démontrent des effets plus qu'additifs ou moins qu'additifs selon les protocoles expérimentaux (modèles, mélanges, doses...) (Jarvis et al. 2014). Alors que différents mélanges (fumée de diesel, condensat de fumée de cigarette...) induisent autant de tumeurs cutanées qu'une forte dose de B[a]P sur souris FVB/N (Siddens et al. 2012), le nombre de tumeurs cutanées développées par des souris SENCAR est divisé par 2 lors de l'application d'un extrait de coaltar en comparaison au B[a]P ou au dibenzo[*a,l*]pyrène (Marston et al. 2001). *In vitro*, les cellules de carcinome de sein MCF-7 exposés au B[a]P pendant 24 heures forment entre 9 et 15 fois plus d'adduits à l'ADN qu'avec trois mélanges artificiellement reconstitués (coaltar, poussière urbaine et fumée de diesel) (Mahadevan et al. 2004). Des résultats similaires sont obtenus après exposition de cellules pulmonaires humaines A549 aux extraits de pollution atmosphérique urbaine de 4 villes tchèques (Líbalová et al. 2014). *In vivo*, l'administration de faibles doses de mélange de 5 HAP (B[a]P, B[b]F, D[*a,h*]A, 5-méthylchrysène et cyclopenta[*cd*]pyrene) exerce néanmoins des effets plus qu'additif sur souris A/J, mais moins qu'additifs à fortes doses (Nesnow et al. 1998). De manière générale, l'effet des mélanges semble ainsi être lié à la dose. A fortes doses, la génotoxicité et la cancérogénicité des mélanges de HAP diminue par compétition inhibitrice des HAP et des autres constituants des mélanges envers les CYP450 (Jarvis et al. 2014; Líbalová et al. 2014; Mahadevan et al. 2007).

Afin de pallier aux carences des TEF, d'autres approches se sont orientées vers l'évaluation de l'effet des mélanges complets, en combinant l'évaluation du potentiel cancérigène dans un protocole d'initiation/promotion sur peau de souris *in vivo* et l'analyse de voie biologiques (dommages à l'ADN, apoptose, réponse au stimuli chimiques et interféron gamma) afin de classer et d'estimer la cancérigénicité des mélanges complexes de HAP (Tilton et al. 2015).

En résumé, la prédiction de la toxicité des mélanges de HAP par les approches réglementaires (RPF, TEF) ne semble pas être représentative de la toxicité réelle des mélanges, puisqu'elles reposent sur des hypothèses remises en question et notamment du fait que ces approches négligent les interactions moléculaires. Etant donné que les HAP agissent à travers de multiples mécanismes d'action, l'étape limitante de leur cancérigénicité pourrait différer et l'effet global des mélanges pourrait être synergique. Cependant, l'effet des mélanges reste mal défini, puisque les études sur mélanges complets rapportent des résultats variables. Ceci peut s'expliquer par l'étude de mélanges de compositions différentes, mais également par des disparités dans les méthodologies appliquées. L'un des biais récurrent est l'application de fortes doses de mélanges complexes, irréalistes en regard des expositions humaines, menant à des phénomènes saturation enzymatiques (Jarvis et al. 2014). Ainsi, l'effet des mélanges complexes sur la bioactivation et la génotoxicité des HAP reste inconnu.

V.2.5. Impact des UV : bioactivation, photochimie et phototoxicité des HAP

La toxicité des HAP peut être modulée, inhibée ou exacerbée, par interaction avec des agents physiques tels que les UV. En effet, des études montrent une augmentation de l'incidence des tumeurs cutanées *in vivo* lors de l'exposition combinée aux UV et au B[a]P (Wang et al. 2005). Il est donc essentiel d'en tenir compte lors de l'évaluation du risque (Yu 2002).

La littérature décrit plusieurs modes d'interaction entre les HAP et les UV. Premièrement, les rayonnements UV induisent l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques dont les CYP450 au sein de la peau (paragraphe III.3.2). Par conséquent, la bioactivation ou la détoxification des HAP au sein des kératinocytes pourraient être modulées lors d'une irradiation de la peau. De plus, les HAP sont phototoxiques car leur structure aromatique assimile l'énergie des UVA (320-400 nm) et la lumière visible (> 400 nm) (Fu et al. 2012; Yu 2002). En dehors de certaines exceptions (Ali et al. 2011; Mujtaba et al. 2015), les HAP de 3 à 4 cycles aromatiques absorbent les UVA, tandis que les HAP de 5 cycles et plus ainsi que les HAP substitués (amino, phénol ou nitro) de 3 à 4 cycles absorbent la lumière visible (Fu et al. 2012; Yu 2002).

Après absorption de l'énergie des UV ou de la lumière visible, les HAP entrent dans un état d'excitation et atteignent des niveaux d'énergie supérieurs, singlets ou triplets (Figure 26). Les HAP excités à l'état singlet peuvent retourner à un état d'énergie basal par fluorescence, en émettant un photon ou atteindre un état triplet. Néanmoins, il existe d'autres mécanismes de déperdition d'énergie, tels que la conversion interne, le transfert d'électron ou d'énergie à d'autres molécules, pouvant devenir cytotoxiques (Yu 2002).

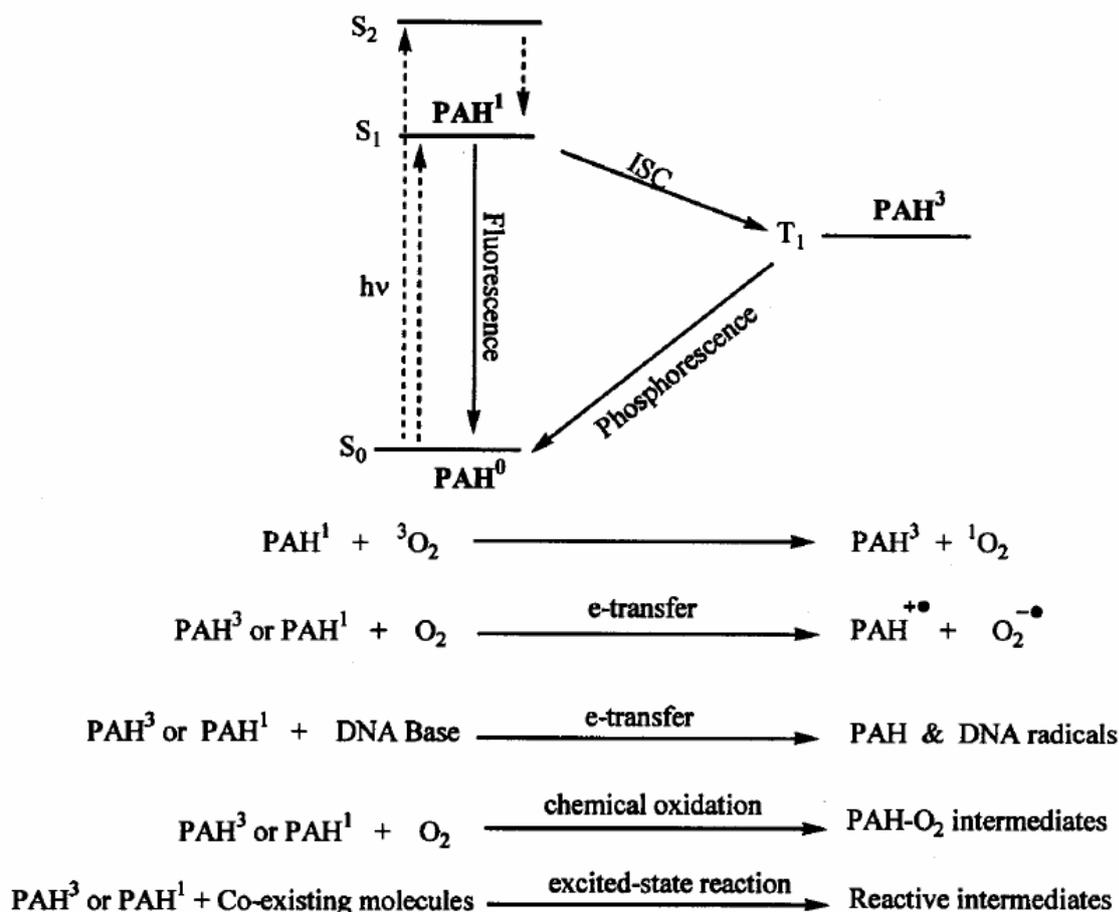


Figure 26. Etats de photoexcitation et photochimie des HAP. PAH⁰ : état énergétique basal. PAH¹ : état énergétique singlet. PAH³ : état énergétique triplet (= T₁). ISC : inter system crossing (= transfert d'énergie ou d'électron à une autre molécule). D'après (Yu 2002).

V.2.5.1. UV et bioactivation des HAP

Les études sur l'impact des UV sur la bioactivation des HAP sont en nombre limité, mais rapportent avec l'induction de l'expression des CYP450 au sein des kératinocytes après irradiation avec les UV.

Lors du traitement bihebdomadaire avec 400 nmol de B[a]P et 50 kJ/cm² d'UVA sur la peau dorsale de souris ♀ SKH-1, les niveaux d'adduits au BPDE et de 8-oxo-dG augmentent significativement lorsque les animaux sont traités de manière combinée au B[a]P et aux UVA,

comparativement aux traitements individuels. A plus faibles doses (20 nmol de B[a]P et 40 kJ/cm² d'UVA), les niveaux d'adduits à l'ADN et de 8-oxo-dG augmentent de manière temps-dépendant au cours de 10 semaines d'exposition. Dans les deux études, les dommages à l'ADN sont associés à une hyperplasie et à un épaissement de la peau. L'augmentation des adduits au BPDE proviendrait d'une hausse de la bioactivation métabolique du B[a]P médiée par les UV, alors que les dommages oxydatifs seraient dus à une phototoxicité du B[a]P et des intermédiaires métaboliques (Saladi et al. 2003).

V.2.5.2. Phototoxicité des HAP

La phototoxicité se définit comme la capacité d'une molécule à déclencher des processus toxiques, suite à son irradiation par une source de lumière. La phototoxicité inclue la toxicité aigüe conduisant à la mort cellulaire mais aussi la génotoxicité aboutissant à la formation de tumeurs (Yu 2002).

La phototoxicité des HAP et de leurs intermédiaires métaboliques est un phénomène complexe qui varie en fonction du poids moléculaire, de l'arrangement des cycles aromatiques et de la substitution des HAP (Fu et al. 2012; Yu 2002). *In vitro*, 9 des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA exercent une phototoxicité sur lignée de kératinocytes humains HaCaT lors d'une irradiation au spectre de la lumière solaire. Excepté le Chr, tous les HAP comprenant 4 cycles aromatiques et plus induisent une diminution de la viabilité cellulaire (Wang et al. 2007b). A l'instar du B[a]A, le Chr, dont le maximum d'absorption des rayonnements solaires se situe entre 280 et 320 nm, produit une phototoxicité conséquente sur lignée cellulaire HaCaT après irradiation aux UVB (Ali et al. 2011; Mujtaba et al. 2015). Alors que le B[a]P et le Pyr sont moins phototoxiques que leurs métabolites respectifs ou des HAP substitués (Ekunwe et al. 2005; Xia et al. 2015), la phototoxicité varie également entre les métabolites. Ainsi, le 3-OHB[a]P pourrait être le dérivé métabolique le plus phototoxique des métabolites du B[a]P (Xia et al. 2015).

La phototoxicité des HAP se divise en deux phénomènes distincts : la génération de photoproduits après irradiation des HAP par les UV (photochimie), et la phototoxicité directe des HAP et des métabolites activés par les rayonnements UV, recoupant plusieurs mécanismes d'action (Fu et al. 2012; Yu 2002).

V.2.5.2.1. Génération de photoproduits toxiques

La photoréaction des HAP engendre différents dérivés et de produits de photomodification ou de photodégradation : HAP oxygénés, phénols, quinones, nitro-HAP, HAP halogénés... (Fu et al. 2012). A titre d'exemple, plus d'une vingtaine de photoproduits sont détectés lors de l'irradiation de

Pyr à la lumière solaire sur papier filtre. La principale réaction photochimique des HAP est la réaction avec l'oxygène moléculaire qui aboutit à la formation de dérivés oxygénés hydrosolubles ou de produits organiques de plus bas poids moléculaire (Yu 2002).

Des expériences menées en solution aqueuse mettent en évidence la production des quinones 1,6-, 3,6 et 6,12- du B[a]P (Figure 27). L'ouverture d'un cycle aromatique a également été montrée lors de l'irradiation du B[a]P dans le benzène. L'étude mécanistique démontre que l'irradiation du B[a]P génère du B[a]P-6-oxyde, ensuite oxydé en 6-OHB[a]P et en quinones du B[a]P. Des processus analogues existent pour le B[a]A, dégradé en B[a]A-7,12-dione, et de nombreux autres HAP tels que le Naph, l'Ant ou le Pyr (Fu et al. 2012).

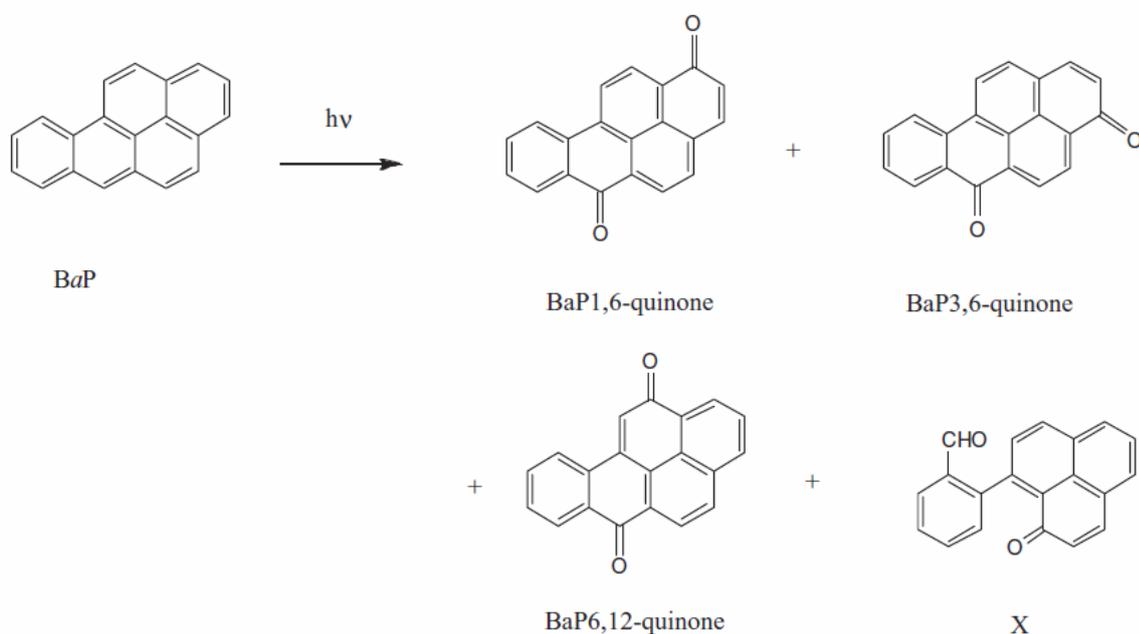


Figure 27. Produits issus de la photodégradation du benzo[a]pyrène. D'après (Fu et al. 2012).

Ainsi, l'irradiation des HAP avec les UV et la lumière solaire génère une multitude de photoproduits issus de processus de photomodification ou de photodégradation. Ces phénomènes constituent l'un des processus de phototoxicité des HAP (Fu et al. 2012; Yu 2002). Certains de ces photoproduits sont des composés génotoxiques, impliqués dans les voies d'activation métabolique des HAP, tels que des quinones responsables de la génération d'ERO et d'adduits instables à l'ADN (IARC 2010; Xue and Warshawsky 2005). D'autres produits de dégradation, photosensibles, sont activés par les UV ou la lumière solaire à travers d'autres mécanismes de phototoxicité (Fu et al. 2012; Yu 2002).

V.2.5.2.2. Autres mécanismes de phototoxicité

Les HAP irradiés transfèrent de l'énergie ou un électron à de l'oxygène moléculaire ou des molécules biologiques générant des radicaux libres et des ERO (production d'énergie, lésions à l'ADN, attaques des membranes cellulaires...), mais aussi des espèces réactives toxiques capables d'interagir avec les macromolécules cellulaires telles que l'ADN et les protéines (Fu et al. 2012; Yu 2002).

Le stress oxydant résultant de la génération d'ERO constitue l'un des principaux mécanismes de phototoxicité des HAP (Fu et al. 2012; Yu 2002). Le B[a]P et ses principaux métabolites, dont le BPDE, induisent une peroxydation lipidique *in vitro* après irradiation aux UVA, probablement initiée par la production d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Xia et al. 2015). Sur lignée HaCaT, le stress oxydant généré par l'irradiation du Chr aux UVB est associé avec une déplétion en glutathion et l'induction de l'apoptose due aux lésions oxydatives à l'ADN (Ali et al. 2011). De même, les lésions oxydatives à l'ADN causées par la photoirradiation du B[a]A sont corrélées avec des cassures simples et doubles brins de la molécule d'ADN, activant la voie apoptotique mitochondriale (Mujtaba et al. 2015). L'exposition simultanée de kératinocytes primaires humains aux UVA et au B[a]P ou à I[1,2,3-c,d]P induit la production intracellulaire et intramitochondriale d'ERO dont l'anion superoxyde (O_2^-). Le stress oxydant induit épuise ainsi les réserves de glutathion et altère le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, provoquant une déplétion en ATP et donc une diminution de la prolifération cellulaire (Soeur et al. 2017). Outre les HAP et leurs métabolites, les adduits au BPDE, situés au sein de la molécule d'ADN, sont également responsables de l'apparition de lésions oxydatives à l'ADN (8-oxo-dG) (Douki et al. 2008).

Après photoirradiation, les HAP activés se lient à l'ADN pour former des adduits covalents sans nécessiter d'activation métabolique préalable. Ce mécanisme a été identifié pour plusieurs HAP dont l'Ant, le B[a]P ou le DB[a,h]A, mais aussi pour certains métabolites non-toxiques tel que le 1-OHP. Les HAP activés produisent également des adduits aux protéines (Fu et al. 2012; Yu 2002), entraînant un dysfonctionnement cellulaire.

L'ensemble de ces atteintes, dommages oxydatifs et adduits covalents, génèrent des zones de faiblesse ou induisent des torsions sur la molécule d'ADN. A terme, ces stress produisent des cassures simple ou double brins (Botta et al. 2009; Fu et al. 2012; Mujtaba et al. 2015; Yu 2002). L'analyse *in vitro* des micronoyaux montre un effet clastogène voire aneugène du traitement combiné aux HAP et aux UV (Botta et al. 2009), et le nombre de cassures à l'ADN dépend à la fois de la concentration en HAP et du temps d'irradiation (Dong et al. 2000). La capacité d'un HAP à

induire des cassures à l'ADN est fonction de la structure du HAP, du poids moléculaire et de l'arrangement des cycles aromatiques. Un fort poids moléculaire n'indique ainsi pas forcément un pouvoir clastogène élevé. L'Ant (3 cycles aromatiques) et le B[a]P (5 cycles aromatiques) induisent un clivage de l'ADN équivalent (Yu 2002). En plus des cassures simple et double brin de l'ADN, l'irradiation augmente la mutagénicité des HAP sans nécessiter d'activation métabolique (Fu et al. 2012).

V.3. Distribution des HAP

Il n'existe pas d'informations relatives à la distribution des HAP chez l'homme après une exposition cutanée et les données obtenues sur animal sont en nombre restreint (ATSDR 1995).

Au sein de la circulation sanguine, le B[a]P s'associe aux lipoprotéines de faibles et de fortes densités qui jouent un rôle essentiel dans son transport plasmatique et modulent son internalisation au sein des différents types cellulaires (Busbee et al. 1990). Après injection en intraveineuse de 40 $\mu\text{mol/kg}$ de B[a]P à des ratte, les volumes de distribution calculés pour le B[a]P et le 3-OHB[a]P sont respectivement de 250 mL et de 390 mL suggérant une importante distribution tissulaire par comparaison au volume sanguin moyen du rat (18 mL) (Marie et al. 2010).

Après application de 20 $\mu\text{g/cm}^2$ de B[a]P sur la peau de rat, la quantité de B[a]P mesurée dans le sang reste toujours inférieure à 0,6% de la dose appliquée jusqu'à 24h alors même que la proportion de B[a]P absorbé atteint 40,28% (Payan et al. 2009). Les résultats sont similaires après application topicale de 200 $\mu\text{g/cm}^2$ de Pyr (Payan et al. 2008). L'équilibre entre les concentrations sanguines et tissulaires semble être atteint entre 4 et 8h après le début de l'exposition cutanée (Payan et al. 2008; Payan et al. 2009). Chez le cochon d'inde sans poil, l'accumulation du B[a]P dans l'organisme atteint un maximum entre 24 à 48h post-exposition (Chu et al. 1996). L'application de 2, 6 ou 15 mg/kg de Pyr sur la peau de rat montre que les organes cibles des HAP sont le foie, les reins et le tissu adipeux (Withey et al. 1993).

V.4. Elimination

Après absorption, les HAP sont éliminés de l'organisme par excrétion urinaire et par sécrétion hépatobiliaire entraînant ainsi de fortes concentrations en HAP au sein du tractus gastro-intestinal (IARC 2010). Lorsque le poids moléculaire des HAP est élevé, l'élimination dans les fèces devient majoritaire.

Chez le rat, 61,1% du B[a]P ($\text{Log}_{K_{ow}} = 6,06$) radiomarqué déposé à la surface de la peau est éliminé dans les fèces, alors que la proportion mesurée dans les urines atteint 8,2%. Chez le cochon d'inde sans poil, l'excrétion hépatobiliaire est également majoritaire (43,1%), bien que 24,6% du B[a]P appliqué soient quantifiés dans l'urine, indiquant une variabilité inter-espèce (Moody et al. 1995). Le B[a]P non-métabolisé n'est pas détecté dans les urines, tandis que sa proportion atteint 4,31% dans les fèces de rat. La quantité de métabolites éliminée par voie hépatobiliaire est de 8 à 141 fois supérieure à celle mesurée dans les urines (Moreau and Bouchard 2014).

Pour le Pyr ($\text{Log}_{\text{Kow}} = 4,88$), la voie d'élimination semble dépendre de la dose. Alors que les proportions de Pyr éliminés par voie urinaire et par voie fécale sont équivalentes (20%) jusqu'à la dose de 6 mg/kg après application de Pyr radiomarké sur la peau de rat, la voie hépatobiliaire est majoritaire pour une exposition de 15 mg/kg (Withey et al. 1993).

Capable de catalyser une grande diversité de réactions métaboliques, la flore intestinale hydrolyse les métabolites du B[a]P majoritairement éliminés dans la bile sous forme conjuguée (Renwick and Drasar 1976; Sousa et al. 2008). Dès lors, les métabolites, mais aussi le B[a]P non-métabolisé, peuvent à nouveau être absorbés par la paroi intestinale et subir une nouvelle phase de métabolisme au sein des entérocytes. La culture d'explants *ex vivo* de colon humain montre la formation des principaux métabolites génotoxiques du B[a]P et d'adduits à l'ADN au sein du tissu intestinal (Autrup et al. 1978). D'autre part, le B[a]P et ses métabolites hydrolysés traversent également la paroi intestinale et atteignent la circulation systémique, entrant dans un cycle entéro-hépatique prolongeant le temps de demi-vie des composés dans l'organisme et le risque cancérigène dû à une nouvelle phase de bioactivation (Chipman et al. 1981).

VI. Suivi de l'exposition aux HAP et biomarqueurs d'exposition

VI.1. De l'importance de la surveillance de l'exposition

L'exposition des salariés aux HAP, composés cancérogènes présents en mélanges complexes, représente un risque sanitaire conséquent nécessitant d'être évalué. D'après la réglementation européenne EC 178/2002, le risque se définit comme la probabilité de développement d'un effet néfaste sur la santé et de la gravité de cet effet, en conséquence de l'exposition à un danger. L'évaluation du risque se découpe en 4 étapes distinctes : identification du danger, évaluation de la dose-réponse, évaluation de l'exposition, caractérisation du risque (risque = danger x exposition) (Araujo et al. 2009).

La surveillance de l'exposition peut se faire par quantification de la dose externe ou par mesure de la dose interne. La dose externe représente la quantité de HAP à laquelle un individu est exposé. La méthode la plus courante consiste à mesurer les HAP présents dans l'atmosphère par prélèvement d'air, mais s'avère inadéquate en cas d'exposition cutanée (Jongeneelen 2001). D'autres méthodes consistent à quantifier la déposition des HAP sur la peau par lavage avec des compresses, par tape-stripping permettant d'extraire les premières couches cellulaires du *stratum corneum* ou encore par utilisation de pad d'exposition (Fernando et al. 2016; Kammer et al. 2011; Sobus et al. 2009). Ces techniques sous-estiment cependant la contamination de la peau ainsi que la dose absorbée et comportent une variabilité incompatible avec une évaluation quantitative de l'exposition (VanRooij et al. 1993b). La mesure de la dose interne ou SBE évalue la dose ayant réellement été absorbée par l'organisme, mais ne discrimine pas les voies d'exposition.

VI.2. La surveillance biologique de l'exposition professionnelle aux HAP

En milieu professionnel, la SBE consiste au mesurage de biomarqueurs dans les matrices biologiques de travailleurs exposés à des composés chimiques. Elle est régulièrement appliquée sur des groupes de travailleurs comparés à des groupes témoins afin de déterminer le risque sous-jacent d'une activité professionnelle. La SBE présente de nombreux avantages : quantification de la dose interne à de multiples polluants permettant l'identification d'interactions entre xénobiotiques, estimation d'une exposition passée, évaluation de l'efficacité d'équipements de protection individuels et collectifs. Ces informations sont utilisées pour le bénéfice de l'individu (Manno et al. 2010). L'objectif ultime de la SBE est d'extrapoler le niveau d'exposition en regard d'un risque sanitaire potentiel par comparaison avec un niveau limite de référence (Angerer et al. 2007) afin de mettre en place des moyens efficaces de prévention avant la survenue de la maladie.

Certaines approches consistent à mesurer la dose biologique efficace (quantité de xénobiotique ayant réagi avec une cible cellulaire critique) ou les effets génotoxiques résultant de l'exposition aux HAP : mesure des adduits totaux, des adduits nucléiques ou protéiques au B[a]P, du stress oxydatif (*i.e.* 8-oxo-dG), des effets clastogènes (test des comètes) ou cytogénétiques (test des micronoyaux, aberrations chromosomiques ou recombinaison intra-chromosomiques) (Angerer et al. 2007; Brandt and Watson 2003; Crebelli et al. 2002; Hopf et al. 2009; Mensing et al. 2005; Wang et al. 2007a). Ces différents biomarqueurs présentent l'intérêt d'être proches du risque sanitaire et reflètent la variabilité interindividuelle (absorption, distribution, métabolisme), cependant leur interprétation en terme d'évaluation du risque est délicate du fait d'un manque de sensibilité, de spécificité et de valeur prédictive (Angerer et al. 2007; Györfy et al. 2004; Hopf et al. 2009; Scherer et al. 2000). De plus, une des difficultés de ces approches est liée au caractère invasif du prélèvement nécessaire à leur analyse (sang, biopsie tissulaire...) rendant difficile voire impossible la mise en place de campagne de prélèvements (Esteban and Castaño 2009).

La SBE s'est ainsi orientée vers la mesure de biomarqueurs d'exposition reflétant une exposition récente tels que le dosage des HAP et de leurs métabolites. Bien que l'élimination des HAP se produise majoritairement par voie hépatobiliaire, la matrice urinaire est le milieu de prélèvement le plus adéquat en milieu professionnel pour des raisons évidentes de faisabilité. L'analyse des HAP non-métabolisés dans les urines de sujets exposés est possible (Sobus et al. 2009). Cependant, cette approche souffre d'un risque important de contamination des échantillons par les niveaux ambiants de HAP lors du prélèvement, d'une sous-estimation des concentrations en HAP gazeux et d'un manque de sensibilité pour les HAP particuliers. Pour pallier ces difficultés, la SBE s'est tournée vers le dosage urinaire des métabolites des HAP.

Historiquement, le 1-OHP urinaire est le premier métabolite urinaire à avoir été proposé en tant que biomarqueur d'exposition aux HAP. A l'heure actuelle, le dosage du 1-OHP est utilisé à grande échelle du fait de méthodes analytiques robustes et de concentrations urinaires élevées, due à l'abondance du Pyr dans les mélanges (Jongeneelen 2001). Dérivé du Pyr, le 1-OHP ne reflète néanmoins pas l'exposition aux HAP cancérigènes. Globalement, les proportions d'HAP non-cancérigènes (Naph, Phe, Pyr...) dans les mélanges sont supérieures aux proportions d'HAP cancérigènes (B[a]P, Chr, B[a]A...) (IARC 2010). Actuellement, le risque cancérigène est mieux caractérisé grâce aux développements analytiques récents permettant le dosage urinaire du 3-OHB[a]P et du B[a]P-tétraol (Barbeau et al. 2017; Barbeau et al. 2011; Hecht et al. 2010; Zhong et al. 2011). Néanmoins, ces biomarqueurs dérivent uniquement du B[a]P ce qui pose un problème de représentativité dans l'analyse du risque cancérigène résultant de l'exposition aux mélanges complexes de HAP, dont le profil en HAP cancérigènes varie considérablement en fonction de la

source ou de la saisonnalité. L'analyse urinaire des métabolites mono-hydroxylés du Chr ou du B[a]A ont été proposé mais il serait intéressant d'élargir le panel de biomarqueurs urinaires pour évaluer l'exposition aux mélanges d'HAP cancérogènes (Ifegwu and Anyakora 2015).

VII. Synthèse, objectifs et organisation du travail de thèse

Synthèse

Les HAP sont une famille de toxiques composés de cycles aromatiques fusionnés, toujours identifiés en mélanges complexes. L'exposition humaine résulte de la combustion incomplète de matière organique, fréquente lors des procédés industriels, mais également de l'emploi de produits dérivés du charbon ou du pétrole. Au cours de nombreuses activités professionnelles, les HAP contaminent la surface de la peau en traversant les vêtements de protection, ainsi que par contact avec des produits bruts ou des surfaces contaminées. Les HAP pénètrent alors le tégument et s'accumulent dans la couche la plus externe de l'épiderme, le *stratum corneum*. Cette strate cutanée, constituée de cellules inactives aplaties remplies de fibres protéiques insolubles et encerclées par une riche matrice lipidique, est particulièrement favorable à la formation d'un réservoir cutané, notamment du fait de la diffusion limitée des HAP à travers les autres couches épidermiques. Ce n'est qu'après biotransformation en composés plus hydrophiles au sein des kératinocytes qui possèdent un arsenal complet d'enzymes du métabolisme que survient leur élimination de la peau.

Les HAP induisent l'expression des enzymes de phase 1 et de phase 2 par les kératinocytes et sont convertis en une multitude de métabolites diffusant dans le derme superficiel jusqu'à la circulation sanguine. Le métabolisme des HAP est complexe et comprend plusieurs voies de bioactivation dont certaines génèrent des composés réactifs capables de se lier à l'ADN ou de générer des ERO, engendrant des adduits ou lésions oxydatives à l'ADN. Ces altérations peuvent s'inscrire dans le génome sous la forme de mutations délétères. En outre, les HAP sont capables de reprogrammer les cellules en interférant avec les voies de signalisation, leur conférant une capacité de prolifération échappant à tout rétrocontrôle. À terme, les expositions peuvent être responsables de l'apparition de cancers de la peau, pathologie reconnue comme maladie professionnelle.

La cancérogénicité cutanée des HAP est un phénomène complexe comprenant plusieurs étapes dont l'absorption et la bioactivation (Nesnow et al. 1998). Si l'absorption cutanée est bien caractérisée pour quelques HAP (Pyr, Phe, B[a]P), ces connaissances découlent majoritairement d'études conduites à fortes doses sur des explants de peau animale. À ce jour, le comportement des HAP appliqués sur la peau à des niveaux proches des expositions humaines reste encore méconnu. De plus, l'effet des mélanges complexes sur l'absorption et la bioactivation des HAP reste une préoccupation majeure.

Dans certains secteurs industriels, l'exposition de la peau aux mélanges de HAP s'accompagne d'une irradiation aux rayonnements UV. Cancérogènes notoires, ces rayonnements altèrent l'intégrité de la barrière cutanée et induisent l'expression des CYP450, enzymes centrales de la bioactivation des HAP. Photosensibles, les HAP sont activés par le rayonnement solaire provoquant leur conversion en composés génotoxiques mais aussi la formation d'ERO, de radicaux libres et d'espèces réactives. De ce fait, la cancérogénicité des HAP pourrait être exacerbée par les UV. Toutefois, ces mécanismes ont été décrits *in vitro* et l'impact des UV sur l'absorption cutanée, la bioactivation et la génotoxicité des HAP nécessitent d'être évaluées dans des conditions d'expositions réalistes afin d'améliorer la compréhension du risque cancérogène chez l'homme.

En milieu professionnel, l'évaluation de l'exposition aux HAP est réalisée préférentiellement par SBE car plus proche du risque cancérogène. Après leur formation au sein de l'épiderme et leur diffusion jusqu'à la circulation systémique, une fraction des métabolites générés par la peau est excrétée dans l'urine et quantifiée en tant que biomarqueurs d'exposition afin de caractériser l'exposition aux HAP cancérogènes. A l'heure actuelle, le faible nombre de biomarqueurs aux HAP cancérogènes limite cependant la représentativité des mesurages en termes d'évaluation du risque lié à l'exposition à des mélanges complexes. En outre, une meilleure connaissance de l'action des UV sur les HAP est nécessaire car ceux-ci sont susceptibles d'influencer qualitativement et quantitativement la production des différents métabolites.

Objectifs

Ce travail de thèse a pour objectif de caractériser l'absorption cutanée et le métabolisme des HAP liée à la contamination de la peau par des mélanges complexes de HAP et à l'exposition combinée aux UV solaires. La mise en œuvre de conditions représentatives des expositions professionnelles tant en terme de dose que de mélanges mais aussi l'utilisation d'explants de peau humaine ont constitué les bases de notre travail afin d'améliorer la compréhension du risque cancérogène, et l'évaluation du risque sanitaire en milieu professionnel.

Organisation du travail de thèse

La première phase de ce travail a consisté au développement d'un modèle d'exposition cutanée réaliste à partir d'explants de peau humaine obtenus après chirurgie mammaire, ce modèle étant considéré comme le « gold standard » pour l'étude de l'absorption et du métabolisme des xénobiotiques.

Après mise au point des méthodes d'extraction et d'analyses du B[a]P et de ses métabolites, son absorption cutanée et son métabolisme ont été étudiés après application de faibles doses afin de déterminer le comportement du B[a]P au sein de la peau et d'identifier le biomarqueur d'exposition le plus pertinent en terme de SBE lors d'une exposition cutanée (Publication n°1).

La deuxième phase de ce travail correspond à une synthèse de la littérature sur le métabolisme des HAP cancérigènes autres que le B[a]P. L'objectif était d'identifier les métabolites impliqués dans les voies de bioactivation et de détoxification et ceux pour lesquels une mise au point analytique était possible afin d'étudier le métabolisme des mélanges complexes de HAP et de disposer de nouveaux biomarqueurs d'exposition des populations.

La troisième partie de ce travail a consisté à l'étude de l'impact des mélanges complexes de HAP et des rayonnements UV sur l'absorption cutanée et le métabolisme des HAP. L'objectif était d'améliorer la compréhension de l'absorption cutanée, de la bioactivation des HAP en mélanges et en combinaison avec les UV dans des conditions expérimentales proches des expositions professionnelles (Publication n°2).

Ces travaux font partie d'un projet plus large mené en collaboration avec l'équipe Chimie en Interface avec la Biologie en Environnement, Santé et Toxicologie (CIBEST) du Centre d'étude Atomique de Grenoble. Afin d'apporter une compréhension globale de la génotoxicité des HAP, les chercheurs de cette équipe ont mesuré l'expression des enzymes du métabolisme (CYP450...) et des lésions à l'ADN parallèlement aux dosages de HAP que nous réalisons. Leurs premiers résultats centrés sur la toxicité de la combinaison B[a]P/UV ont été publiés (von Koschembahr et al. 2018) et ceux centrés sur les mélanges de HAP et les UV seront publiés prochainement. Les communications scientifiques produites par cette équipe étant complémentaires de nos résultats sont introduites en annexes.

L'ensemble de ce travail devrait permettre d'améliorer la compréhension du risque cancérigène résultant des expositions cutanées aux mélanges de HAP en milieu professionnel, l'évaluation du risque sanitaire ainsi que les stratégies de SBE.

Chapitre 2 : Etude de l'absorption cutanée et du métabolisme du benzo[*a*]pyrène

I. Contexte scientifique

La peau est la voie d'absorption majoritaire dans certains secteurs d'activités professionnelles, provoquant un excès de cancers cutanés. L'absorption des HAP au niveau de la peau dépend essentiellement de leur métabolisme, évènement crucial à leur élimination du compartiment cutané mais qui génère des intermédiaires métaboliques hautement réactifs et génotoxiques. Pour le B[a]P, la principale voie de bioactivation débute par la formation du B[a]P-7,8-diol. Ce métabolite est à la fois impliqué dans la voie de l'o-quinone, responsable de la production de divers adduits à l'ADN et d'ERO, et dans celle du diol-époxyde générant du BPDE qui se lie de manière covalente à l'ADN.

La SBE permet de quantifier l'exposition cutanée aux HAP et d'estimer les risques sanitaires associés. En milieu professionnel, le 3-OHB[a]P et B[a]P-tétraol, deux biomarqueurs urinaires, sont respectivement utilisés en tant qu'indicateurs des voies de détoxification et de bioactivation du B[a]P. La pertinence de ces deux biomarqueurs pour évaluer l'exposition cutanée reste néanmoins à confirmer.

A cet effet, les modèles d'exposition cutanée sont appropriés à la condition que le design du modèle et que le plan expérimental soient adaptés. L'ensemble des données identifiées dans la littérature sont cependant obtenues à fortes doses trop souvent irréalistes, sur peau animale qui est plus perméable que la peau humaine, ou sur peau non-viable, inadéquate pour l'étude du métabolisme.

L'étude a donc trois objectifs : (1) développer un modèle d'exposition réaliste à partir d'explants de peau humaine, (2) étudier l'absorption cutanée et le métabolisme de doses de B[a]P reflétant une exposition professionnelle, afin de (3) sélectionner le biomarqueur le plus pertinent pour la SBE des populations afin d'estimer le risque cancérigène.

II. Développement du modèle d'exposition cutanée

La première étape a consisté au développement du modèle d'exposition cutané. Tel que décrit dans le chapitre 1 (paragraphe II.3 et II.4), il existe plusieurs modèles et systèmes d'étude de l'absorption cutanée mais les explants de peau humaine constituent le « gold standard » pour l'étude de l'absorption et du métabolisme des xénobiotiques. Bien que la variabilité des résultats rende l'interprétation des données délicates, celle-ci représente bien la réalité et est liée aux facteurs de susceptibilité individuelle. Le choix du système d'exposition s'est porté vers le système d'inserts et de puits développé par Jacques *et al.* (Jacques *et al.* 2010b). Les critères de sélection et le design du modèle expérimental sont détaillés dans la discussion de l'article (paragraphe III).

La deuxième étape a permis la mise au point des méthodes d'extraction des HAP et des métabolites de la surface de la peau, de la peau, du milieu, et du système d'exposition. Les méthodes de récupération du B[a]P résiduel à la surface de la peau et sur le système d'exposition ont été adaptées du travail de Jacques *et al.* (Jacques *et al.* 2010b). Afin d'améliorer le rendement d'extraction des HAP du système d'exposition, une étape de sonication dans un bain à ultrason a été ajoutée. Le milieu a été dilué avec du solvant afin de précipiter les protéines présentes et de stabiliser les analytes avant l'injection dans le système chromatographique. L'étape la plus difficile a été l'extraction du B[a]P et de ses métabolites de la peau. La peau est un tissu très gras ce qui rend difficile l'extraction des molécules lipophiles, et est doublée d'une grande élasticité, et donc d'une résistance très importante. La littérature décrit plusieurs méthodes pour extraire les xénobiotiques: broyage mécanique (Jacques *et al.* 2010b; Ng *et al.* 1992; Storm *et al.* 1990), hydrolyse enzymatique (Brinkmann *et al.* 2013; Kao *et al.* 1985), ou digestion chimique (Chu *et al.* 1996; Payan *et al.* 2009). La plupart de ces techniques sont employées afin d'établir une « mass balance » par mesure de radioactivité et un profil de distribution des molécules étudiées au sein de la peau. En pratique, aucune de ces méthodes ne permet à elle seule l'extraction et l'analyse du B[a]P et de ses métabolites. *In fine*, plusieurs techniques ont été associées : hachage de la peau pour faciliter l'hydrolyse enzymatique des fibres protéiques du derme, broyage de la peau et saponification telle que décrite par Grova *et al.* (Grova *et al.* 2011), avant extraction des composés d'intérêt.

III. Exposition de la peau au B[a]P

Les échantillons de peau humaine, provenant de 11 donneuses âgées de 19 à 60 ans, ont été obtenus après chirurgie pour réduction mammaire. Les prélèvements ont été réalisés anonymement avec le consentement des patientes respectant les réglementations et les recommandations en vigueur (notamment d'après l'article L1245-2 du code public français). Après excision, les échantillons de peau ont été transportés en moins d'une heure jusqu'au laboratoire et immédiatement désinfectés et préparés (\varnothing : 12 mm ; \uparrow : 250 μ m).

Les explants de peau ont ensuite été exposés en triplicats à 2 faibles doses de B[a]P (1, 10 nmol) et une forte dose (25 nmol) pour comparaison à la littérature, puis incubés pendant 8h, 24h ou 48h (37°C, 5% CO₂) avec un milieu de survie simple (DMEM-F12, 4% de sérum bovine albumine, 1% pénicilline/streptomycine) afin d'établir une cinétique d'absorption et de métabolisme. A la fin de l'exposition, les explants ont aussitôt été congelés à -80°C afin d'arrêter toute activité métabolique, puis stockés à -20°C avant analyse des échantillons. Le B[a]P et ses métabolites (3-OHB[a]P, B[a]P-7,8-diol, B[a]P-4,5-*trans*-dihydrodiol, B[a]P-tétraol) ont ensuite été extraits de tous les

compartiments du modèle (surface, peau, milieu, système d'exposition) et quantifiés en chromatographie liquide couplée à un détecteur à fluorescence.

Les données ont été analysées au moyen d'un modèle de régression linéaire à effet mixte afin d'évaluer l'effet de la dose, du temps et de l'âge sur la pénétration, le métabolisme et la diffusion dans le milieu.

IV. Article scientifique

Accepté le 10 Octobre 2018 dans Archives of Toxicology.



A realistic human skin model to study benzo[a]pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure

Etienne Bourgart¹ · Damien Barbeau^{1,2} · Marie Marques¹ · Anne von Koschimbahr³ · David Béal³ · Renaud Persoons^{1,2} · Marie-Thérèse Leccia⁴ · Thierry Douki³ · Anne Maitre^{1,2}

Received: 15 May 2018 / Accepted: 10 October 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous pollutants, among which benzo[a]pyrene (B[a]P) is the only compound classified carcinogenic to humans. Besides pulmonary uptake, skin is the major route of PAH absorption during occupational exposure. Health risk due to PAH exposure is commonly assessed among workers using biomonitoring. A realistic human *ex vivo* skin model was developed to explore B[a]P diffusion and metabolism to determine the most relevant biomarker following dermal exposure. Three realistic doses (0.88, 8.85 and 22.11 nmol/cm²) were topically applied for 8, 24, and 48 h. B[a]P and its metabolites were quantified by liquid chromatography coupled with fluorimetric detection. The impact of time, applied dose, and donor age were estimated using a linear mixed-effects model. B[a]P vastly penetrated the skin within 8 h. The major metabolites were 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHB[a]P) and 7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (B[a]P-tetrol). This latter predominantly derives from the most carcinogenic metabolite of B[a]P, benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), as well as benzo[a]pyrene-9,10-diol-7,8-epoxide (reverse-BPDE). Benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol (B[a]P-7,8-diol) was a minor metabolite, and benzo[a]pyrene-trans-4,5-dihydrodiol (B[a]P-4,5-diol) was never quantified. Unmetabolized B[a]P bioavailability was limited following dermal exposure since less than 3% of the applied dose could be measured in the culture medium. B[a]P was continuously absorbed and metabolized by human skin over 48 h. B[a]P-tetrol production became saturated as the applied dose increased, while no effect was measured on the other metabolic pathways. Age had a slight positive effect on B[a]P absorption and metabolism. This work supports the relevance of B[a]P-tetrol to assess occupational exposure and carcinogenic risk after cutaneous absorption of B[a]P.

Keywords *Ex vivo* human skin model · Polycyclic aromatic hydrocarbons · Benzo[a]pyrene · Cutaneous absorption · Metabolism · Biomonitoring

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00204-018-2329-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Anne Maitre
anne.maitre@univ-grenoble-alpes.fr

¹ Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, Faculté de Médecine, Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UGA-CNRS), Université Grenoble Alpes, 38706 La Tronche, France

² Service de Biochimie Biologie moléculaire Toxicologie de l'Environnement, Unité Médicale de Toxicologie

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous pollutants produced during incomplete combustion of organic matter, and distillation of coal or petroleum. They represent a large class of chemicals, consisting of more than 100

Professionnelle et Environnementale, CHU Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

³ Univ. Grenoble Alpes, SyMMES/CIBEST UMR 5819 UGA-CNRS-CEA, INAC/CEA-Grenoble LAN, 38000 Grenoble, France

⁴ Clinique de Dermatologie, Allergologie et Photobiologie, CHU Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

compounds composed of two or more aromatic fused rings. They are emitted in the atmosphere as complex mixtures and their composition depends greatly on the emission sources (IARC 2010). In 1976, the United State Environmental Protection Agency classified 16 PAH as priority substances regarding their abundance and carcinogenicity (Andersson and Achten 2015). Amongst them, benzo[a]pyrene (B[a]P) is the only PAH to be classified “carcinogenic to humans” by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC 2010). In France, around 1.6 million workers involved in different industrial sectors are exposed to PAH, according to the 2010 SUMER study (Cavet and Leonard 2013). Besides pulmonary uptake, skin is the main occupational absorption route that can lead to high internal doses (IARC 2010). Indeed, about 51% of absorbed B[a]P resulted from skin contamination amongst coke oven workers (VanRooij et al. 1993a). Skin is an important absorption pathway due to direct contact with materials containing PAH or indirect contact with contaminated occupational uniforms or particle skin deposition (Fernando et al. 2016; Förster et al. 2008; Sobus et al. 2009). In addition to lung and bladder cancers, PAH are responsible for skin cancer developed during occupational activities, such as shale oil extraction, creosote applying, coal tar roofing and road paving, and chimney sweeping (Boffetta et al. 1997).

Dermal absorption of PAH depends greatly on their metabolism within the epidermis by cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP450) (Ngo and Maibach 2010), including CYP1A1 and CYP1B1 (Hewitt et al. 2013). After being converted into more hydrosoluble compounds, they can easily reach the blood stream and be eliminated from the skin, whereas the diffusion of unmetabolized lipophilic PAH is limited (Jacques et al. 2010; Kao et al. 1985; Ng et al. 1992). Furthermore, PAH metabolic activation is responsible for the formation of highly mutagenic and carcinogenic metabolites in the skin (Shimada 2006). The major B[a]P bioactivation pathway begins with the formation of benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol (B[a]P-7,8-diol). This metabolic intermediate is involved in the α -quinone pathway, thereby producing unstable DNA adducts and reactive oxygen species (IARC 2010), and in the production of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), the ultimate carcinogen metabolite of B[a]P, which reacts with cellular content to form stable DNA adducts.

Occupational dermal exposure is generally assessed using “hand wiping”, exposure pads, or “tape-stripping” (Fernando et al. 2016; Kammer et al. 2011; Sobus et al. 2009), but those methods evaluate skin deposition and not the amount of PAH absorbed through skin. To take into account all exposure routes and personal protective equipment, the most relevant method is the measurement of internal dose. PAH biomonitoring is routinely conducted by measuring urinary metabolites among workers using 1-hydroxypyrene which

is the major metabolite of pyrene, a non-carcinogenic PAH (Jongeneelen 2001). 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHB[a]P) has been used, although this metabolite derives from a B[a]P detoxification pathway (Lutier et al. 2016). Urinary assay of 7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (B[a]P-tetrol) which reflects B[a]P bioactivation pathway has been proposed for assessing PAH carcinogenic exposure (Hecht et al. 2010; Zhong et al. 2011). However, the current issue is to confirm that these biomarkers are suitable for cutaneous exposure assessment.

Due to restrictions of animal use, ex vivo skin models were used to study cutaneous absorption and metabolism of B[a]P since in vivo and in vitro experiments demonstrate a great correlation, as long as the exposure protocols are appropriately matched (Lehman et al. 2011). However, many of those percutaneous penetration studies reflect a bias that influence B[a]P cutaneous absorption and metabolism. Since access to human skin is limited, absorption has been frequently studied using mice, rat, rabbit or guinea pig skin samples, but rodent skin was shown to more permeable to PAH than human skin (Payan et al. 2009; Storm et al. 1990 #104). Frozen skin, which is non-viable, and therefore, unable to metabolize B[a]P, was used to study PAH cutaneous absorption (Sartorelli et al. 1998). Furthermore, high exposure doses unrepresentative of human exposure are usually applied on skin, but such amounts of B[a]P decrease cutaneous absorption and saturate skin metabolism (Jacques et al. 2010; Ng et al. 1992). Finally, absorption and metabolism were mostly evaluated using radioactivity, but metabolites were rarely individually identified in those studies (Kao et al. 1985; Ng et al. 1992).

The current study had three aims: (1) the development of a representative ex vivo penetration model via freshly excised human skin for studying PAH dermal uptake pathway; (2) the investigation of cutaneous absorption and metabolism of realistic B[a]P exposure, by analysis of B[a]P and its different metabolites on the skin, in the skin, and in the culture medium; and (3) the selection of the most relevant biomarker for monitoring occupational exposure and assessing carcinogenic risk after dermal exposure.

Materials and methods

Chemicals and reagents

All aqueous solutions were prepared with water purified using the Milli-Q treatment system (Merck Millipore, Germany). Acetate buffer AVS titrinorm (pH = 4.66) solution, formic acid (HCOOH) Anala[®] Normapur solution (99–100%), and potassium hydroxide Prolabo[®] Normapur were obtained from VWR chemicals (USA). Methanol (MeOH) Chromasolv V ($\geq 99.9\%$), B[a]P, and Bovine

Serum Albumin (BSA) came from Sigma-Aldrich (USA). Ammonium acetate and ethyl acetate RPE for analysis ACS (99.9%) were purchased from Carlo Erba Reagents (France). β -glucuronidase/arylsulfatase solution and liberase™ TH Research Grade powder were supplied by Roche Diagnostics GmbH (Germany). Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12), Phosphate Buffer Saline (PBS), and Gibco™ Penicillin–Streptomycin (Pen/Strep; 5,000 U/mL) were purchased from Thermo Fisher Scientific (USA). 3-OHB[a]P was obtained from LGC Standards (France). B[a]P-tetrol, benzo[a]pyrene-trans-4,5-dihydrodiol (B[a]P-4,5-diol), and B[a]P-7,8-diol were supplied by the National Cancer Institute Chemical Carcinogen Reference Standards Repository (MRIGlobal, USA).

Human skin preparation

Human skin was obtained from breast reduction surgery at Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, (Grenoble, France). Skin samples of 11 donors, aged from 19 to 60 years old were obtained, under informed consent and anonymous donation, in accordance with relevant guidelines and regulations. Experiments were especially conducted from article L1245-2 of the French Public Health Code on the use of surgical wastes for research purposes. Collection, storage, and use of human skin samples were declared to the French authorities and validated in the CODECOH DC-2008-444 document. After surgery, the skin was immediately transported to the laboratory within one hour at ambient temperature in 50 mL falcon tubes (Becton Dickinson Labware, USA). Skin was disinfected with PBS supplemented with 0.4% Betadine for 15 min and rinsed twice with PBS containing 10% Pen/Strep. Then, the skin was dermatomized to a thickness of 250 μ m (SOBER, Humeca, Netherlands) and cut into 12-mm diameter skin discs with sterile punches (Help Medical, France). These skin biopsies included the epidermis and a minimal part of the dermis. The structural integrity on application areas was ensured, as skin damage could impact B[a]P diffusion and metabolism.

Treatment of human skin samples

Skin biopsies were placed dermal side down into polystyrene ThinCert™ inserts (14 mm inner diameter, 1 μ m pore size filter, Greiner Bio-One, Austria) maintained in 12 well non-treated culture plates (Greiner Bio-One, Austria). Three doses of B[a]P (1, 10, 25 nmol, corresponding to 0.88, 8.85 and 22.11 nmol/cm², respectively) were applied in 5 μ L of acetone on the epidermal surface. Acetone evaporation was permitted and then 500 μ L of medium were added into the well, under the insert, ensuring that the epidermis was not touched. The culture medium used was DMEM-F12 supplemented with 1% Pen/Strep, and 4% BSA. Afterwards, skin

biopsies were placed at 37 °C in 5% CO₂ air incubator for three different time points: 8, 24, and 48 h. For the longest exposure, the medium was removed and renewed with fresh culture medium at 24 h. Collected medium from samples was immediately stored at –20 °C. After exposure, plates were frozen at –80 °C to stop any metabolic activity, and then stored at –20 °C until analysis. Experiments were performed in triplicates and were repeated on different donors' skin when possible.

B[a]P and metabolites collection from skin surface, skin, medium, and insert/well

After thawing plates at ambient temperature, skin discs were removed from inserts and placed on parafilm (Parafilm, USA, Neenah). The skin surface was softly washed twice with cotton swabs plunged in 1 mL MeOH, and then sonicated for 30 min (Bransonic® ultrasonic cleaner 5510E-MT, Branson, USA). Thirty μ L MeOH were injected into high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC-FLD) for analysis.

After mincing skin samples and adding 1 mL acetate buffer (pH=7.4), skin was digested with 1 U/mL Liberase™ TH enzyme at 37 °C for 2 h. One mL of acetate buffer (pH=4.66) was added, and the skin was next ground with an ultra turrax (IKA werke®, Germany), then incubated with 30 μ L β -glucuronidase/arylsulfatase at 37 °C for 30 min. The next step was skin saponification in 1M of potassium hydroxide at 60 °C for 1 h. After cooling at ambient temperature, B[a]P and its metabolites were extracted by liquid–liquid extraction. Two millilitres of ethyl acetate saturated with water were added. Mixture was placed on rotary agitator for 30 min, and then centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4 °C. The upper phase corresponding to the organic phase was recovered. The liquid–liquid extraction was repeated twice, and the organic phases were pooled before a 1:4 dilution in MeOH. Thirty μ L were injected into HPLC–FLD. The recovery of B[a]P and metabolites extracted from the skin was assessed using untreated skin samples spiked with B[a]P and metabolites reference standards before applying the whole extraction protocol.

The medium was removed from the well and pooled with the related previous medium stored at –20 °C in the case of a 48 h exposure. Hydrolysis step of conjugated metabolites was performed by adding 50 μ L acetate buffer (pH 4.66) and 10 μ L β -glucuronidase arylsulfatase to 100 μ L of the medium by incubation at 37 °C for 2 h. This step was stopped by addition of 150 μ L MeOH. After sample centrifugation at 4000 rpm for 10 min at 4 °C, 30 μ L of the supernatant was injected into HPLC. Alongside this procedure, inserts and wells were washed and sonicated twice for 2 min with 1 mL MeOH. Thirty μ L was injected into HPLC-FLD for analysis.

HPLC analysis of B[a]P and its metabolites

The analysis of B[a]P and its metabolites was performed using a HPLC Waters® (USA) Model 2695 separation module equipped with a quaternary pump, a thermostated compartment for the chromatographic column, an auto-sampler, an automatic injector, and an integrated degasser. Fluorescence detection was performed with a Waters® 2475 multi-wavelength detector. A Waters® PAH-C18 column (3.0 × 250 mm, 3 μm) was used for analytes separation. The column temperature was maintained at 30 °C and samples temperature at 12 °C. Mobile phases, used at a flow-rate of 0.5 mL/minute, consisted of formic acid (13.2 μM), and MeOH. The gradient of mobile phases is described in Table 1. Excitation and emission wavelengths were fixed at: 345 and 389 nm for B[a]P-Tetrol, 265 and 365 nm for B[a]P-4,5-diol, 349 and 398 nm for B[a]P-7,8-diol, 365 and 430 nm for 3-OHB[a]P, and 296 and 405 nm for B[a]P, respectively.

Data analysis

Concentrations of B[a]P and metabolites below the quantification limit (QL) were replaced by the half of the QL value. Their levels were expressed in the percentage of the applied dose. The results were presented in 3 parts: unmetabolized B[a]P distribution in human skin model, B[a]P-tetrol/B[a]P ratios in skin and culture medium, and metabolites production by human skin. In each part, results were graphically presented before describing modelling results. Figures were created using Microsoft Excel or R 3.3.2 software.

Due to repeated measures, either at the same time (replicates) or at different times (from 8 to 48 h) and the inclusion

Table 1 Composition of mobile phases and gradient curves during the whole run

Time (min)	Mobile phases		Gradient curves
	Formic acid (%)	MeOH (%)	
0.0	90.0	10.0	Convex (<i>n</i> = 1/3)
1.0	90.0	10.0	Convex (<i>n</i> = 1/3)
–	↓	↓	Convex (<i>n</i> = 1/3)
21.0	0.0	100.0	Convex (<i>n</i> = 1/3)
24.0	0.0	100.0	Linear (<i>n</i> = 1)
–	↓	↓	Linear (<i>n</i> = 1)
25.0	90.0	10.0	Linear (<i>n</i> = 1)
35.0	90.0	10.0	Linear (<i>n</i> = 1)

↓: gradient in progress. % of MeOH variation was calculated by the Waters® software according to the following equation:

$$\%B = \%B_{\text{initial}} + (\%B_{\text{final}} - \%B_{\text{initial}}) \times \left(\frac{\%T}{100}\right)^n$$

%*T* is percentage of time passed in the gradient segment, *n* is described for each gradient curve

of several donors, linear mixed effects models were used. Data analysis was performed using R 3.3.2 software (R foundation for Statistical Computing). The normality of the distributions was ensured or approached using Shapiro–Wilk test following Box-Cox transformation. Metabolites data obtained after 8 h exposures were excluded from the model as a great majority of concentrations were below the QL: B[a]P-tetrol was below the QL for all the skin samples while B[a]P-tetrol, B[a]P-7,8-diol, and 3OHB[a]P were below the QL in 21, 20, and 24 out of 24 medium samples, respectively. The relations between B[a]P dose, time, and age of donors with total unmetabolized B[a]P (B[a]P on skin surface, in skin, and adsorbed on the insert/well), unmetabolized B[a]P and metabolites in the medium, B[a]P-tetrol/B[a]P ratios in the skin and in the medium were studied using the “lme” function from “nlme” package (Pinheiro and Bates 2000). B[a]P dose, time, and age of donors were included as fixed effects, while random effects were defined by replicates nested in the same subject’s samples. Data from 24 to 48 h exposures were compared to those of 8 and 24 h exposures, respectively, while data from 10 nmol-exposure and 25 nmol-exposure were both compared to those of 1 nmol-exposure. For all tests, a *p* value below 0.05 was considered significant.

Results

Analysis and skin extraction efficiency of B[a]P and its metabolites

B[a]P and its four metabolites were well separated by HPLC coupled with fluorescence detection (Fig. 1). The QL for B[a]P-tetrol, B[a]P-4,5-diol, B[a]P-7,8-diol, 3-OHB[a]P, and B[a]P were 0.07, 0.14, 0.08, 0.13 and 0.31 ng/mL, respectively.

The recoveries for B[a]P, B[a]P-tetrol, and B[a]P-4,5-diol from skin samples spiked with standards were 99.2 ± 0.5%, 105.0 ± 1.3% and 106.5 ± 2.8% (*n* = 9), respectively. However, B[a]P-4,5-diol was always below the QL in the skin or medium samples. On the contrary, 3-OHB[a]P recovery from skin was very low (extraction mean = 5.9 ± 1.5%; *n* = 9), and B[a]P-7,8-diol recovery was variable (extraction mean = 60.6 ± 16.0%; *n* = 9). Besides B[a]P, B[a]P-tetrol was the only metabolite that could be quantified in the skin, while B[a]P-tetrol, B[a]P-7,8-diol, and 3-OHB[a]P could be analysed in the medium.

Unmetabolized B[a]P distribution in the 4 compartments of the skin model

The distribution of unmetabolized B[a]P quantified in the four compartments of skin model after B[a]P exposure at

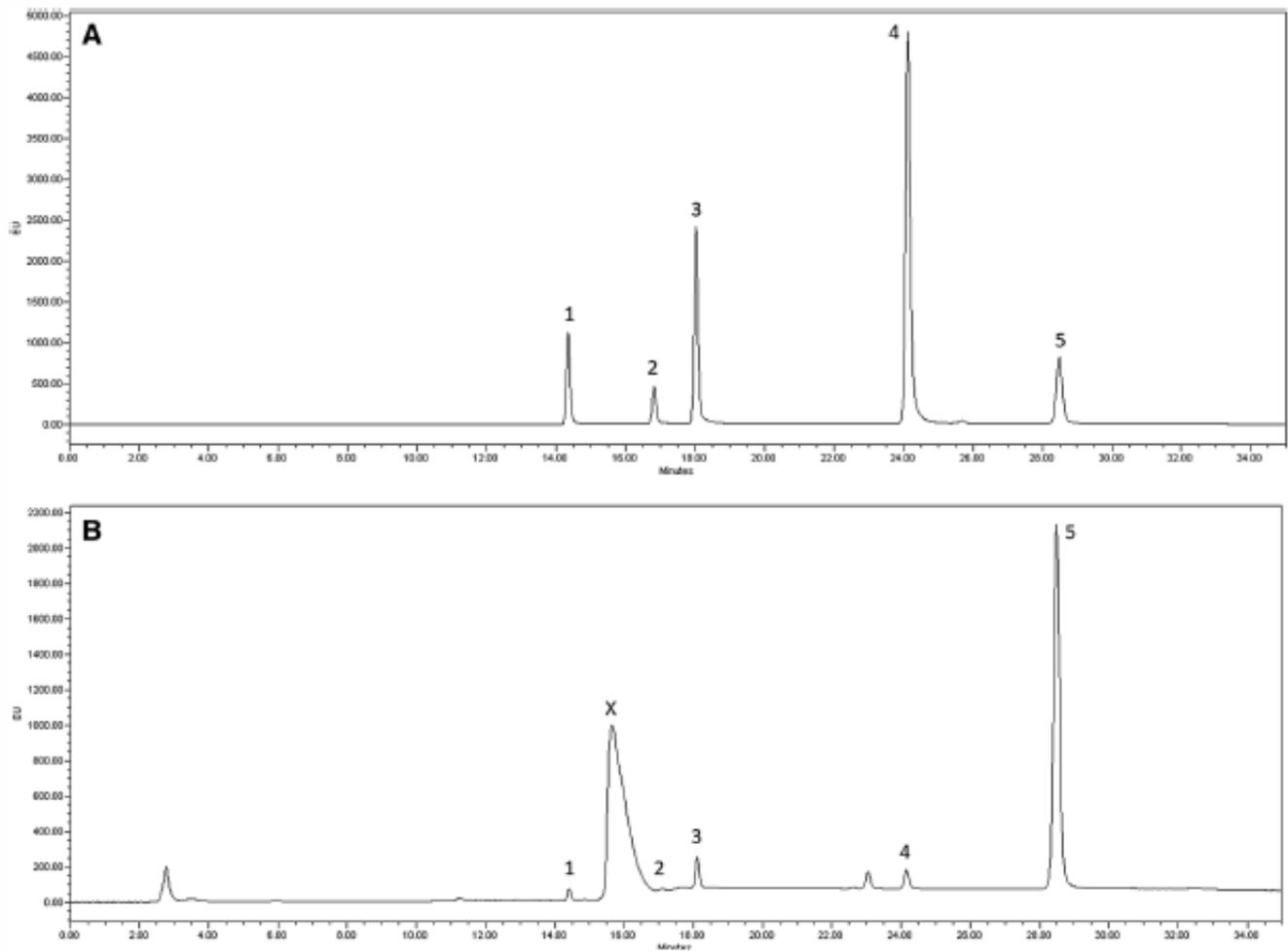


Fig. 1 Chromatographic separation of (1) B[a]P-tetrol, (2) B[a]P-4,5-diol, (3) B[a]P-7,8-diol, (4) 3-OHB[a]P and (5) B[a]P after injection of (A) standards mixture, (B) culture medium sample of human skin explants exposed to B[a]P (25 nmol, 24 h). *X* unknown impurity

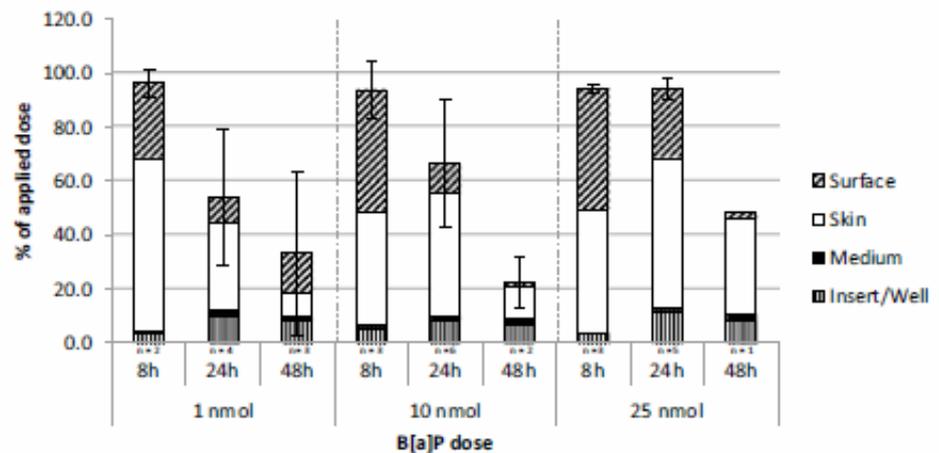
different doses (1, 10, 25 nmol), and at different exposure times (8, 24, 48 h) is presented on Fig. 2. The percentage of total unmetabolized B[a]P out of the applied dose globally decreased with the exposure time, whatever the dose. While the percentage was around 95% after 8 h exposure for all the doses, it ranged from 54 to 94% at 24 h and from 22 to 48% at 48 h, according to the dose.

The percentage of B[a]P remaining on the skin surface reduced with increasing exposure time. For 1 nmol, B[a]P decreased from 25% after 8 h to 10–15% after 24 and 48 h. For 10 and 25 nmol, the decline was more important as the percentage of B[a]P decreased from 45% after 8 h to 3% after 48 h of exposure. The percentage of B[a]P remaining on the skin surface rose with increasing applied dose for the two first exposure times. After 8 h, B[a]P found on the skin surface was about 28% for 1 nmol, while it was 45% for 10 and 25 nmol. After 24 h, B[a]P on the skin surface was 2–3 times higher for 25 nmol than for 1 and 10 nmol. The percentage of B[a]P measured in the skin varied according

to applied dose and exposure time. At 8 h of exposure, 64% of the applied dose was located in the skin for 1 nmol, while it was around 43% for 10 and 25 nmol. The decrease of unmetabolized B[a]P with rising exposure time seemed faster for 1 nmol than for the two other doses. Indeed, after 24 and 48 h, 32% and 9% of applied dose were in the skin for 1 nmol, respectively. For 10 and 25 nmol, 45% and 55% remained in the skin after 24 h, respectively, and then decreased to 12% and 35% after 48 h. B[a]P in the medium and on the insert/well remained below 3% and 12%, respectively, whatever the time and dose.

The impact of applied dose and exposure time on unmetabolized B[a]P quantified in the different compartments of skin model was analysed using a linear mixed-effect model (Table 2). Results confirmed that total unmetabolized B[a]P and B[a]P remaining on the skin surface decreased as exposure time increased. For total unmetabolized B[a]P, a very high negative coefficient (−16) was calculated for the 8–24 h period, and it was multiplied by two during the

Fig. 2 Unmetabolized B[a]P distribution in human skin model in function of exposure time and topically applied dose. Data are expressed in the percentage of applied dose (n = number of donors, mean of donors \pm standard deviation of donors' mean total recovery)



24–48 h period. Coefficients for skin surface were lower (-2), but comparable for the 2 time periods. While time had a great negative effect (-9) on unmetabolized B[a]P found in the skin during the second period, it had no significant effect during the first period. On the contrary, time had a low, positive impact ($+0.5$) on B[a]P found in the medium for the two time periods. While it had a low positive impact on B[a]P found on the insert/well during the first period, it had a low negative effect for the second.

The increase of B[a]P applied dose had an important positive effect on total unmetabolized B[a]P. The coefficient which was around $+10$ when the dose increased from 1 to 10 nmol, was multiplied by two when the dose rose from 10 to 25 nmol. A moderate positive effect ($+1.5$) of applied dose was observed on B[a]P remaining on skin surface for the 2 dose increases. For B[a]P in the skin, only the highest dose had a great significant positive effect ($+3.5$), although the intermediate dose was close to being statistically significant. Conversely, applied dose did not influence the percentage of B[a]P found in the medium or on the insert/well.

Age had a roughly positive effect on the B[a]P found in the medium. Inter-individual variability was higher than residual variability, except in the skin.

B[a]P-tetrol/B[a]P ratios in skin and culture medium

The ratios of B[a]P-tetrol level out of B[a]P level found in skin and in medium were calculated after B[a]P exposure at different doses (1, 10, 25 nmol) and different exposure times (8, 24, 48 h) (Fig. 3). After an 8 h exposure, the ratios were close to zero in the skin and in the medium, whatever the dose applied. These ratios increased over time in the skin and in the medium, but increases in the medium were higher than those in the skin. However, these increases were lower when the applied dose was extended, whether in the skin or in the medium. While the ratios reached 0.23 in the skin and 1.05 in the medium for 1 nmol after 48 h exposure, they

were 2–3 times lower for 10 nmol, and 5–6 times lower for 25 nmol, respectively.

These results were confirmed using a linear mixed effects model (Table 3). Time had a positive effect on the B[a]P-tetrol/B[a]P ratios, while increasing applied dose had a negative effect, whether in the skin or in the culture medium. The coefficient which was equal to -0.8 when the dose increased from 1 to 10 nmol, was multiplied by two when the dose raised from 10 to 25 nmol. These coefficients were in the same order of magnitude in the skin and in the medium. Age had no effect on B[a]P-tetrol/B[a]P ratio. While inter-individual variability was twice lower than residual variability in the skin, it was comparable in the medium.

B[a]P metabolites in the culture medium

B[a]P-tetrol, B[a]P-7,8-diol and 3-OHB[a]P were quantified in the medium following B[a]P exposure at different doses (1, 10, 25 nmol) and different exposure times (8, 24, 48 h) (Fig. 4). B[a]P-tetrol and 3-OHB[a]P were the main metabolites released at comparable levels in the medium, while B[a]P-7,8-diol levels were around seven times lower. The percentage of B[a]P-tetrol and 3-OHB[a]P out of the total B[a]P applied dose increased in the medium with exposure time. B[a]P-tetrol production was lower when the B[a]P applied dose increased after 24 and 48 h exposure times, whereas this difference was unclear for 3-OHB[a]P after 48 h.

Data analysis with a linear mixed effects model confirmed that the levels of B[a]P-tetrol and 3-OHB[a]P increased during the 24–48 h period ($+1.4$), whereas this factor had a lower negative effect on B[a]P-7,8-diol production (-0.6) (Table 4). Increasing the B[a]P applied dose had no effect on 3-OHB[a]P and B[a]P-7,8-diol production, whereas it had a negative effect on B[a]P-tetrol production. The coefficient, which was equal to -0.5 when the dose increased from 1 to 10 nmol, was doubled when the dose raised from 10 to

Table 2 Results from linear mixed effects models for total unmetabolized B[a]P (skin surface + skin + medium + insert/well), B[a]P remaining on skin surface, B[a]P in skin, B[a]P in medium and B[a]P adsorbed on insert/well

	Total			Skin surface			Skin			Medium			Insert/well		
	Estimate (SE)	<i>p</i> value		Estimate (SE)	<i>p</i> value		Estimate (SE)	<i>p</i> value		Estimate (SE)	<i>p</i> value		Estimate (SE)	<i>p</i> value	
Intercept	77.394 (21.277)	0.001		7.236 (2.338)	0.003		11.466 (3.861)	0.005		-1.753 (0.908)	0.059		1.694 (0.864)	0.055	
Age	-0.570 (0.489)	0.274		-0.103 (0.054)	0.091		-0.035 (0.088)	0.698		0.049 (0.021)	0.044		0.003 (0.020)	0.871	
Dose															
1	Ref			Ref			Ref			Ref			Ref		
10	10.990 (4.457)	0.017		1.152 (0.249)	0.000		1.826 (0.942)	0.058		-0.097 (0.172)	0.577		-0.109 (0.176)	0.539	
25	21.073 (5.914)	0.001		1.721 (0.338)	0.000		3.600 (1.249)	0.006		0.189 (0.229)	0.412		0.059 (0.233)	0.800	
Time															
24-8	-16.088 (4.868)	0.002		-2.207 (0.274)	0.000		0.731 (1.025)	0.479		0.390 (0.189)	0.044		0.789 (0.192)	0.000	
48-24	-39.726 (4.676)	0.000		-2.389 (0.267)	0.000		-8.670 (0.984)	0.000		0.500 (0.181)	0.008		-0.549 (0.184)	0.004	
Random effects															
σ_e^2	339.566			4.515			10.632			0.633			0.547		
Residual	225.225			0.672			10.263			0.334			0.349		

Significant *p* values are in boldSE standard error, σ_e^2 inter-individual variability

Fig. 3 Ratios B[a]P-tetrol/B[a]P in skin and medium in function of exposure time (n = number of donors, mean of donors \pm standard deviation)

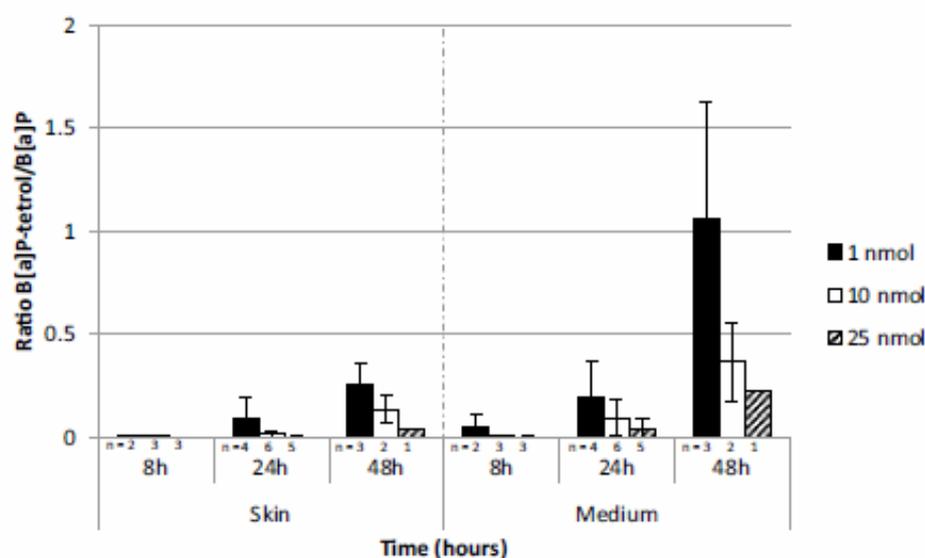


Table 3 Results from linear mixed effects model for the ratios B[a]P-tetrol/B[a]P calculated in the skin and in the medium

	Skin		Medium	
	Estimate (SE)	<i>p</i> value	Estimate (SE)	<i>p</i> value
Intercept	-3.094 (0.536)	0.000	-0.918 (0.756)	0.234
Age	0.026 (0.012)	0.067	-0.002 (0.018)	0.898
Dose				
1	Ref		Ref	
10	-0.833 (0.172)	0.000	-0.739 (0.210)	0.001
25	-1.454 (0.220)	0.000	-1.392 (0.265)	0.000
Time				
48-24	1.226 (0.147)	0.000	0.977 (0.177)	0.000
Random effects				
σ_b^2	0.159		0.353	
Residual	0.234		0.328	

Significant *p* values are in bold

SE standard error, σ_b^2 inter-individual variability

25 nmol. Age had a slight positive effect on the production of B[a]P-tetrol and 3-OHB[a]P, but had no influence on B[a]P-7,8-diol formation. Inter-individual variability was lower than residual variability for B[a]P-tetrol and 3-OHB[a]P, while it was higher for B[a]P-7,8-diol.

Discussion

Dermal uptake is a major concern in pharmaceutical and toxicological sciences. Increasing restrictions in animal testing has led to the development of diversified in vitro skin models, from artificial membrane and reconstructed human skin models to ex vivo skin models (Flaten et al. 2015). In the present study, using ex vivo samples from freshly excised human skin serves as the best representative model to reproduce realistic cutaneous exposure in humans. Moreover, it suppresses the uncertainty between species (Kao et al. 1985;

Fig. 4 Appearance of B[a]P-tetrol, B[a]P-7,8-diol and 3-OHB[a]P in medium as a function of time. Data are expressed in % of applied dose (n = number of donors, mean of donors \pm standard deviation)

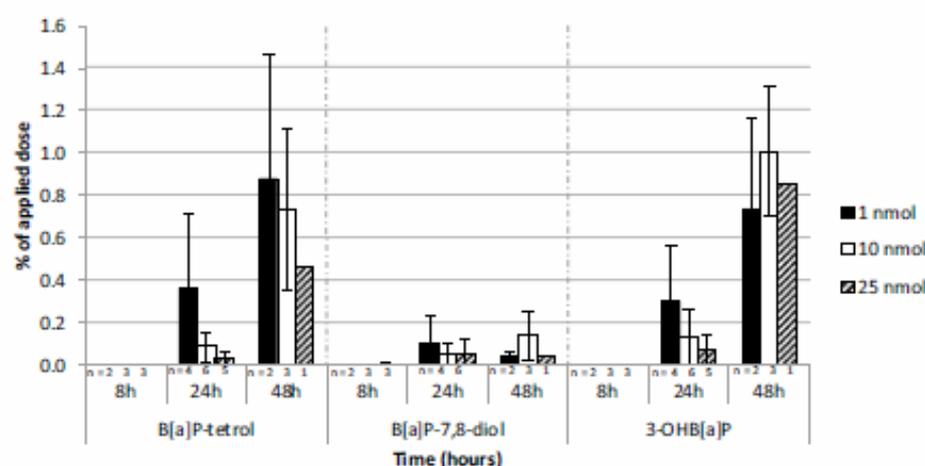


Table 4 Results from linear mixed effects models for B[a]P-tetrol, B[a]P-7,8-diol and 3-OHB[a]P in medium

	B[a]P-tetrol		B[a]P-7,8-diol		3-OHB[a]P	
	Estimate (SE)	<i>p</i> value	Estimate (SE)	<i>p</i> value	Estimate (SE)	<i>p</i> value
Intercept	-2.808 (0.546)	0.000	3.285 (1.095)	0.005	-2.713 (0.339)	0.000
Age	0.044 (0.013)	0.008	-0.021 (0.026)	0.437	0.042 (0.007)	0.000
Dose						
1	Ref		Ref		Ref	
10	-0.533 (0.176)	0.005	-0.142 (0.195)	0.473	-0.059 (0.160)	0.714
25	-1.006 (0.224)	0.000	0.341 (0.244)	0.171	-0.325 (0.208)	0.128
Time						
48–24	1.425 (0.150)	0.000	-0.634 (0.163)	0.000	1.423 (0.141)	0.000
Random effects						
σ_b^2	0.165		0.861		0.026	
Residual	0.243		0.259		0.254	

Significant *p* values are in bold*SE* standard error, σ_b^2 inter-individual variability

Payan et al. 2009). The use of human skin is cumbersome, since the experimental plan has to be adapted to the operating program of surgeons, as well as to the size and quality of skin biopsies obtained following surgery. Acetone was chosen as the deposition vehicle, as in number of studies (Brinkmann et al. 2013; Jacques et al. 2010; Moody et al. 2009). A restricted volume (5 μ L) was applied on the skin to limit its impact on cutaneous absorption and metabolism (Ibrahim and Li 2009; Kontir et al. 1986). Culture plates with inserts (static membranes) were used because this model of organ culture system maintains the skin at an air–liquid interface and nutrients diffuse across the insert to feed the dermis/epidermis. Additionally, numerous experimental conditions can be conducted simultaneously and low amounts of xenobiotics can be applied (Jacques et al. 2010). Other systems were used in the literature as Franz cells (static cells) or flow-through cells (dynamic cells) (Kao et al. 1985), but no difference was showed between them (Bronaugh and Stewart 1985; van de Sandt et al. 2004). The proportion of B[a]P recovered from the insert/well was comparable to those previously measured (Jacques et al. 2010).

Breast skin was recovered immediately after plastic surgery, whereas other studies were usually conducted on abdominal skin (Brinkmann et al. 2013; Hopf et al. 2018; Payan et al. 2009; Storm et al. 1990), but differences in PAH permeation between anatomical skin sites were low in humans in vivo (VanRooij et al. 1993b). Moreover, breast skin was reproducibly dermatomized to 250 μ m with a SOBER mechanical dermatome while other anatomical pieces, such as abdominal skin, require the use of an electrodermatome, due to higher thickness and resistance (Brinkmann et al. 2013; Hopf et al. 2018; Payan et al. 2009). A thickness of 250 μ m was chosen because most of the absorbed chemicals enter the bloodstream through the skin capillaries located in the dermis at a depth of 200 μ m

(Bronaugh and Stewart 1986). This is in agreement with the literature, as most authors use a skin thickness ranging from 200 μ m to 500 μ m (Jacques et al. 2010; Ng et al. 1992; Payan et al. 2009; Storm et al. 1990). Unmetabolized B[a]P in the medium, as substitute of B[a]P uptake, was limited and remained below 3% of the applied dose. This result demonstrated the great importance of metabolism in B[a]P cutaneous absorption. Similar results were previously obtained using either human or pig skin (Jacques et al. 2010; Moody et al. 2009). A study recently confirmed that unmetabolized B[a]P diffusion through human skin was limited, while lighter and thus more hydrosoluble PAH were shown to cross human skin more easily (Hopf et al. 2018). Since B[a]P is a lipophilic compound, special attention was made to help its partitioning in the medium, while avoiding components likely to artificially influence skin metabolism, such as fetal bovine serum. Indeed, absence of substances helping the diffusion of lipophilic compounds was responsible for the quantification of B[a]P traces only (Brinkmann et al. 2013). Thus, BSA was added to the medium, as previously published (Jacques et al. 2010; Moody et al. 1995; Payan et al. 2009). Unmetabolized B[a]P uptake increased over time, but the dose had no significant effect on the proportion in the medium, demonstrating the proportionality to applied dose up to 25 nmol in accordance with a passive diffusion mechanism. Due to a great first-pass metabolism, unmetabolized B[a]P is poorly bioavailable following dermal exposure, which indicates that B[a]P carcinogenicity is mostly located on the skin contamination site.

Skin samples were recovered from the hospital and treated within two hours to ensure viability. This operating mode was previously shown to conserve skin integrity using transepidermal water loss measurements (Hopf et al. 2018). In this study, human skin metabolized B[a]P to a great extent, especially after 24 h. This time point corresponds

with the maximum activity of CYP450 enzymes in human skin following a treatment with coal tar (Bickers and Kappas 1978). CYP450 production is dependent of the activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) via PAH binding to the AhR complex (Moorthy et al. 2015), resulting in a latency in their production (Genies et al. 2013). The core of the present study was the specific analysis of four B[a]P metabolites selected as potential biomarkers, according to the current literature. B[a]P-tetrol and B[a]P-7,8-diol were selected for the evaluation of B[a]P carcinogenic bioactivation. B[a]P-7,8-diol constitutes the proximate carcinogenic metabolite of B[a]P, while B[a]P-tetrol is the hydrolysis product of both the ultimate carcinogen, BPDE, and the non-carcinogenic reverse-BPDE. B[a]P-tetrol quantified in the present study corresponded to the sum of the two enantiomers deriving from BPDE (B[a]P-(7R,8S,9R,10S)-tetrol) and reverse-BPDE (B[a]P-(7S,8R,9S,10R)-tetrol). Nevertheless, the B[a]P-(7R,8S,9R,10S)-tetrol enantiomer represented 78% of B[a]P-tetrol measured in the urine of occupationally exposed creosote workers (Hecht et al. 2010). Therefore, racemic B[a]P-tetrol analyzed in this study seems to be a relevant PAH exposure biomarker linked to the B[a]P proportion involved into carcinogenic BPDE pathway (Barbeau et al. 2017). 3-OHB[a]P is used as biomarker of exposure among occupationally exposed workers and represent a detoxification pathway (Barbeau et al. 2011; IARC 2010). Along with B[a]P-4,5-diol, those two metabolites are used as biomarkers for *in vivo* studies (Moreau and Bouchard 2014). B[a]P-9,10-diol was excluded as potential biomarker, contrary to other studies (Brinkmann et al. 2013), as this metabolic intermediate belongs to the reverse-BPDE pathway and was not detected in rat urine following exposure to B[a]P (Bouchard and Viau 1996). Three of these metabolites (B[a]P-7,8-diol, B[a]P-tetrol, and 3-OHB[a]P) were quantified in the culture medium while B[a]P-4,5-diol was constantly below the QL. Although B[a]P-4,5-diol was the second major metabolite in rats, this is consistent with *in vitro* studies showing limited formation in humans (Plakunov et al. 1987; Schwarz et al. 2001). B[a]P-tetrol and 3-OHB[a]P were the two major metabolites, steadily produced by human skin at comparable levels, whereas B[a]P-7,8-diol production was minor. Levels of B[a]P-tetrol and 3-OHB[a]P increased over time, while time had a low negative effect on the production of B[a]P-7,8-diol. 3-OHB[a]P was the major metabolite *in vivo* in rats after cutaneous exposure to B[a]P, while B[a]P-7,8-diol was minor and B[a]P-tetrol was barely detectable (Moreau and Bouchard 2014). B[a]P-7,8-diol is an intermediate metabolite involved in several metabolic pathways (Penning 2014); further metabolism could thus explain its low levels. Brinkmann *et al.* obtained a different metabolic profile after application of 50 nmol/cm² of B[a]P on abdominal human skin explants. B[a]P-7,8-diol was among the major metabolites whereas 3-OHB[a]P and B[a]P-tetrol were the minor

metabolites. This discrepancy in the metabolic profile probably comes from differences in experimental procedures. Brinkmann *et al.* used the EFT-400-ASY medium designed by MatTek for the production and maintenance of EpiDermFT™, a reconstituted human skin model (Brinkmann *et al.* 2013). Among other components (epidermal growth factor and other proprietary stimulators of epidermal differentiation), the medium composition includes hormones (insulin and hydrocortisone) and lipid precursors added to induce cellular growth and differentiation, but which may also be involved in the regulation of CYP450 expression (Zanger and Schwab 2013). A previous *in vitro* study underlined the dramatic impact of various hormones (triiodothyronine and growth hormone) on the expression of CYP3A4 by primary cultured hepatocytes (Liddle *et al.* 1998). In addition, the absence of BSA in the EFT-400-ASY medium greatly impacts the metabolic profile measured from the medium. Thus, in preliminary experiments in our study, 3-OHB[a]P and B[a]P-tetrol levels were respectively divided by 8.5 and 1.5 when BSA was excluded from medium composition (Fig. S2). This discrepancy may also result from the use of explants coming from different anatomic regions. Nevertheless, the few data available in the literature demonstrates a relatively even skin metabolism according to anatomic site and equal constitutive expression of xenobiotic metabolizing enzymes between breast and abdominal skin (Cheung *et al.* 1999; VanRooij *et al.* 1993b). The increase of metabolite levels after 48 h demonstrates that skin is viable at the end of exposure, as previously described with pig skin (Jacques *et al.* 2010).

With the goal of representing occupational exposures while being able to measure metabolites, two low B[a]P doses (0.88 and 8.85 nmol/cm²) and one high dose (22.12 nmol/cm²) for comparison with the literature, were deposited on skin explants. Indeed, applied doses usually ranged from 6 to 293 nmol/cm², with a great majority higher than 30 nmol/cm² (Brinkmann *et al.* 2013; Jacques *et al.* 2010; Kao *et al.* 1985; Ng *et al.* 1992; Payan *et al.* 2009). In our study, the deposited amounts were close to dermal exposures measured in industrial settings using coal tar raw material. Dermal contamination remained below 5 fmol/cm² for asphalt workers (Fustinoni *et al.* 2010), whereas it reached 1 nmol/cm² for workers exposed to coal tar in aluminium production or roofing (McClellan *et al.* 2006; VanRooij *et al.* 1992). Results demonstrate a great permeability of human skin up to 25 nmol. More than half of the applied dose penetrated the skin within 8 h, which corresponds to the duration of a full working day. The remaining B[a]P steadily penetrated the skin, since lipophilic compounds like B[a]P accumulate in the stratum corneum by passive diffusion, resulting in a skin reservoir (Bronaugh and Maibach 2005; Chu *et al.* 1996). However, B[a]P penetration and metabolism were slower at higher doses resulting in unmetabolized

B[a]P accumulation both in and on the skin, which was also demonstrated on pig skin over 50 nmol/cm^2 and hairless guinea pig skin over 32 nmol/cm^2 (Jacques et al. 2010; Ng et al. 1992). The decrease in penetration at high doses may indicate a saturation of the skin reservoir. As a result, Moody et al. measured more than 40% of B[a]P remaining on the skin surface after an application of 39 nmol/cm^2 for 24 h (Moody et al. 1995). B[a]P-tetrol metabolic pathway was saturated above 0.88 nmol/cm^2 , whereas no significant effect was observed on 3-OHB[a]P formation. Indeed, sulfate and glucuronide conjugated 3-OHB[a]P and 9-OHB[a]P were the major metabolites after application of high doses of B[a]P on pig skin, whereas B[a]P-tetrol represented only a limited amount of metabolites. Comparatively to B[a]P-tetrol, the saturation of OH-B[a]P glucuronide and sulfate conjugates production observed with pig skin started over 200 nmol/cm^2 (Jacques et al. 2010). This limitation in B[a]P-tetrol production may be due to a saturation of epoxide hydrolase (EH). Indeed, B[a]P conversion to B[a]P-tetrol requires three successive biochemical reactions involving xenobiotic metabolizing enzymes like CYP1A1/1B1 and EH to form BPDE, and a spontaneous hydrolysis step from BPDE to B[a]P-tetrol. In contrast, 3-OHB[a]P metabolism counts only one step involving CYP450 to form arene oxide (Shimada 2006; Zhong et al. 2011), and a spontaneous non enzymatic rearrangement from intermediate arene oxide to phenol. The saturation in B[a]P-tetrol production indicates a limitation of BPDE metabolic pathway as the applied dose increases. *In vitro*, BPDE adducts were quantitatively the main mechanism of B[a]P carcinogenicity, whereas *o*-quinone and radical cation pathways were minor contributors even when the dose increased (Genies et al. 2013). In addition, DNA adducts produced during the radical cation pathway is a minor activation mechanism of PAHs *in vivo* (Xue and Warshawsky 2005). Altogether, this may indicate that B[a]P carcinogenicity might not increase even when skin contamination increases (in concentration or number of exposure times). These results demonstrate that the applied dose has a great influence on B[a]P metabolism and needs to be carefully discussed before using data of *in vitro* or *in vivo* model for human risk assessment. The importance of metabolic considerations in the use of *in vitro* skin model for risk assessment was previously underlined (Hewitt et al. 2013).

Data analysis was ensured using a linear mixed-effect model to take into account the use of the 11 different skin donors. The accuracy of the linear mixed effect model was confirmed by homoscedasticity distributions of standardized residues over fitted values (Fig. S1). Besides underlining the significant trends, the linear mixed effect model quantified the inter-individual and the residual variabilities in B[a]P skin absorption and metabolism. A high inter-individual variability was observed for unmetabolized B[a]P penetration as various skin donors were exposed to different applied

doses during various durations. Inter-individual variability in B[a]P uptake was rather limited, contrary to previous studies (Hopf et al. 2018; Payan et al. 2009). Donors' ages were declared as a fixed effect, although it only had a limited impact on permeation and metabolism. In the literature, high inter-individual variabilities are also described toward skin absorption of numerous other drugs (Farahmand and Maibach 2009). Several factors contribute to inter-individual variability such as ethnicity, gender, genotype, general health, local blood flow, and formation and duration of skin depot (Aklilu et al. 2005; Farahmand and Maibach 2009; Payan et al. 2009; Shimada 2006). Residual variability was sometimes higher than inter-individual variability, since intra-individual variability, as well as analytical or experimental imprecisions were not defined in the model. This increase in model error remained limited since variances were low in such cases.

Conclusion

Ex vivo human skin models are relevant to study absorption and metabolism of xenobiotics after cutaneous exposure, but our results highlight the great influence of applied dose and experimental conditions on skin absorption assays. Due to the large amount of B[a]P cutaneous absorption, wearing protective equipment during occupational activities is essential, as well as skin decontamination following work completion. Unmetabolized B[a]P and B[a]P-7,8-diol are not good biomarkers. Indeed, samples can become contaminated by B[a]P when collecting at the workplace. Moreover, B[a]P uptake was limited, while B[a]P-7,8-diol was a minor metabolite. Conversely, both 3-OHB[a]P and B[a]P-tetrol are the two major metabolites found in the culture medium and these biomarkers can be quantified in the urine of workers exposed to PAH. For assessing carcinogenic risk, racemic B[a]P-tetrol is more relevant than 3-OHB[a]P because it is representative of the main B[a]P bio-activation pathway. Furthermore, B[a]P-tetrol metabolic pathway was rapidly saturated, whereas no significant effect was observed on 3-OHB[a]P formation. Thus, the quantification of this last metabolite could overestimate the carcinogenic risk when skin contamination increase, due to increased concentrations or occurrences. Due to metabolism interactions of different PAH and other pollutants present in complex mixtures emitted by occupational and environmental sources, further studies are required to evaluate cutaneous absorption and metabolism of B[a]P using commercial products used in different types of companies.

Acknowledgements This work was funded by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) (Grant Number ENV201412) and Plan Cancer. The authors wish to thank the team

"Service de Chirurgie Plastique et Maxillo-faciale CHU Grenoble Alpes" for their help in skin sample collection.

Compliance with ethical standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Experiments were conducted in accordance with the article L1245-2 of the French Public Health Code on the use of surgical wastes for research purposes. Collection, storage, and use of human skin samples were made anonymously, declared to the French authorities, and validated in the CODECOH DC-2008-444 document.

Informed consent Informed consent was obtained from all skin donors.

References

- Akllilu E, Øvrebø S, Botnen IV, Otter C, Ingelman-Sundberg M (2005) Characterization of common CYP1B1 variants with different capacity for Benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol epoxide formation from Benzo[*a*]pyrene. *Cancer Res* 65(12):5105–5111 <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-0113>
- Andersson JT, Achten C (2015) Time to Say goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an up-to-date use of PACs for environmental purposes. *Polycyclic Aromat Compd* 35(2–4):330–354. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.991042>
- Barbeau D, Lutier S, Choissard L, Marques M, Persoons R, Maitre A (2017) Urinary trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene as the most relevant biomarker for assessing carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons exposure. *Environ Int* 112:147–155. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.012>
- Barbeau D, Maitre A, Marques M (2011) Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst* 136(6):1183–1191. <https://doi.org/10.1039/C0AN00428F>
- Bickers DR, Kappas A (1978) Human skin aryl hydrocarbon hydroxylase. Induction by coal tar. *J Clin Invest* 62(5):1061–1068. <https://doi.org/10.1172/JCI109211>
- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 8(3):444–472. <https://doi.org/10.1023/a:1018465507029>
- Bouchard M, Viau C (1996) Urinary excretion kinetics of Pyrene and Benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 139(2):301–309. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0169>
- Brinkmann J, Stolpmann K, Trappe S et al (2013) Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[*a*]pyrene. *Toxicol Sci* 131(2):351–359. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs316>
- Bronaugh RL, Maibach HI (2005) Percutaneous absorption: drugs, cosmetics, mechanisms, methods. CRC Press, Boca Raton
- Bronaugh RL, Stewart RF (1985) Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: the flow-through diffusion cell. *J Pharm Sci* 74(1):64–67
- Bronaugh RL, Stewart RF (1986) Methods for in vitro percutaneous absorption studies VI: preparation of the Barrier layer. *J Pharm Sci* 75(5):487–491. <https://doi.org/10.1002/jps.2600750513>
- Cavet M, Leonard M (2013) Les expositions aux produits chimiques cancérogènes en 2010. *Dares Anal* 54:9
- Cheung C, Smith CK, Hoog J-O, Hotchkiss SAM (1999) Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem Biophys Res Commun* 261(1):100–107. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0943>
- Chu I, Dick D, Bronaugh R, Tryphonas L (1996) Skin reservoir formation and bioavailability of dermally administered chemicals in hairless guinea pigs. *Food Chem Toxicol* 34(3):267–276. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00112-3](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00112-3)
- Farahmand S, Maibach HI (2009) Transdermal drug pharmacokinetics in man: interindividual variability and partial prediction. *Int J Pharma* 367(1–2):1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.11.020>
- Fernando S, Shaw L, Shaw D et al (2016) Evaluation of firefighter exposure to wood smoke during training exercises at burn houses. *Environ Sci Technol* 50(3):1536–1543. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04752>
- Flaten GE, Palac Z, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Ž, Škalko-Basnet N (2015) In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *Eur J Pharm Sci* 75:10–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.018>
- Fustinoni S, Campo L, Ciria PE et al (2010) Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in asphalt workers. *Occup Environ Med* 67(7):456–463. <https://doi.org/10.1136/oem.2009.050344>
- Förster K, Preuss R, Roßbach B, Brüning T, Angerer J, Simon P (2008) 3-Hydroxybenzo[*a*]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occup Environ Med* 65(4):224–229. <https://doi.org/10.1136/oem.2006.030809>
- Genies C, Maître A, Lefebvre E, Jullien A, Chopard-Lallier M, Douki T (2013) The extreme variety of genotoxic response to Benzo[*a*]pyrene in three different human cell lines from three different organs. *PLoS one* 8(11):e78356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078356>
- Hecht SS, Carmella SG, Villalta PW, Hochalter JB (2010) Analysis of phenanthrene and Benzo[*a*]pyrene tetraol enantiomers in human urine: relevance to the bay region diol epoxide hypothesis of Benzo[*a*]pyrene carcinogenesis and to biomarker studies. *Chem Res Toxicol* 23(5):900–908. <https://doi.org/10.1021/tx9004538>
- Hewitt NJ, Edwards RJ, Fritsche E et al (2013) Use of human in vitro skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Toxicol Sci* 133(2):209–217. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kf080>
- Hopf NB, Spring P, Hirt-Burri N et al (2018) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) skin permeation rates change with simultaneous exposures to solar ultraviolet radiation (UV-S). *Toxicol Lett* 287:122–130. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.024>
- IARC (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans/World Health Organization. *Int Agency Res Cancer* 92:1–853
- Ibrahim SA, Li SK (2009) Effects of solvent deposited enhancers on transdermal permeation and their relationship with Emax. *J Controlled Release* 136(2):117–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.023>
- Jacques C, Perdu E, Duplan H et al (2010) Disposition and biotransformation of 14C-Benzo(a)pyrene in a pig ear skin model: ex vivo and in vitro approaches. *Toxicol Lett* 199(1):22–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.08.001>
- Jongeneelen FJ (2001) Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 45(1):3–13. <https://doi.org/10.1093/annhyg/45.1.3>

- Kammer R, Tinnerberg H, Eriksson K (2011) Evaluation of a tape-stripping technique for measuring dermal exposure to pyrene and benzo(a)pyrene. *J Environ Monit* 13(8):2165–2171. <https://doi.org/10.1039/C1EM10245A>
- Kao J, Patterson FK, Hall J (1985) Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo(a)pyrene and testosterone. *Toxicol Appl Pharmacol* 81(3 Pt 1):502–516
- Kontir DM, Glance CA, Colby HD, Miles PR (1986) Effects of organic solvent vehicles on benzo(a)pyrene metabolism in rabbit lung microsomes. *Biochem Pharmacol* 35(15):2569–2575. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90055-9)
- Lehman PA, Raney SG, Franz TJ (2011) Percutaneous absorption in man: in vitro-in vivo correlation. *Skin Pharmacol Physiol* 24(4):224–230
- Liddle C, Goodwin BJ, George J, Tapner M, Farrell GC (1998) Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes I. *J Clin Endocrinol Metabol* 83(7):2411–2416. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.7.4877>
- Lutier S, Maître A, Bonneterre V et al (2016) Urinary elimination kinetics of 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene of workers in a prebake aluminum electrode production plant: Evaluation of diuresis correction methods for routine biological monitoring. *Environ Res* 147:469–479. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.035>
- McClellan M, Rinehart R, Herrick R (2006) Dermal exposure and urinary 1-hydroxypyrene among asphalt roofing workers. *Epidemiology* 17(6):S134–S135
- Moody RP, Nadeau B, Chu I (1995) In vivo and in vitro dermal absorption of benzo(a)pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. *J Dermatol Sci* 9(1):48–58
- Moody RP, Yip A, Chu I, Glycol E (2009) Effect of cold storage on in vitro human skin absorption of six ¹⁴C-radiolabeled environmental contaminants: Benzo(a)Pyrene, methyl parathion, naphthalene, nonyl phenol, and toluene. *J Toxicol Environ Health Part A* 72(8):505–517. <https://doi.org/10.1080/15287390802328713>
- Moorthy B, Chu C, Carlin DJ (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci* 145(1):5–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv040>
- Moreau M, Bouchard M (2014) Comparison of the kinetics of various biomarkers of benzo(a)pyrene exposure following different routes of entry in rats. *J Appl Toxicol* 35(7):781–790. <https://doi.org/10.1002/jat.3070>
- Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA (1992) Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo(a)pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol Appl Pharmacol* 115(2):216–223
- Ngo MA, Maibach HI (2010) Dermatotoxicology: Historical perspective and advances. *Toxicol Appl Pharmacol* 243(2):225–238. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.008>
- Payan JP, Lafontaine M, Simon P et al (2009) 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol* 83(9):873–883. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0440-0>
- Penning TM (2014) Human Aldo-Keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* 27(11):1901–1917. <https://doi.org/10.1021/tx500298n>
- Pinheiro JC, Bates DM (2000) Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer, New York, pp 528
- Plakunov I, Smolarek TA, Fischer DL, Wiley JC Jr, Baird WM (1987) Separation by ion-pair high-performance liquid chromatography of the glucuronide, sulfate and glutathione conjugates formed from benzo(a)pyrene in cell cultures from rodents, fish and humans. *Carcinogenesis* 8(1):59–66
- van de Sandt JJM, van Burgsteden JA, Cage S et al (2004) In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regul Toxicol Pharmacol* 39(3):271–281. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.02.004>
- Sartorelli P, Aprea C, Cenni A et al (1998) Prediction of percutaneous absorption from physicochemical data: a model based on data of in vitro experiments. *Ann Occup Hyg* 42(4):267–276
- Schwarz D, Kisselev P, Cascorbi I, Schunck WH, Roots I (2001) Differential metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* 22(3):453–459
- Shimada T (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabol Pharmacokinet* 21(4):257–276
- Sobus JR, McClellan MD, Herrick RF et al (2009) Comparing urinary biomarkers of airborne and dermal exposure to polycyclic aromatic compounds in asphalt-exposed workers. *Ann Occup Hyg* 53(6):561–571. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mep042>
- Storm JE, Collier SW, Stewart RF, Bronaugh RL (1990) Metabolism of xenobiotics during percutaneous penetration: role of absorption rate and cutaneous enzyme activity. *Fundam Appl Toxicol* 15(1):132–141
- VanRooij JG, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ (1993a) Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *Br J Ind Med* 50(7):623–632
- VanRooij JGM, De Roos JHC, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ (1993b) Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons through human skin: differences between anatomical sites and individuals. *J Toxicol Environ Health* 38(4):355–368. <https://doi.org/10.1080/15287399309531724>
- VanRooij JGM, Bodelier-Bade M, De Looft M, Dijkmans AJA, Jongeneelen APGF (1992) Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among primary aluminium workers. *La Medicina del lavoro* 83(5):519–529
- Xue W, Warshawsky D (2005) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 206(1):73–93. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.006>
- Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138(1):103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zhong Y, Carmella SG, Hochalter JB, Balbo S, Hecht SS (2011) Analysis of *r*-7,*t*-8,9,*c*-10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene in Human Urine: a biomarker for directly assessing carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon exposure plus metabolic activation. *Chem Res Toxicol* 24(1):73–80. <https://doi.org/10.1021/tx100287n>

Fig. S1 Plots representing fitted values calculated by linear mixed effect modelling (X axis) as function of standardized residues (Y axis) for total unmetabolized B[a]P (A), unmetabolized B[a]P on skin surface (B), in the skin (C), in the medium (D), on the insert/well (E), ratios B[a]P-tetrol/B[a]P in the skin (F), ratios B[a]P-tetrol/B[a]P in the medium (G), B[a]P-tetrol (H), B[a]P-7,8-diol (I) and 3-OHB[a]P in the medium (J).

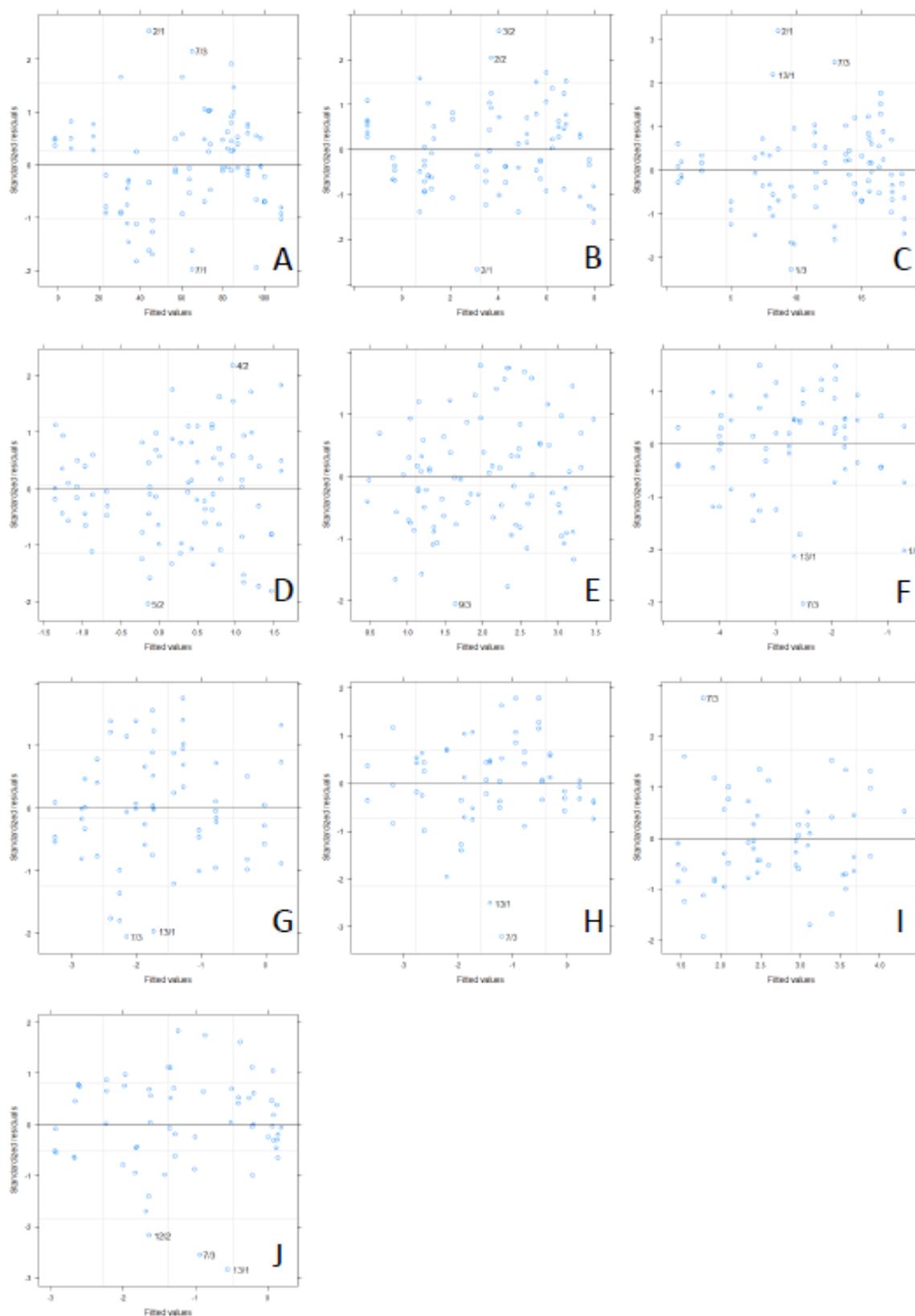
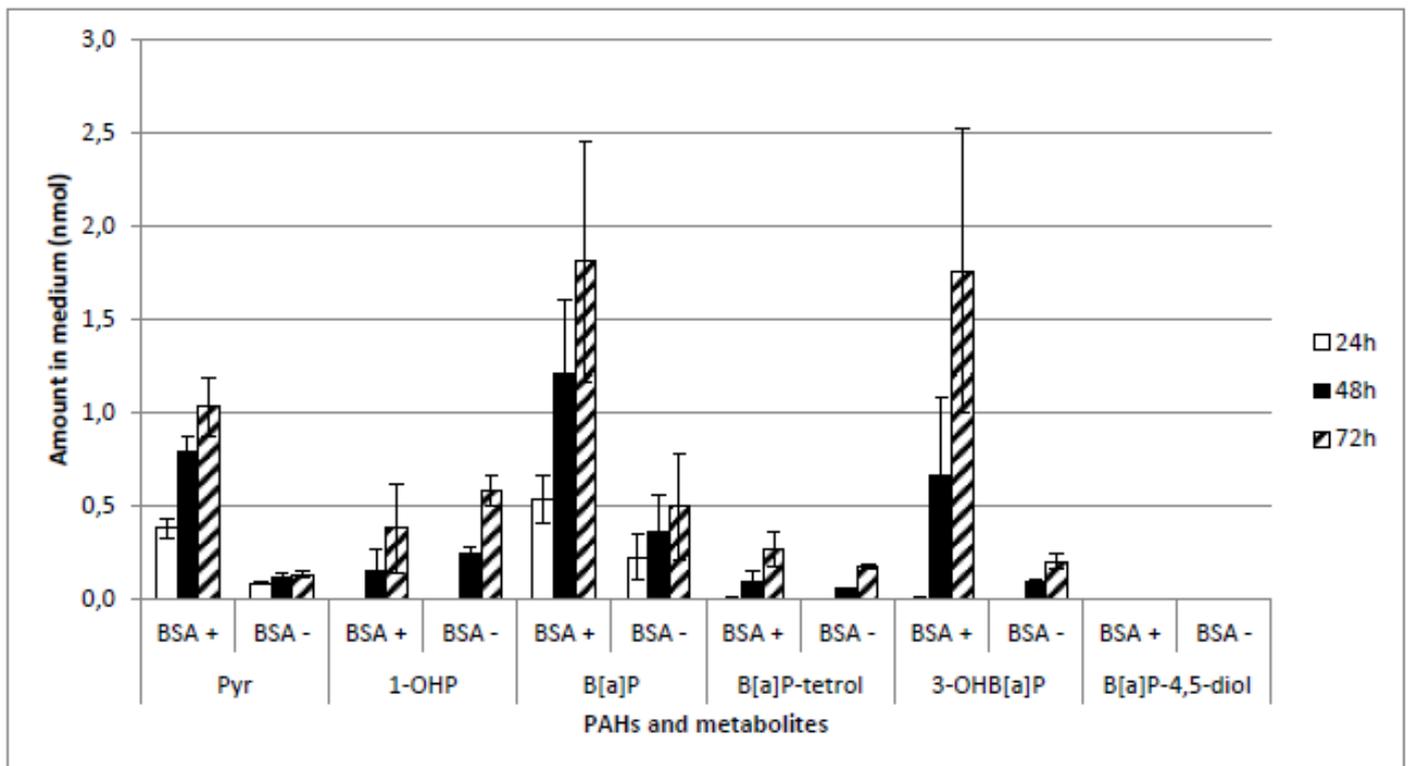


Fig. S2 Preliminary experiments for the comparison of B[a]P and Pyrene (Pyr) uptake and metabolic profile with or without addition of BSA (4%) in medium composition after application of 50 nmol of B[a]P and 5 nmol of Pyr on human skin explants (one skin donor) during 72 hours. Medium was renewed every 24 hours. Data are expressed in nmol \pm standard deviation, n = 3.



V. Principaux résultats

Le B[a]P pénètre très rapidement la peau avec une absorption d'au moins 50% de la dose appliquée en 8h d'exposition, quelle que soit la dose. Il est ensuite progressivement métabolisé au sein de la peau.

Si la pénétration du B[a]P est très rapide dans un premier temps, elle diminue lorsque la dose appliquée dépasse 1 nmol à l'instar du métabolisme, indiquant une saturation du métabolisme et du réservoir cutané. Dans la peau, la quantité de B[a]P non-métabolisé baisse rapidement à 1 nmol, tandis qu'il s'accumule plus longtemps à 10 et 25 nmol à l'instar des expérimentations conduites avec de fortes doses sur la peau de porc ou de cochon d'inde sans poil (Jacques et al. 2010b; Ng et al. 1992).

Le pourcentage de B[a]P non-métabolisé quantifié dans le milieu reste inférieur à 3% de la dose appliquée, en accord avec les études précédentes conduites sur peau humaine et de porc (Jacques et al. 2010b; Moody et al. 2009). Ainsi, la cancérogénicité du B[a]P semble essentiellement s'exprimer au niveau du site de contamination.

Les niveaux de biomarqueurs mesurés dans le milieu s'accroissent durant 48h, prouvant le maintien de la viabilité des explants de peau sur cette période d'exposition. Le 3-OHB[a]P et le B[a]P-tétraol sont les métabolites majoritaires. A l'inverse, le benzo[a]pyrène-4,5-*trans*-dihydrodiol n'a jamais été détecté, ce qui est en accord avec les études *in vitro* (Plakunov et al. 1987; Schwarz et al. 2001). Le B[a]P-7,8-diol est quantifiable mais est un métabolite minoritaire ce qui diffère des résultats de Brinkmann *et al.* (Brinkmann et al. 2013). Ceci peut être lié à la composition du milieu de survie employé dans cette dernière étude puisqu'il n'inclut pas de sérum albumine bovine, ce qui influence grandement la nature des profils métaboliques, et qu'il contient des hormones et des précurseurs lipidiques modulant l'expression des CYP450 (Liddle et al. 1998; Zanger and Schwab 2013).

La dose impacte différemment les voies métaboliques desquelles proviennent le 3-OHB[a]P et le B[a]P-tétraol. La quantité de 3-OHB[a]P, dont le métabolisme dépend uniquement des CYP450 (Shimada 2006), ne sont pas influencés par l'augmentation de dose de 1 à 25 nmol. Ceci correspond aux données de la littérature puisque la saturation de la voie des métabolites hydroxylés a été rapportée uniquement pour des doses 10 fois supérieures (Jacques et al. 2010b). Inversement, la formation du B[a]P-tétraol, dépendante des CYP450 et des EH (Zhong et al. 2011), chute lorsque la dose appliquée s'accroît ce qui pourrait être dû à la saturation des EH. Les autres voies de bioactivation étant minoritaires (Genies et al. 2013; Xue and Warshawsky 2005), ces résultats

pourraient indiquer que la cancérogénicité du B[a]P n'augmente pas lorsque la contamination de la peau augmente.

VI. Conclusion

Globalement, les résultats obtenus démontrent la pertinence des explants de peau humaine pour l'étude de l'absorption et de métabolisme des xénobiotiques. En revanche, le design expérimental et le choix des doses impactent largement les processus cutanés et doivent être considérés avec attention lors de l'extrapolation en terme de risque sanitaire. L'absorption importante et rapide du B[a]P par la peau atteste de l'importance du port des équipements de protection lors des activités professionnelles mais aussi des procédures de décontamination de la peau à la fin du temps de travail.

En matière de SBE, le B[a]P, le B[a]P-4,5-*trans*-dihydrodiol et le B[a]P-7,8-diol ne sont pas de bons biomarqueurs d'exposition. D'une part, ces composés sont en très faibles quantités, et d'autre part, les échantillons urinaires pourraient être contaminés par le B[a]P lors du prélèvement en milieu professionnel. Inversement, le 3-OHB[a]P et le B[a]P-tétraol sont les deux métabolites prédominants et sont par ailleurs quantifiables dans les urines de salariés (Barbeau et al. 2017; Barbeau et al. 2011). Le B[a]P-tétraol, provenant de la voie du diol-époxyde, est le métabolite le plus pertinent pour la caractérisation du risque cancérogène. De plus, le métabolisme du 3-OHB[a]P par la peau n'étant pas impacté par l'augmentation de la dose, contrairement au B[a]P-tétraol, le dosage urinaire du 3-OHB[a]P pourrait entraîner une mésestimation du risque sanitaire.

Chapitre 3 : Métabolisme des HAP particuliers autres que le benzo[*a*]pyrène

I. Contexte scientifique

La caractérisation de l'effet des mélanges, ou « effet cocktail », constitue l'un des enjeux prioritaires de la toxicologie contemporaine. Les HAP, toujours identifiés en mélanges complexes, sont composés de larges proportions de HAP gazeux (Phe, Pyr...) et de plus faibles quantités de HAP particulaires (B[a]P, Chr, B[a]A...). Ces derniers représentent la fraction cancérogène des mélanges complexes de HAP (Tableau 2), dont la génotoxicité s'exprime après bioactivation par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, telles que les CYP450 (IARC 2010). Une des approches pour étudier l'effet des mélanges sur la génotoxicité des HAP est la métabolomique ciblée par mesurage de la quantité de métabolites. Cette approche tient compte de l'ensemble des processus aboutissant à la génotoxicité des HAP particulaires, depuis l'internalisation des HAP par la cellule, l'induction de l'expression des enzymes de biotransformation, à la métabolisation par les enzymes. Elle nécessite cependant l'identification de dérivés métaboliques pertinents utilisés en tant que biomarqueurs.

La biotransformation des HAP est extrêmement complexe et se divise en de nombreuses voies métaboliques (Paragraphe V.2.1), résultant en une grande diversité de métabolites : diol-époxydes, quinones, phénols... D'après une théorie basée sur l'étude du B[a]P (Lehr et al. 1985), les diol-époxydes localisés au niveau d'une région de Bay ou de Fjord sont considérés comme la forme métabolique cancérogène ultime des HAP (Shimada et al. 1996; Xue and Warshawsky 2005). Les diol-époxydes sont cependant des composés très réactifs qui ne sont pas quantifiables. Il est néanmoins possible d'estimer la quantité de diol-époxyde formée à travers la quantification des dihydrodiols précurseurs (ou proximaux) ou des tétraols, correspondant aux produits d'hydrolyse des diol-époxydes. A l'inverse, d'autres métabolites, tels que les phénols conjugués, représentent des produits de détoxification.

Alors que le métabolisme et la bioactivation du B[a]P ont été caractérisés sur de nombreux modèles *in vitro*, *in situ* et *in vivo*, et sont détaillés dans plusieurs revues de la littérature, les informations relatives à la biotransformation du B[a]A, Chr, B[b]F, B[k]F, benzo[j]fluoranthène (B[j]F), benzo[e]pyrène (B[e]P) et du DB[a,h]A sont parcellaires. L'objectif de ce chapitre est de réaliser une synthèse bibliographique sur le métabolisme de ces HAP particulaires afin de sélectionner des métabolites représentatifs des voies de bioactivation et de détoxification.

In fine, ces métabolites pourront également être utilisés pour la SBE aux HAP cancérogènes, afin d'élargir le panel de biomarqueurs disponibles, pour l'instant limités au B[a]P, au Chr et au B[a]A (Barbeau et al. 2017; Barbeau et al. 2011; Hecht et al. 2010; Ifegwu and Anyakora 2015; Zhong et

al. 2011). De plus, la mesure en parallèle des métabolites issus des voies de détoxification et de bioactivation pourrait permettre d'évaluer la susceptibilité individuelle liée au polymorphisme enzymatique. En regard de la complexité des processus biologiques mis en œuvre (métabolisme au sein de la cellule, élimination de la cellule, distribution dans l'organisme, élimination de l'organisme...), la validité de l'approche reste cependant encore à démontrer.

II. Synthèse de la littérature

II.1. Le benzo[*a*]anthracène

II.1.1. Quantification de biomarqueurs urinaires chez l'homme

Chez l'homme, les études se focalisent sur les métabolites monohydroxylés du B[*a*]A urinaires. Toutefois, les niveaux urinaires sont majoritairement inférieurs aux limites de détection (LD) des méthodes d'analyse. Ainsi les niveaux de 1-hydroxyB[*a*]A (1-OHB[*a*]A) et 3-hydroxyB[*a*]A (3-OHB[*a*]A) sont respectivement inférieurs à 1,32 et 1,47 ng/L dans des urines poolées d'individus exposés aux HAP de manière non-professionnelle (Smith et al. 2002). Dans les urines de 73 individus habitant près d'une usine de production d'aluminium, les 1-OHB[*a*]A (LD = 5 ng/L) et 3-OHB[*a*]A (LD = 10 ng/L) ont été identifiés au maximum dans 21% des échantillons (Bouchard et al. 2009). Lors de l'étude de l'exposition de familles à faible revenu, le 1-OHB[*a*]A (LD = 17 ng/L) est quantifié à 220 ng/L et le 3-OHB[*a*]A à 280 ng/L (LD = 17 ng/L) chez 24 adultes, tandis que les niveaux de 1-OHB[*a*]A et de 3-OHB[*a*]A sont respectivement de 80 et 49 ng/L chez 24 enfants (Chuang et al. 1999). Enfin, Li *et al.* identifient le 1-OHB[*a*]A (LD = 3,9 ng/L) et le 3-OHB[*a*]A (LD = 10,4 ng/L) dans 9,5 et 12% des 2748 urines collectées au sein de la population générale américaine dans le cadre de l'étude NHANES, bien que toutes les concentrations mesurées soient inférieures à la LD (Li et al. 2008). Analysant également les urines du projet NHANES, Grainger *et al.* obtiennent néanmoins des résultats légèrement différents. Le 1-OHB[*a*]A (LD = 4,6 ng/L) est inférieur à la LD chez 2084 individus de la population générale mais le 3-OHB[*a*]A (LD = 5,4 ng/L) est quantifié à 11,6 ng/L dans le 95^e percentile d'une population comprenant 2152 individus (Grainger et al. 2006).

Parmi 49 travailleurs d'extérieurs (28 policiers, 10 constructeurs de route et 11 travailleurs dans l'enrobage des routes), le 3-OHB[*a*]A urinaire (LD = 0,1 nmol/L ou 97,7 ng/L) reste en-dessous de la LD (Szaniszlo and Ungvary 2001). Tandis que des traces de 1-OHB[*a*]A (LQ = 1 ng/L) sont décelées chez 1 des 57 salariés travaillant dans une aciérie, le 2-hydroxyB[*a*]A reste inférieur à la LQ (2 ng/L) dans l'ensemble des échantillons urinaires (Onyemauwa et al. 2009). De la même manière, Xu *et al.* mesurent 20 nmol de 1-OHB[*a*]A par mol de créatinine (LD = 3,05 ng/L) chez seulement 1 des 7 salariés travaillant dans les fours de production du coke (Xu et al. 2004). Des niveaux élevés (15 à 1871 ng/L) de 3-OHB[*a*]A (LD = 8 ng/L) sont dosés dans les urines de 19 travailleurs produisant des équipements résistants au feu (Gundel and Angerer 2000).

II.1.2. Quantification de biomarqueurs *in vivo*

Chez le rat, les analyses se focalisent également sur les OHB[a]A. Ces études sont globalement peu informatives à cause de faibles niveaux dans les matrices analysées et de phénomènes de co-élution chromatographique des métabolites.

Des métabolites monohydroxylés du B[a]A sont quantifiés dans une étude exposant 20 rats mâles Lister Hooded à 0, 10, 100 et 1000 mg/kg d'un mélange de HAP solubilisés dans l'huile végétale par voie intrapéritonéale trois fois par semaine pendant 28 jours avant sacrifice. Les 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 8-, 9-, 10-, 11-hydroxyB[a]A (OHB[a]A) sont ensuite analysés par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de masse en tandem (GC-MS/MS) dans le cerveau des rats. La méthode d'analyse permet de séparer individuellement le 1-OHB[a]A (limite de quantification (LQ) = 0,1 pg/mg de cerveau) et le 10-OHB[a]A (LQ = 0,2 pg/mg), tandis que le 11-OHB[a]A élué avec le 6-hydroxyChr (6-OHChr) (LQ = 0,1 pg/mg), les 2-, 5- et 8-OHB[a]A (LQ = 0,1 pg/mg) éluent ensemble, le 3-OHB[a]A n'est pas séparé du 9-OHB[a]A (LQ = 0,2 pg/mg) et le 4-OHB[a]A élué avec le 1-OHChr (LQ = 0,1 pg/mg). Après analyse des échantillons, une médiane de 0,4 pg/mg de cerveau (quartiles : <LQ-0,9) en 1-OHB[a]A est mesurée, tandis que les 4-OHB[a]A et 1-OHChr sont quantifiés ensemble à 2 pg/mg (0,4-3,2) après exposition à 1 mg/kg de mélange de HAP. Les 11-OHB[a]A et 6-OHChr, 2- + 5- + 8-OHB[a]A et 3- + 9-OHB[a]A sont inférieurs à la LQ, tandis que le 10-OHB[a]A n'est jamais détecté (Grova et al. 2011).

Appliquant le même protocole d'exposition, cette équipe quantifie cette fois les métabolites dans les poils de rats. Les LQ sont de 0,3 pg/mg de poils pour le 1-OHB[a]A, 0,2 pg/mg pour les 2- et 5-OHB[a]A, 0,2 pg/mg pour les 3- et 9-OHB[a]A, 0,2 pg/mg pour les 4-OHB[a]A et 1-OHChr, 0,3 pg/mg pour le 8-OHB[a]A, 1 pg/mg pour le 10-OHB[a]A et 0,2 pg/mg pour les 11-OHB[a]A et 6-OHChr. Les rats Lister Hooded ayant un pelage noir et blanc, les métabolites sont analysés dans les poils des deux couleurs. En moyenne (quartiles), 0,35 (0,35-0,35) pg/mg de poils blancs et 0,28 (0,28-0,28) pg/mg de poils noirs de 11-OHB[a]A et 6-OHChr sont mesurés. Pour les 4-OHB[a]A et 1-OHChr, 0,31 (0,24-0,45) et 0,46 (0,34-0,54) pg/mg sont respectivement quantifiés dans les poils blancs et noirs (Grova et al. 2013).

II.1.3. Métabolisme et cancérogénicité

Les études *in vitro* et *ex vivo* s'intéressent au métabolisme général du B[a]A : ils quantifient les métabolites monohydroxylés, les dihydrodiols et parfois les quinones. En 1965, une étude du métabolisme de 10 mg de B[a]A sur des homogénats de foie de rat détecte les 3- et 4- OHB[a]A, mais aussi des dihydrodiols du B[a]A en position 1,2- 5,6- et 8,9- (présupposés en conformation *trans*)

ainsi que le B[a]A-7,12-quinone (Boyland and Sims 1965). Suite à la transformation du B[a]A (20 µmol) par des microsomes ou homogénats de foie de rat (prétraités ou non au 3-méthylcholanthrène pour augmenter la quantité d'enzymes de détoxification hépatique), les B[a]A-5,6-dihydrodiol et B[a]A-8,9-dihydrodiol (présupposés en conformation *trans*) sont identifiés comme les métabolites majoritaires (respectivement 34 et 26 µmol/g de foie de rat non-traités) alors que les 3- et 4-OHB[a]A sont minoritaires (5 et 7 µmol/g de foie de rat) (Sims 1970b). Après incubation *in vitro* de peau de souris Swiss en présence de 0,4 µmol B[a]A, les *trans*-1,2-, *trans*-3,4-, *trans*-5,6-, *trans*-8,9- et *trans*-10,11- dihydrodiols du B[a]A en sont quantifiés dans le milieu de culture et la peau. Les B[a]A-3,4-*trans*-dihydrodiol (B[a]A-3,4-diol) et B[a]A-8,9-*trans*-dihydrodiol (B[a]A-8,9-diol) (respectivement 0,44 à 0,45 nmol et 0,40 à 0,42 nmol) sont majoritaires tandis que les *trans*-dihydrodiols du B[a]A en position 5,6- et 10,11- sont minoritaires (respectivement 0,17 à 0,19 nmol et 0,11 à 0,12 nmol) et le B[a]A-1,2-*trans*-dihydrodiol n'est jamais détecté (MacNicoll et al. 1980).

En 1977, une étude de cancérogénèse cutanée sur des souris femelles CD-1 identifie le B[a]A-3,4-diol en tant que dihydrodiol le plus tumorigène du B[a]A, alors que le B[a]A lui-même n'induit que peu de tumeurs (Wood et al. 1977). En 1978, ces résultats sont confirmés sur des souris femelles CD-1 ainsi que *in vitro* sur cellules de hamster chinois V79 (Slaga et al. 1978). Le B[a]A-3,4-diol semble être le métabolite cancérogène proximal du B[a]A, étant par la suite métabolisé en *trans*-3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-B[a]A, identifié comme le métabolite cancérogène ultime du B[a]A (Levin et al. 1978a; Slaga et al. 1978). Les auteurs expliquent la faible cancérogénicité du B[a]A par la faible production de B[a]A-3,4-diol. Le B[a]A serait majoritairement métabolisé en B[a]A-8,9-diol puis en *trans*-8,9-dihydrodiol-10,11-époxyde-B[a]A (Slaga et al. 1978; Wood et al. 1977). Une étude du métabolisme du B[a]A (100 nmol) par des microsomes préparés à partir du foie de rats « Long-Evans » confirme en effet que le B[a]A-3,4-diol ainsi que les dihydrodiols en position 1,2- et 10,11- sont minoritaires tandis que les deux métabolites majoritaires du B[a]A se trouvent être le B[a]A-5,6-*trans*-dihydrodiol et le B[a]A-8,9-diol (> 80% du métabolisme total). La conversion du B[a]A en phénols et en quinones par les microsomes de foie de rat reste faible (Thakker et al. 1979). Une autre étude montre cependant que le B[a]A-8,9-diol, métabolisé en *anti*-8,9-dihydrodiol-10,11-époxyde-B[a]A, forme autant d'adduits à l'ADN dans la peau de souris Swiss et sur des cellules embryonnaires de hamster que l'*anti*-3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-B[a]A (Cooper et al. 1980). La réactivité de l'*anti*-8,9-dihydrodiol-10,11-époxyde-B[a]A avec l'ADN est cependant limitée en comparaison à celle de l'*anti*-3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-B[a]A (Hall et al. 1988).

II.1.4.Synthèse

Le métabolisme du B[a]A est représenté à l'aide d'un schéma récapitulatif (Figure 28). L'analyse des métabolites monohydroxylés du B[a]A en population humaine, au niveau professionnel ou environnemental, quantifie généralement le 3-OHB[a]A à des niveaux plus élevés que les autres phénols. Pour des raisons de co-élution des analytes, les études *in vivo* ne permettent pas d'obtenir des informations probantes sur la biotransformation du B[a]A. L'exploration *in vitro* du métabolisme du B[a]A démontre que les dihydrodiols sont les métabolites majoritaires, car les époxydes du B[a]A, stables, sont pris en charge par l'EH alors que l'hydrolyse spontanée des époxydes apparaît secondaire. Cependant, l'analyse quantitative et les informations en regard de la cancérogénicité du B[a]A varient selon le modèle d'étude. Globalement, la génotoxicité du B[a]A semble provenir de l'*anti*-3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-B[a]A, formé par métabolisme ultérieur du B[a]A-3,4-diol, métabolite cancérogène proximal. Le B[a]A-8,9-diol, métabolite majoritaire du B[a]A, pourrait être impliqué dans la cancérogénicité du B[a]A, par biotransformation en *anti*-8,9-dihydrodiol-10,11-époxyde-B[a]A. La littérature révèle néanmoins des résultats contradictoires. Tandis que ce diol-époxyde se lie de manière covalente à l'ADN, sa réactivité avec la macromolécule est par ailleurs décrite comme limitée. De plus, le B[a]A-8,9-diol est un faible initiateur de tumeur *in vivo*.

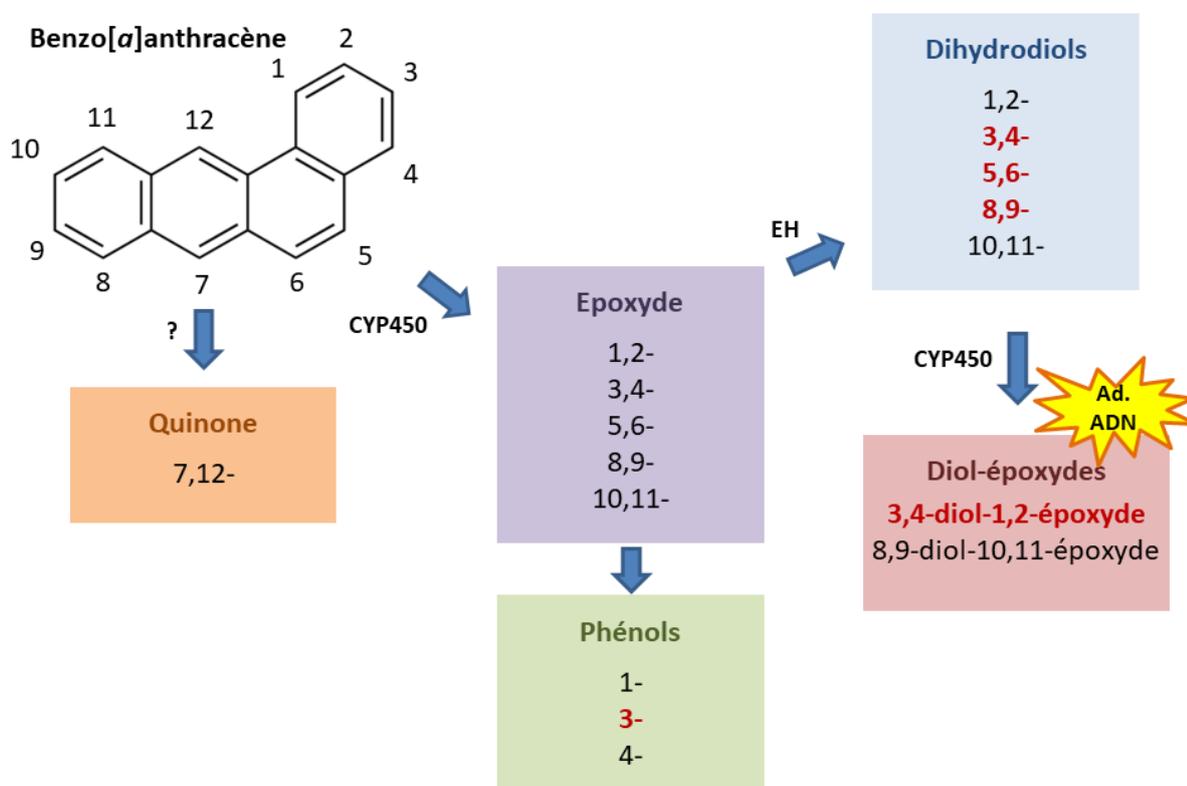


Figure 28. Schéma simplifié du métabolisme du B[a]A. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[a]A.

II.2. Le chrysène

II.2.1. Quantification de biomarqueurs urinaires chez l'homme

A l'instar du B[a]A, les dosages réalisés chez l'homme se focalisent sur les métabolites monohydroxylés du Chr (hydroxyChr : OHChr) mais la plupart des études retrouvent des niveaux urinaires inférieurs aux LD des méthodes d'analyse. Les niveaux de 3-hydroxyChr (3-OHChr) et 6-OHChr sont inférieurs à la LD (1,68 ng/L) dans les urines poolées d'individus exposés aux HAP de manière non-professionnelle (Smith et al. 2002). Dans le cadre du projet américain NHANES, les 1-OHChr (N = 2748, LD = 5 ng/L), 2-OHChr (N = 2748, LD = 5 ng/L), 3-OHChr (N = 2748, LD = 8,3 ng/L), 4-OHChr (N = 2748, LD = 2,8 ng/L) et 6-OHChr (N = 2736, 2,4 ng/L) sont respectivement détectés dans 28, 12, 24, 4,6 et 28% des urines d'individus de la population générale américaine, mais là encore toutes les concentrations mesurées sont inférieures à la LD (Li et al. 2008). Gündel *et al.* n'ont pas obtenu une résolution chromatographique suffisante pour quantifier les 1-OHChr, 2-OHChr et 3-OHChr urinaires (Gundel and Angerer 2000). Les 3-OHChr (LD = 10 ng/L) et 6-OHChr (LD = 6 ng/L) urinaires sont également inférieurs à la LD chez 73 individus vivant à moins d'un kilomètre d'une usine de production d'aluminium (Bouchard et al. 2009).

Publiant deux études sur 10 et 55 ouvriers travaillant sur les fours à coke, Campo *et al.* n'arrivent pas à mesurer le 6-OHChr urinaire (LQ = 1400 ng/L) (Campo et al. 2008; Campo et al. 2010). Le 6-OHChr est également inférieur à la LQ (1400 ng/L) dans les urines de 1333 salariés chinois (Li et al. 2012) ou de 55 ouvriers polonais travaillant sur des fours à coke (Rossella et al. 2009). Parmi 57 ouvriers d'Europe centrale travaillant dans une aciérie, des traces de 3-OHChr (LQ = 2 ng/L) sont détectées chez 7 salariés tandis qu'aucune trace de 6-OHChr n'est observée (LQ = 1 ng/L) (Onyemauwa et al. 2009).

Quelques travaux arrivent toutefois à doser les métabolites monohydroxylés du Chr en milieu professionnel et dans la population générale. Le 3-OHChr (LD = 4,3 ng/L, 2 à 27 nmol/mol de créatine chez 7/7 salariés) est mesuré plus fréquemment et à des niveaux plus élevés que le 6-OHChr (LD = 0,4 ng/L, 0,7 – 15 nmol/mol créatine chez 3/7 salariés) dans les urines de 7 ouvriers chinois travaillant sur des fours de production de coke (Xu et al. 2004). En moyenne, Grimmer *et al.* quantifient respectivement 700, 600, 300, 800 et 100 ng/L de 1-, 3-, 4-, 5- et 6-OHChr dans les urines de 25 salariés d'une usine de production de coke et 10, 10, 10, 50 et 3 ng/L dans les urines de deux d'ouvriers de voirie (Grimmer et al. 1991). Dans une étude plus récente, les mêmes auteurs montrent une grande variation des profils d'excrétion urinaire des 1-, 2-, 3- et 4-OHChr ainsi que des Chr-1,2-dihydrodiol et Chr-3,4-dihydrodiol (présumés en conformation *trans*) chez 3 salariés

travaillant dans une usine de production de coke. Les quantités de dihydrodiol du Chr mesurées dans les urines sont du même ordre de grandeur que les quantités de phénols du Chr (Grimmer et al. 1997). Dans le cadre du projet américain NHANES, Grainger *et al.* quantifient en moyenne 6 ng/L de 6-OHChr urinaire dans le 95^e percentile de 2279 individus de la population générale (LD = 3,4 ng/L) mais ne retrouve pas de 3-OHChr (LD = 9,9 ng/L, N = 2233) (Grainger et al. 2006). Chuang *et al.* mesurent en moyenne 41 ng/L et 140 ng/L de 6-OHChr (LD = 17 ng/L) dans les urines d'enfants (N = 24) et d'adultes (N = 24) de familles américaines à faibles revenus (Chuang et al. 1999).

II.2.2. Quantification de biomarqueurs *in vivo*

A l'instar du B[a]A, ces études sont globalement peu informatives à cause de faibles niveaux dans les matrices analysées et de phénomènes de co-élution chromatographique des métabolites.

Des phénols du Chr sont analysés dans une étude exposant 20 rats mâles de race Lister Hooded à 0, 10, 100 et 1000 mg/kg d'un mélange de HAP solubilisés dans l'huile végétale par voie intrapéritonéale trois fois par semaine pendant 28 jours avant sacrifice. Les 1-, 2-, 3-, 4- et 6-OHChr sont séparés par GC-MS/MS dans le cerveau des rats. La méthode d'analyse permet de séparer individuellement le 2-OHChr (LQ = 0,2 pg/mg de cerveau), le 3-OHChr (LQ = 0,2 pg/mg) et le 4-OHChr (LQ = 0,1 pg/mg), tandis que le 1-OHChr élué avec le 4-OHB[a]A (LQ = 0,1 pg/mg), et le 6-OHChr élué avec le 11-OHB[a]A (LQ = 0,1 pg/mg). Après analyse des échantillons, des médianes de 0,5 (quartiles : <LQ-0,9), 1,1 (0,2-1,7), 0,6 (<LQ-1,3) pg/mg de cerveau sont respectivement mesurées pour les 2-, 3- et 4-OHChr, tandis que les 1-OHChr et 4-OHB[a]A sont quantifiés ensemble à 2 pg/mg (0,4-3,2) après exposition à 1 mg/kg de mélange de HAP. Les 6-OHChr et 11-OHB[a]A sont inférieurs à la LQ (Grova et al. 2011).

Appliquant le même protocole d'exposition, cette équipe mesure cette fois les métabolites dans les poils de rats. La LQ est de 0,2 pg/mg de poils de rat pour les 2-, 3-, 4-OHChr, les 1-OHChr et 4-OHB[a]A, mais aussi les 6-OHChr et 11-OHB[a]A. Les rats Lister Hooded ayant un pelage noir et blanc, les métabolites sont quantifiés dans les poils des deux couleurs. En moyenne (quartiles), 0,62 (0,46-0,88) pg/mg de poils blancs et 0,84 (0,62-0,94) pg/mg de poils noirs de 3-OHChr sont quantifiés après exposition à 1 mg/kg de mélange de HAP. Les poils blancs contenaient 0,25 (0,20-0,29) pg/mg de 4-OHChr et les poils noirs 0,33 (0,25-0,40) pg/mg. Pour les 1-OHChr et 4-OHB[a]A, 0,31 (0,24-0,45) et 0,46 (0,34-0,54) pg/mg sont respectivement quantifiés dans les poils blancs et noirs. 0,35 (0,35-0,35) pg/mg de poils blancs et 0,28 (0,28-0,28) pg/mg de poils noirs de 6-OHChr et 11-OHB[a]A sont mesurés (Grova et al. 2013).

II.2.3. Métabolisme et cancérogénicité

A l'instar du B[a]A, les études *in vitro* et *ex vivo* du métabolisme du Chr incluent d'autres métabolites en plus des phénols. Après exposition de cellules fœtales d'épithélium bronchique humain et d'une population mixte de cellules fœtales de poumons de hamster syrien à 10 µg de Chr, les 1-, 2-, 3- et 4-OHChr ainsi que les Chr-1,2-*trans*-dihydrodiol (Chr-1,2-diol) et Chr-3,4-*trans*-dihydrodiol (Chr-3,4-diol) sont quantifiés. Les cellules humaines produisent majoritairement du Chr-3,4-diol puis du Chr-1,2-diol, tandis que les 1-, 2-, 3- et 4-OHChr sont minoritaires et formés à des niveaux comparables. Sur la population de cellules de hamster, les quantités de phénols sont supérieures à celle des dihydrodiols (1-OHChr > 2-OHChr > Chr-1,2-diol et 3-OHChr > 4-OHChr > Chr-3,4-diol) (Jacob et al. 1987).

Weston *et al.* exposent des peaux humaines, de rat et de souris à 0,15 µmol/cm² de Chr puis quantifient les Chr-1,2-diol, Chr-3,4-diol et Chr-5,6-*trans*-dihydrodiol dans la peau et le milieu de culture. Les trois types de peaux produisent des profils métaboliques différents. La peau de souris génère majoritairement du Chr-5,6-*trans*-dihydrodiol (moyenne = 1051,5 fmol/mg de protéines), puis du Chr-1,2-diol (138,5 fmol/mg de protéines) et du Chr-3,4-diol (102 fmol/mg de protéines). En revanche, la peau de rat forme principalement du Chr-3,4-diol (77 fmol/mg de protéine), puis du Chr-5,6-*trans*-dihydrodiol (15 fmol/mg de protéine), et du Chr-1,2-diol (6,5 fmol/mg de protéine). La peau humaine produit également une majorité de Chr-3,4-diol (418 fmol/mg de protéine), tandis que les Chr-1,2-diol et Chr-5,6-*trans*-dihydrodiol semblent être produits en quantités comparables (respectivement 173,7 fmol de protéine et 254 fmol/mg de protéine), compte tenu de la variabilité observée entre les peaux (Weston et al. 1985). Dans une autre étude exposant la peau de souris à 0,4 µmol de Chr, le Chr est majoritairement métabolisé en Chr-3,4-diol (0,54-0,63 nmol), puis en Chr-1,2-diol (0,31-0,32 nmol) et en Chr-5,6-*trans*-dihydrodiol (0,13-0,15 nmol) (quantification des dihydrodiols libres uniquement) (MacNicoll et al. 1980).

En 1969, une étude du métabolisme du Chr (20 µmol) sur des extraits de foie de rat (prétraités ou non avec du 3-méthylcholanthrène) quantifie les mêmes dihydrodiols du Chr (présupposés en conformation *trans*) mais aussi les phénols totaux du Chr. Le Chr-3,4-diol est le métabolite majoritaire du Chr (4 µmol/g foie de rat non-traité). Le Chr-1,2-diol (2 µmol/g) représente également une proportion importante du métabolisme au même titre que les phénols (3 µmol/g). Quant au Chr-5,6-*trans*-dihydrodiol, il n'est détecté dans aucune des conditions expérimentales (Sims 1970b). Des recherches plus récentes sur le métabolisme du Chr (100 nmol) par des microsomes de foie de rat (prétraités ou non au phénobarbital ou au 3-méthylcholanthrène) montrent que les Chr-1,2-dihydrodiol et Chr-3,4-dihydrodiol sont produits en quantités équivalentes

et en majorité en conformation *trans*, représentant respectivement 33,5% et 34,5% du métabolisme total. Les phénols comptent pour environ 17% du métabolisme et le Chr-5,6-*trans*-dihydrodiol est minoritaire (environ 2%) (Nordqvist et al. 1981).

En 1978, une étude de cancérogénicité par application de Chr sur la peau de souris femelle CD-1 montre que le Chr-1,2-diol est probablement le métabolite à l'origine du cancérogène ultime du Chr : le 1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr. Par ailleurs, le Chr-1,2-diol est plus cancérogène que le Chr lui-même (Levin et al. 1978b). Chez la souris mâle Swiss, l'*anti*-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr est à l'origine de l'adduit à l'ADN majeur (Hodgson et al. 1983). Cependant, d'autres adduits à l'ADN sont mis en évidence dont ceux formés par l'*anti*-9-OH-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr, un triol-époxyde. L'existence d'une voie de bioactivation alternative pourrait expliquer la forte activité cancérogène du Chr-1,2-diol comparativement au Chr (Hall et al. 1988; Hodgson et al. 1983). L'*anti*-9-OH-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr pourrait être formé de trois manières différentes : (1) Par addition d'un groupement dihydrodiol en position 1,2- ou 7,8- sur le 3- ou 9-OHChr (il s'agit symétriquement de la même molécule) ou (2) par formation de l'*anti*-9-OH-1,2-dihydrodiolChr à partir du Chr-1,2-diol. Le *trans*-9-OH-1,2-dihydrodiolChr serait ensuite converti en *anti*-9-OH-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr (Hodgson et al. 1983; Phillips et al. 1987). (3) L'*anti*-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr pourrait également être transformé en *anti*-9-OH-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr, bien que cette voie métabolique s'avérerait très limitée (Hodgson et al. 1986). Quantitativement, les trihydrodiolChr (à l'exemple du *trans*-9-OH-1,2-dihydrodiolChr) sont minoritaires (Hodgson et al. 1983). Les dihydrodiol-époxydes et les trihydrodiol-époxydes ne sont pas les seuls métabolites biologiquement actifs du Chr, mais leurs activités de mutagénèse sont bien supérieures à celles des autres dérivés du Chr (Glatt et al. 1986).

II.2.4.Synthèse

La biotransformation du Chr est représentée à l'aide d'un schéma récapitulatif (Figure 29). Chez l'homme, les 3- et 6-OHChr urinaires sont quantifiés en population générale et en milieu professionnel. En milieu professionnel, les Chr-1,2-diol et Chr-3,4-diol apparaissaient également comme des biomarqueurs pertinents car excrétés en quantités équivalentes aux phénols. La quantification de biomarqueurs chez le rat présente le 3-OHChr en tant que l'un des métabolites majoritaires du Chr. *In vitro*, les Chr-1,2-diol et Chr-3,4-diol sont produits de manière très majoritaire sur différents modèles d'étude. La bioactivation du Chr se produit à travers plusieurs voies de métabolisation différentes, débutant par la formation du 3-OHChr et du Chr-1,2-diol, et aboutissant aux dérivés métaboliques cancérogènes dont l'*anti*-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr et l'*anti*-9-OH-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chr.

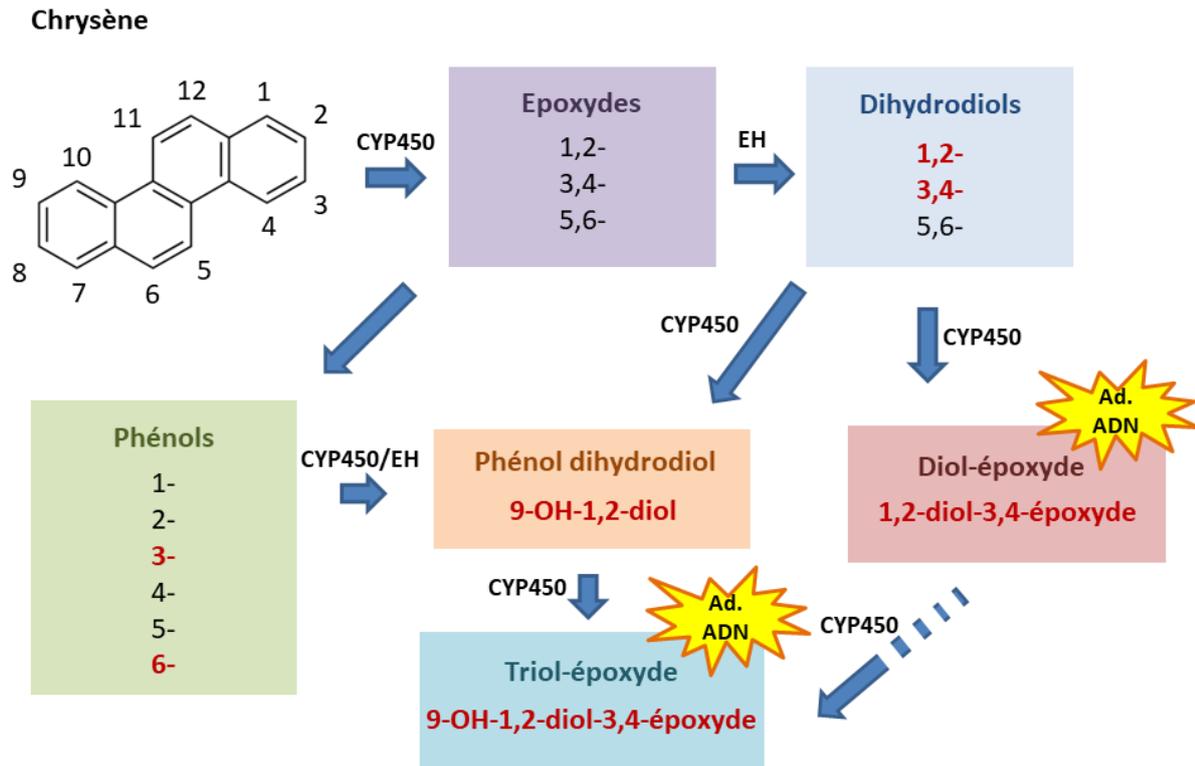


Figure 29. Schéma simplifié du métabolisme du Chr. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. Flèche hachurée : voie métabolique hypothétique. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du Chr.

II.3. Le benzo[*b*]fluoranthène

II.3.1. Quantification de biomarqueurs urinaires chez l'homme

Aucune étude de screening de métabolites du B[*b*]F n'a pu être répertoriée chez l'homme.

II.3.2. Quantification de biomarqueurs *in vivo*

Ces études sont globalement peu informatives pour les mêmes raisons que celles évoquées pour le Chr et le B[*a*]A.

Des phénols du B[*b*]F sont quantifiés dans une étude exposant 20 rats mâles de race Lister Hooded à 0, 10, 100 et 1000 mg/kg d'un mélange de HAP solubilisés dans l'huile végétale par voie intrapéritonéale trois fois par semaine pendant 28 jours avant sacrifice. Les 1-, 2-, 7-, 8-, 10-, 11- et 12-hydroxyB[*b*]F (OHB[*b*]F) sont analysés par GC-MS/MS dans le cerveau des rats. La méthode d'analyse permet de séparer individuellement le 2-OHB[*b*]F (LQ = 6,0 pg/mg de cerveau), le 8-OHB[*b*]F (LQ = 3,0 pg/mg), le 10-OHB[*b*]F (LQ = 3,0 pg/mg) et le 11-OHB[*b*]F (LQ = 2,4 pg/mg), le 1-OHB[*b*]F élue avec le 7-OHB[*b*]F (LQ = 0,9 pg/mg), tandis que le 12-OHB[*b*]F élue

avec le 8-hydroxyB[k]F (8-OHB[k]F) (LQ = 0,9 pg/mg). Après analyse des échantillons, aucun de ces métabolites n'est quantifié dans le cerveau de rat (Grova et al. 2011).

Appliquant le même protocole d'exposition, l'équipe mesure les métabolites dans les poils de rats mâles Lister Hooded. La LQ est de 2 pg/mg de poils de rat pour les 2-, 10-, 11-OHB[b]F, 0,5 pg/mg pour le 8-OHB[b]F, 0,3 pg/mg pour les 1- et 7-OHB[b]F ainsi que les 12-OHB[b]F et 8-OHB[k]F. Les rats Lister Hooded ayant un pelage noir et blanc, les métabolites sont quantifiés dans les poils des deux couleurs. En moyenne (quartiles), 1,01 (0,5-1,47) pg de 8-OHB[b]F/mg de poils blancs et 0,6 (<LOQ-0,81) pg de 8-OHB[b]F/mg de poils noirs sont mesurés après exposition à 1 mg/kg de mélange de HAP. A la plus forte dose, les 1- et 7-OHB[b]F sont détectés mais leurs niveaux restent inférieurs à la LQ (Grova et al. 2013).

II.3.3. Métabolisme et cancérogénicité

Le métabolisme du B[b]F a été peu étudié et les théories quant à son mécanisme d'action et l'identité de son métabolite cancérogène ultime se sont succédées au cours des années. Entre les années 80 et 90, une équipe de l'institut américain « Naylor Dana Institute for Disease Prevention » a publié la majorité des études menées sur le B[b]F.

La première correspond à une étude de la phase d'initiation, étape primaire de la cancérogénèse, par le B[b]F et le B[b]F-9,10-*trans*-dihydrodiol (B[b]F-9,10-diol) sur la peau dorsale de souris femelles albinos CD-1. Les résultats montrent que le B[b]F-9,10-diol et le B[b]F initient autant de tumeurs cutanées. Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que le 9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F, métabolite résultant de la conversion du B[b]F-9,10-diol, est le métabolite cancérogène ultime du B[b]F (LaVoie et al. 1982). La deuxième étudie le métabolisme du B[b]F (250 µg) par des extraits de foie de rat (prétraités à l'Aroclor 1254). Les métabolites majoritairement produits sont les 5-, 6- ainsi que le 4- ou le 7-OHB[b]F car l'identification de ce dernier métabolite est incertaine. Deux dihydrodiols sont également identifiés : le B[b]F-11,12-*trans*-dihydrodiol, majoritaire, et le B[b]F-1,2-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*), minoritaire. En revanche, aucune trace de B[b]F-9,10-diol n'est décelée au cours de cette étude (Amin et al. 1982). En 1984, l'équipe explore la mutagénicité des B[b]F-1,2-*trans*-dihydrodiol et B[b]F-11,12-*trans*-dihydrodiol sur *Salmonella typhimurium*, une bactérie modèle utilisée pour le screening des xénobiotiques mutagènes (test d'Ames). Les auteurs concluent que ces dihydrodiols du B[b]F ne peuvent pas être responsables de la mutagénicité du B[b]F au vu de leurs niveaux de production ou de leurs pouvoirs mutagènes (Amin et al. 1984). En 1985, les chercheurs adoptent une nouvelle stratégie : ils étudient le pouvoir mutagène et cancérogène sur *S. typhimurium* et peau dorsale de souris du B[b]F substitué avec des groupements méthyl (-CH₃) à différentes positions. Cette substitution bloque certaines voies

métaboliques et permet en théorie d'identifier les métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[b]F. Leurs expériences mettent en évidence d'autres métabolites candidats possibles pour expliquer le pouvoir cancérogène du B[b]F : le B[b]F avec des groupements époxydes en position 4,5-, 6,7- et 11,12- (Amin et al. 1985).

En 1987, l'équipe s'intéresse au métabolisme *in vitro* et *in vivo* du B[b]F après amélioration de leurs méthodes d'analyse, mais aussi à sa cancérogénicité *in vivo*. *In vitro*, le B[b]F (500 µg) était majoritairement métabolisé en 4-, 5-, 12-OHB[b]F et B[b]F-11,12-*trans*-dihydrodiol par la fraction S-9 des foies de rats prétraités à l'Aroclor 1254. Les 6-, 11-OHB[b]F et B[b]F-1,2-*trans*-dihydrodiol sont produits en moins grandes quantités. Les auteurs mettent en évidence la conversion du B[b]F-9,10-diol en *trans*-5- et *trans*-6-OH-9,10-dihydrodiolB[b]F par des microsomes de rats, ce qui pourrait expliquer l'impossibilité de quantifier le B[b]F-9,10-diol. Après application de B[b]F (70 nmol) sur la peau de souris femelle CD-1, les métabolites sont extraits de l'épiderme des souris et quantifiés. L'épiderme produisait majoritairement les 4-, 5-, 6- et 12-OHB[b]F, puis le B[b]F-11,12-*trans*-dihydrodiol tandis que les quantités de B[b]F-1,2-*trans*-dihydrodiol formé sont faibles. Une grande proportion des 4-, 5-, 6- et 12-OHB[b]F sont glucurono- et sulfo-conjugués. Aucune trace de B[b]F-9,10-diol, *trans*-5- ou *trans*-6-OH-9,10-dihydrodiolB[b]F n'est mesurée. *In vivo*, il est cependant possible que ces métabolites aient rapidement diffusé dans l'organisme. Les auteurs testent également le potentiel cancérogène de plusieurs métabolites du B[b]F mais seul le B[b]F-9,10-diol a une activité d'initiation conséquente, égale à celle du B[b]F. L'étude révèle cependant la formation de plusieurs adduits à l'ADN après exposition au B[b]F. En résumé, les résultats ne parviennent pas à démontrer que le B[b]F-9,10-diol est le métabolite carcinogène proximal du B[b]F, mais les auteurs émettent l'hypothèse que les 9,10-dihydrodiol-4,5-époxyde-B[b]F et 9,10-dihydrodiol-6,7-époxyde-B[b]F pourraient être responsables de sa cancérogénicité (Geddie et al. 1987). En 1989, l'équipe applique du B[b]F et du B[b]F substitué par des groupements fluorés à différentes positions sur la peau de souris femelles CD-1. Ils quantifient ensuite le nombre de tumeurs produites et étudient le profil d'adduits à l'ADN formés. Les résultats obtenus sont difficiles à interpréter mais démontrent l'existence de plusieurs adduits à l'ADN et donc de plusieurs voies de bioactivation possibles du B[b]F (Weyand et al. 1989).

D'autres laboratoires se sont ensuite intéressés à la cancérogénicité du B[b]F. En 1990, une étude comparant le pouvoir d'initiation de plusieurs molécules sur peau de souris femelles CD-1 confirme que le B[b]F est un initiateur de tumeur. Les résultats indiquent une implication de la région de Bay et donc du 9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F (Weyand et al. 1990). En 1993, un nouvel essai de tumorigénicité du B[b]F et de ses métabolites sur peau de souris femelles CD-1 prouve que le *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiolB[b]F induit autant de tumeurs que le B[b]F tandis que le *trans*-6-

hydroxy-9,10-dihydrodiolB[b]F est peu cancérigène. Le profil d'adduits à l'ADN formé par le B[b]F comptabilise un adduit majeur et 4 adduits mineurs. Le *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiolB[b]F est responsable de l'adduit majeur et de l'un des adduits mineurs formé par le B[b]F, soit 58% des adduits à l'ADN formés par le B[b]F. En comparaison, le *trans*-6-hydroxy-9,10-dihydrodiolB[b]F n'induit la formation que de l'un des adduits mineurs du B[b]F. Cette étude confirme ainsi que le B[b]F-9,10-diol est converti *trans*-5- et *trans*-6-hydroxy-9,10-dihydrodiolB[b]F. L'article montre également que 20% de ces adduits à l'ADN sont dus au *trans*-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F. En conclusion, le *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F serait donc le métabolite cancérigène ultime majoritaire du B[b]F (Weyand et al. 1993b). En 1995, des recherches démontrent qu'après injection de B[b]F par voie intrapéritonéale et quantification d'adénomes pulmonaires, le B[b]F est faiblement cancérigène comparativement au B[a]P et au DB[a,h]A. Le B[b]F forme 4 adduits à l'ADN et que l'adduit majeur est formé par le *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F. Les auteurs suggèrent une métabolisation du 5-OHB[b]F en *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F (Nesnow et al. 1995). Appliquant un protocole similaire, une troisième étude publiée en 1996 confirme que l'adduit à l'ADN majoritaire du B[b]F est formé par le *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F (Mass et al. 1996).

II.3.4.Synthèse

Le métabolisme du B[b]F est détaillé à l'aide d'un schéma récapitulatif (Figure 30). Aucune étude chez l'homme n'a pu être identifiée. Les mesurages de biomarqueurs chez le rat échouent à quantifier les métabolites du B[b]F. D'après les expériences *in vitro* et *in vivo*, les métabolites majoritaires sont les 4-, 5-, 6-, 12-OHB[b]F et le B[b]F-11,12-*trans*-dihydrodiol. Ces études révèlent la pluralité des voies de bioactivation du B[b]F. La voie des triol-époxydes débute par les formations des 5-, 6-OHB[b]F ou du B[b]F-9,10-diol et aboutit à la formation du *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F et à celle du *trans*-6-hydroxy-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F. La voie du diol-époxyde débute par la formation du B[b]F-9,10-diol, ensuite métaboliquement converti en *trans*-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F. D'après la littérature, la génotoxicité du B[b]F serait majoritairement due au *trans*-5-hydroxy-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[b]F.

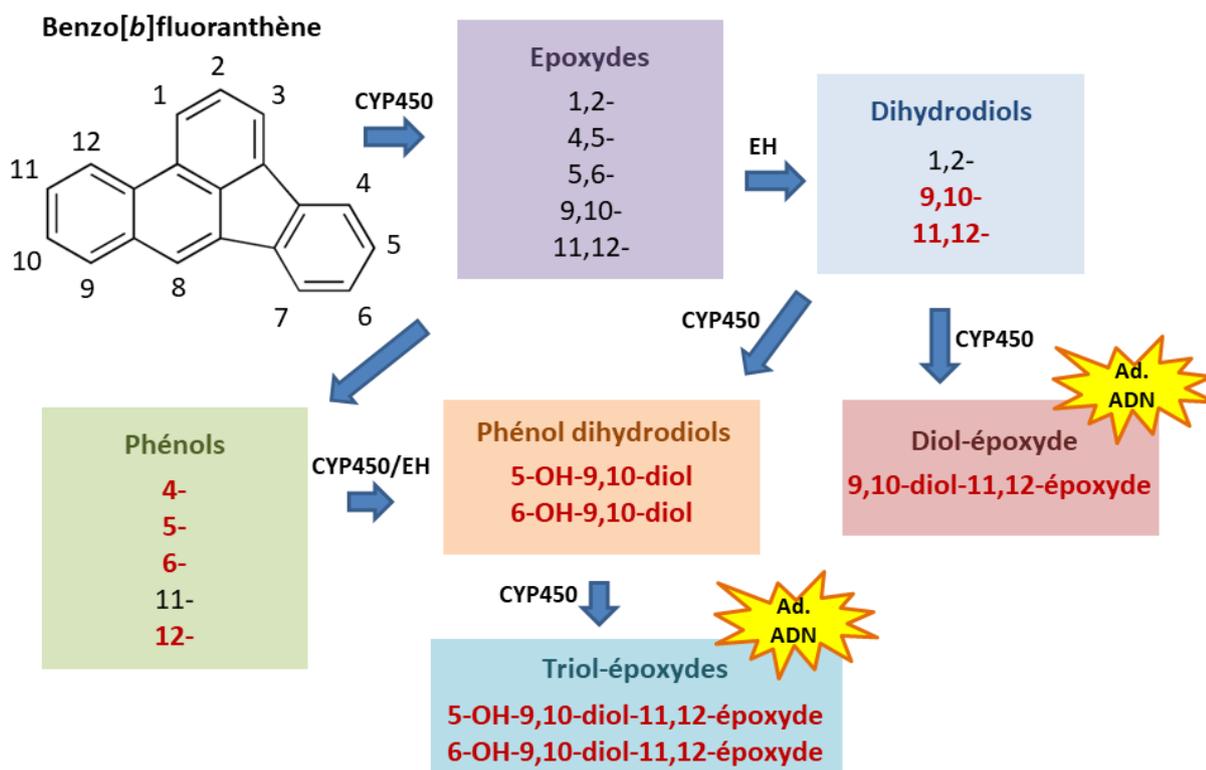


Figure 30. Schéma simplifié du métabolisme du B[b]F. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[b]F.

II.4. Le benzo[k]fluoranthène

II.4.1. Quantification de biomarqueurs urinaires chez l'homme

Aucune étude de screening de métabolites du B[k]F n'a pu être répertoriée chez l'homme.

II.4.2. Quantification de biomarqueurs *in vivo*

Ces études sont globalement peu informatives pour les raisons précédemment évoquées.

Des phénols du B[k]F sont quantifiés dans une étude exposant 20 rats mâles de race Lister Hooded à 0, 10, 100 et 1000 mg/kg d'un mélange de HAP solubilisés dans l'huile végétale par voie intrapéritonéale trois fois par semaine pendant 28 jours avant sacrifice. Les 3-hydroxyB[k]F (3-OHB[k]F), 8-OHB[k]F et 9-hydroxyB[k]F (9-OHB[k]F) sont analysés par GC-MS/MS dans le cerveau des rats. La méthode d'analyse ne permet pas de séparer individuellement aucun des phénols du B[k]F : le 3-OHB[k]F élue avec le 4-OHB[a]P (LQ = 3,0 pg/mg), le 8-OHB[k]F avec le 12-OHB[b]F (LQ = 0,9 pg/mg de cerveau), et le 9-OHB[k]F avec le 7-OHB[a]P (LQ = 1,2 pg/mg). Après analyse des échantillons de cerveau, seuls les 8-OHB[k]F et 12-OHB[b]F sont détectés mais les niveaux des phénols du B[k]F restent inférieurs à la LQ (Grova et al. 2011).

Appliquant le même protocole d'exposition, cette équipe quantifie ces métabolites dans les poils de rats mâles Lister Hooded. La LQ était de 2 pg/mg pour les 3-OHB[k]F et 4-OHB[a]P, 0,3 pg/mg de poils de rat pour les 12-OHB[b]F et 8-OHB[k]F, 3,0 pg/mg pour le 9-OHB[k]F et le 7-OHB[a]P . Les rats Lister Hooded ayant un pelage noir et blanc, les métabolites sont analysés dans les poils des deux couleurs. Aucun de ces métabolites n'est détecté même à la plus forte dose d'exposition (Grova et al. 2013).

II.4.3.Métabolisme et cancérogénicité

Dans la littérature, il existe peu de données relative au le métabolisme et à la cancérogénicité du B[k]F. Extrait de cendre de cigarettes et appliqué sur la peau de souris Swiss, le B[k]F ne possède qu'une faible activité cancérogène (Wynder and Hoffmann 1959). En 1980, une étude du métabolisme du B[k]F (250 µg) par la fraction S-9 de foie de rats identifie le B[k]F-8,9-*trans*-dihydrodiol (B[k]F-8,9-diol) en tant que métabolite majoritaire du B[k]F. Ce métabolite est plus mutagène que le B[k]F sur *Salmonella typhimurium* (test d'Ames), mais uniquement en présence de la fraction microsomale S-9. Ces résultats indiquent que le B[k]F-8,9-diol est probablement le métabolite cancérogène proximal du B[k]F, converti par le suite en diol-époxyde (LaVoie et al. 1980). Appliqué sur la peau de souris femelle Swiss, le B[k]F est faiblement cancérogène mais initie toutefois des tumeurs cutanées. Alors qu'il est identifié mutagène lors du test d'Ames, le B[k]F-8,9-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*) est largement inactif sur la peau de souris. Les auteurs concluent ainsi que le B[k]F est initiateur de tumeur mais n'est pas un cancérogène complet, tandis que le B[k]F-8,9-dihydrodiol serait le métabolite mutagène proximal du B[k]F mais ne serait pas cancérogène. D'après les auteurs, la cancérogénicité du B[k]F pourrait également venir du B[k]F-8,9-époxyde (LaVoie et al. 1982). En 1988, les résultats du test d'Ames et du métabolisme microsomale du B[k]F obtenus en 1980 sont confirmés. Les B[k]F-8,9-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*), 3-, 8- et 9-OHB[k]F sont les métabolites majoritaires du B[k]F après incubation avec des microsomes de foie de rats (prétraités à l'Aroclor 1254), tandis que le B[k]F-2,3-quinone est minoritaire. Le test d'Ames confirme que le B[k]F-8,9-dihydrodiol est le métabolite le plus mutagène du B[k]F (Weyand et al. 1988). Plus récemment, le métabolisme du B[k]F sur lignée cellulaire humaine de cancer du sein T47D produit essentiellement des phénols du B[k]F sous forme conjuguée. Le phénol principal est le 8-OHB[k]F (50,7 nM à 48h), suivi des 3- (18,6 nM) et 9-OHB[k]F (11,4 nM). Les CYP1A1 et 1B1 extraits des cellules T47D produisent majoritairement les 3-, 8-, 9-OHB[k]F ainsi que le B[k]F-8,9-diol, et minoritairement le B[k]F-2,3-*trans*-dihydrodiol (Spink et al. 2008).

II.4.4. Synthèse

Le biotransformation du B[k]F est représentée à l'aide d'un schéma récapitulatif (Figure 31). Il n'existe aucune donnée relative au mesurage de métabolites urinaires du B[k]F chez l'homme. Les études métaboliques *in vivo* n'apportent pas d'informations utiles du fait de la co-élution des phénols du B[k]F avec d'autres métabolites. De manière globale, la cancérogénicité du B[k]F semble liée au métabolisme du B[k]F-8,9-diol, un des métabolites majoritaires du B[k]F, en diol-époxyde. Cette théorie n'est cependant pas vérifiée et d'autres auteurs ont émis l'hypothèse d'une réactivité directe du B[k]F-8,9-époxyde. Parmi les phénols, les 8- et 9-OHB[k]F conjugués, issus du B[k]F-8,9-époxyde, apparaissent comme les biomarqueurs de détoxication les plus pertinents.

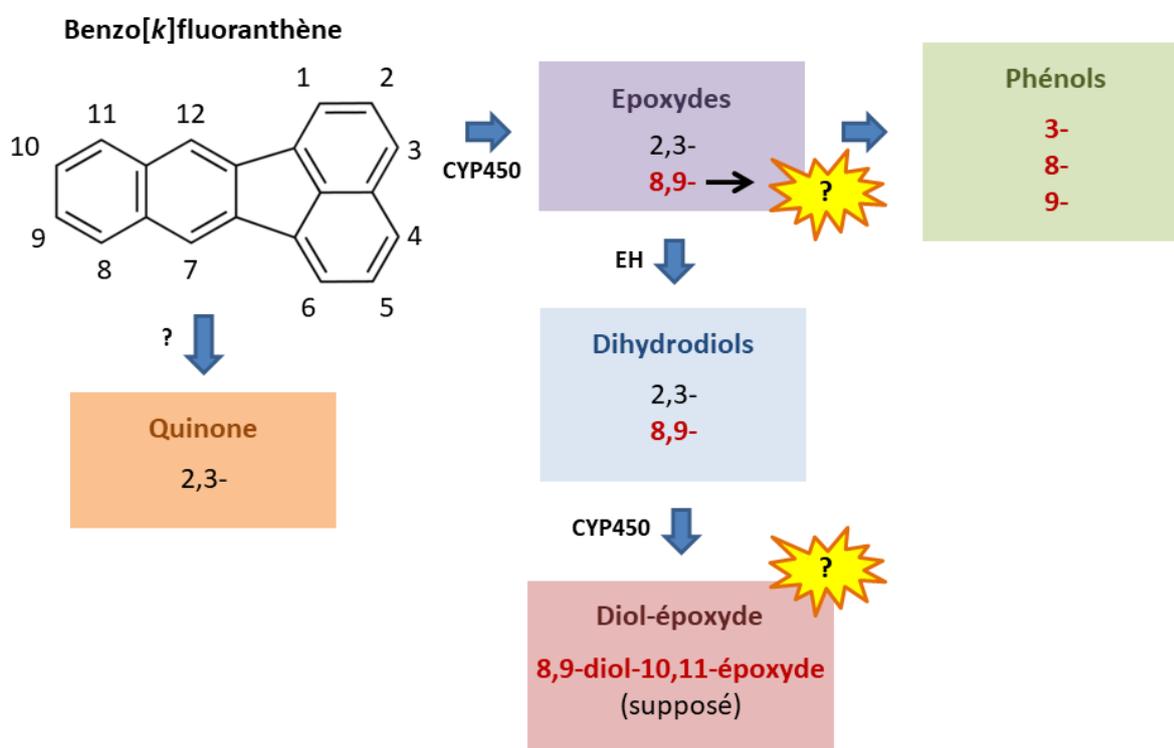


Figure 31. Schéma simplifié du métabolisme du B[k]F. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[k]F.

II.5. Le benzo[j]fluoranthène

II.5.1. Quantification de biomarqueurs urinaires chez l'homme

Aucune étude de screening de métabolites du B[j]F chez l'homme n'a pu être répertoriée.

II.5.2. Quantification de biomarqueurs *in vivo*

Aucune étude de quantification de biomarqueurs du B[j]F chez l'animal n'a pu être répertoriée.

II.5.3. Métabolisme et cancérogénicité

En 1959, la première étude sur le B[j]F démontrait sur peau de souris Swiss que ce composé était un cancérogène complet (Wynder and Hoffmann 1959). En 1980, deux dihydrodiols du B[j]F mutagènes sur *S. typhimurium* sont mis en évidence : le premier correspondait au B[j]F-9,10-*trans*-dihydrodiol (B[j]F-9,10-diol), tandis qu'à l'époque le second n'a pas pu être identifié. Ces dihydrodiols du B[j]F sont produits en quantités non-négligeables par des microsomes de foie de rat (LaVoie et al. 1980). En 1982, une nouvelle étude sur peau de souris femelles CD-1 montre cependant que le B[j]F-9,10-diol seul n'explique pas la cancérogénicité du B[j]F (LaVoie et al. 1982). En 1987, deux études s'intéressant au métabolisme du B[j]F sont publiées. La première correspond à une étude du métabolisme du B[j]F (400 µg) par des homogénats de foie de rat (prétraités à l'Aroclor 1254). Deux métabolites majoritaires sont mis en évidence : le B[j]F-9,10-diol, et le B[j]F-4,5-*trans*-dihydrodiol (B[j]F-4,5-diol) qui correspond au deuxième dihydrodiol non-identifié dans la publication de Lavoie et al. en 1980. Cette expérience identifie également quatre autres métabolites en quantités plus faibles : les 3-, 4-, 6- et 10-hydroxyB[j]F (OHB[j]F) (Rice et al. 1987a). La deuxième est une étude cinétique du métabolisme du B[j]F par la peau de souris femelle CD-1 *in vivo*. Entre 20 minutes et 4h d'exposition, la peau de souris est récupérée et les métabolites extraits. Les métabolites majoritairement identifiés sont le B[j]F-9,10-diol (22 à 54% du total des métabolites extraits), suivi du 10-OHB[j]F (14 à 17%) et du B[j]F-4,5-diol (2 à 18%). Deux métabolites minoritaires, le 4-OHB[j]F (6 à 7%) et le B[j]F-4,5-quinone (5 à 6%), sont également quantifiés dans la peau de souris entre 20 et 40 minutes d'exposition. Les auteurs étudient en outre la cancérogénicité des B[j]F-2,3-*trans*-dihydrodiol (B[j]F-2,3-diol), B[j]F-4,5-diol et B[j]F-9,10-diol sur la peau de souris CD-1. Les résultats indiquent que le B[j]F-4,5-diol est plus actif que le B[j]F-9,10-diol, ce qui confirme les conclusions de LaVoie *et al.* de 1982. L'activité cancérogène du B[j]F-2,3-diol est très limitée. Les auteurs postulent alors sur une conversion du B[j]F-4,5-diol en *trans*-4,5-dihydrodiol-6,6a-époxyde-B[j]F (Rice et al. 1987b).

En 1993, deux études révèlent que l'*anti*-4,5-dihydrodiol-6,6a-époxyde-B[j]F est responsable de la majeure partie des adduits à l'ADN formé par le B[j]F sur *S. Typhimurium* mais aussi sur la peau de souris femelles CD-1. La liaison de l'*anti*-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[j]F à l'ADN forme des adduits mineurs du B[j]F à l'ADN. Le B[j]F-4,5-diol semble donc être le principal métabolite à l'origine de la cancérogénicité du B[j]F, par comparaison au B[j]F-9,10-diol qui y participe de manière limitée (Marshall et al. 1993; Weyand et al. 1993a). La même année, l'injection en intrapéritonéale à des souris nouveau-nés CD-1 de B[j]F, des B[j]F-4,5-diol et B[j]F-9,10-diol et de leurs diol-époxydes en conformation *syn* et *anti* confirme ces résultats (LaVoie et al. 1994). Toutefois en 1996, l'injection directe de *trans*-4,5-dihydrodiol-6,6a-époxyde-B[j]F et *trans*-9,10-

dihydrodiol-11,12-époxyde-B[j]F dans la glande mammaire montre que ce dernier induit plus de tumeurs au niveau du tissu mammaire que le *trans*-4,5-dihydrodiol-6,6a-époxyde-B[j]F (Hecht et al. 1996).

II.5.4. Synthèse

Le métabolisme du B[j]F est résumé à l'aide d'un schéma simplifié (Figure 32). Aucun dosage de biomarqueurs n'a pas été réalisé chez l'homme ou chez l'animal. La cancérogénicité du B[j]F semble provenir de l'*anti*-4,5-dihydrodiol-6,6a-époxyde-B[j]F et du *trans*-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[j]F, formé respectivement à partir des B[j]F-4,5-diol et B[j]F-9,10-diol. Les 4-OHB[j]F et 10-OHB[j]F sont les métabolites majeurs issus des voies de détoxication.

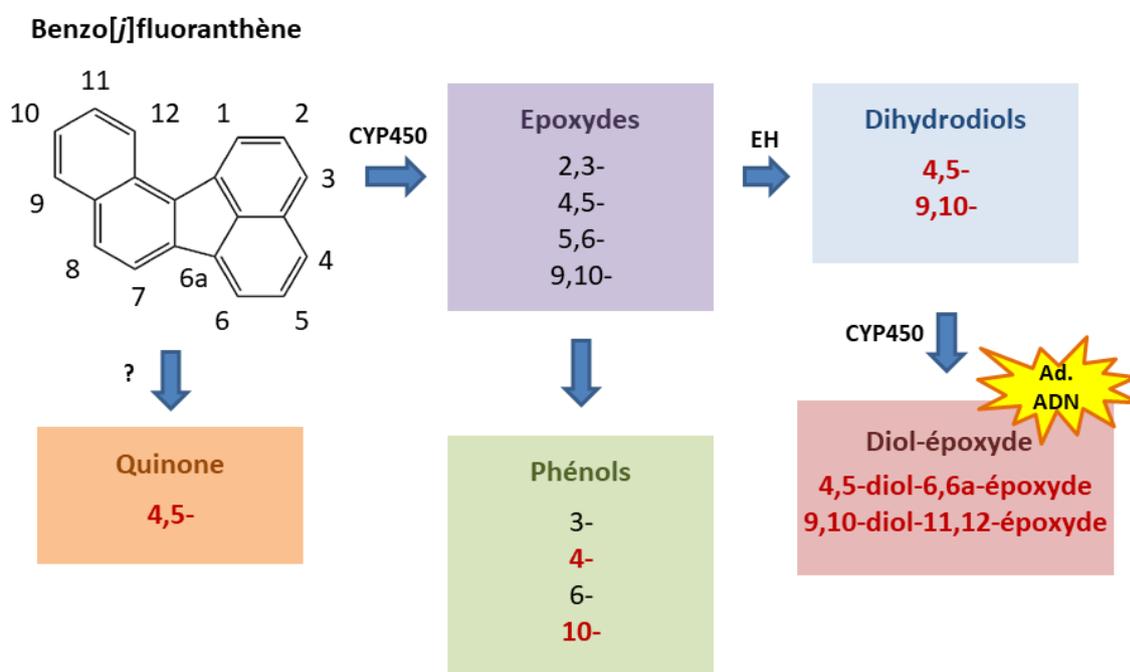


Figure 32. Schéma simplifié du métabolisme du B[j]F. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[j]F.

II.6. Le benzo[e]pyrène

II.6.1. Quantification de biomarqueurs urinaires chez l'homme

Aucune étude de screening de métabolites du B[e]P chez l'homme n'a été publiée.

II.6.2. Quantification de biomarqueurs *in vivo*

Aucune étude de quantification de biomarqueurs du B[e]P chez l'animal n'a pu être répertoriée.

II.6.3. Métabolisme et cancérogénicité

Le métabolisme du B[e]P a essentiellement été étudié sur des systèmes microsomaux de rat prétraités ou non avec des inducteurs enzymatiques (Aroclor 1254...). Les deux premières études du métabolisme du B[e]P paraissent en 1969. La première publication explore le métabolisme d'une série de HAP par des homogénats de foie de rat et des cellules embryonnaires de souris. Le B[e]P-4,5-dihydrodiol est le métabolite majoritairement produit lors de ces deux séries d'expériences, tandis qu'un autre métabolite est potentiellement le 3-hydroxyB[e]P (3-OHB[e]P) (Sims 1970a). Le même auteur étudie ensuite le métabolisme du B[e]P par des préparations de foie ou des microsomes de rat (pré traités ou non au 3-méthylcholanthrène). Le B[e]P-4,5-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*) est majoritairement produit (36 $\mu\text{mol/g}$ foie de rat, microsomes de foie de rat non-prétraités) suivi d'un phénol étant toujours hypothétiquement identifié comme le 3-OHB[e]P (19 $\mu\text{mol/g}$) (Sims 1970b). En 1980, une expérience de métabolisme du B[e]P par des enzymes de microsomes de foie de rat (prétraités ou non au 3-méthylcholanthrène/phénobarbital) confirme ces résultats. Le B[e]P-4,5-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*) représente 29% du total des métabolites, tandis que le deuxième métabolite du B[e]P le plus abondant est un phénol (possiblement le 1-, 2- ou 3-hydroxyB[e]P (OHB[e]P)) comptant pour 15 à 20% du total des métabolites. Le B[e]P-9,10-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*), identifié comme l'un des métabolites cancérogène proximale du B[e]P, représente moins de 1 % du total des métabolites (MacLeod et al. 1980). L'incubation de B[e]P avec des cellules embryonnaires de hamster HEC pendant 96h montre que le B[e]P-4,5-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*) (1,85 dpm.10⁻⁶/5 cultures), puis le 3-OHB[e]P (0,17 dpm.10⁻⁶/5 cultures) sont les métabolites majoritaires et identifiés du B[e]P. Le B[e]P-9,10-dihydrodiol (présumé en conformation *trans*) est largement minoritaire (0,2 % du métabolisme total). Cette étude quantifie également deux autres métabolites abondants (respectivement 2,13 et 0,73 dpm.10⁻⁶/5 cultures), sans réussir à les identifier. Les auteurs affirment que ces composés n'appartiennent néanmoins pas à la voie métabolique du B[e]P-9,10-dihydrodiol (MacLeod et al. 1982). Une autre expérience du métabolisme du B[e]P par des microsomes de foie de rat (prétraités ou non avec des HAP, PCB, du phénobarbital...) confirme également que le B[e]P-4,5-*trans*-dihydrodiol (B[e]P-4,5-diol) est le métabolite majoritaire du B[e]P. Dans cette étude, le 1-OHB[e]P est produit en quantité plus élevée que le 3-OHB[e]P avec et sans inducteur enzymatique. La différence est cependant minime selon les conditions expérimentales : 0,3 nmol/mg de protéine microsomale en 3-OHB[e]P et 0,5 nmol/mg en 1-OHB[e]P sans inducteur enzymatique. Les niveaux de B[e]P-9,10-*trans*-dihydrodiol (B[e]P-9,10-diol) sont globalement trop faibles pour être quantifiés (Jacob et al. 1983).

En parallèle de l'étude du métabolisme, les chercheurs étudient la cancérogénicité et la mutagénicité du B[e]P. En 1979, une étude montre ainsi que le B[e]P, le B[e]P-9,10-diol et le B[e]P-4,5-diol ne sont pas mutagènes lors du test d'Ames. L'étude du métabolisme du B[e]P-9,10-diol par des microsomes de foie de rat indique sa conversion en trois hydroxy-9,10-dihydrodiolB[e]P et un tétraol, le 4,5,9,10-tetrahydroxy-4,5,9,10-tetrahydroB[e]P. Aucune trace de conversion en diol-époxyde n'est cependant observée, ce qui pourrait expliquer l'absence de mutagénicité observée lors du test d'Ames (Wood et al. 1979). En 1980, des chercheurs confirment que le B[e]P et ses dérivés métaboliques ont peu ou n'ont pas de cancérogénicité sur la peau de souris femelles CD-1 et chez le nouveau-né de souris Swiss-Webster par injection intrapéritonéale (Buening et al. 1980). Après injection des *anti*- et *syn*-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[e]P en intrapéritonéale à des souris nouveaux-nés, le premier provoque une légère augmentation de l'incidence de tumeurs pulmonaires tandis que le deuxième induit une large augmentation du nombre de tumeurs hépatiques. Les diol-époxydes du B[e]P-9,10-diol possèdent ainsi une activité cancérogène, contrairement au B[e]P et au B[e]P-4,5-diol. L'absence de cancérogénicité du B[e]P pourrait ainsi venir de sa non métabolisation à la fois en B[e]P-9,10-diol et en diol-époxyde (Chang et al. 1981). Les diols-époxydes du B[e]P sont également mutagènes sur *S. typhimurium* et cellules de hamster chinois V79, bien que leurs activités soient très limitées en comparaison avec celles des diol-époxydes du B[a]P (Wood et al. 1980). Cependant l'*anti*-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[e]P montre une interaction limitée avec l'ADN de virus (Hsu et al. 1979). Incubé avec des cellules embryonnaire de hamster HEF, le B[e]P n'interagit en réalité que très peu avec les macromolécules telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines. L'explication est que sa biotransformation en B[e]P-4,5-diol (69,6% des métabolites du milieu), puis phénol (21,9%) est très majoritaire tandis qu'aucune trace de B[e]P-9,10-diol n'est mesurée (MacLeod et al. 1979).

II.6.4. Synthèse

La biotransformation du B[e]P est détaillée à l'aide d'un schéma récapitulatif (Figure 33). Aucune donnée relative à la quantification de biomarqueurs n'est disponible chez l'homme ou chez l'animal. D'après cette revue de la littérature et d'autres (IARC 2010), les éléments démontrant la cancérogénicité du B[e]P sont limités. Cette absence de cancérogénicité pourrait s'expliquer de plusieurs manières : (1) le B[e]P n'est pas ou peu converti en diol-époxyde au niveau de la région de Bay, dont l'encombrement stérique paraît important. (2) Les diol-époxydes du B[e]P ne possèdent qu'une réactivité limitée avec les macromolécules dont l'ADN. Quelques études montrent cependant une cancérogénicité des *anti*- et *syn*-9,10-dihydrodiol-11,12-époxyde-B[e]P, hypothétiquement formés à partir du B[e]P-9,10-diol. Enfin, les métabolites les plus fréquemment détectés en tant que dérivés métaboliques majoritaires sont le 3-OHB[e]P et le B[e]P-4,5-diol.

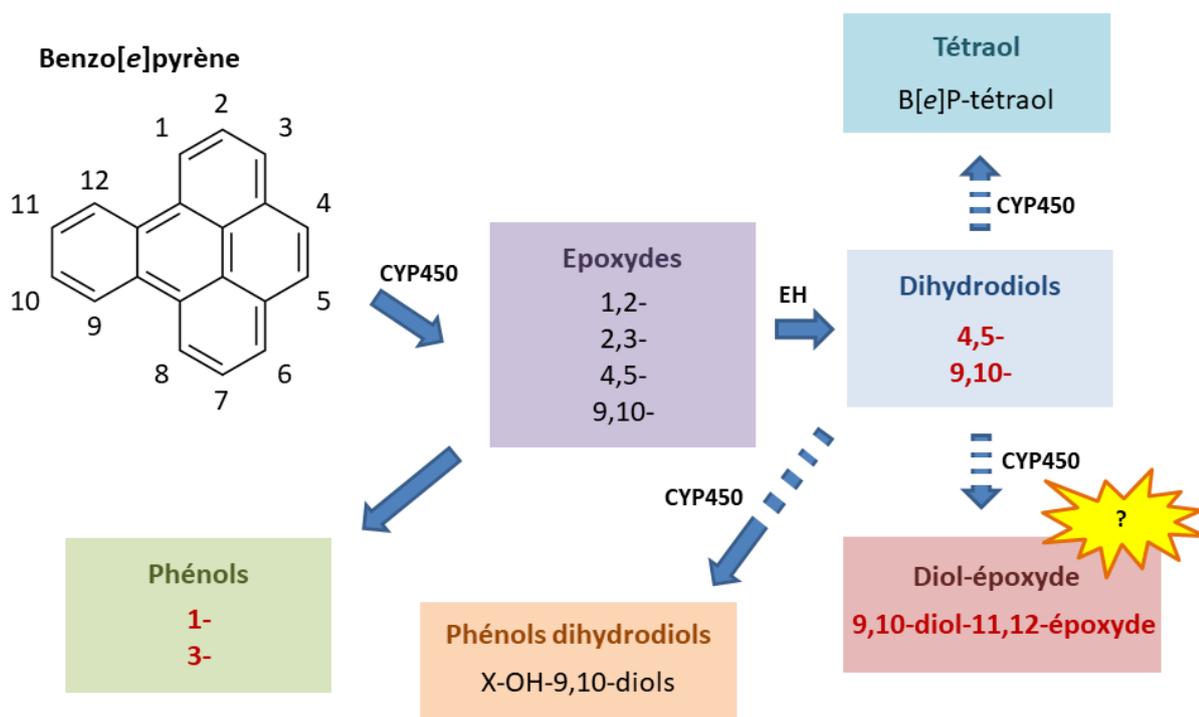


Figure 33. Schéma simplifié du métabolisme du B[e]P. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Flèche hachurée : voie métabolique hypothétique. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du B[e]P.

II.7. Le dibenzo[*a,h*]anthracène

II.7.1. Quantification de biomarqueurs urinaires chez l'homme

Aucune étude de screening de métabolites du DB[*a,h*]A chez l'homme n'a pu être répertoriée.

II.7.2. Quantification de biomarqueurs *in vivo*

Le 3-hydroxyDB[*a,h*]A (3-OHDB[*a,h*]A) est quantifié par GC-MS/MS dans une étude exposant 20 rats mâles de race Lister Hooded à 0, 10, 100 et 1000 mg/kg d'un mélange de HAP solubilisés dans l'huile végétale par voie intrapéritonéale trois fois par semaine pendant 28 jours avant sacrifice. La LQ est de 1,2 pg/mg de cerveau de rat. Le 3-OHDB[*a,h*]A n'est jamais détecté dans aucun échantillon (Grova et al. 2011).

Appliquant le même protocole d'exposition, cette équipe quantifie cette fois le 3-OHDB[*a,h*]A dans les poils de rats mâles Lister Hooded. La LQ est de 10 pg/mg de poils. Les rats Lister Hooded ayant un pelage noir et blanc, le 3-OHDB[*a,h*]A est analysé dans les poils des deux couleurs mais n'est détecté dans aucun des échantillons (Grova et al. 2013).

II.7.3. Métabolisme et cancérogénicité

En 1965, une première étude du métabolisme du DB[*a,h*]A par des homogénats de foie de rat détectait les 3-OHDB[*a,h*]A et 4-hydroxyDB[*a,h*]A (4-OHDB[*a,h*]A), mais aussi les dihydrodiols en position 1,2-, 3,4 et 5,6- (présumés en conformation *trans*). A cette époque, l'identification des métabolites est toutefois expérimentale dans de nombreux cas car peu de standards sont synthétisés (Boyland and Sims 1965). Quatre ans plus tard, une autre étude de métabolisme par des microsomes et des homogénats de foie de rat (prétraités ou non au 3-méthylcholanthrène) identifie et quantifie les métabolites du DB[*a,h*]A. Le DB[*a,h*]A-3,4-dihydrodiol (28 µmoles/g de foie de rat, microsomes de foie de rat non traité), le 3-OHDB[*a,h*]A (21 µmoles/g), le DB[*a,h*]A-5,6-dihydrodiol (17 µmoles/g) et le 4-OHDB[*a,h*]A (15 µmoles/g) constituent les métabolites majoritaires du DB[*a,h*]A tandis que le DB[*a,h*]A-1,2-dihydrodiol (4 µmoles/g) est plus minoritaire. Les dihydrodiols étudiés dans cette publication sont présumés être en conformation moléculaire *trans* (Sims 1970b). En 1979, Nordqvist *et al.* confirment que le DB[*a,h*]A-3,4-*trans*-dihydrodiol (DB[*a,h*]A-3,4-diol) est le métabolite majoritaire formé par les microsomes de foie de rat prétraités ou non au phénobarbital, au 3-Méthylcholanthrène ou à l'Aroclor 1254 (26% du total des métabolites, microsomes contrôles). En revanche, cette étude identifie le DB[*a,h*]A-1,2-*trans*-dihydrodiol (DB[*a,h*]A-1,2-diol) comme métabolite secondaire (8,3%) et ne détecte que des traces de DB[*a,h*]A-5,6-*trans*-dihydrodiol (1,9%). Les auteurs n'arrivent pas à discriminer les phénols des deux fractions phénoliques obtenues (respectivement 14 et 33% des métabolites). 17% des métabolites restent non-identifiés. Cette étude présente également des preuves de formation de 3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-DB[*a,h*]A donné comme le métabolite cancérogène ultime du DB[*a,h*]A par la théorie de la région de Bay (Nordqvist *et al.* 1979). Après exposition de peau de souris mâle Swiss en culture à du DB[*a,h*]A et quantification des dihydrodiols libres, le DB[*a,h*]A-3,4-diol est le métabolite majoritaire (0,3 nmol) tandis que les DB[*a,h*]A-1,2-diol et DB[*a,h*]A-5,6-*trans*-dihydrodiol libres ne représentent qu'une faible portion du métabolisme (respectivement 0,01 et 0,03 nmol) (MacNicoll *et al.* 1980). Plus récemment, Shou *et al.* expriment plusieurs CYP450 humains (CYP1A1, CYP3A4...) en lignée cellulaire hépatique transformée HepG2 et les purifiaient avant d'étudier leur participation au métabolisme du DB[*a,h*]A. Deux CYP450, le CYP1A2 et le CYP2C9, sont particulièrement actifs dans la conversion métabolique du DB[*a,h*]A. Le CYP1A2 produit majoritairement du DB[*a,h*]A-1,2-diol (286,2 pmol/min,nmol de substrat contre 94,0 pmol/min,nmol de DB[*a,h*]A-3,4-diol) alors que le CYP2C9 produit majoritairement du DB[*a,h*]A-3,4-diol (223,3 pmol/min,nmol contre 68,6 pmol/min,nmol de DB[*a,h*]A-1,2-diol). Les auteurs extraient ensuite les microsomes de foie de 14 donneurs humains non-fumeurs et non-alcooliques. Les profils métaboliques alors obtenus après incubation avec 100 µM de DB[*a,h*]A montrent un

métabolisme différent de celui obtenu dans les études précédentes avec des microsomes de foie de rat : DB[a,h]A-1,2-diol > DB[a,h]A-3,4-diol > Diphénols > total phénols > DB[a,h]A-5,6-*trans*-dihydrodiol (Shou et al. 1996).

Parallèlement à ces études de métabolisme, les scientifiques explorent les mécanismes de cancérogénicité du DB[a,h]A. En 1979, Buening *et al.* étudient la cancérogénicité du DB[a,h]A et de ses trois *trans*-dihydrodiols *in vivo* sur la peau de souris femelle CD-1 ainsi que sur des nouveau-nés souris Swiss. Les souris exposées au DB[a,h]A et le DB[a,h]A-3,4-diol développent approximativement autant de cancers que celles exposées au DB[a,h]A tandis que les DB[a,h]A-1,2-diol et DB[a,h]A-5,6-*trans*-dihydrodiol sont peu de cancérogènes (Buening et al. 1979). Le DB[a,h]A est d'ailleurs mutagène lors du test d'Ames. Le 1,2,3,4-tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydroDB[a,h]A, produit de l'hydrolyse du 3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-DB[a,h]A, est détecté après incubation de DB[a,h]A avec la fraction S9 ou des microsomes isolés de foie de rats (Lecoq et al. 1989). Ces deux études démontrent que le DB[a,h]A-3,4-diol et le 3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-DB[a,h]A sont respectivement les métabolites cancérogènes proximales et ultimes du DB[a,h]A. Après injection de DB[a,h]A en intrapéritonéale à des rats A/J mâle, le DB[a,h]A est plus cancérogène que le B[a]P. 5 adduits à l'ADN résultent de l'interaction entre l'ADN et le DB[a,h]A après biotransformation. L'adduit majeur et deux adduits mineurs proviennent de l'activation métabolique du *trans-trans*-3,4,10,11-tetrahydroxy-3,4,10,11-tetrahydroDB[a,h]A (ou DB[a,h]A-3,4,10,11-bis-dihydrodiol), tandis que les deux autres adduits se forment après interaction entre le *anti*-3,4-dihydrodiol-1,2-époxyde-DB[a,h]A avec l'ADN (Nesnow et al. 1995).

II.7.4. Synthèse

Le métabolisme du DB[a,h]A est résumé à l'aide d'un schéma récapitulatif (Figure 34). Aucune étude n'a pu être répertoriée chez l'homme et les niveaux sont indétectables chez le rat. Peu d'informations sont disponibles dans la littérature concernant le métabolisme et la cancérogénicité du DB[a,h]A. Toutes les données indiquent que le DB[a,h]A-3,4-diol est le métabolite cancérogène proximal du DB[a,h]A. Ce métabolite serait ensuite activé en diol-époxyde et bis-dihydrodiol à travers différentes voies métaboliques. Avec le DB[a,h]A-1,2-diol, le DB[a,h]A-3,4-diol est un métabolite majoritaire du DB[a,h]A, alors que les 3- et 4-OHDB[a,h]A sont minoritaires d'après les études les plus récentes.

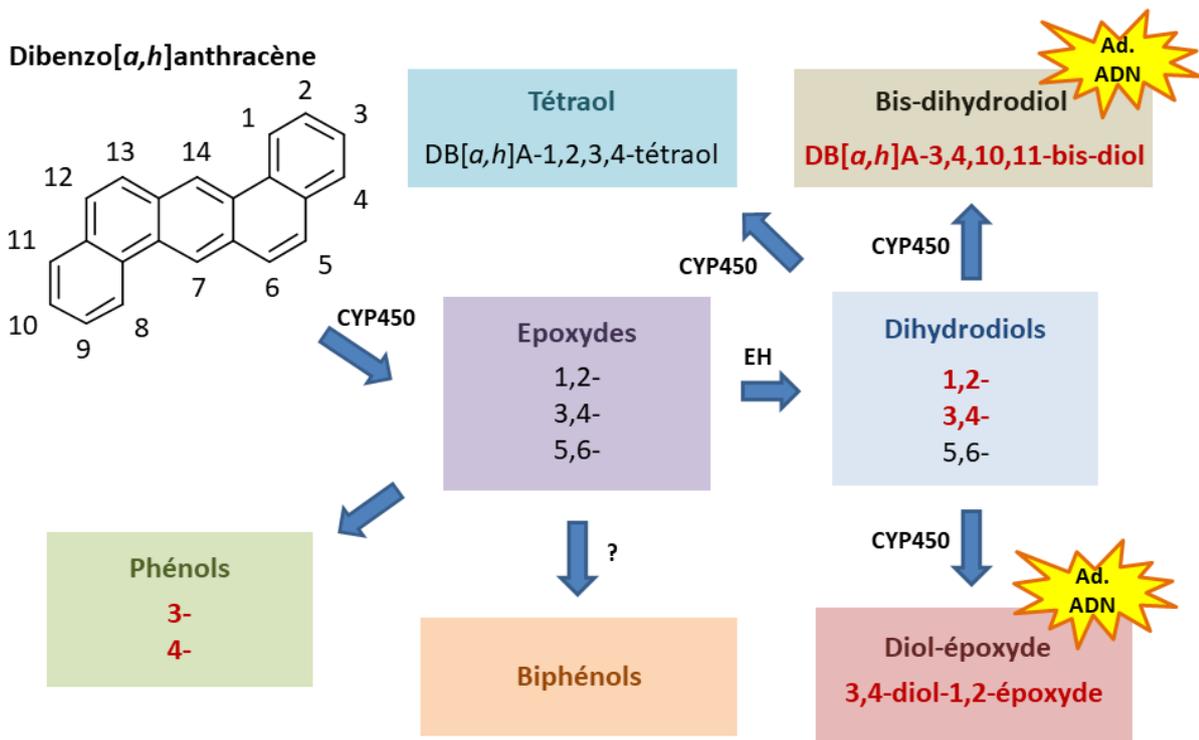


Figure 34. Schéma simplifié du métabolisme du DB[*a,h*]A. CYP450 : cytochrome P 450. EH : époxyde hydrolase. Ad. ADN : adduits à l'ADN. En rouge : biomarqueurs potentiels, ou métabolites impliqués dans la génotoxicité du DB[*a,h*]A.

II.8. Conclusion

L'étude du métabolisme et des mécanismes de cancérogénicité des 7 HAP particulières a permis l'élaboration d'une liste de métabolites qui constituent des biomarqueurs pouvant être impliqués dans la cancérogénicité mais aussi dans les voies de détoxification de ces HAP (Tableau 4).

Tableau 4. Résumé des biomarqueurs d'intérêts d'après revue de la littérature. Vert : degré de confiance élevé; Orange : degré de confiance moyen; Rouge : degré de confiance faible.

HAP	Biomarqueurs potentiels	Bioactivation	Détoxification
B[a]A	3-OHB[a]A		X
	B[a]A-3,4-diol	X	
	B[a]A-8,9-diol	X	
Chr	3-OHChr	X	
	6-OHChr		X
	Chr-1,2-diol	X	
	Chr-3,4-diol		X
B[b]F	4-OHB[b]F		X
	5-OHB[b]F	X	
	6-OHB[b]F	X	
	12-OHB[b]F		X
	B[b]F-9,10-diol	X	
	B[b]F-11,12-diol		X
B[k]F	8-OHB[k]F		X
	9-OHB[k]F		X
	B[k]F-8,9-diol	X	
B[j]F	4-OHB[j]F		X
	10-OHB[j]F		X
	B[j]F-4,5-diol	X	
	B[j]F-9,10-diol	X	
B[e]P	3-OHB[e]P		X
	B[e]P-4,5-diol		X
	B[e]P-9,10-diol	X	
DB[a,h]A	3-OHDB[a,h]A		X
	4-OHDB[a,h]A		X
	DB[a,h]A-1,2-diol		X
	DB[a,h]A-3,4-diol	X	

III. Sélection de composés purs et commercialisés

Dans la littérature, la plupart des études sur le métabolisme des HAP particuliers datent de la fin du 20^e siècle. La quasi-totalité des auteurs se procuraient les standards de métabolites auprès de l'organisation indépendante américaine MRIGlobal, étant par ailleurs quasiment l'unique fournisseur pour ce type de standards. Malheureusement, la production de ces standards dépendait d'un contrat gouvernemental arrivé à expiration en 2011. Les standards encore disponibles chez MRIGlobal sont ainsi des reliquats de ce contrat ce qui explique que la liste des standards disponibles soit sensiblement différente de celle originellement établie après la synthèse de la littérature. De ce fait, pour le B[b]F, le 12-OHB[b]F a été remplacé par le 10-OHB[b]F qui est également un métabolite issu des voies de détoxification. Pour le B[j]F, seul le B[j]F-2,3-diol était disponible mais aucun métabolite du DB[a,h]A ne l'était. Par conséquent aucun biomarqueur n'a pu être développé pour ce HAP particulier (Tableau 5).

Lors de l'achat des métabolites des HAP particuliers, MRIGlobal accompagnait chaque standard d'une fiche de renseignements détaillant ses caractéristiques moléculaires et analytiques. Cette fiche précisait notamment la pureté des métabolites ainsi que le nombre d'année dans l'inventaire avant la vente (Tableau 5). Lors des premières injections en GC-MS/MS, le Chr-1,2-diol et le B[a]A-3,4-diol présentaient trois pics chromatographiques distincts lors de leur analyse alors que les 3-OHChr, 6-OHChr et 3-OHB[a]A ne présentaient qu'un seul pic chromatographique. Bien que d'après les données fournies par MRIGlobal, ces dihydrodiols étaient respectivement purs à 95 et à 99%, l'ensemble des dihydrodiols furent analysés en HPLC-UV à 254 nm (Figure 35). Sur 5 des 9 chromatogrammes, un unique pic majoritaire apparaissait indiquant la pureté du standard (en vert sur le Tableau 5). Par contre, la présence de nombreux pics sur les chromatogrammes des autres dihydrodiols signalait la présence d'impuretés en solution avec les standards (en rouge sur le Tableau 5).. Ces impuretés peuvent correspondre à des résidus produits lors de la synthèse des métabolites, mais également à des molécules issues de la dégradation progressive des standards au cours de leur stockage chez MRIGlobal. Outre les problèmes chromatographiques posés par ces impuretés, quantifier des échantillons biologiques avec des standards potentiellement dégradés est inenvisageable. Parmi les dihydrodiols, la suite du projet fut ainsi menée sur les B[a]A-8,9-diol, B[k]F-8,9-diol, B[j]F-2,3-diol, ainsi que les B[e]P-4,5-diol et B[e]P-9,10-diol.

Tableau 5. Liste des métabolites obtenus suite à la synthèse de la littérature et la disponibilité chez MRIGlobal, pureté des standards acquis, âge des standards au moment de l'achat. Vert : dihydrodiols sans impuretés ; Rouge : dihydrodiols avec impuretés

HAP	Biomarqueurs potentiels	Pureté	Âge (années)
B[a]A	3-OHB[a]A	97%	3
	B[a]A-3,4-diol	99%	31
	B[a]A-8,9-diol	99%	31
Chr	3-OHChr	99%	3
	6-OHChr	99%	11
	Chr-1,2-diol	95%	28
B[b]F	10-OHB[b]F	100%	31
	B[b]F-9,10-diol	85%	31
	B[b]F-11,12-diol	90%	18
B[k]F	8-OHB[k]F	98%	14
	9-OHB[k]F	99%	24
	B[k]F[8,9-diol	97%	31
B[j]F	B[j]F-2,3-diol	86%	20
B[e]P	3-OHB[e]P	91%	18
	B[e]P-4,5-diol	99%	14
	B[e]P-9,10-diol	98%	17

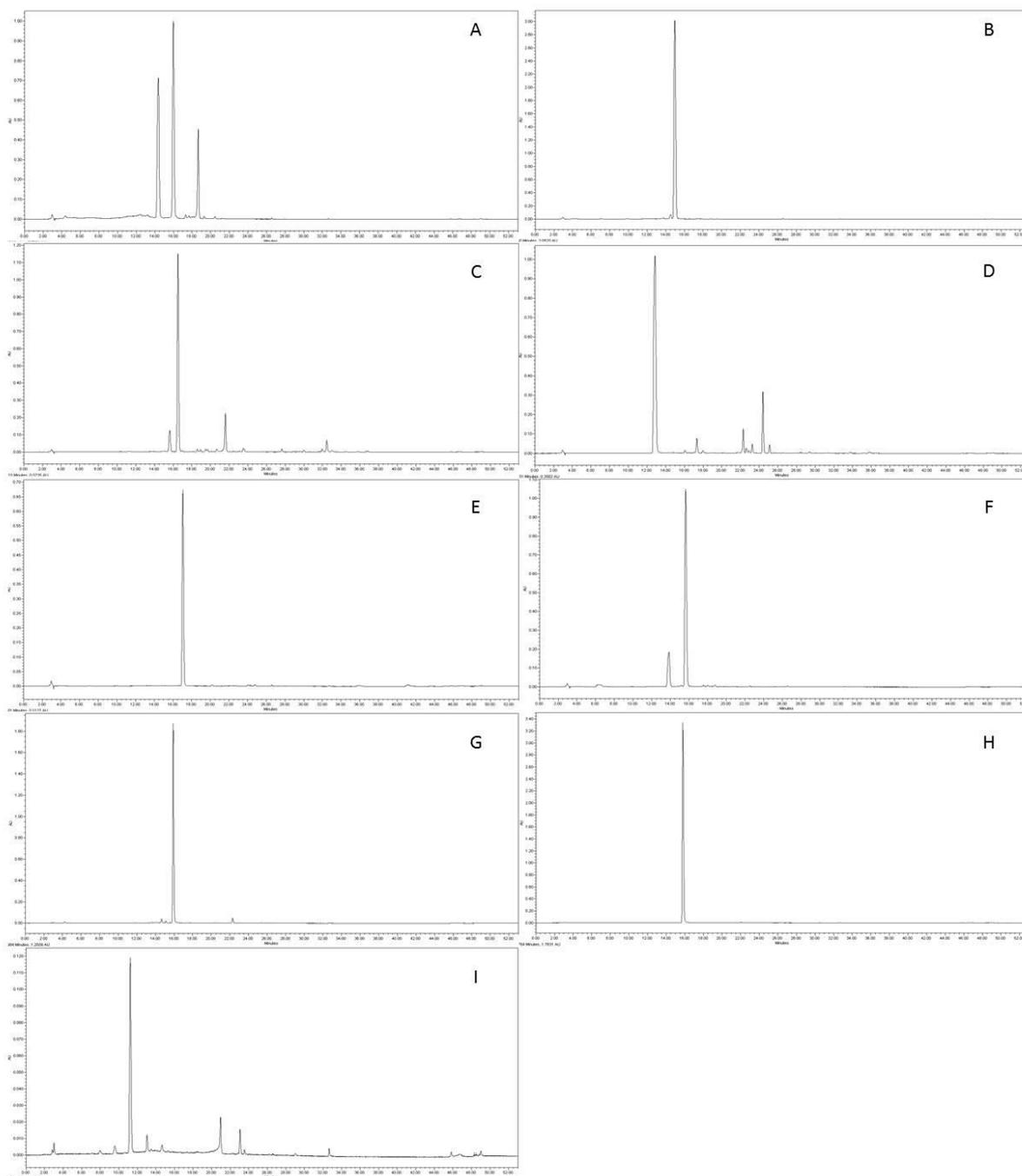


Figure 35 : Chromatogramme HPLC-UV à 254 nm pour l'ensemble des dihydrodiols ; A : B[a]A-3,4-diol, B : B[a]A-8,9-diol, C : B[b]F-9,10-diol, D : B[b]F-11,12-diol, E : B[k]F[8,9]-diol, F : Chr-1,2-diol, G : B[j]F-2,3-diol, H : B[e]P-4,5-diol, I : B[e]P-9,10-diol.

IV. Choix de l'étalon interne

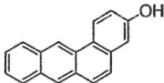
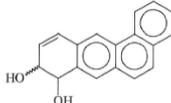
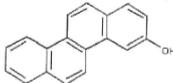
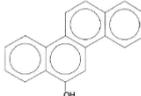
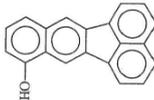
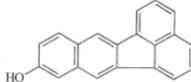
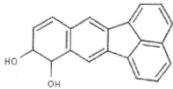
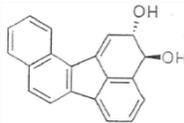
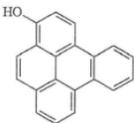
En spectrométrie de masse, la réponse du détecteur varie au cours du temps et n'est pas parfaitement proportionnelle à la concentration de l'analyte cible. Pour corriger ce biais, l'étalonnage se fait par ajout d'une quantité connue d'étalon interne aux échantillons. Cet étalon est une molécule qui est naturellement absente de l'échantillon et qui est distinguable des analytes, mais possède des propriétés physico-chimiques analogues. Lors du protocole d'analyse, l'étalon interne se comporte ainsi de la même manière que les molécules d'intérêt à quantifier. Par conséquent, il subit les mêmes variations d'intensité (instrumentales, erreurs de prises d'échantillons...) dans la détection. En calculant le rapport analyte/étalon interne, il est ainsi possible de s'affranchir des variations analytiques.

Dans le cadre du développement analytique des métabolites des HAP particulaires, le 3-hydroxy[$^{13}\text{C}_6$]benzo[*c*]phénanthrène (3-OHB[*c*]P $^{13}\text{C}_6$) (MRIGlobal, Etats-Unis, ref 1146), le 6-hydroxy[$^{13}\text{C}_6$]chrysène (6-OHChr $^{13}\text{C}_6$) (Cambridge Isotope Laboratories Inc, Etats-Unis, ref CLM-4860-T-1.2) et le 1-hydroxy[$^{13}\text{C}_6$]pyrène (1-OHP $^{13}\text{C}_6$) (Cambridge Isotope Laboratories Inc, Etats-Unis, ref CLM-9012-1.2) ont été choisis en tant qu'étalons internes. Il s'agit de métabolites de HAP particulaires marqués au carbone 13. L'idéal est de posséder un équivalent marqué pour chaque métabolite de chaque HAP particulaire, cependant les possibilités commerciales sont limitées. Les étalons internes sélectionnés sont néanmoins chimiquement proches des métabolites d'intérêts et permettent de corriger les variations de la réponse inhérente à la GC-MS/MS.

V. Conclusion

Après étude de la littérature, acquisition des standards disponibles chez MRIGlobal et vérification de leur pureté, la liste des métabolites dont le dosage en GC-MS/MS sera développé est détaillée dans le Tableau 6. La liste des étalons internes et leur formule est détaillée dans le Tableau 7.

Tableau 6. Liste finale des métabolites sélectionnés après étude de la littérature et vérification de leur pureté.

HAP	Liste des standards	Formule développée
B[a]A	3-OHB[a]A	
	B[a]A-8,9-diol	
Chr	3-OHChr	
	6-OHChr	
B[b]F	10-OHB[b]F	
B[k]F	8-OHB[k]F	
	9-OHB[k]F	
	B[k]F-8,9-diol	
B[j]F	B[j]F-2,3-diol	
B[e]P	3-OHB[e]P	

Suite du tableau 6

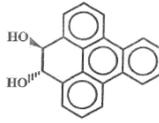
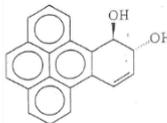
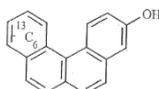
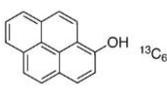
	B[e]P-4,5-diol	
	B[e]P-9,10-diol	

Tableau 7. Liste des étalons internes et leurs formules développées.

HAP	Liste des standards	Formule développée
Etalons internes	3-OHB[c]P $^{13}\text{C}_6$	
	6-OHChr $^{13}\text{C}_6$	
	1-OHP $^{13}\text{C}_6$	

**Chapitre 4 : Etude de l'absorption cutanée et du métabolisme
des HAP particulaires en conditions d'expositions
professionnelles**

I. Contexte scientifique

L'évaluation de l'effet cocktail des mélanges complexes de HAP constitue l'un des challenges majeurs en termes d'évaluation du risque sanitaire lié aux expositions aux HAP. La composition de ces mélanges est de surcroît variable et dépend des sources et des installations industrielles. Toutefois, la cancérogénicité des mélanges de HAP résulte essentiellement de la fraction particulaire, et particulièrement du B[a]P. La contamination de la peau par les HAP constitue l'une des principales voies d'entrée chez les travailleurs, responsable de cancers cutanés.

La cancérogénicité des HAP est un processus comportant plusieurs étapes, dont l'absorption et la bioactivation. Ces deux étapes de la cancérogénèse ont lieu dans le tissu cutané et sont bien caractérisées pour certains HAP. A contrario, l'influence des mélanges complexes sur ces processus est méconnue.

Lors de certaines activités professionnelles, la contamination de la peau par les HAP est combinée avec une irradiation par les rayonnements UV solaires, provoquant un excès de cancers. Les rayonnements UV impactent la structure de l'épiderme, dont le *stratum corneum*, et du derme, réduisant la fonction de barrière de la peau. Ainsi, la perméabilité de la peau envers certains xénobiotiques est accrue et pourrait de même être augmentée pour les HAP. Les UV induisent l'expression des enzymes du métabolisme, dont les CYP450, ce qui renforce la génotoxicité des HAP et pourrait augmenter leur absorption cutanée. Toutefois, des résultats contradictoires ont récemment été observés, indiquant le besoin d'études complémentaires. Enfin, les HAP et leurs métabolites sont photosensibles, ce qui pourrait aussi augmenter leur toxicité et/ou aggraver l'altération de la barrière cutanée provoquée par les UV.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de la composition des mélanges complexes, de la dose et de l'irradiation simultanée de la peau par les UV solaires sur l'absorption cutanée et le métabolisme des HAP sur des explants *ex vivo* de peau humaine, dans des conditions expérimentales proches des expositions professionnelles afin d'améliorer l'évaluation du risque cancérogène.

II. Développement analytique

Dans un premier temps, l'objectif était de développer une méthode d'analyse pour l'ensemble des métabolites des HAP particulaires en GC-MS/MS, plus spécifique que la chromatographie liquide couplée à un détecteur à fluorescence. Une étape préalable de dérivation était toutefois nécessaire afin de rendre les composés plus volatiles.

L'appareillage consistait en une chromatographie gazeuse Agilent 7890B avec un injecteur multimode couplé avec détecteur de masse quadripôle Agilent 7000C avec une source d'ionisation en impact électronique. Afin d'atteindre la plus grande spécificité possible tout en préservant la sensibilité de la méthode, le mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM), dont le principe est la mesure simultanée de plusieurs transitions énergétiques, a été adopté. La méthode a été mise au point d'après les documents de support fournis par Agilent. Le développement de la méthode de détection s'est déroulé en quatre étapes : sélection des transitions énergétiques, optimisation des énergies de collision (test de 1 à 50 eV), du dwell time et du gain (test de 1 à 50). L'optimisation de l'énergie de collision et du dwell time a été réalisée à l'aide des logiciels « Design experiments » et « Analyze experiments » développés par Agilent. Concernant la séparation chromatographique, les colonnes DB-XLB et DB-5MS produites par Agilent ont été testées. La colonne DB-XLB, sensible à la pyridine nécessaire à l'étape de dérivatisation, présentait une diminution très rapide du signal lors d'injections successives. Ainsi, la colonne DB-5MS, plus stable et permettant une bonne séparation analytique doublée d'une bonne résolution, a été sélectionnée. Les paramètres finaux de la méthode de détection et de séparation sont détaillés dans l'article scientifique.

Au cours de cette mise au point, les B[e]P-9,10-diol et B[j]F-2,3-diol furent éliminés du pool de métabolites analysables. En effet, les transitions obtenues en impact électronique pour le B[e]P-9,10-diol étaient trop peu spécifiques pour l'analyse de ce composé dans des matrices complexes. Lors d'essais à des concentrations de l'ordre du mg/L, aucun signal ne fut détecté pour le B[j]F-2,3-diol alors que cette gamme de concentration était bien supérieure à celle attendue dans les futurs échantillons (de l'ordre du µg/L). Malgré des tests supplémentaires (renouvellement des solutions de travail, changement de la colonne), aucun signal ne fut identifié pour le B[j]F-2,3-diol.

III. Matériel et Méthodes

Dans un premier temps, des mélanges de HAP ont été extraits de composés industriels dérivant du brai de houille (CTP) ou du coke de pétrole (PC). Après analyse du profil en HAP des extraits, les mélanges ont été ajustés à 1 et/ou 10 nmol de B[a]P (PC-I-1, CTP-I-1 et CTP-I-10). De plus, le profil en HAP de l'extrait de brai de houille à 10 nmol de B[a]P a fidèlement été reconstitué à l'aide de standards analytiques (CTP-S-10).

A l'instar du travail précédent, les échantillons de peau humaine ont été obtenus après opération chirurgicale de réduction mammaire et transportés en moins d'une heure jusqu'au laboratoire. Les explants ont ensuite été traités selon plusieurs protocoles. Dans une première expérience, les cinétiques de pénétration et de métabolisme du CTP-S-10 (24, 48 et 72 heures) et du CTP-I-10 (48,

72 et 96 heures) ont été comparées à celle de 10 nmol de B[a]P (B[a]P-10), sur la peau de deux donneuses. L'effet de la complexité du mélange sur l'absorption cutanée et le métabolisme des HAP a ensuite été étudié par application de B[a]P-10, de CTP-S-10 et de CTP-I-10 sur la peau de 6 donneuses pendant 48 heures. Puis, l'effet de la dose et de la composition des mélanges a été évalué en déposant du CTP-I-1 et du CTP-I-10, ainsi que du PC-I-1 et 1 nmol de B[a]P (B[a]P-1), sur la peau de 3 donneuses pendant 48 heures. Enfin, l'influence des UV sur l'absorption cutanée et le métabolisme du B[a]P-10, du CTP-S-10 et du CTP-I-10 a été étudié en irradiant pendant 15 min (LSS, 6,4 J/cm²) la peau de 4 donneuses 1 heure avant application des HAP pendant 48 heures, ou 24 heures après le début de l'application des HAP.

La distribution des HAP au sein de la peau humaine a été évaluée par quantification des HAP non-métabolisés à la surface de la peau, dans la peau et dans le milieu par chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence. Les métabolites des HAP, dont le B[a]P-tétraol, ont été mesurés par GC-MS/MS. Afin de simplifier l'analyse des données, les HAP ont été regroupés par comportements similaires. Ainsi, la moyenne du FluA et du Pyr a été calculée ($\Sigma F+P$), de même que la moyenne des HAP particuliers excepté le B[a]P ($\Sigma HAPP$). L'analyse statistique a ensuite été menée à l'aide des tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis and Mann-Whitney, lorsque le nombre d'échantillons dont la valeur était inférieure à la LQ n'excédait pas 10% du total.

IV. Article scientifique

Soumise dans Archives of Toxicology. Under Review.

Influence of Exposure dose, Complex Mixture and Ultraviolet Radiation on Skin Absorption and Bioactivation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Etienne Bourgart¹, Renaud Persoons^{1,2}, Marie Marques¹, Alex Rivier¹, Franck Balducci¹, Anne von Koschembahr³, David Béal³, Marie-Thérèse Leccia⁴, Thierry Douki³, Anne Maitre^{1,2,*}

¹ Equipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UGA-CNRS), Université Grenoble Alpes, Faculté de Médecine, 38706 La Tronche Cedex, FRANCE

² Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, Service de Biochimie Biologie moléculaire Toxicologie Environnementale, IBP, CHU Grenoble Alpes

³ Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC-SyMMES-CIBEST, Grenoble, France

⁴ Clinique de Dermatologie, Allergologie et Photobiologie – CHU Grenoble Alpes

Abstract

Background: Combined exposure to complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and ultraviolet radiations (UVR) is suspected to enhance PAH skin permeability and skin cancer risk depending on PAH bioactivation. The impact of exposure dose, composition and complexity of PAH mixtures along with UVR was assessed on PAH cutaneous absorption and bioactivation using realistic exposure conditions and human skin explants. PAH complex mixtures were extracted from industrial products: coal tar pitch (CTP-I) or petroleum coke (PC-I). Synthetic mixture (CTP-S) was identically reconstituted with PAH standards. The applied dose was adjusted to 1 (PC-I, CTP-I) or 10 nmol (CTP-I, CTP-S) of benzo[a]pyrene (B[a]P). Unmetabolized PAH were recovered from skin surface, skin, medium and quantified by HPLC-FLD. PAH metabolites were collected from medium and analyzed by GC-MS/MS.

Results: B[a]P and PAH penetration was lower for the highest B[a]P dose, for industrial mixtures and for CTP-I compared to PC-I. Skin irradiation increased PAH penetration only for CTP-I. However, PAH uptake was poorly influenced by the different experimental conditions. PAH metabolism strongly decreased upon mixtures application leading to unmetabolized PAH accumulation in human skin. While PAH metabolism was similar between CTP-I and PC-I, PAH biotransformation was lower with the highest dose and industrial mixtures suggesting a saturation of xenobiotic metabolizing enzymes as confirmed in a time-course study. Furthermore, UVR strongly inhibited all particulate PAH metabolism.

Conclusions: The cutaneous impact of mixtures is much more complex than a simple additivity of each PAH's effect. These results highlight the gap between *in vitro* studies performed on individual high-dose PAH and health risk resulting from PAH exposure.

Keyword

Polycyclic aromatic hydrocarbons, mixtures, toxicological interactions, Ultraviolet radiation, Biotransformation, Skin absorption.

Background

While toxicology has focused on the study of single compounds for many years, the current challenge is to assess health risk of complex mixtures. However, interactions between xenobiotics constitute one of the main barriers towards complex mixture evaluation since compounds from identical or different chemical classes may modulate the toxicity from one another. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous pollutants always identified as complex mixtures which compositions are highly variable according to emitting sources and industrial facilities (1). PAH behavior is mainly determined by their molecular weight: under 178 g/mol, PAH diffuse in gaseous phase, while over 228 g/mol, PAH bind to air particles. Weighting about 202 g/mol, fluoranthene (FluA) and pyrene (Pyr) are both in gaseous and particulate phases (2). PAH human exposure results from incomplete combustion of organic matter or from the use of raw materials deriving from coal distillation and at a lesser extent from petroleum distillation. PAH occupational exposures occurring during several work activities were classified carcinogenic to human in 2010 by the International Agency of Research against Cancer (IARC). PAH mixture carcinogenicity mostly derives from particulate fraction, especially from benzo[a]pyrene (B[a]P), the only PAH classified carcinogenic to human by IARC (1). Although workers are mainly exposed to PAH via inhalation, skin contamination is another important absorption pathway in various occupational environments (3-5) and triggers an increase of skin cancer (6, 7). Extent of skin contamination fluctuates between workers according to the tasks performed and to the means of protection set up (8).

PAH skin carcinogenicity is a multistage process that notably involves skin absorption and bioactivation (9). Upon entrance in human skin, PAH accumulate in the *stratum corneum*, the outermost layer of the skin, forming a skin reservoir because their lipophilicity prevents further diffusion in the epidermis. Subsequent PAH dermal absorption is intrinsically dependent on their metabolism (10-12). PAH biotransformation splits into different metabolic pathways leading to the formation of a great variety of metabolites including genotoxic intermediates among which diol-epoxides are considered as ultimate carcinogenic metabolites (13, 14). By binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), PAH induce the expression of various xenobiotic metabolizing enzymes (XME) including different cytochrome P450 (CYP450) monooxygenases as CYP1A1/2 or CYP1B1. These enzymes are expressed in human skin, especially in epidermis, demonstrating its great capacities toward PAH metabolism (15-17). While skin absorption is well documented for few individual PAH, especially B[a]P, knowledge about PAH mixtures is limited (11, 12, 15).

For years, occupational outdoor activities like asphalt paving or roofing have been associated with an increase in skin cancer with some of the excesses attributable to PAH skin deposition (18). However, some workers are exposed to ultraviolet radiation (UVR), and syncarcinogenesis between these two toxic agents has recently gained recognition in Germany (19). Furthermore, an increase of skin cancer after combined exposure to UVR and PAH was reported *in vivo* as well as among offshore petroleum workers (20, 21).

UVR, classified carcinogenic to human (22), represent 5% of total solar radiation and roughly consist in 95% of UVA (320-400 nm) and 5% of UVB (290-320 nm) (23-25). UVB are highly energetic and mainly absorbed by the epidermis, whereas 50% of less energetic UVA interact with the epidermis as the other half enters the dermis (26). UVB affect the properties of the *stratum corneum*, reducing the barrier function of the skin (27). UVA activate endogenous photosensitizers which generate reactive oxygen species (ROS) as well as free radicals, resulting in biological structures alterations (25, 28). Thus, UVR triggers structural changes in both epidermis and dermis, including keratinocytes' tight junctions disruption and dermis' extracellular matrix degradation (26, 29). All these structural modifications increase the uptake of xenobiotics as observed after irradiation of human and rodent skin, and might as well increase PAH skin

permeation (30-33). Furthermore, solar irradiation influences the expression of XME which might modulate PAH bioactivation and their cutaneous absorption. Upregulation of CYP1A1 and CYP1B1 expression and production by UVR was reported in HaCat cell line, primary keratinocytes and human skin, probably by activation of AhR signaling pathway (34-36). An enhanced BPDE-DNA adducts formation was reported in mice skin with combined chronic exposure to UVA and B[a]P (37). However, diminished CYP450 expression has been described when B[a]P-treated human skin explants were irradiated with UVR (38). In addition, PAH and their metabolites are known photosensitizers since they absorb sun light in the visible light, UVB or UVA regions. Once excited, PAH may undergo internal conversion processes yielding several compounds including genotoxic quinones. They are also able to transfer energy or electrons to biological molecules or molecular oxygen, therefore generating reactive species and ROS (39-41). This was previously identified as a possible carcinogenic mechanism (21), but this could also result in an aggravation of the enhanced skin permeability caused by UVR. However, little is known on the modulation of PAH skin absorption and bioactivation by combined exposure to UVR and PAH mixtures. Most of researches focused on B[a]P genotoxicity under UVR (37, 38). Only one study has examined the diffusion of different PAH through human skin under UVR irradiation (42), but PAH metabolites were not measured.

In the present work, we investigated the influence of chemical composition and exposure levels of PAH mixtures (synthetic or industrial mixtures) as well as the influence of combined full solar UV spectrum on PAH skin absorption and bioactivation by *ex vivo* human skin explants, using realistic human exposure to better assess cancer risk and evaluate systemic bioavailability.

Results

PAH profile of mixtures

PAH profiles were different between the two mixtures topically applied on skin surface. While light PAH (Pyr and FluA) accounted for more than 30% in coal tar pitch (CTP), only Pyr was present in petroleum coke (PC) representing 6% of total PAH. Conversely, particulate PAH represented 94% in PC and 68% in CTP. The percentage of chrysene (Chr) and dibenzo[a,h]anthracene (DB[a,h]A) were 2.2 and 3.3 folds higher in PC than in CTP and those of benzo[a]anthracene (B[a]A), B[a]P, benzo[b]fluoranthene (B[b]F) and benzo[g,h,i]perylene (B[g,h,i]P) were between 1.3 and 1.8 times greater. While the percentages of benzo[e]pyrene (B[e]P) were equal between the two mixtures, PC contained percentages of benzo[j]fluoranthene (B[j]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F) and indeno[1,2,3-c,d]pyrene (I[1,2,3-c,d]P) twice lower than CTP.

At 1 nmol of B[a]P, the applied amount of Chr, B[e]P, Pyr and FluA ranged between 1.3 and 2.3 nmol while those of B[a]A and B[b]F was around 1 nmol with CTP (Additional File 1: Table S1). The lowest amount was those of DB[a,h]A (0.2 nmol) and the dose of other particulate PAH ranged around 0.5 nmol. At 1 nmol of B[a]P, PC contained 1.2, 1.4 and 2 nmol of B[b]F, B[e]P and Chr, respectively, while the amounts of other PAH were below 1 nmol. The amount of B[a]A was 0.9 nmol and those of Pyr and B[g,h,i] were about 0.5 nmol. Other PAH accounted for less than 0.4 nmol (DB[a,h]A > B[j]F > I[1,2,3-c,d]P > B[k]F).

Kinetic preliminary experiments

In order to determine the most relevant exposure duration, the penetration (defined as the unmetabolized PAH fraction disappearing from skin surface) and metabolism kinetics of PAH were established by topical application of 10 nmol of

B[a]P (B[a]P-10) and synthetic coal tar pitch adjusted to 10 nmol of B[a]P (CTP-S-10) for 24, 48 and 72 hours on one skin donor, and B[a]P-10 and coal tar pitch extract adjusted to 10 nmol of B[a]P (CTP-I-10) for 48, 72 and 96 hours on another (Tables 1 and 2). B[a]P skin penetration was much slower when applied in mixtures than alone. Indeed, the amounts of B[a]P measured on skin surface were respectively about 12 folds higher with CTP-S-10 at 24 hours and 18 folds greater with CTP-I-10 at 48 hours compared to B[a]P-10 (Table 1). Following exposure to CTP-S-10, low percentages of PAH were measured on skin surface after 24 hours and remaining amounts progressively penetrated until 72 hours. Only 5% of FluA and Pyr were quantified on skin surface after 24 hours and around 1% after 72 hours. Regarding B[a]P or other particulate PAH, 10% to 25% were measured on skin surface after 24 hours and less than 8% after 72 hours, except for Chr and B[g,h,i]P of which 15% remained on skin surface. After topical application of CTP-I-10, around 28% of FluA and Pyr remained on skin surface at 48 hours while only 16% was measured at 96H. The penetration of particulate PAH was slower with 37% to 78% of PAH remaining on skin surface at 48 hours and 30% to 69% at 96 hours. Apart from FluA and Pyr, it was unclear whether PAH penetrated human skin to a greater extent when incubations were longer.

<Table 1>

PAH metabolites were detectable in the medium starting from 24 hours with CTP-S-10 or 48 hours with CTP-I-10 (Table 2). While B[a]P metabolism was slower after topical application of CTP-S-10 than with B[a]P-10 at 24 and 48 hours, 7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (B[a]P-tetrol) levels reached the same range after 72 hours of exposure regardless of the PAH treatment. Similar kinetic was observed for the other particulate PAH with CTP-S-10. However, 6-hydroxychrysene (6-OHChr) was not quantifiable at 48 and 72 hours due to contaminant hiding chromatographic pic. With CTP-I-10, PAH metabolites levels remained extremely low, except for benzo[k]fluoranthene-8,9-*trans*-dihydrodiol (B[k]F-8,9-diol). The levels of 6 out of 11 quantified metabolites remained below the quantification limit (QL) regardless of the exposure duration.

<Table 2>

The progressive penetration and metabolism of PAH demonstrate that human skin was maintained metabolically active and structurally intact up to 96 hours. Although greater penetration and metabolism was observed at 72 and 96 hours, a 48-hours exposure was retained to comply with the constraints of the surgery schedule.

Influence of mixture complexity on PAH absorption and metabolism

Parent PAH distributions in six donor skins exposed to B[a]P-10, CTP-S-10 and CTP-I-10 for 48-hours are presented on Figure 1. B[a]P, the mean of Pyr and FluA ($\Sigma F+P$) and the mean of particulate PAH except B[a]P ($\Sigma HAPP$) exhibited similar behaviors. B[a]P penetration decreased with increasing mixture complexity. While 3% of B[a]P remained on skin surface with B[a]P-10, it rose to 21% with CTP-S-10 and to 49% with CTP-I-10. $\Sigma F+P$ and $\Sigma HAPP$ were respectively about five and two folds higher for CTP-I-10 compared to CTP-S-10. Those trends were also significant when PAH were analyzed individually (data of individual PAH behaviors can be examined in Additional File 1: Table S2).

When B[a]P was applied in mixtures, parent B[a]P significantly accumulated in the skin compared to B[a]P-10 but no difference was observed between CTP-S-10 and CTP-I-10 (Figure 1). $\Sigma F+P$ and $\Sigma HAPP$ measured in the skin were also comparable between the two mixtures. However, higher levels of Chr were observed after application of CTP-I-10, while the percentages of B[b]F and B[e]P were significantly lower (Additional File 1: Table S2).

B[a]P and \sum HAPP uptake (defined as the percentage of unmetabolized PAH measured in the medium) was limited (< 2%) whereas \sum F+P levels were from 6 to 8 folds greater regarding the mixtures (Figure 1). B[a]P uptake slightly increased when skin was exposed to CTP-S-10 while no difference was observed between B[a]P-10 and CTP-I-10. B[a]P, \sum F+P and \sum HAPP were significantly reduced when CTP-I-10 was applied compared to CTP-S-10. Likewise, individual PAH uptakes were significantly decreased by mixture application; except for Chr (Additional File 1: Table S2).

PAH metabolism was significantly lower when mixture complexity increased (Figure 2). B[a]P-tetrol level was significantly divided by 5 with CTP-S-10 and by 45 with CTP-I-10 exposure compared to B[a]P-10. For 3-hydroxychrysene (3-OHChr), 3-hydroxybenzo[a]anthracene (3-OHB[a]A) and benzo[a]anthracene-8,9-*trans*-dihydrodiol (B[a]A-8,9-diol), the decrease was significant with CTP-I-10 compared with CTP-S-10, but not for 6-OHChr. A decrease was also observed for the other metabolites after application of CTP-I-10 but statistical tests were not performed as more than 10% of values were below QL.

Influence of exposure level and industrial mixture composition on PAH absorption and metabolism

The distribution of parent PAH in three donor skins according to exposure level (CTP-I-10 and coal tar pitch extract adjusted to 1 nmol of B[a]P (CTP-I-1)) and composition of industrial mixtures (1 nmol of B[a]P (B[a]P-1), petroleum coke extract adjusted to 1 nmol of B[a]P (PC-I-1) or CTP-I-1) are displayed on Figure 3. \sum F+P was not calculable for PC-I-1 as this latter did not contain any FluA. Results obtained after B[a]P-1, PC-I-1 or CTP-I-1 treatments were more variable than those obtained with CTP-I-10. PAH penetration decreased when exposure dose increased. Although no trends were statistically significant, PAH amounts (B[a]P, \sum F+P and \sum HAPP) remaining on skin surface was multiplied by 1.4 to 1.8 folds with CTP-I-10 compared to CTP-I-1. The mixture composition also had a great impact on PAH penetration. B[a]P amounts quantified on skin surface were significantly greater with CTP-I-1 compared to PC-I-1, while B[a]P penetration was similar after B[a]P-1 and PC-I-1 application. Likewise, \sum HAPP levels on skin surface increased by 2 folds when human skin was exposed to CTP-I-1 compared to PC-I-1, even though this result was not statistically significant.

In human skin, significantly higher levels of B[a]P and \sum HAPP were quantified after topical deposition of CTP-I-1 compared to B[a]P-1 and PC-I-1, whereas PAH accumulation in the skin was similar with CTP-I-1 and CTP-I-10.

Exposure level and mixture composition modulated PAH uptake. The percentage of B[a]P and \sum HAPP measured in the medium were divided by 2.4 to 4.2 folds with B[a]P-1, PC-I-1 and CTP-I-10 compared to CTP-I-1. Furthermore, \sum F+P was reduced by 1.4 fold with CTP-I-10 compared to CTP-I-1. However, the differences for B[a]P and \sum F+P were not significant, and statistical analysis was not conducted for \sum HAPP because more than 10% levels measured in medium samples with CTP-I-1 and PC-I-1 were below the QL. Overall, the investigation of individual PAH confirmed those results (Additional File 1: Table S3).

PAH metabolism after exposure to B[a]P-1, PC-I-1, CTP-I-1 and CTP-I-10 is presented on Figure 4. B[a]P-tetrol levels respectively decreased by 6.3 and 3.6 with PC-I-1 and CTP-I-1 compared to B[a]P-1. Although metabolites levels were generally a bit lower with PC-I-1, except with B[k]F, no great differences were observed with PC-I-1 compared to CTP-I-1. Statistical analysis was only performed on 3-OHChr, which display non-significant trend, as more than 10% of samples were below QL for the other metabolites. PAH metabolism was strongly reduced with CTP-I-10 compared to CTP-I-1. All metabolites levels, except 6-OHChr, decreased by 7 to 55 folds with CTP-I-10 compared to CTP-I-1.

B[a]P metabolism was reduced by 27 folds, and 3-OHChr and B[a]A-8,9-diol levels were significantly reduced by CTP-I-10 application compared to CTP-I-1. Statistical analysis was only conducted for 3-OHChr and B[a]A-8,9-diol.

Influence of simulated sunlight (SSL) on PAH absorption and metabolism

Parent PAH distributions in four donor skins after exposure to PAH (B[a]P-10, CTP-S-10, CTP-I-10) under the influence of SSL are presented on Figure 5A. SSL did not impacted PAH penetration with B[a]P-10 or CTP-S-10. In contrast, the amounts of PAH measured on skin surface tended to decrease after combined exposure to SSL and CTP-I-10. PAH penetration was higher when skin was irradiated with SSL 1 hour before PAH exposure for 48 hours (SSL-PAH) than when PAH were applied on skin for 48 hours with SSL irradiation at 24 hours (PAH-SSL protocol) but these increases were not significant. Only B[a]P penetration was significantly enhanced following SSL-PAH protocol compared to PAH exposure for 48 hours without SSL exposure (\emptyset SSL protocol), but not with the PAH-SSL protocol.

Parent PAH accumulated in human skin under the influence of SSL (Figure 5B). After topical application of B[a]P-10 and CTP-S-10, B[a]P and Σ HAPP significantly rose in the skin with PAH-SSL and SSL-PAH protocols compared to \emptyset SSL. B[a]P and Σ HAPP accumulations were larger with the SSL-PAH protocol than with the PAH-SSL protocol. After combined exposure to SSL and CTP-I-10, PAH skin accumulation was less clear and this trend was only significant for B[a]P with the SSL-PAH protocol. Σ F+P behavior was not significantly modified by any of the irradiation protocols.

SSL irradiation of human skin did not impact PAH uptake as amounts remained unchanged in the medium regardless of the irradiation protocol (Figure 5C). The investigation of individual PAH, except for B[j]F, confirmed those results (Additional File 1: Table S4).

PAH metabolism was massively disrupted by SSL after exposure to B[a]P-10 and CTP-S-10 (Figure 6A and 6B). Following B[a]P-10 treatment, B[a]P-tetrol production was significantly reduced by 2 and 4 folds with the PAH-SSL and SSL-PAH protocols, respectively. Similar decreases were observed for all metabolites with the CTP-S-10 mixture. B[a]P-tetrol, 3-OHB[a]A and B[a]A-8,9-diol levels were significantly lower with the PAH-SSL protocol than with the \emptyset SSL protocol, and 3-OHChr, 6-OHChr, 3-OHB[a]A, B[a]A-8,9-diol and benzo[e]pyrene-4,5-*trans*-dihydrodiol (B[e]P-4,5-diol) were significantly reduced by the SSL-PAH protocol compared to the \emptyset SSL protocol. Other differences did not reach statistical significance or statistical analysis were not performed as more than 10% of samples were below QL. Except for 6-OHChr, no significant effect of SSL treatment was observed with CTP-I-10 (Figure 6C). Statistical analysis were only performed on Chr and B[a]A metabolites with the PAH-SSL protocol, and for 3-OHChr, 6-OHChr as well as 3-OHB[a]A with the SSL-PAH protocol, since metabolites concentrations were too low following CTP-I-10 application.

Discussion

The main concern of the study design was to be the most representative of PAH occupational exposure. Human skin explants are suitable model to study PAH skin absorption, as long as the design is appropriate (43). PC, commonly used for silicon carbide production, is a carbon-rich raw material that derives from oil refining (44). CTP is a component of carbon electrode subsequently consumed during metal production, leading to high atmospheric and cutaneous PAH occupational exposure (1). In addition, products derived from coal distillation largely contributed to asphalt workers and roofers working under solar radiations and were responsible for human cancers (45). Hence, CTP suited UVR experiments which represented occupational exposure scenarios: skin irradiation prior PAH contamination (SSL-PAH

protocol) or after PAH exposure (PAH-SSL protocol). CTP is notably composed of high proportions of PAH including PAH not measured in the present study such as substituted PAH, but also monocyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic compounds and alkenes (46, 47). In order to assess the influence of those chemicals on PAH skin absorption, the PAH profile of CTP was accurately reconstituted with marketed standards. Among the wide number of PAH, twelve were examined as they were either major constituents of coal tar pitch (46), or classified priority substances by the US-EPA and the European Union or carcinogens by the IARC (1). Although CTP contained higher total of PAH, particulate PAH represented a much larger proportion of PC composition than CTP's. Setting a realistic applied dose is crucial in the experimental design as it largely impacts skin absorption and metabolism (43). Skin explants were therefore exposed to 10 nmol of B[a]P, constituting a small applied dose of B[a]P in *ex vivo* studies compared to literature (11, 48), and to 1 nmol of B[a]P, a dose approaching dermal exposure of roofers (49). For particulate PAH biotransformation study, marketed particulate PAH metabolites were quantified in addition to B[a]P-tetrol: biomarkers measured among workers (50, 51), major metabolites reported in *in vivo* and *in vitro* studies (52-54), but also dihydrodiols involved in carcinogenic bioactivation pathways (55, 56). B[a]P-tetrol was selected to represent B[a]P bioactivation, since this metabolite mostly derives from the hydrolysis of benzo[a]pyrene-diol-epoxide (BPDE), the ultimate carcinogenic metabolite of B[a]P (57).

Unmetabolized PAH distributions in human skin were investigated using different mixture compositions and exposure doses in order to understand PAH fate upon skin contamination during occupational activities. The penetration of B[a]P, other particulate PAH as well as FluA and Pyr, was strongly reduced when the complexity of the mixtures applied on skin surface increased. Indeed, the presence of other PAH greatly impacts B[a]P penetration which dropped with CTP-S-10 compared to B[a]P-10. Furthermore, B[a]P and other PAH penetration was decreased by the other chemicals contained in CTP-I-10. Analogous results were reported in mouse as B[a]P residence time on skin was multiplied by 6.9 folds when B[a]P was co-administrated with high boiling point (850°F) complex organic mixtures (58). This may result from a saturation of the skin reservoir as the quantity and the number of applied chemicals increase, or chemicals interactions on skin surface. This decreased penetration was associated with a diminution in PAH uptake with CTP-I-10 compared to CTP-S-10. Nevertheless, PAH levels remained low, below 2% and 12% for particulate PAH, including B[a]P, and $\Sigma F+P$, respectively. In addition to the complexity of the mixture, the exposure dose and the different mixtures (PC and CTP) greatly impacted PAH penetration. Indeed, the residual amount of B[a]P and $\Sigma HAPP$ remaining on skin surface diminished proportionally with CTP-I-1 compared to CTP-I-10. In addition, they were twice lower with PC-I-1 compared to CTP-I-1. Contrary to CTP-I-1, B[a]P skin distribution was very similar between PC-I-1 and B[a]P-1. While it is clear that the drop in PAH penetration with CTP-I-10 is related to the greater amount of chemicals deposited on skin surface, difference between PC and CTP may be due to variations in the content of PAH or other chemicals. However, exposure dose and mixture composition at most seem to have a limited impact on B[a]P and $\Sigma HAPP$ uptake because their amount in medium remained below 2% of applied dose regardless of experimental conditions. Conversely, Pyr and FluA, penetrated human skin faster than particulate PAH and their uptake was at least five folds higher than that of particulate PAH. This is well supported by literature since numerous studies have measured weak diffusion of unmetabolized particulate PAH compared to lighter PAH (12, 42, 59, 60). The poor bioavailability of B[a]P and particulate PAH following dermal exposure indicates that their carcinogenicity seems to be mainly located on the skin contamination site. Nonetheless, a systemic toxicity following skin uptake cannot be excluded as PAH undergo an enterohepatic circulation after biliary elimination, leading to PAH retoxification and extended life time in human body (1, 61, 62).

PAH metabolism, a crucial process in PAH bioactivation and removal from the skin, is also considerably influenced by the composition of applied mixture. While parent B[a]P accumulated in human skin, B[a]P-tetrol formation, representing B[a]P carcinogenic bioactivation, dropped with CTP-S-10 compared to B[a]P-10. During kinetic metabolism study, B[a]P-tetrol formation was also largely lower after CTP-S-10 application compared to B[a]P-10 until 48 hours. Furthermore, PAH metabolism reduction was stronger with CTP-I-10 compared to CTP-S-10, although PAH accumulation in human skin was not statistically different between the two mixtures, probably due to reduced PAH skin penetration after CTP-I-10 application. This decrease in PAH metabolism cannot be explained by transcriptional inhibition of XME expression because the expression of CYP1A1 and CYP1B1 is steeply induced by various mixtures present in cigarette smoke, diesel exhaust, carbon black, urban air or jet fuel (63-65). This reduction in PAH metabolism rather comes out of enzymatic saturation. Indeed, B[a]P and other PAH biotransformation was considerably higher after CTP-I-1 application compared to CTP-I-10, suggesting a severe enzymatic saturation by competitive inhibition. Previous studies demonstrated enzymatic saturations of XME with application of increasing amount of pure B[a]P (11, 12, 43), competitive inhibition of CYP450 activity by PAH or other organic components of complex mixtures (58, 64, 66). Yet, CTP-I contains a great diversity of chemicals which may interfere with XME activity through biochemical mechanisms different than those previously described. For instance, heavy metals were shown to inhibit PAH-mediated CYP450 activity, probably by interfering with mRNA translation or heme loss (67). The impact of complex mixtures on PAH carcinogenicity, which depends partly on PAH genotoxicity thus bioactivation, is a primary concern regarding risk assessment. While the effect of PAH mixtures is often considered to be additive (68), this dogma is often questioned by numerous researches which reveal much more complex impacts. PAH genotoxicity studies are often performed with high doses leading to XME activity saturation (69). Thus, the current study was conducted with a dose representative of occupational exposure. B[a]P bioactivation was still 3.6 folds lower with CTP-I-1 than with B[a]P-1. In addition, B[a]P-tetrol levels were divided by approximatively 6 folds with PC-I-1 compared to B[a]P-1. Unmetabolized PAH accumulation in the skin was lower with PC-I-1 than with CTP-I-1, however, PAH metabolites levels were in the same range, except for B[k]F, that may partly be explained by substantially lower amount of B[k]F. Those results suggest that complex mixtures have a less-than-additive effect on PAH bioactivation even at low exposure dose. Nevertheless, longer study studies should be performed since PAH bioactivation might just be delayed.

To the best of our knowledge, this is the first study examining the effect of UVR on the penetration, the uptake and the metabolism of PAH complex mixtures. While ultraviolet rays increased skin penetration of all particulate PAH with CTP-I-10, especially for B[a]P, no effect was observed with CTP-S-10 or B[a]P-10 application, even though great amount of particulate PAH (at least 20%) remained of skin surface with CTP-S-10. This difference could be caused by an increase of skin permeation of the chemicals other than PAH contained in CTP-I-10, creating a gradient of concentration which triggers particulate PAH skin penetration. Contrary to the SSL-PAH protocol, the results were not statistically different with the PAH-SSL protocol, as UVR cause skin barrier disruption in a time-dependent manner. Indeed, the trans epidermal water loss, a signature of an altered skin barrier function, increased *in vivo* from 3 to 8 days after irradiation with 150 mJ/cm² UVB dose (70). In addition, an increase of quantum dots skin penetration due to this time-dependent skin barrier alteration was shown (32). Photo-irradiation of CTP chemical constituents may also play a role in skin barrier disruption with the PAH-SSL protocol. Substituted PAH contained in this mixture (46, 47), such as 1-nitropyrene, might undergo light-induced activation and produce ROS or free radicals attacking skin structures (25, 39, 71). However, PAH uptake is not influenced by SSL regardless of the protocol. These results suggest that UVR do not disrupt PAH skin reservoir unlike a recent study that measured an upward trend of PAH permeation after

simultaneous exposure to mixtures of PAH standards or bitumen fume extract and irradiation to 60 mJ/cm² (90.5% UVA and 9.5% UVB). However, those results were obtained with a different mixture (bitumen fume extract), PAH permeation rates were low and results were dispersed (42).

PAH metabolism was clearly inhibited by SSL. Indeed, parent PAH accumulated in the skin with the SSL-PAH protocol, whereas metabolites levels dropped with a greater effect after application of B[a]P-10 and CTP-S-10. Such modulations were less clear with CTP-I-10 because of lower skin penetration and metabolism. Recently, an inhibition of B[a]P-induced CYP450 expression by SSL (6.4 J/cm², 95% UVA and 5% UVB) was shown whether human skin explants were irradiated before or after B[a]P application (38). However, UVR are known inducers of CYP450 expression. A steep induction of CYP1A1 and CYP1B1 expression by UVB was demonstrated in human skin, primary keratinocytes and HaCaT cell line (35, 36). Furthermore, the combined treatment of mouse skin with 400 nmol of B[a]P and 5 J/cm² of UVA resulted in a raise of B[a]P genotoxicity with a significantly higher number of BPDE adducts in keratinocytes compared to the application of B[a]P alone (37). To date, underlying mechanisms of CYP450 induction or inhibition by UVR remains poorly characterized. Skin irradiation might directly affect CYP450 activity since UVR trigger protein aggregations and photo-excitation of NADPH, a required cofactor for CYP450 activity, both leading to possible CYP450 degradation and inactivation (28, 29, 72). Inhibition of PAH biotransformation might also result from the cytotoxicity of UVR levels commonly used in studies (31-33, 73). Indeed, UVR dose seems to be crucial since Gélis *et al.* reported a 60% reduction of skin explants viability after irradiations to 210 mJ/cm² of UVB (30). Although PAH bioactivation appeared to be inhibited, PAH might exhibit genotoxicity through other mechanisms such as phototoxicity. Upon photoirradiation, PAH and metabolites, including DNA adducts, undergo a series of chemical reaction that leads to the formation of DNA adducts, the transformation of endogenous molecules in free radicals attacking cellular constituents or ROS generation (39-41, 74). Further studies will be required to investigate the effect of low doses of solar light on PAH bioactivation or phototoxicity.

Conclusion

Our study provides detailed information on cutaneous absorption and bioactivation of PAH under realistic scenarios close to human exposure. Further to skin contact with products containing PAH, their absorption and bioactivation are inversely proportional to the mixture complexity as well as the exposure dose, driving to unmetabolized PAH accumulation in the skin. B[a]P and PAH bioactivation is not proportional to the amount of each congener because of enzymatic saturation which might delay PAH bioactivation. Thus, genotoxicity studies based only on pure B[a]P or other congener application are not sufficient for assessing health risk because toxicological interactions are much more complex than a simple additive effect. While PAH penetration differed between PC and CTP, PAH biotransformation was similar, however, other mixtures might affect differently PAH skin metabolism. Contrary to metabolites, the dermal uptake of parent PAH only contributes to body burden in a minor way, especially for particulate PAH, indicating that metabolites are more relevant biomarkers for assessing human exposure after skin contamination. The postponed cutaneous metabolism of particulate PAH delays urinary metabolites excretion in all likelihood, which compels to determine the most adequate sampling time. Ultraviolet exposure enhances B[a]P and particulate PAH penetration when applying coal tar pitch, while PAH uptake remains constant, proof of an unaltered skin reservoir. Furthermore, UVR disrupts PAH bioactivation resulting in an accumulation of parent PAH in the skin. However, PAH genotoxicity may provide from phototoxic processes. It is fundamental to consider those processes in a biomonitoring program since biomarkers might be affected both qualitatively and quantitatively. Further studies are required to determine the long-term fate of this increased PAH skin reservoir but adapted protecting means, skin decontamination procedures,

information of the workers and proper biomonitoring are needed to prevent PAH skin accumulation and avoid toxic effects.

Material and Methods

Chemicals and Reagents

All aqueous solutions were prepared with purified water produced with Milli-Q treatment system (Merck Millipore, Germany). Ethyl acetate (AE) RPE for analysis ACS (99.9%), ammonium acetate, cyclohexane (cyclo) RS SPECTROSOL for optical spectroscopy (99.9%), acetone RPE ACS ISO for analysis (99.8%), dichloromethane RS for HPLC Isocratic grade stabilized with ethanol (99.9%) were purchased from Carlo Erba Reagents (France). Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12), Phosphate Buffer Saline (PBS) and Gibco™ Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) (5.000 U/mL) were obtained from ThermofisherScientific (USA). Acetate buffer AVS titrinorm (pH = 4.66) solution, formic acid (HCOOH) Anala® Normapur solution (99-100%), potassium hydroxide (KOH) Prolabo® Normapur, acetonitrile (ACN) HiperSolv Chromanorm (≥99.9%) and Tetrahydrofuran (THF) HiPerSolv Chromanorm® for HPLC were supplied by VWR chemicals (USA). BSA and pyridine solution (99.8%) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). β-Glucuronidase/arylsulfatase solution and Liberase™ TH Research Grade powder came from Roche Diagnostics GmbH (Germany). Helium (99.9%) and Argon (99.9%) were supplied by Air Liquide (France). Tri-methylsilyl 2,2,2-trifluoro-N-(trimethylsilyl)acetimidate + chloro-trimethylsilane (BSTFA+TMCS) (99:1) was obtained from Supelco (USA). Stock solution of FluA, Pyr, B[a]A, Chr, B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[g,h,i]P, B[j]F and I[1,2,3-c,d]P supplied by LGC Standards were prepared in dichloromethane (DCM). For quantification purpose, a mixture of 16 EPA Priority PAH in toluene 100 µg/ml (including FluA, Pyr, B[a]A, Chr, B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[a]P, dB[a,h]A, B[g,h,i]P, B[j]F, I[1,2,3-c,d]P) and ¹³C₆-trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene(¹³C₆-B[a]P-tetrol) (99%) at 100 µg/mL in MeOH were obtained from LGC Standards (France). Additionally, B[j]F and B[e]P at 10 ng/µl in acetonitrile were obtained from Dr Ehrenstorfer GmbH (Germany). B[a]P-tetrol, (99.9%), 3-OHChr (99%), 6-OHChr (99%), 3-OHB[a]A (97%), B[a]A-8,9-diol (99%), 3-hydroxybenzo[e]pyrene (3-OHB[e]P) (91%), B[e]P-4,5-diol (99%), 8-hydroxybenzo[k]fluoranthene (8-OHB[k]F) (98%), 9-hydroxybenzo[k]fluoranthene (9-OHB[k]F) (99%), B[k]F-8,9-diol (97%) and 10-hydroxybenzo[b]fluoranthene (10-OHB[b]F) (100%) were purchased from National Cancer Institute Chemical Carcinogen Reference Standards Repository (MRIGlobal, USA) and stored in THF. ¹³C₆-1-hydroxypyrene (¹³C₆-1-OHP) (99%) and ¹³C₆-6-hydroxychrysene (¹³C₆-6-OHChr) (mix of ring labelling, 98%) supplied by Cambridge Isotope Laboratories Inc (USA).

Preparation of PAH mixtures

Mixtures were extracted from industrial raw materials (CTP and PC) and adjusted to required concentrations of B[a]P. After reducing CTP to powder, an aliquot (10,051 g) was dissolved in 100 mL of DCM and sonicated for 60 minutes (Bransonic® ultrasonic cleaner 5510E-MT, Branson, USA). Then, 2 mL were evaporated to dryness using Labconco laboratory concentrator (USA) coupled with a Vacuubrand CVC 3000 pump (Germany). Dry residue was dissolved and diluted in acetone to 54.7 and 547 µg/mL of B[a]P, corresponding to 1 (CTP-I-1) and 10 nmol (CTP-I-10) of B[a]P for 5µL of acetone. After reducing PC to powder, an aliquot (1143.41 mg) was dissolved in 10 mL of DCM, sonicated during 60 minutes and filtrated (Filters Whatman QMA 37 mm, GE Healthcare Life science). After evaporation to dryness, residue was solubilized in acetone to 55.07 µg/mL of B[a]P corresponding to 1 nmol of B[a]P for 5µL of acetone (PC-I-1). After PAH analysis contained in CTP-I-10, a synthetic PAH mixture (CTP-S-10) was identically

reconstituted using PAH stock solutions. DCM was evaporated; residues were dissolved in acetone and then diluted to required levels of B[a]P.

Preparation and short-term culture of human skin

Skin was collected from healthy patients undergoing breast reduction surgery (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble, France). Skin was obtained under informed consent and anonymous donation, in accordance with relevant guidelines and regulations (article L1245-2 of the French Public Health Code on the use of surgical wastes for research purposes). Collection, storage and use of human skin samples were declared to the French authorities and validated in the CODECOH DC-2008-444 document. No personal information regarding the patient was retained. Within one hour after surgery, skin was transported to the laboratory at ambient temperature in 50 mL falcon tubes (Becton Dickinson Labware, USA). Skin samples were disinfected with PBS supplemented with 0.4% betadine for 15 minutes and rinsed twice with PBS containing 10% Pen/Strep. Skin was dermatomed to a thickness of 250 μm (SOBER, Humeca, Netherlands) and punched into 12 mm diameter skin discs with sterile punches (Help Medical, France). Skin explants were checked for damages as skin alterations could affect diffusion and metabolism.

Skin explants were placed dermal side down into polystyrene ThinCert™ insert (14 mm inner diameter, 1 μm pore size filter, Greiner Bio-One, Austria) and installed in 12 well non-treated culture plates (Greiner Bio-One, Austria). Five μL of PAH solutions were topically applied, acetone evaporated rapidly and 500 μL of medium were added into the well, under the insert. Culture medium was composed of DMEM-F12 supplemented with 1% Pen/Strep and 4% BSA. Afterwards, skin biopsies were incubated until end points at 37°C in 5% CO₂ air. Medium was removed and renewed with fresh culture medium every 24 hours when exposures exceeded 24 hours. Removed media were stored at -20°C until analysis. At end point, plates were frozen at -80°C in order to stop any metabolic activity and stored at -20°C until analysis. Experiments were performed in duplicates or triplicates depending on the skin sample size obtained after plastic surgery.

Solar irradiation

SSL exposure of skin explants was carried out using solar simulator (Solar LIGHT® Model LS-1000-4S-009 Solar Simulator, Glenside, Pennsylvania, USA). This device emitted wavelengths from 290 to 400 nm reproducing closely the UV spectrum of natural sunlight (95% of UVA and 5% of UVB). Irradiation intensity was measured using the Erythema Meter and displayed in real-time intensity (minimal erythema dose (MED)/hr). For all SSL treatments, skin explants were irradiated during 15-20 minutes, corresponding to 6.4 J/cm² (2 MED). SSL treatments were realized at room temperature replacing medium with PBS.

Skin exposure

Preliminary kinetic experiments were conducted with one donor skin exposed to B[a]P-10 and CTP-S-10 for 24, 48 and 72 hours, and one other donor skin exposed to B[a]P-10 and CTP-I-10 for 48, 72 and 96 hours. The effect of mixture composition was studied applying B[a]P-10 or in mixtures (CTP-S-10 or CTP-I-10) on six donor skins for 48 hours. The effects of dose and mixture composition were studied at the lowest dose applying CTP-I-10, CTP-I-1, PC-I-1 and B[a]P-1 on three donor skins for 48 hours. The assessment of combined exposures to PAH (B[a]P-10, CTP-S-10, CTP-I-10) and SSL were performed on four donor skins according to three different protocols: PAH exposure for 48 hours without SSL exposure (\emptyset SSL); PAH exposure for 48 hours with SSL irradiation at 24 hours (PAH-SSL); SSL irradiation 1 hour before PAH exposure for 48 hours (SSL-PAH).

During PAH-SSL protocol, culture media was removed before SSL irradiations, stored at -20°C until analysis, and the plates were rinsed with PBS. Afterwards, PBS was replaced with culture medium and samples were incubated until end-points.

Analytical procedures

Pre-analytical procedures

Stored plates were thawed out at ambient temperature. Skin explants were removed from inserts and placed on parafilm (Parafilm, USA, Neenah). Skin surface was gently washed twice with cotton swab embedded in 1 mL of ACN to remove unabsorbed PAH. Cotton swab heads were cut, plunged in the 1 mL of ACN and sonicated for 30 minutes. Thirty µL were injected into high performance liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC-FLD) for PAH analysis.

In order to extract parent PAH from explants, thawed skin samples were minced and digested with 1 U/mL Liberase™ TH enzyme at 37°C for 2 hours in 1 mL acetate buffer (pH = 7.4). After adding 1 mL of acetate buffer (pH = 4.66), skin was next grinded with an ultra turrax (IKA werke®, Germany) and saponified in 1 M of potassium hydroxide at 60°C for 1 hour. After cooling at ambient temperature, parent PAH were extracted twice by liquid-liquid extraction (LLE). Briefly, after adding 2 mL of water saturated AE, the mixture was shaken for 30 minutes and then centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C. The organic phases were recovered and pooled, then evaporated to dryness. Residues were redissolved in 1 mL of ACN, and 30 µL were injected into HPLC-FLD for PAH quantification.

Medium was removed from the well and pooled with the related previous media stored at -20°C if exposure duration exceeded 24 hours. For parent PAH and B[a]P-tetrol quantification in the medium, 200 µL of thawed culture medium were buffered with 100 µL of acetate buffer (pH 4.66) and conjugated metabolites were hydrolysed by incubation at 37°C for 2 hours with 10 µL of β-glucuronidase arylsulfatase. Then, 50 µL of internal standard ¹³C₆-B[a]P-tetrol (500 ng/mL) were added. Samples were extracted twice with 1 mL of water saturated AE, shaken during 30 minutes and centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. Organic phases were pooled and homogenized. One mL was evaporated to dryness before dissolution in 1 mL of ACN, and 30 µL were injected in HPLC-FLD for parent PAH quantification. The other milliliter was evaporated to dryness. Residues were solubilized with 60 µL of ACN. Twenty µL of pyridine and 20 µL of BSTFA were added and derivatization was realized with 15 minutes of sonication. For B[a]P-tetrol analysis, 1 µL was injected into a gas chromatography coupled with a tandem mass spectrometer with electronic impact source (GC-EI-MS/MS). To quantify the metabolites of other particulate PAH, conjugated metabolites were first hydrolysed by incubation of 200 µL of culture medium with 100 µL of acetate buffer (pH 4.66) and 10 µL of β-glucuronidase arylsulfatase for two hours at 37°C. Sixty microliter of internal standards ¹³C₆-1-OHP and ¹³C₆-6-OHChr (0.1 µg/mL) were added to hydrolysed medium. Samples were extracted twice with 1 mL of AE:cyclo 50:50, shaken for 30 minutes and centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. Organic phases were pooled and evaporated to dryness. Residues were solubilized in 60 µL of ACN, 20 µL of pyridine and 20 µL of BSTFA+TMCS then derivatized with 20 minutes of sonication. 1 µL was injected into GC-EI-MS/MS.

The efficiency of skin and medium extraction protocols was assessed by recoveries calculation using the slope comparison method. Briefly, recovery was obtained by comparing the slope of calibration curve obtained with standard solutions to the slope of calibration curve realized with extraction of spiked samples. For skin, parent PAH recoveries were: FluA, 73%; Pyr, 74%; Chr, 68%; B[a]A, 68%; B[j]F, 70%, B[b]F, 67%; B[k]F, 65%; B[e]P, 69%; B[a]P, 63%;

B[g,h,i]P, 65%; I[1,2,3-c,d]P, 64%; DB[a,h]A, 59%. For medium, parent PAH recoveries were: FluA, 79%; Pyr, 82%; Chr, 97%; B[a]A, 95%; B[j]F, 101%, B[b]F, 96%; B[k]F, 97%; B[e]P, 98%; B[a]P, 97%; B[g,h,i]P, 97%; I[1,2,3-c,d]P, 98%; DB[a,h]A, 97%. For medium, the extraction yields of PAH metabolites were respectfully: 3-OHChr, 102%; 6-OHChr, 101%; 3-OHB[a]A, 103%; B[a]A-8,9-diol, 82%; 10-OHB[b]F, 100%; 8-OHB[k]F, 116%; 9-OHB[k]F, 145%; B[k]F-8,9-diol, 117%; 3-OHB[e]P, 110%; B[e]P-4,5-diol, 92%; B[a]P-tetrol, 111%.

Parent PAH quantification

The chromatographic system consisted in a HPLC Waters® (USA) Model 2695 separation module associated with a quaternary pump, a thermostated compartment for chromatographic column, a thermostated auto-sampler, an automatic injector and an integrated degasser. Chromatographic column was a Waters® PAH-C18 column (3.0 x 250 mm, 3µm) and was maintained at a temperature of 30°C, while sample temperature was kept at 12°C. Mobile phase consisted of (A) purified water supplemented with 0.05% formic acid and (B) ACN. Chromatographic separation was performed at a rate of 0.5 mL/min with gradients and isocratic elutions: 0 min, 10% B; 1 min, 10% B; 3 min, 20% B; 7 min, 20% B; 21 min, 90% B; 24 min, 90% B; 26 min, 100% B; 33 min, 100% B; 34-45 min, 10% B. Excitation and emission wavelength were fixed at 285 and 450 nm for FluA, 333 and 390 nm for Pyr, 265 and 380 nm for B[a]A and Chr, 295 and 425 nm for B[e]P and B[b]F, 296 and 405 nm for B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A and B[g,h,i]P, 302 and 500 nm for B[j]F and I[1,2,3-c,d]P. QL was 0.05 ng/mL for Pyr, B[k]F and B[a]P while it was 0.1 ng/mL for other parent PAH.

Quantification of PAH metabolites

The chromatographic system consisted in an Agilent (USA) gas chromatography 7890B equipped with a multimode injector, a PAL RSI 85 system (CTC analytic AG, Switzerland), using a chromatographic column DB-5MS (30m X 250 µm X 0.25 µm) from Agilent coupled with an Agilent tandem mass spectrometer 7000C with electronic impact source.

For B[a]P-tetrol analysis, the inlet temperature was set at 300°C and 1 µL was injected in splitless mode. Liner was Agilent 5062-3587. After setting initial oven temperature at 70°C for 5 min, temperature increased at a rate of 20°C/min until 300°C and then temperature was maintained at 300°C for 15 min. Helium was used as carrier gas with a flow of 1 mL/min. Mass spectrometry was performed in electronic impact with source at 200°C and acquisition mode was multimode reaction monitoring. Detailed parameters are presented in Table S1. Collision gas (0.9 mL/min) and quench gas (2.25 mL/min) were argon and helium, respectively. QL was 1.5 ng/mL for B[a]P-tetrol.

For the analysis of other particulate PAH metabolites, the inlet temperature was at 350°C. 1 µL was injected in pulse splitless mode with a pressure of 30 psi for 1.5 min. Liner was Restek low pressure drop liner w/wool (USA). After setting oven temperature at 70°C for 5 min, temperature increased at a rate of 15°C/min until 300°C, and after, temperature was maintained at 300°C for 15 min. Helium was used as carrier gas with a flow of 1 mL/min. As for B[a]P-tetrol analysis, mass spectrometry was performed in EI with MRM acquisition mode (detailed parameters are presented in Additional File 1: Table S5). For internal calibration, B[e]P-4,5-diol was calibrated using ¹³C₆-1-OHP and all the other metabolites were calibrated with ¹³C₆-6-OHChr. QL were 0.2 and 0.3 ng/mL for 3-OHChr and 6-OHChr, respectively, 0.6 ng/mL for 3-OHB[a]A and B[e]P-4,5-diol, 1.5 and 5 ng/mL for B[a]A-8,9-diol and 8-OHB[k]F, and finally 10 ng/mL for B[k]F-8,9-diol, 10-OHB[b]F, 9-OHB[k]F and 3-OHB[e]P.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS Statistics 22.0 software (SPSS, France). Concentrations lower than QL were replaced by half of QL. Data were then converted in percentage of the applied dose. For graphic representation issues, PAH were regrouped by similar behaviors. The mean of FluA and Pyr ($\Sigma F+P$) and the mean of particulate PAH other than B[a]P ($\Sigma HAPP$) were calculated. As arithmetic mean and median were close, means \pm standard deviations were presented. Statistical analysis were carried out when experiments were conducted on a minimum of three skin donors, except if the proportion of values below the QL exceeded 10% of total samples. Non-parametric tests were performed to analyze the influence of experimental conditions (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests).

List of abbreviations

$\Sigma F+P$: Pyr and FluA. $\Sigma HAPP$: mean of particulate PAH except B[a]P. \emptyset SSL protocol: PAH exposure for 48 hours without SSL exposure. 3-OHB[a]A: 3-hydroxyBenzo[a]anthracene. 3-OHB[e]P: 3-hydroxyBenzo[e]pyrene. 3-OHChr: 3-hydroxyChrysene. 6-OHChr: 6-hydroxyChrysene. 8-OHB[k]F: 8-hydroxyBenzo[k]fluoranthene. 9-OHB[k]F: 9-hydroxyBenzo[k]fluoranthene. 10-OHB[b]F: 10-hydroxyBenzo[b]fluoranthene. $^{13}C_6$ -1-OHP: $^{13}C_6$ -1-hydroxyPyrene. $^{13}C_6$ -6-OHChr: $^{13}C_6$ -6-hydroxyChrysene. $^{13}C_6$ -B[a]P-tetrol: $^{13}C_6$ -trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. ACN: acetonitrile. AE: Ethyl acetate. AhR: aryl hydrocarbon receptor. B[a]A: Benzo[a]anthracene. B[a]A-8,9-diol: Benzo[a]anthracene-8,9-*trans*-dihydrodiol. B[a]P: Benzo[a]pyrene. B[a]P-1: 1 nmol of B[a]P. B[a]P-10: 10 nmol of B[a]P. B[a]P-tetrol: 7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. B[b]F: Benzo[b]fluoranthene. B[e]P: Benzo[e]pyrene. B[e]P-4,5-diol: Benzo[e]pyrene-4,5-*trans*-dihydrodiol. B[g,h,i]P: Benzo[g,h,i]perylene. B[j]F: Benzo[j]fluoranthene. B[k]F: Benzo[k]fluoranthene. B[k]F-8,9-diol: Benzo[k]fluoranthene-8,9-*trans*-dihydrodiol. BPDE: Benzo[a]pyrene-diol-epoxide. BSA: Bovine serum albumin. BSTFA+TMCS: Tri-methylsilyl 2,2,2-trifluoro-N-(trimethylsilyl)acetimidate + chloro-trimethylsilane. Chr: Chrysene. CTP: coal tar pitch. CTP-S-10: synthetic coal tar pitch adjusted to 10 nmol of B[a]P. CTP-I-1: coal tar pitch extract adjusted to 1 nmol of B[a]P. CTP-I-10: coal tar pitch extract adjusted to 10 nmol of B[a]P. cyclo: cyclohexane. CYP450: cytochrome P450. DB[a,h]A: Dibenzo[a,h]anthracene. DCM: dichloromethane. DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12. FluA: Fluoranthene. GC-EI-MS/MS: gas chromatography coupled with a tandem mass spectrometer with electronic impact source. HPLC-FLD: high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. IARC: International Agency of Research against Cancer. I[1,2,3-c,d]P: Indeno[1,2,3-c,d]pyrene. KOH: potassium hydroxide. LLE: liquid-liquid extraction. MED: minimal erythema dose. PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbons. PAH-SSL: PAH exposure for 48 hours with SSL irradiation at 24 hours. PBS: Phosphate Buffer Saline. PC: petroleum coke. PC-I-1: petroleum coke extract adjusted to 1 nmol of B[a]P. Pen/Strep: Penicillin-Streptomycin. Pyr: Pyrene. QL: quantification limit. ROS: reactive oxygen species. SSL: simulated sunlight. SSL-PAH: SSL irradiation 1 hour before PAH exposure for 48 hours. THF: Tetrahydrofuran. UVR: ultraviolet radiation. XME: xenobiotic metabolizing enzymes.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Experiments were conducted in accordance with the article L1245-2 of the French Public Health Code on the use of surgical wastes for research purposes. Collection, storage, and use of human skin samples were made anonymously, with informed consent and declared to the French authorities, and validated in the CODECOH DC-2008-444 document.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The relevant datasets supporting the conclusions of this article are included within the article. However, all datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was funded by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) (grant number ENV201412) and the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) (grant number EST-2014/1/176). These funders had no role in study design, in the collection, analysis or interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication.

Authors' contributions

EB designed the experiments, conducted the experiments, carried out the statistical analysis, drafted and revised the manuscript. AR, DB and MM had a major implication in performing the experiments. RP and M-TL provided pertinent revisions to the manuscript. FB provided major help with statistical analysis. AvK, TD and AM designed the experiments, while TD and AM also managed the whole project and brought some major revisions to the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgement

The authors wish to thank the team of the "Service de Chirurgie Plastique et Maxillo-faciale CHU Grenoble Alpes" for skin sample collection.

Additional File

Additional File 1: Table S1. PAH molecular weight (MW) and PAH profile of 5 µL of CTP-I-1 and PC-I-1 (nmol). **Table S2.** PAH (except B[a]P) distribution in human skin exposed to CTP-S-10 or CTP-I-10 for 48 hours. **Table S3.** PAH (except B[a]P) distribution in human skin exposed to CTP-I-1, CTP-I-10, PC-I-1 for 48 hours. **Table S4.** SSL influence on PAH (CTP-S-10 or CTP-I-10) distribution in human skin exposed for 48 hours. **Table S5.** GC-EI-MS/MS method parameters for PAH metabolites analysis in culture medium.

References

1. IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2010;92:1-853.
2. Baek SO, Goldstone ME, Kirk PWW, Lester JN, Perry R. Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere. *Chemosphere*. 1991;22(5):503-20.
3. Fustinoni S, Campo L, Cirila PE, Martinotti I, Buratti M, Longhi O, et al. Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in asphalt workers. *Occupational and environmental medicine*. 2010;67(7):456-63.
4. VanRooij JG, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *British Journal of Industrial Medicine*. 1993;50(7):623-32.

5. Förster K, Preuss R, Roßbach B, Brüning T, Angerer J, Simon P. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occupational and environmental medicine*. 2008;65(4):224-9.
6. Pukkala E, Martinsen JI, Weiderpass E, Kjaerheim K, Lynge E, Tryggvadottir L, et al. Cancer incidence among firefighters: 45 years of follow-up in five Nordic countries. *Occupational and environmental medicine*. 2014;71(6):398-404.
7. Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes & Control*. 1997;8(3):444-72.
8. VanRooij JG, Van Lieshout EM, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Effect of the reduction of skin contamination on the internal dose of creosote workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1993(3):200-7.
9. Nesnow S, Mass MJ, Ross JA, Galati AJ, Lambert GR, Gennings C, et al. Lung tumorigenic interactions in strain A/J mice of five environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives*. 1998;106(suppl 6):1337-46.
10. Chu I, Dick D, Bronaugh R, Tryphonas L. Skin reservoir formation and bioavailability of dermally administered chemicals in hairless guinea pigs. *Food and Chemical Toxicology*. 1996;34(3):267-76.
11. Jacques C, Perdu E, Duplan H, Jamin EL, Canlet C, Debrauwer L, et al. Disposition and biotransformation of ¹⁴C-Benzo(a)pyrene in a pig ear skin model: ex vivo and in vitro approaches. *Toxicology letters*. 2010;199(1):22-33.
12. Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA. Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicology and applied pharmacology*. 1992;115(2):216-23.
13. Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2015;145(1):5-15.
14. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;206(1):73-93.
15. Brinkmann J, Stolpmann K, Trappe S, Otter T, Genkinger D, Bock U, et al. Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2013;131(2):351-9.
16. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*. 2014;88(12):2135-90.
17. Oesch F, Fabian E, Landsiedel R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*. 2018.
18. Timo Partanen PhD M, Paolo Boffetta Md MPH, Partanen T, Boffetta P. Cancer risk in asphalt workers and roofers: Review and meta-analysis of epidemiologic studies 1994. 721-40 p.
19. Dickel H, Blome O, Dickel B, Bruckner T, Stockfleth E, Soemantri SP. Occupational syncarcinogenesis in the skin – combined effects of two carcinogens from the German occupational disease list. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2016;14(12):1284-96.
20. Stenehjem JS, Robsahm TE, Bråtveit M, Samuelsen SO, Kirkeleit J, Grimsrud TK. Aromatic hydrocarbons and risk of skin cancer by anatomical site in 25 000 male offshore petroleum workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 2017;60(8):679-88.
21. Burke KE, Wei H. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicology and industrial health*. 2009;25(4-5):219-24.
22. IARC. Radiation. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2012;100(Pt D):7-303.
23. Diffey BL. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*. 2002;28(1):4-13.
24. IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Solar and ultraviolet radiation. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 1992;55:1-316.
25. Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature Chemical Biology*. 2014;10:542.
26. Svoboda M, Bílková Z, Muthný T. Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? *Journal of dermatological science*. 2016;81(3):147-52.
27. Biniek K, Levi K, Dauskardt RH. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(42):17111-6.
28. Pattison DI, Davies MJ. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*. 2006(96):131-57.
29. Rittie L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1):a015370.
30. Gelis C, Mavon A, Delverdier M, Paillous N, Vicendo P. Modifications of in vitro skin penetration under solar irradiation: evaluation on flow-through diffusion cells. *Photochem Photobiol*. 2002;75(6):598-604.
31. Hung CF, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Yang SY, Fang JY. Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. *Journal of dermatological science*. 2012;68(3):135-48.

32. Mortensen LJ, Jatana S, Gelein R, De Benedetto A, De Mesy Bentley KL, Beck LA, et al. Quantification of quantum dot murine skin penetration with UVR barrier impairment. *Nanotoxicology*. 2013;7(8):1386-98.
33. McAuliffe DJ, Blank IH. Effects of UVA (320-400 nm) on the barrier characteristics of the skin. *J Invest Dermatol*. 1991;96(5):758-62.
34. Ma Q. Influence of light on aryl hydrocarbon receptor signaling and consequences in drug metabolism, physiology and disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7(10):1267-93.
35. Katiyar SK, Mukhtar H, Matsui MS. Ultraviolet-B Exposure of Human Skin Induces Cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000;114(2):328-33.
36. Villard PH, Sampol E, Elkaim JL, Puyou F, Casanova D, Séré E, et al. Increase of CYP1B1 Transcription in Human Keratinocytes and HaCaT Cells after UV-B Exposure. *Toxicology and applied pharmacology*. 2002;178(3):137-43.
37. Saladi R, Austin L, Gao D, Lu Y, Phelps R, Lebowitz M, et al. The Combination of Benzo[a]pyrene and Ultraviolet A Causes an In Vivo Time-related Accumulation of DNA Damage in Mouse Skin. *Photochemistry and Photobiology*. 2003;77(4):413-9.
38. von Koschimbahr A, Youssef A, Béal D, Calissi C, Bourgart E, Marques M, et al. Solar simulated light exposure alters metabolization and genotoxicity induced by benzo[a]pyrene in human skin. *Scientific Reports*. 2018;8(1):14692.
39. Yu H. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2002;20(2):149-83.
40. Fu PP, Xia Q, Sun X, Yu H. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2012;30(1):1-41.
41. Xia Q, Chiang HM, Yin JJ, Chen S, Cai L, Yu H, et al. UVA photoirradiation of benzo[a]pyrene metabolites: induction of cytotoxicity, reactive oxygen species, and lipid peroxidation. *Toxicology and industrial health*. 2015;31(10):898-910.
42. Hopf NB, Spring P, Hirt-Burri N, Jimenez S, Sutter B, Vernez D, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) skin permeation rates change with simultaneous exposures to solar ultraviolet radiation (UV-S). *Toxicology letters*. 2018;287:122-30.
43. Bourgart E, Barbeau D, Marques M, von Koschimbahr A, Béal D, Persoons R, et al. A realistic human skin model to study benzo[a]pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure. *Archives of Toxicology*. 2018.
44. Dufresne A, Lesage J, Perrault G. Evaluation of Occupational Exposure to Mixed Dusts and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Silicon Carbide Plants. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 1987;48(2):160-6.
45. IARC. Bitumens and bitumen emissions, and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons: World Health Organization; 2013.
46. Li Z, Wu Y, Zhao Y, Wang L, Zhu H, Qin L, et al. Analysis of coal tar pitch and smoke extract components and their cytotoxicity on human bronchial epithelial cells. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;186(2):1277-82.
47. Kershaw JR. The Chemical Composition of a Coal-Tar Pitch. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 1993;3(3):185-97.
48. Storm JE, Collier SW, Stewart RF, Bronaugh RL. Metabolism of xenobiotics during percutaneous penetration: role of absorption rate and cutaneous enzyme activity. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*. 1990;15(1):132-41.
49. McClean M, Rinehart R, Herrick R. Dermal Exposure and Urinary 1-Hydroxypyrene Among Asphalt Roofing Workers. *Epidemiology*. 2006;17(6):S134-S5.
50. Gundel J, Angerer J. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenz[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 2000;738(1):47-55.
51. Xu X, Zhang J, Zhang L, Liu W, Weisel CP. Selective detection of monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2004;18(19):2299-308.
52. Grova N, Fayès F, Hardy EM, Appenzeller BMR. New insights into urine-based assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposure from a rat model: Identification of relevant metabolites and influence of elimination kinetics. *Environmental Pollution*. 2017;228:484-95.
53. MacLeod MC, Mansfield BK, Selkirk JK. Time course of metabolism of benzo[e]pyrene by hamster embryo cells and the effect of chemical modifiers. *Chemico-biological interactions*. 1982;40(3):275-85.
54. Spink DC, Wu SJ, Spink BC, Hussain MM, Vakharia DD, Pentecost BT, et al. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008;226(3):213-24.
55. LaVoie EJ, Hecht SS, Amin S, Bedenko V, Hoffmann D. Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites of benzo(j)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene. *Cancer research*. 1980;40(12):4528-32.

56. Cooper CS, Ribeiro O, Hewer A, Walsh C, Pal K, Grover PL, et al. The involvement of a 'bay-region' and a non-'bay-region' diol-epoxide in the metabolic activation of benz(a)anthracene in mouse skin and in hamster embryo cells. *Carcinogenesis*. 1980;1(3):233-43.
57. Hecht SS, Carmella SG, Villalta PW, Hochalter JB. Analysis of Phenanthrene and Benzo[a]pyrene Tetraol Enantiomers in Human Urine: Relevance to the Bay Region Diol Epoxide Hypothesis of Benzo[a]pyrene Carcinogenesis and to Biomarker Studies. *Chemical research in toxicology*. 2010;23(5):900-8.
58. Dankovic DA, Wright CW, Zangar RC, Springer DL. Complex mixture effects on the dermal absorption of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons from mouse skin. *Journal of applied toxicology : JAT*. 1989;9(4):239-44.
59. Sartorelli P, Montomoli L, Sisinni AG, Bussani R, Cavallo D, Foa V. Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from coal dust. *Toxicology and industrial health*. 2001;17(1):17-21.
60. VanRooij JG, Vinke E, De Lange J, Bruijnzeel PL, Bodelier-Bade MM, Noordhoek J, et al. Dermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons in the blood-perfused pig ear. *Journal of applied toxicology : JAT*. 1995;15(3):193-200.
61. Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;363(1):1-25.
62. Chipman JK, Hirom PC, Frost GS, Millburn P. The biliary excretion and enterohepatic circulation of benzo(a)pyrene and its metabolites in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 1981;30(9):937-44.
63. Sen B, Mahadevan B, DeMarini DM. Transcriptional responses to complex mixtures—A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2007;636(1):144-77.
64. Líbalová H, Krčková S, Uhlířová K, Milcová A, Schmuczerová J, Ciganek M, et al. Genotoxicity but not the AhR-mediated activity of PAHs is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. *Toxicology letters*. 2014;225(3):350-7.
65. Líbalová H, Uhlířová K, Kléma J, Machala M, Šrám RJ, Ciganek M, et al. Global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts induced by organic extracts from respirable air particles. *Particle and Fibre Toxicology*. 2012;9(1):1.
66. Shimada T, Murayama N, Tanaka K, Takenaka S, Imai Y, Hopkins NE, et al. Interaction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Human Cytochrome P450 1B1 in Inhibiting Catalytic Activity. *Chemical research in toxicology*. 2008;21(12):2313-23.
67. Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang Q-Y, et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon/Metal Mixtures: Effect on PAH Induction of CYP1A1 in Human HepG2 Cells. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001;29(7):999-1006.
68. Nisbet ICT, LaGoy PK. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1992;16(3):290-300.
69. Jarvis IWH, Dreij K, Mattsson Å, Jernström B, Stenius U. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology*. 2014;321:27-39.
70. Jiang SJ, Chu AW, Lu ZF, Pan MH, Che DF, Zhou XJ. Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. *Exp Dermatol*. 2007;16(12):985-92.
71. Garcia-Berrios ZI, Arce R. Photodegradation mechanisms of 1-nitropyrene, an environmental pollutant: the effect of organic solvents, water, oxygen, phenols, and polycyclic aromatics on the destruction and product yields. *J Phys Chem A*. 2012;116(14):3652-64.
72. Feo F, Pirisi L, Pascale R, Daino L, Frassetto S, Zanetti S, et al. Modulatory mechanisms of chemical carcinogenesis: the role of the NADPH pool in the benzo(a)pyrene activation. *Toxicol Pathol*. 1984;12(3):261-8.
73. Soeur J, Belaïdi J-P, Chollet C, Denat L, Dimitrov A, Jones C, et al. Photo-pollution stress in skin: Traces of pollutants (PAH and particulate matter) impair redox homeostasis in keratinocytes exposed to UVA1. *Journal of dermatological science*. 2017;86(2):162-9.
74. Douki T, Ksoury Z, Marie C, Favier A, Ravanat J-L, Maitre A. Genotoxicity of Combined Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and UVA—A Mechanistic Study. *Photochemistry and Photobiology*. 2008;84(5):1133-40.

Figure legends

Figure 1. PAH distributions in human skin after exposure to B[a]P-10, CTP-S-10 or CTP-I-10 during 48 hours.

Results are expressed in % of applied dose (6 donor skins, mean \pm standard deviation, N = 16). No value was below QL. Σ F+P: mean of Pyr and FluA, Σ HAPP: mean of all particulate PAH except B[a]P. The statistical differences between mixtures are indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Figure 2. PAH skin biotransformation after exposure to B[a]P-10, CTP-S-10 or CTP-I-10 mixtures for 48 hours.

Data are expressed in % of applied dose (6 donor skins, mean \pm standard deviation, N = 16). For 3-OHChr, N = 13 after exposure to CTP-S-10 since this metabolite was not quantifiable in three samples. N = 11 and N = 14 for 6-OHChr following topical application of CTP-S-10 and CTP-I-10 mixtures, respectively, as this metabolite was not quantifiable in five and two samples. Low levels of 10-OHB[b]F were only detected in 4 medium samples after CTP-S-10 application, but remained undetectable in all other samples regardless of the mixture. The statistical differences were indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Figure 3. PAH distribution in human skin exposed to B[a]P-1, CTP-I-1, CTP-I-10 or PC-I-1 during 48 hours.

Results are expressed in % of applied dose (3 donor skins, mean \pm standard deviation, N = 7 for CTP-I-1 and PC-I-1, N = 8 for B[a]P-1 and CTP-I-10). Σ F+P: mean of Pyr and FluA, Σ HAPP: mean of all particulate PAH except B[a]P. The statistical differences are indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01 by comparison to CTP-I-1.

Figure 4. PAH skin biotransformation after topical application of B[a]P-1, CTP-I-1, CTP-I-10 or PC-I-1 during 48 hours.

Results are expressed in % of applied dose (3 donor skins, mean \pm standard deviation, N = 7 for CTP-I-1 and PC-I-1, N = 8 for B[a]P-1 and CTP-I-10). For 3-OHChr, N = 3 and N = 6 after exposure to CTP-I-1 and CTP-I-10, respectively, since this metabolite was not quantifiable in 4 and 2 samples. 6-OHChr was not quantifiable after PC-I-1 application, while 8-OHB[k]F and 9-OHB[k]F were below QL following PC-I-1 and CTP-I-10 application. 10-OHB[b]F was undetected in every sample. The statistical differences were indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Figure 5. Influence of SSL on PAH distribution between (A) skin surface, (B) skin and (C) medium.

Results are expressed in % of applied dose (4 donor skins, mean \pm standard deviation). Σ F+P: mean of Pyr and FluA, Σ HAPP: mean of all particulate PAH except B[a]P. \emptyset SSL: exposure to PAH for 48 hours without SSL. PAH-SSL: exposure to PAH for 48 hours with SSL treatment at 24 hours. SSL-PAH: SSL treatment 1 hour before topical application of PAH for 48 hours. N = 11 for \emptyset SSL and N = 12 for PAH-SSL and SSL-PAH. No value was below QL. The statistical differences between mixtures are indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Figure 6. PAH skin biotransformation under SSL after exposure to (A) B[a]P-10, (B) CTP-S-10 or (C) CTP-I-10.

Results are expressed in % of applied dose (4 donor skins, mean \pm standard deviation). \emptyset SSL: exposure to PAH for 48 hours without SSL. PAH-SSL: exposure to PAH for 48 hours with SSL treatment at 24 hours. SSL-PAH: SSL treatment 1 hour before topical application of PAH for 48 hours. N = 11 for B[a]P exposures (A). For CTP-S-10 exposures (B), N = 11 for \emptyset SSL except for 3-OHChr (N = 8), N = 12 for PAH-SSL and SSL-PAH. For CTP-I-10 exposures (C), N = 11 for \emptyset SSL, N = 12 for PAH-SSL and SSL-PAH. 10-OHB[b]F was only detected in one sample (data not shown). 9-OHB[k]F was constantly below QL following CTP-I-10 topical application, as well as 8-OHB[k]F, B[k]F-8,9-diol, 3-OHB[e]P, B[e]P-4,5-diol in the SSL-PAH after CTP-I-10 exposure. The statistical differences are indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Table 1. Kinetic of PAH skin penetration after exposure to B[a]P-10, CTP-S-10 and CTP-I-10.

Treatment	Time (h)	FluA	Pyr	Chr	B[a]A	B[j]F	B[b]F	B[k]F	B[e]P	B[a]P	B[g,h,i]P	I[1,2,3-c,d]P	DB[a,h]A
B[a]P-10	24									1.4 ± 0.3			
<i>Donor skin 1</i>	48									0.3 ± 0.1			
	72									0.1 ± 0.1			
CTP-S-10	24	5.0 ± 0.6	5.5 ± 0.6	23.5 ± 6.7	11.1 ± 3.6	12.8 ± 4.9	9.7 ± 2.3	18.8 ± 6.8	19.5 ± 5.7	16.1 ± 5.9	25.5 ± 7.2	21.7 ± 6.1	17.8 ± 4.5
	48	3.7 ± 0.4	4.2 ± 0.4	21.3 ± 5.6	6.2 ± 0.9	5.8 ± 1.5	5.9 ± 0.8	9.1 ± 2.8	13.0 ± 3.0	7.3 ± 2.1	19.2 ± 5.5	10.5 ± 2.5	9.4 ± 2.4
	72	1.0 ± 0.6	1.3 ± 0.8	13.7 ± 6.8	1.8 ± 1.3	1.4 ± 0.8	1.9 ± 1.0	3.3 ± 1.0	7.8 ± 4.2	2.3 ± 1.4	14.7 ± 5.9	6.0 ± 2.5	5.5 ± 2.2
B[a]P-10	48									2.7 ± 1.6			
	<i>Donor skin 2</i>	72								1.6 ± 1.1			
		96									2.1 ± 1.2		
CTP-I-10	48	27.2 ± 4.5	28.5 ± 4.3	39.2 ± 4.7	36.9 ± 5.1	53.4 ± 8.2	50.1 ± 4.6	47.5 ± 5.0	46.5 ± 4.8	48.8 ± 4.8	53.7 ± 3.9	77.7 ± 4.4	55.4 ± 4.0
	72	18.6 ± 2.0	19.9 ± 1.9	32.6 ± 2.4	30.2 ± 2.4	45.7 ± 3.8	43.1 ± 3.2	40.1 ± 3.0	39.1 ± 3.0	41.7 ± 3.6	48.8 ± 3.5	69.8 ± 5.5	50.4 ± 3.8
	96	15.2 ± 3.4	16.9 ± 3.7	32.9 ± 4.8	30.3 ± 4.5	45.4 ± 7.1	43.6 ± 5.4	40.6 ± 5.3	40.0 ± 5.1	42.4 ± 5.0	49.2 ± 4.5	69.0 ± 5.8	50.7 ± 5.0

Results are expressed in % of applied dose (mean ± standard deviation, N = 3). No value was below QL.

Table 2. Kinetic of PAH skin metabolism after exposure to B[a]P-10, CTP-S-10 and CTP-I-10.

Treatment	Time (h)	3-OHChr	6-OHChr	3-OHB[a]A	B[a]A-8,9-diol	10-OHB[b]F	8-OHB[k]F	9-OHB[k]F	B[k]F-8,9-diol	3-OHB[e]P	B[e]P-4,5-diol	B[a]P-tetrol
B[a]P-10 <i>Donor skin 1</i>	24											0.52 ± 0.33
	N (N<QL)											3 (0)
	48											3.39 ± 0.17
	N (N<QL)											3 (0)
	72											4.29 ± 0.57
N (N<QL)											3 (0)	
CTP-S-10	24	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.07	<QL	0.32 ± 0.06	0.51 ± 0.07	0.28 ± 0.19	0.27 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	N (N<QL)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (3)	3 (0)	3 (0)	3 (2)	3 (0)	3 (0)	3 (0)
	48	0.35 ± 0.21	NQ	0.20 ± 0.14	0.34 ± 0.13	<QL	1.55 ± 1.30	1.88 ± 1.21	0.66 ± 0.27	1.50 ± 1.35	0.10 ± 0.07	0.56 ± 0.22
	N (N<QL)	3 (0)	0 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (3)	3 (0)	3 (0)	3 (1)	3 (0)	3 (0)	3 (0)
	72	1.94 ± 0.36	NQ	1.18 ± 0.12	1.64 ± 1.75	1.00 ± 0.19	8.25 ± 1.26	6.82 ± 1.25	1.90 ± 2.39	10.54 ± 1.97	1.05 ± 0.26	3.51 ± 0.51
N (N<QL)	3 (0)	0 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (2)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	
B[a]P-10 <i>Donor skin 2</i>	48											0.98 ± 0.63
	N (N<QL)											3 (0)
	72											2.23 ± 1.21
	N (N<QL)											3 (0)
	96											4.43 ± 2.10
N (N<QL)											3 (0)	
CTP-I-10	48	0.03 ± 0.02	0.33 ± 0.22	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.06	<QL	<QL	<QL	0.48 ± 0.22	<QL	<QL	<QL
	N (N<QL)	3 (0)	3 (0)	3 (1)	3 (1)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
	72	0.06 ± 0.02	0.39 ± 0.13	0.06 ± 0.02	0.22 ± 0.15	<QL	<QL	<QL	1.10 ± 0.52	<QL	<QL	<QL
	N (N<QL)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (1)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (1)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
	96	0.07 ± 0.00	0.49 ± 0.05	0.09 ± 0.00	0.56 ± 0.15	<QL	<QL	<QL	1.60 ± 0.16	<QL	<QL	<QL
N (N<QL)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (0)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	

Results are expressed in % of applied dose (mean ± standard deviation, N is specified for each experimental condition). N<QL: number of samples below QL. NQ: not quantifiable.

<QL: below QL.

Figure 1.

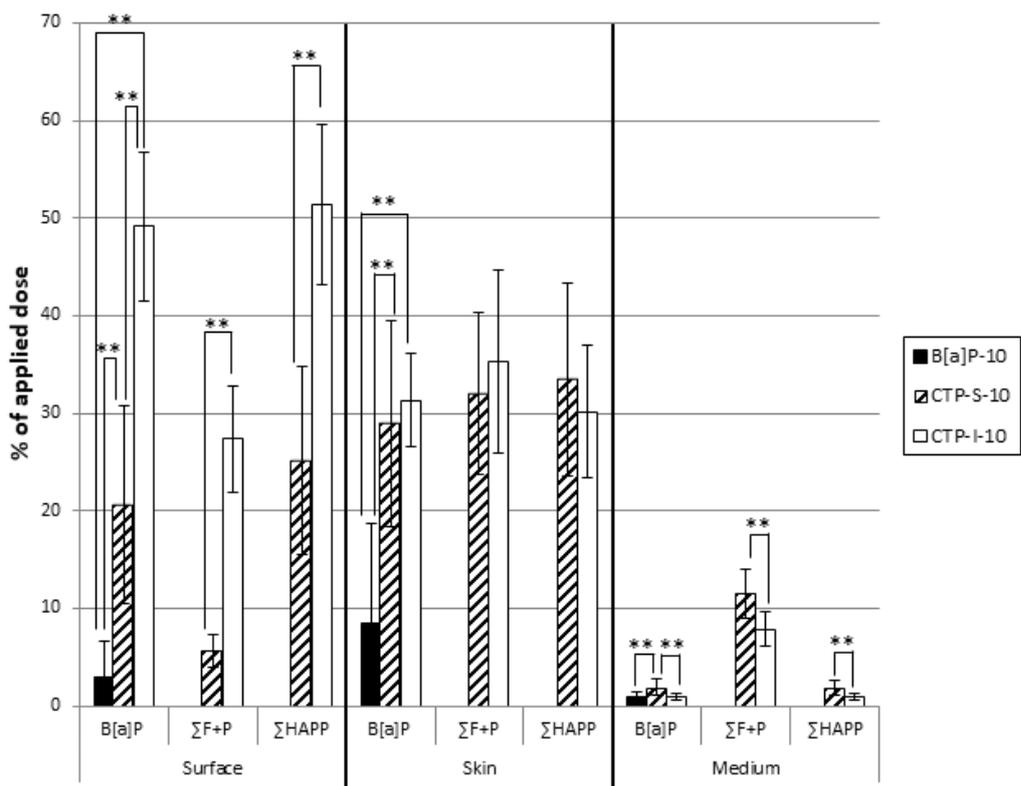


Figure 2.

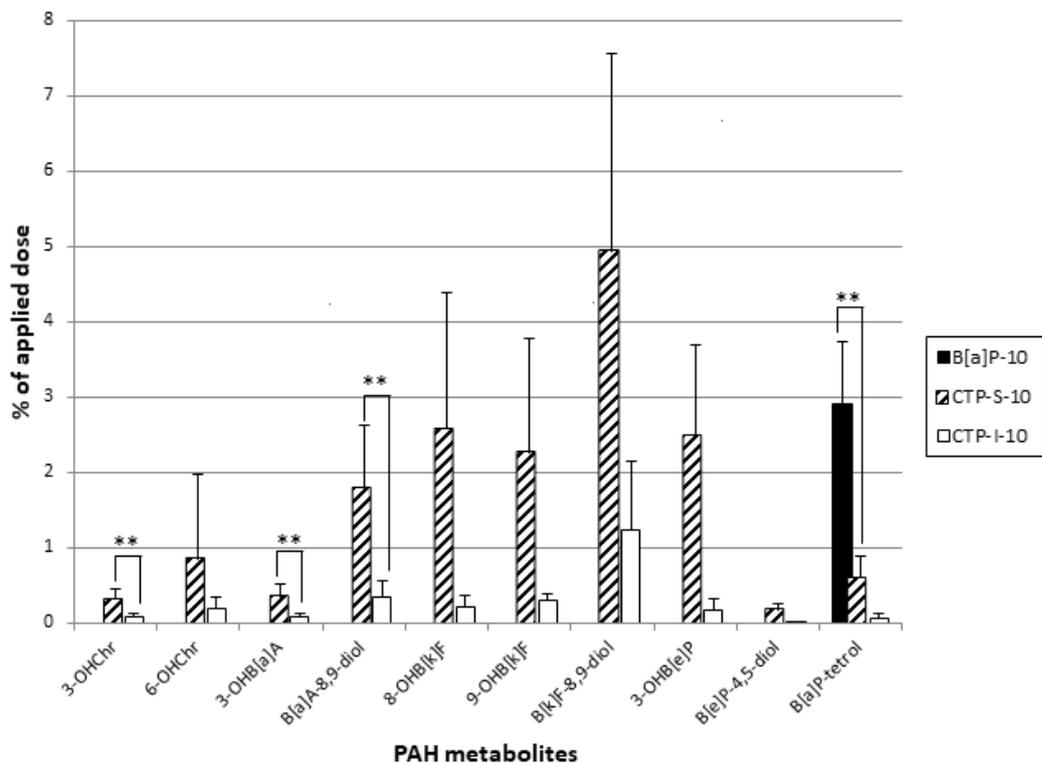


Figure 3.

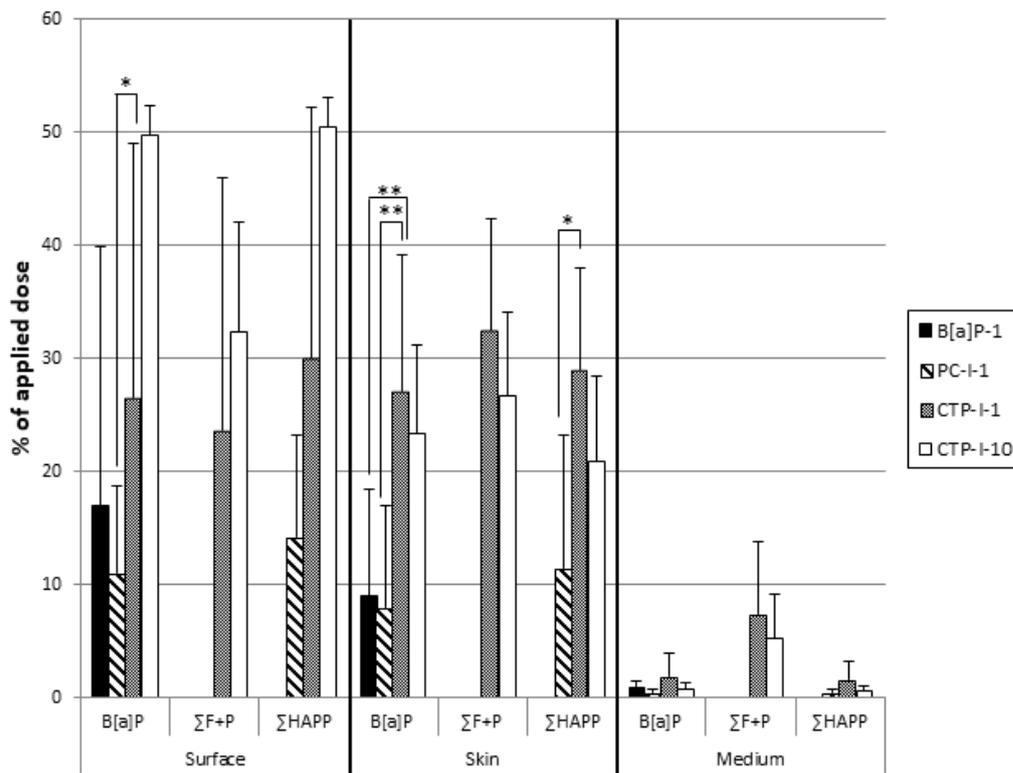


Figure 4.

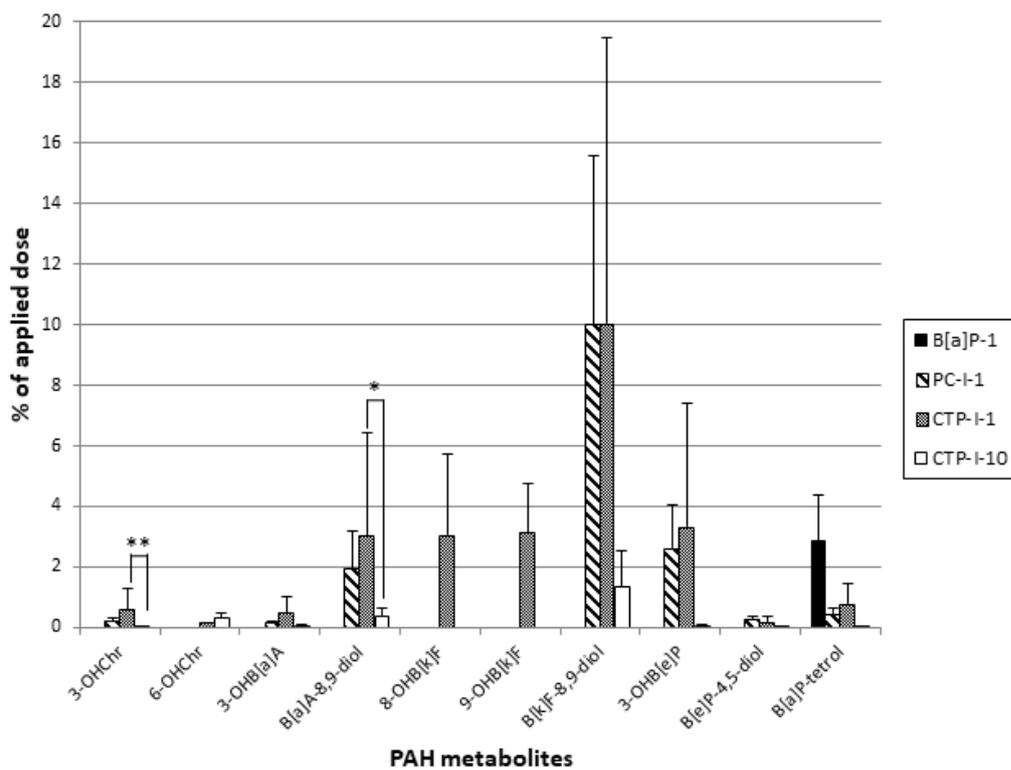


Figure 5.

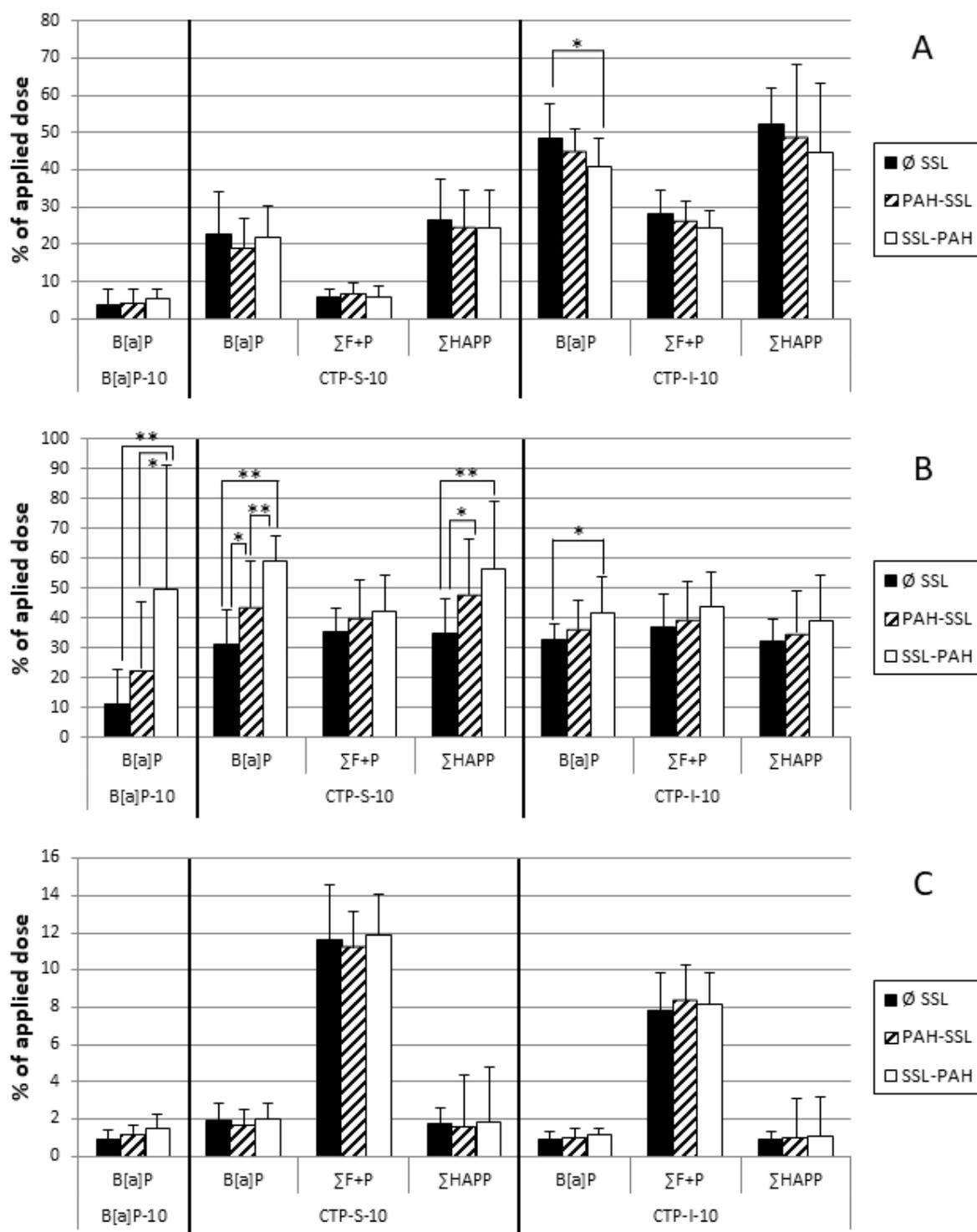
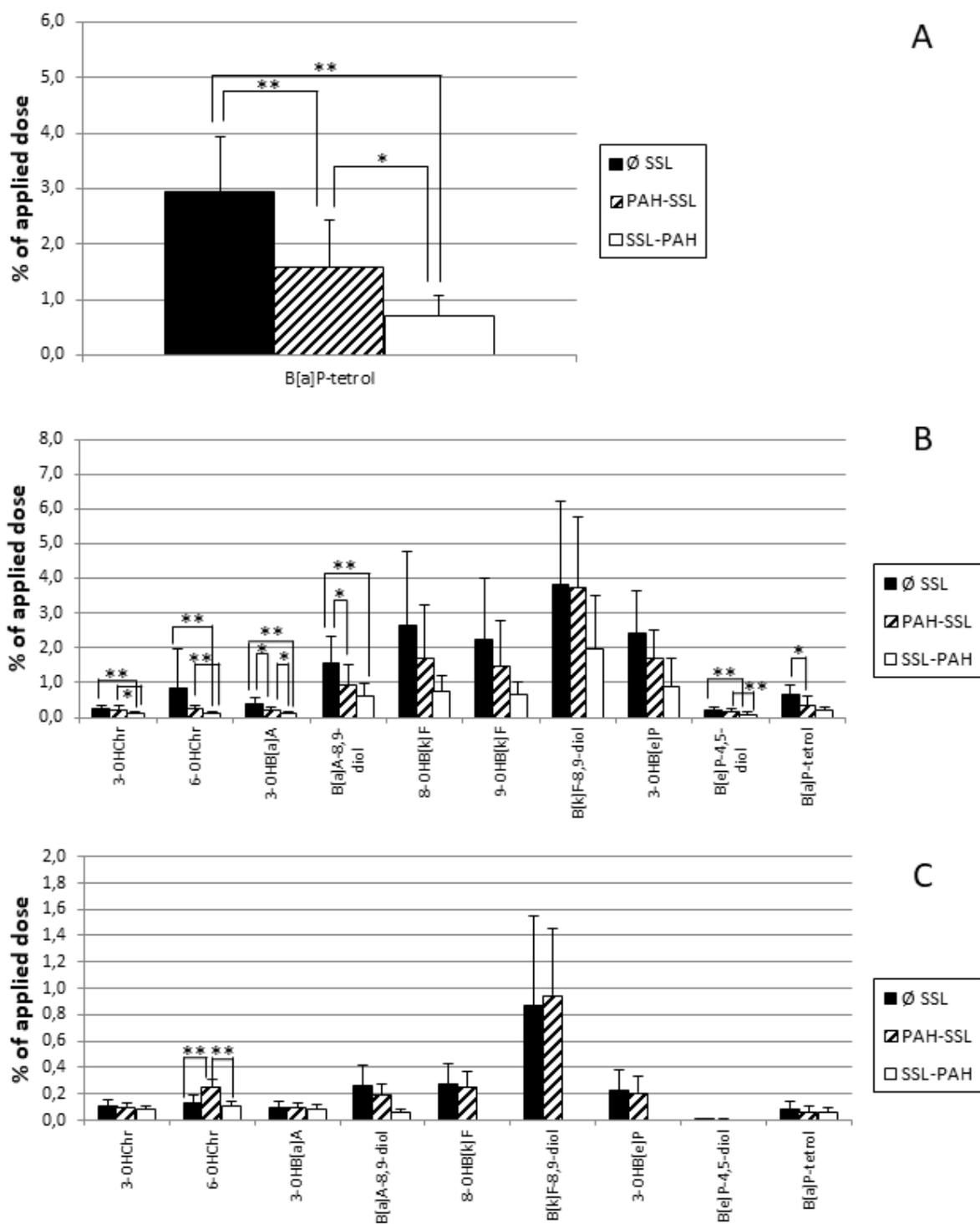


Figure 6.



Supporting information

Table S1. PAH molecular weight (MW) and PAH profile of 5 μL of CTP-I-1 and PC-I-1 (nmol).

	FluA	Pyr	Chr	B[a]A	B[j]F	B[b]F	B[k]F	B[e]P	B[a]P	B[g,h,i]P	I[1,2,3-c,d]P	DB[a,h]A	Total
MW ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	202.256	202.256	228.294	228.294	252.316	252.316	252.316	252.316	252.316	276.338	276.338	278.354	-
CTP-I-1	2.31	1.73	1.32	1.06	0.53	1.01	0.50	1.87	1.08	0.48	0.58	0.17	12.67
PC-I-1	-	0.55	1.97	0.89	0.24	1.19	0.12	1.37	1.09	0.54	0.19	0.38	8.55

Table S2. PAH (except B[a]P) distribution in human skin exposed to CTP-S-10 or CTP-I-10 for 48 hours.

	Mixture	FluA	Pyr	Chr	B[a]A	B[j]F	B[b]F	B[k]F	B[e]P	B[g,h,i]P	I[1,2,3-c,d]P	DB[a,h]A
Surface	CTP-S-10	5.2 ± 1.5	6.2 ± 1.9	35.3 ± 12.4	15.0 ± 7.8	19.1 ± 8.9	13.6 ± 7.3	24.5 ± 11.0	29.1 ± 10.5	35.7 ± 10.4	29.6 ± 10.2	24.7 ± 10.6
	CTP-I-10	27.4 ± 5.4**	27.4 ± 5.6**	44.6 ± 12.2*	41.2 ± 9.3**	50.8 ± 7.7**	52.0 ± 8.1**	51.4 ± 8.4**	48.8 ± 9.6**	57.3 ± 11.6**	67.6 ± 8.7**	49.7 ± 12.9**
Skin	CTP-S-10	30.4 ± 7.5	33.8 ± 9.2	33.0 ± 9.7	42.5 ± 12.8	25.5 ± 10.0	46.6 ± 16.7	28.1 ± 9.6	45.0 ± 10.3	27.6 ± 7.3	24.8 ± 8.3	28.1 ± 9.8
	CTP-I-10	32.3 ± 8.4	38.3 ± 10.5	41.0 ± 8.0*	41.6 ± 8.9	26.1 ± 4.5	33.4 ± 11.6*	32.8 ± 7.1	31.8 ± 8.9**	22.5 ± 6.0	20.1 ± 5.4	22.2 ± 10.0
Medium	CTP-S-10	12.6 ± 2.8	10.4 ± 2.3	1.7 ± 0.6	2.7 ± 1.1	2.1 ± 0.9	2.5 ± 1.1	1.5 ± 0.7	2.4 ± 0.9	1.1 ± 0.4	1.4 ± 0.7	1.0 ± 0.5
	CTP-I-10	8.2 ± 1.8**	7.5 ± 1.8**	1.7 ± 0.6	1.6 ± 0.6**	1.0 ± 0.3**	0.9 ± 0.4**	0.9 ± 0.3**	0.9 ± 0.5**	0.6 ± 0.3**	0.5 ± 0.2**	0.4 ± 0.2**

Results are expressed in % of applied dose (6 donor skins, mean ± standard deviation, N = 16). No value was below QL. The statistical differences between mixtures are indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Table S3. PAH (except B[a]P) distribution in human skin exposed to CTP-I-1, CTP-I-10, PC-I-1 for 48 hours.

	Mixture	FluA	Pyr	Chr	B[a]A	B[j]F	B[b]F	B[k]F	B[e]P	B[g,h,i]P	I[1,2,3-c,d]P	DB[a,h]A
Surface	CTP-I-1	23,09 ± 21,54	24,30 ± 23,06	23,97 ± 21,48	22,49 ± 20,74	27,92 ± 25,94	28,86 ± 21,93	26,13 ± 20,88	25,45 ± 22,61	40,38 ± 14,48	45,02 ± 29,89	29,73 ± 23,15
	N (N<QL)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)
	CTP-I-10	31,94 ± 8,90	32,73 ± 10,59	41,85 ± 5,48	39,72 ± 2,42	50,84 ± 6,16	51,16 ± 3,07	51,92 ± 3,76*	46,71 ± 2,46	62,51 ± 11,86*	66,89 ± 7,06	42,89 ± 8,73
	N (N<QL)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)
	PC-I-1	-	12,7 ± 13,38*	8,48 ± 6,03	7,01 ± 6,66	10,6 ± 12,87*	11,28 ± 8,55*	18,65 ± 8,08	17,69 ± 16,26	22,65 ± 2,92**	21,1 ± 18,04*	10,31 ± 6,10*
	N (N<QL)		7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)
Skin	CTP-I-1	30,86 ± 8,79	34,07 ± 11,14	35,68 ± 10,21	32,39 ± 11,64	21,03 ± 7,84	32,00 ± 10,76	28,32 ± 11,65	33,99 ± 11,17	36,8 ± 12,51	22,1 ± 7,15	19,17 ± 6,29
	N (N<QL)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)
	CTP-I-10	25,05 ± 7,06	28,36 ± 7,67	27,84 ± 7,72	27,59 ± 10,37	19,57 ± 8,86	22,23 ± 7,30	23,61 ± 8,95	21,72 ± 9,03	18,83 ± 8,51**	14,42 ± 4,93*	12,01 ± 2,95**
	N (N<QL)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)
	PC-I-1	-	38,29 ± 49,62	10,95 ± 8,93**	9,88 ± 12,16**	9,72 ± 13,38*	6,99 ± 6,47**	24,1 ± 32,52*	12,21 ± 8,58**	12,24 ± 3,48**	12,87 ± 18,33*	4,18 ± 2,56**
	N (N<QL)		7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)
Medium	CTP-I-1	7,74 ± 6,69	7,04 ± 6,09	2,18 ± 1,98	2,16 ± 1,99	1,68 ± 1,65	1,95 ± 1,94	1,78 ± 1,81	0,83 ± 0,67	1,86 ± 2,02	1,25 ± 1,36	0,75 ± 0,72
	N (N<QL)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (3)	7 (0)	7 (0)	7 (0)	7 (3)	7 (3)	7 (3)
	CTP-I-10	5,24 ± 3,79	5,22 ± 3,89	0,94 ± 0,63	1,12 ± 0,81	0,68 ± 0,44	0,72 ± 0,52	0,68 ± 0,50	0,29 ± 0,15	0,58 ± 0,46	0,44 ± 0,31	0,26 ± 0,17
	N (N<QL)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)	8 (0)
	PC-I-1	-	3,12 ± 1,66	0,70 ± 0,44	0,49 ± 0,32	0,26 ± 0,40	0,35 ± 0,23	0,64 ± 0,39	0,63 ± 0,36	0,72 ± 0,48	0,44 ± 0,29	0,19 ± 0,10
	N (N<QL)		7 (0)	7 (0)	7 (2)	7 (5)	7 (2)	7 (2)	7 (0)	7 (2)	7 (0)	7 (2)

Results are expressed in % of applied dose (3 donor skins, mean ± standard deviation, N is specified for each experimental condition). N<QL: number of samples below QL. The statistical differences are indicated: * p < 0.05, ** p < 0.01 by comparison to CTP-I-1.

Table S4. SSL influence on PAH (CTP-S-10 or CTP-I-10) distribution in human skin exposed for 48 hours.

	Mixture	SSL	N	FluA	Pyr	Chr	B[a]A	B[<i>j</i>]F	B[b]F	B[k]F	B[e]P	B[g,h,i]P	I[1,2,3-c,d]P	DB[a,h]A	
Surface	CTP-S-10	Ø SSL	11	5.37 ± 1.61	6.58 ± 2.01	35.22 ± 14.30	16.10 ± 8.97	20.4 ± 10.10	15.14 ± 8.23	26.51 ± 12.38	30.12 ± 12.04	36.28 ± 11.42	31.49 ± 10.83	27.38 ± 11.41	
		PAH-SSL	12	6.10 ± 2.56	7.29 ± 2.95	33.38 ± 9.55	14.30 ± 5.92	18.48 ± 7.44	15.74 ± 6.87	24.27 ± 8.66	27.30 ± 8.77	32.39 ± 7.93	30.19 ± 10.16	23.69 ± 8.35	
		SSL-PAH	12	5.24 ± 2.65	6.62 ± 3.50	32.31 ± 6.63	14.85 ± 5.55	19.61 ± 8.94	13.70 ± 7.27	25.07 ± 8.67	26.42 ± 8.28	33.29 ± 9.33	29.06 ± 13.15	23.78 ± 9.40	
	CTP-I-10	Ø SSL	11	28.18 ± 6.34	28.42 ± 6.51	45.85 ± 13.99	42.47 ± 11.02	52.64 ± 8.59	52.29 ± 9.59	50.32 ± 9.87	50.00 ± 11.45	51.14 ± 7.84	69.62 ± 9.26	55.62 ± 11.13	
		PAH-SSL	12	25.97 ± 4.45	26.52 ± 5.85	41.94 ± 11.41	37.94 ± 9.14	49.24 ± 6.61	49.82 ± 6.60	47.78 ± 6.74	45.77 ± 8.41	48.51 ± 5.00	64.67 ± 7.08	51.60 ± 9.74	
		SSL-PAH	12	24.23 ± 4.23	24.53 ± 5.39	38.43 ± 3.87	36.06 ± 4.01	45.11 ± 8.85	44.76 ± 6.76	43.22 ± 6.00	42.95 ± 6.08	43.29 ± 5.82 ^a	60.19 ± 12.58	48.57 ± 5.74	
Skin	CTP-S-10	Ø SSL	11	32.73 ± 7.63	37.57 ± 8.59	35.18 ± 10.96	44.24 ± 14.39	24.66 ± 11.69	48.34 ± 19.26	29.66 ± 11.04	46.03 ± 11.98	28.62 ± 8.59	25.33 ± 9.85	31.21 ± 10.40	
		PAH-SSL	12	36.85 ± 11.78	43.12 ± 13.55	47.00 ± 13.24 ^a	53.32 ± 15.27	39.41 ± 14.24 ^a	68.57 ± 18.55 ^a	48.05 ± 15.45 ^b	59.44 ± 14.81 ^a	38.20 ± 10.54 ^a	39.71 ± 12.55 ^b	39.31 ± 11.81	
		SSL-PAH	12	37.69 ± 11.68	47.03 ± 11.83	46.92 ± 12.01	68.72 ± 12.24 ^{b,c}	48.43 ± 6.86 ^{b,c}	81.72 ± 12.90 ^b	53.15 ± 8.64 ^b	64.05 ± 13.42 ^b	40.76 ± 9.46 ^b	47.88 ± 7.76 ^b	56.64 ± 11.28 ^{b,d}	
	CTP-I-10	Ø SSL	11	33.41 ± 10.00	40.58 ± 12.08	44.82 ± 6.65	44.65 ± 9.12	26.26 ± 5.24	36.29 ± 13.04	34.28 ± 8.02	33.56 ± 10.12	21.46 ± 6.87	21.20 ± 6.06	26.20 ± 9.68	
		PAH-SSL	12	36.33 ± 12.06	42.83 ± 13.38	51.70 ± 14.31	44.66 ± 12.41	30.77 ± 9.25	37.05 ± 9.16	38.20 ± 9.63	34.53 ± 10.28	25.01 ± 9.21	25.37 ± 8.24	28.23 ± 10.69	
		SSL-PAH	12	39.87 ± 11.62	46.98 ± 12.45	56.12 ± 16.49	51.92 ± 14.16	34.82 ± 11.67	39.94 ± 10.95	41.24 ± 11.79	38.97 ± 11.96	26.44 ± 10.23	27.56 ± 9.76	32.29 ± 13.21	
	Medium	CTP-S-10	Ø SSL	11	12.84 ± 3.29	10.33 ± 2.76	1.67 ± 0.73	2.61 ± 1.20	2.02 ± 0.92	2.53 ± 1.22	1.54 ± 0.72	2.32 ± 1.02	1.10 ± 0.45	1.34 ± 0.69	1.07 ± 0.49
			PAH-SSL	12	12.49 ± 2.31	9.98 ± 1.62	1.56 ± 0.58	2.29 ± 0.84	1.33 ± 0.50 ^a	2.24 ± 1.00	1.50 ± 0.74	2.26 ± 0.96	1.13 ± 0.63	1.15 ± 0.58	0.84 ± 0.47
			SSL-PAH	12	12.90 ± 2.33	10.90 ± 2.03	1.78 ± 0.62	2.74 ± 1.08	1.71 ± 0.94	2.69 ± 1.17	1.59 ± 0.66	2.41 ± 0.99	1.18 ± 0.54	1.40 ± 0.61	1.08 ± 0.52
CTP-I-10		Ø SSL	11	8.26 ± 2.14	7.32 ± 2.08	1.78 ± 0.73	1.62 ± 0.68	1.03 ± 0.36	0.88 ± 0.38	0.79 ± 0.33	1.15 ± 0.47	0.44 ± 0.18	0.43 ± 0.19	0.42 ± 0.16	
		PAH-SSL	12	8.94 ± 2.14	7.79 ± 1.79	1.89 ± 0.78	1.65 ± 0.72	0.88 ± 0.65	1.01 ± 0.53	0.93 ± 0.49	1.25 ± 0.58	0.56 ± 0.33	0.51 ± 0.35	0.46 ± 0.30	
		SSL-PAH	12	8.78 ± 1.89	7.58 ± 1.51	1.98 ± 0.56	1.77 ± 0.53	1.17 ± 0.56	1.07 ± 0.39	0.99 ± 0.36	1.31 ± 0.44	0.63 ± 0.30	0.65 ± 0.38	0.57 ± 0.32	

Results are expressed in % of applied dose (4 donor skins, mean ± standard deviation, N is specified for each experimental condition). Ø SSL: exposure to PAH for 48 hours without SSL. PAH-SSL: exposure to PAH for 48 hours with SSL treatment at 24 hours. SSL-PAH: SSL treatment followed by topical application of PAH for 48 hours. No value was below QL. The statistical differences between mixtures are indicated: ^a p < 0.05 by comparison to Ø SSL, ^b p < 0.01 by comparison to Ø SSL, ^c p < 0.05 by comparison to PAH-SSL, ^d p < 0.01 by comparison to PAH-SSL.

Table S5. GC-EI-MS/MS method parameters for PAH metabolites analysis in culture medium.

Compound	Rt ^a (min)	Quantification transition (m/z)	Dwell time (ms)	CE ^b (V)	Qualification transition (m/z)	Dwell time (ms)	CE (V)
B[a]P-tetrol	21.28	403.7 → 404.2	11.6	5	403.7 → 389.2	10	7
¹³ C ₆ -B[a]P-tetrol	21.28	409.2 → 409.2	69.4	1	409.2 → 394.2	10	4
¹³ C ₆ -1-OHP	19.86	296.1 → 296.2	10	10	296.1 → 281.2	10	5
6-OHChr	21.07	316.0 → 316.0	10	3	316.0 → 301.1	10	13
¹³ C ₆ -6-OHChr	21.07	322.1 → 322.2	10.6	5	322.1 → 307.2	11.6	15
3-OHChr	21.66	316.0 → 316.2	10	3	316.0 → 301.1	10	10
B[a]A-8,9-diol	21.75	406.1 → 406.3	10	3	406.1 → 244.1	10	3
3-OHB[a]A	21.91	316.0 → 316.2	10.2	3	316.0 → 301.1	10	13
B[e]P-4,5-diol	21.92	430.2 → 340.2	10	7	430.2 → 415.2	10	7
8-OHB[k]F	23.60	339.8 → 340.2	10	3	339.8 → 325.2	10	10
B[k]F-8,9-diol	23.93	251.9 → 252.1	10	7	429.9 → 430.2	10	3
10-OHB[b]F	24.52	339.8 → 340.2	10	3	339.8 → 325.2	10	10
9-OHB[k]F	24.67	339.8 → 340.2	10	3	339.8 → 325.2	10	13
3-OHB[e]P	24.96	340.1 → 340.2	10	7	340.1 → 325.1	10	7

^a Retention time. ^b Collision energy.

V. Principaux résultats

La pénétration du B[a]P (B[a]P-10 > CTP-S-10 > CTP-I-10) et des Σ F+P et Σ HAPP (CTP-S-10 > CTP-I-10) est fortement réduite lorsque la quantité et la diversité des produits chimiques appliqués sur la peau augmente, à l'instar de résultats obtenus *in vivo* (Dankovic et al. 1989). La pénétration des HAP est fortement impactée par la dose d'exposition (CTP-I-1 > CTP-I-10) et la composition des mélanges (PC-I-1 > CTP-I-1).

La faible diffusion du B[a]P et des HAP particulières ($\approx 2\%$) à travers la peau indique que leur cancérogénicité pourrait être locale. La diffusion passive du Pyr et du FluA, de plus faible poids moléculaire, est plus élevée que celle des HAP particulières, à l'instar des résultats mesurés dans de nombreuses études (Hopf et al. 2018; Ng et al. 1992; Sartorelli et al. 2001; VanRooij et al. 1995).

La biotransformation des HAP est particulièrement impactée par la complexité des mélanges (pour le B[a]P, B[a]P-10 > CTP-S-10 > CTP-I-10, et pour les HAP particulières, CTP-S-10 > CTP-I-10) et la dose d'exposition (CTP-I-1 > CTP-I-10). Cette diminution de la biotransformation des HAP pourraient être due à une saturation enzymatique (Jacques et al. 2010b; Ng et al. 1992), à une compétition des HAP et des autres constituants du mélange complexe envers les CYP450 (Dankovic et al. 1989; Líbalová et al. 2014; Shimada et al. 2008), ou d'autres mécanismes, puisque certains composés, tels que les métaux, inhibent l'activité des CYP450 induits par les HAP (Vakharia et al. 2001).

L'additivité des effets des HAP présents dans les mélanges qui est généralement supposée (Nisbet and LaGoy 1992), est donc à reconsidérer. A des doses comparables à celles des expositions professionnelles, la bioactivation du B[a]P en mélanges (CTP-I-1 et PC-I-1) est 4 à 6 fois plus faible que celle du B[a]P pur. L'effet des mélanges sur la bioactivation des HAP est ainsi inférieur à un effet additif, néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires car cette inhibition pourrait induire un délai dans le métabolisme des HAP. Globalement, la biotransformation des HAP est similaire entre le PC et le CTP.

Avec le CTP-I-10, la pénétration des HAP particulières, et particulièrement du B[a]P, augmente quand l'irradiation aux UV est réalisée avant application des HAP. A l'inverse, les UV n'impactent pas la pénétration des HAP contenus dans le CTP-S-10. Cette différence pourrait provenir d'une perméabilité cutanée accrue des autres constituants du mélange CTP-I-10, ayant pour conséquence une hausse de la pénétration des HAP. La diffusion passive des HAP n'est pas altérée par l'irradiation de la peau, contrairement à ce qui est suggéré par une

étude récente. Cependant, aucune des tendances mesurées dans cette étude n'atteint une différence statistiquement significative (Hopf et al. 2018).

Le métabolisme des HAP est inhibé par les rayonnements UV ce qui concorde avec l'inhibition de l'induction des CYP450 par le B[a]P récemment rapporté (von Koschembahr et al. 2018). Toutefois, les UV sont des inducteurs de l'expression des CYP1A1 et 1B1 (Katiyar et al. 2000; Villard et al. 2002) et exacerbent la génotoxicité du B[a]P *in vivo* (Saladi et al. 2003). Le résultat de notre étude pourrait provenir d'une cytotoxicité de la dose d'irradiation (Gelis et al. 2002), pourtant classiquement utilisée dans les études (Hung et al. 2012; McAuliffe and Blank 1991; Mortensen et al. 2013; Mujtaba et al. 2015).

VI. Conclusion

Notre travail apporte des informations précises sur l'absorption cutanée et la bioactivation des HAP dans des conditions expérimentales proches des expositions humaines. L'absorption et la bioactivation des HAP diminuent lors de l'application de mélanges et lorsque la dose d'exposition augmente, ce qui pourrait induire un délai dans la bioactivation des HAP. Le métabolisme des HAP est similaire entre le PC et le CTP, cependant d'autres mélanges pourraient impacter différemment leur métabolisation. L'effet des mélanges est donc bien plus complexe qu'un simple effet additif et l'évaluation du risque sanitaire ne peut donc se faire sur la seule base d'études menées avec des HAP appliqués individuellement. Au contraire, une meilleure connaissance de l'exposition des populations aux HAP, notamment cancérigènes de la phase particulaire, est nécessaire alors que dans bons nombres de situations, seul le B[a]P est quantifié du fait de l'existence d'une valeur limite recommandée à ne pas dépasser pour ce composé en France.

L'exposition humaine est généralement évaluée par la SBE. Du fait d'une diffusion limitée des HAP parent à travers la peau, les métabolites sont les biomarqueurs les plus pertinents en cas d'exposition cutanée. Le métabolisme cutané différé du B[a]P et des HAP particuliers lors de l'application des mélanges retarde très probablement l'excrétion urinaire des biomarqueurs, ce qui pose la question du moment de prélèvement le plus adéquat.

Les rayonnements UV augmentent la pénétration du B[a]P et des HAP particuliers lors de l'application de CTP, tandis que la diffusion passive des HAP à travers la peau reste constante indiquant que le réservoir cutané n'est pas altéré. L'irradiation de la peau inhibe le métabolisme des HAP. Néanmoins, il ne faut pas oublier les phénomènes de phototoxicité qui pourraient affecter qualitativement et quantitativement la production de biomarqueurs.

Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le devenir du réservoir cutané des HAP, car l'effet des mélanges sur la biotransformation des HAP est inconnu à long terme, mais ces résultats soulignent là encore l'importance des équipements de protection et de la décontamination de la peau afin d'éviter des effets toxiques.

Chapitre 5 : Conclusion générale et perspectives

Tégument protecteur vital, la peau est le tissu le plus étendu du corps humain. Sa structure, en renouvellement perpétuel, est constituée de plusieurs couches de kératinocytes afin d'établir une barrière protectrice contre l'environnement extérieur. Cette fonction repose essentiellement sur le *stratum corneum*, strate la plus externe de la peau. Elle est composée de kératinocytes morts renforcés par des réseaux de protéines, formant les briques d'un mur maintenu par le mortier, les lipides intercellulaires. Bien que la peau constitue une barrière efficace, elle représente une voie d'entrée pour de nombreux xénobiotiques.

En milieu professionnel, les salariés sont exposés à des concentrations de HAP très supérieures à celles de la population générale, provoquant un excès de cancers de la peau, notamment dans les secteurs de la production d'aluminium, de la gazéification du charbon et de l'extraction de schistes bitumineux. Les HAP sont des composés d'au moins deux cycles aromatiques fusionnés, toujours émis en mélanges complexes dont la composition, extrêmement variable, dépend de la source d'émission ou du produit brut utilisé durant les activités professionnelles. La contamination de la peau peut se produire par contact direct des produits contenant des HAP, par contact indirect avec des surfaces contaminées ou par passage des HAP à travers les vêtements de protection. Le degré de contamination de la peau fluctue entre les travailleurs, et dépend de la tâche effectuée mais aussi des moyens de protection.

La cancérogénicité des HAP est un processus complexe impliquant de multiples étapes comprenant leur absorption et leur métabolisme. A la surface de la peau, les HAP diffusent passivement dans le *stratum corneum*, où ils s'accumulent, formant ainsi un réservoir cutané. En raison de leur lipophilie, leur diffusion à travers les autres couches de l'épiderme, plus hydrophiles, est limitée et leur absorption dépend largement de leur biotransformation au sein des kératinocytes. Les HAP sont naturellement inertes mais acquièrent leur génotoxicité au cours de cette étape de métabolisation. Le métabolisme des HAP est extrêmement complexe et se divise en plusieurs voies de bioactivation où la voie du diol-époxyde est considérée comme la voie génotoxique majeure.

En plus de l'exposition aux HAP, les salariés peuvent être exposés aux rayonnements UV solaires. La combinaison de ces deux agents cancérogènes est associée à un accroissement du risque de cancer de la peau en milieu professionnel. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'exacerbation de la cancérogénicité des HAP par les UV : (1) une perméabilité accrue de la peau aux HAP, (2) une augmentation de la bioactivation des HAP par induction de l'expression des enzymes du métabolisme, et (3) des mécanismes de phototoxicité.

A l'heure actuelle, les connaissances relatives à l'absorption cutanée des HAP découlent d'études le plus fréquemment menées à fortes doses sur des explants de peau animale qui est plus perméable que la peau humaine. De plus, les expérimentations sont souvent conduites en appliquant des HAP individuellement (Phe, Pyr et B[a]P) ou se limitent à l'étude de la diffusion des HAP parents contenus dans des mélanges à travers des explants de peau, parfois non-viables. Ainsi, la compréhension de la cancérogénicité des faibles doses et des mélanges complexes de HAP sur la peau humaine est lacunaire, en particulier en regard de leur absorption cutanée et surtout de leur métabolisme. De même, la caractérisation de l'effet des rayonnements UV solaires sur ces processus est limitée.

L'objectif de cette thèse était ainsi d'étudier l'absorption cutanée et le métabolisme des HAP dans des conditions proches des expositions professionnelles (faibles doses, mélanges complexes), ainsi que l'impact des UV afin d'améliorer la compréhension du risque cancérogène des populations. Un objectif secondaire était d'améliorer la SBE des populations, notamment à travers l'identification de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux HAP particuliers, à ce jour encore largement restreinte au pyrène non cancérogène, et plus récemment au B[a]P, seul HAP cancérogène certain pour l'homme.

L'étape initiale de ce travail de thèse a consisté à la conception et au design d'un modèle d'exposition cutanée réaliste. Dans le contexte actuel des 3R, l'objectif était également de proposer un modèle alternatif à l'expérimentation animale. Dès le début du projet, le choix du modèle s'est orienté vers les explants de peau humaine considérés comme le « gold standard » pour étudier l'absorption cutanée des xénobiotiques. L'obtention de peau humaine est généralement difficile et ce modèle a pu être développé du fait de la proximité entre le laboratoire d'analyses et le service de chirurgie du CHU de Grenoble. Le design du modèle d'exposition (épaisseur de la peau, composition du liquide récepteur) a été optimisé en fonction des données de la littérature et a été élaboré dans l'objectif de se rapprocher le plus de la physiologie humaine de l'absorption cutanée. Le principal critère de sélection du système d'inserts/puits était de permettre la réalisation d'un grand nombre d'expériences en parallèle mais aussi d'avoir un volume de liquide récepteur limité afin de concentrer les métabolites et de faciliter leur analyse. Lors de ce développement, l'étape la plus difficile a certainement été la mise au point de la méthode d'extraction du B[a]P et des métabolites de la peau car les protocoles décrits dans la littérature n'étaient pas assez efficaces. L'objectif initial, visant la quantification de l'ensemble des métabolites d'intérêts (B[a]P-tétraol, 3-OHB[a]P, B[a]P-7,8-diol...) contenus dans le tissu cutané, n'a pas pu être atteint du fait d'une variabilité des résultats obtenus. Cette variabilité s'est avérée non-maîtrisable pour le 3-

OHB[a]P en dépit de nombreux tests. Néanmoins, la méthode développée a permis l'extraction et la quantification précise des HAP parents et de certains métabolites dont le B[a]P-tétraol, apportant de nouvelles données sur le comportement des HAP après une contamination de la peau car les recherches se limitent bien souvent à l'évaluation de la diffusion des HAP à travers la peau.

L'absorption cutanée et le métabolisme du B[a]P ont ensuite été étudiés à des doses réalistes (1, 10 et 25 nmol). Le travail décrit dans le premier article montre que les faibles doses de B[a]P pénètrent la peau de manière extrêmement rapide puisqu'au moins 50% de la dose est retrouvée au sein de la peau après 8 heures d'exposition, quelle que soit la dose appliquée. La pénétration massive du B[a]P n'était pas associée à une augmentation de la diffusion passive du B[a]P, puisque la quantité de B[a]P mesurée dans le milieu restait limitée (<3%). Ces résultats indiquent que la cancérogénicité du B[a]P semble s'exprimer majoritairement au niveau de la zone de contamination. Tandis que la pénétration du B[a]P diminue avec l'augmentation de la dose, cette étude révèle l'existence de phénomènes de saturation enzymatique pour la voie du diol-époxyde débutant à très faibles doses. Par ailleurs, la saturation de la voie du diol-époxyde, attribuée à une saturation de l'EH, pourrait également être expliquée par l'absence d'induction de l'expression de cette enzyme par le B[a]P (von Koschembahr et al. 2018). Ceci souligne l'importance de l'application de doses réalistes dans les études expérimentales car celles-ci influencent largement le profil métabolique des HAP. Dans notre étude, le B[a]P-tétraol, minoritaire dans la plupart des études à fortes doses, était produit en quantités équivalentes au 3-OHB[a]P, métabolite fréquemment rapporté comme majoritaire (Jacques et al. 2010b). Le B[a]P-tétraol, produit de l'hydrolyse du BPDE reflétant la bioactivation ultime du B[a]P, apparaît ainsi comme le biomarqueur le plus pertinent pour la SBE en cas d'exposition cutanée. Enfin, la comparaison de nos données à celles de la littérature montre la précision et la pertinence de notre modèle. Le métabolisme continu du B[a]P durant 48 heures démontre que les conditions expérimentales choisies permettent le maintien de la viabilité des explants de peau *ex vivo* au moins sur cette période temps. En conclusion, ce premier travail a permis de démontrer la validité du concept de modèle d'exposition réaliste.

Au cours de la deuxième partie, un état de l'art incluant près de 70 références bibliographiques a permis de synthétiser les connaissances sur le métabolisme et les voies de bioactivation des HAP particuliers autres que le B[a]P, composé dont la biotransformation avait largement été caractérisée sur de nombreux modèles *in vitro* et *ex vivo*. Cette synthèse a permis d'identifier 13 dérivés métaboliques d'intérêt impliqués dans la voie du diol-époxyde

des HAP particuliers ainsi que 15 métabolites issus des voies de détoxification. La principale difficulté a ensuite été de se procurer des standards commercialisés et purs. Au final, 12 de ces métabolites d'intérêt ont été retenus, mais l'analyse n'a pu être mise au point en GC-MS/MS que pour 10 de ces métabolites. La quantification de ces analytes a uniquement été réalisée dans le milieu, car l'usage d'hydroxyde de potassium nécessaire à leur extraction de la peau endommage le système chromatographique et le détecteur de la GC-MS/MS. En plus de permettre l'étude du métabolisme cutané de ces composés, ces métabolites constituent de nouveaux biomarqueurs potentiellement pertinents pour la SBE des populations aux HAP cancérigènes.

La troisième partie du travail a consisté à caractériser deux des étapes déterminantes de la cancérogénicité cutanée des mélanges complexes de HAP, l'absorption et le métabolisme. A ce jour, l'influence des mélanges complexes sur la bioactivation des HAP demeure inconnue. Les recherches sur les mélanges remettent en cause le principe d'additivité des effets, néanmoins les résultats varient entre les études. L'un des biais méthodologiques semble être l'application de fortes doses (Jarvis et al. 2014). Pour ces études, notre choix s'est porté sur deux mélanges couramment utilisés lors d'activités professionnelles dans le secteur de la métallurgie, le CTP et le PC, qui ont été appliqués à faibles doses. L'ensemble de ce travail fait l'objet du deuxième article est en cours de soumission.

L'étude cinétique a permis de vérifier en premier lieu que notre procédure expérimentale permettait d'assurer la viabilité des explants de peau pendant 96 heures d'incubation. Globalement, au plus la composition du mélange est complexe et au plus la dose d'exposition est élevée, au moins les HAP, et en particulier le B[a]P, pénètrent dans la peau. Ainsi, après une exposition de 48 heures, la fraction de HAP particuliers restant à la surface de la peau s'accroît de 20% lorsque la dose de B[a]P contenue dans le mélange industriel CTP augmente de 1 à 10 nmol. Cette fraction représente une forte proportion de la dose appliquée ce qui suggère qu'après 8 heures d'exposition, durée maximale d'un poste de travail, la pénétration des HAP est modeste. Ceci souligne, comme après étude du B[a]P pur, l'importance des procédures de décontamination de la peau après l'activité de travail. Toutefois, la pénétration des HAP est deux fois plus faible après application de CTP qu'avec le PC mais la pénétration du B[a]P est similaire entre le PC et le B[a]P-1. Ceci démontre que la pénétration cutanée des HAP, première étape de la cancérogénicité, est modulée par la présence d'autres HAP et composés chimiques au sein des mélanges.

La bioactivation des HAP en diol-époxyde, puis leur liaison aux bases de l'ADN, est considérée comme l'une des étapes cruciales de la mutagénèse et de la tumorigénicité (Jarvis

et al. 2014). Le métabolisme cutané dépend là encore de façon importante de la quantité et du nombre de produits chimiques appliqués sur la peau. Les mélanges industriels induisent une saturation enzymatique réduisant selon toute vraisemblance la bioactivation des HAP. A des doses représentatives des expositions professionnelles, cette saturation est également observable entraînant une accumulation des HAP non-métabolisés dans la peau. Avec le CTP-I-1, la pénétration des HAP est proportionnellement plus grande qu'avec le CTP-I-10. Néanmoins, la quantité absolue de HAP et de produits chimiques absorbés dans la peau est plus élevée avec le CTP-I-10, expliquant une saturation enzymatique exacerbée à forte dose. A court terme, ces résultats suggèrent que les mélanges complexes induisent des effets plus faibles que des effets additifs sur la bioactivation, et par conséquent sur la génotoxicité des HAP. Toutefois, l'étude de la bioactivation des mélanges complexes de HAP à plus long terme est nécessaire afin de déterminer le devenir du réservoir cutané et l'effet des interactions entre xénobiotiques, car les mélanges complexes sont connus pour être de puissants inducteurs des enzymes du métabolisme telles que les CYP450 (Líbalová et al. 2014; Líbalová et al. 2012; Sen et al. 2007). Dans notre étude, le métabolisme du B[a]P à 72 heures est similaire avec le CTP-S-10 et le B[a]P-10 indiquant un retard de la bioactivation des HAP. Cependant, les nombreux composés chimiques présents dans les mélanges industriels, CTP et PC, ou dans d'autres produits utilisés en métallurgie pourraient moduler la bioactivation des HAP à travers des mécanismes d'action plus complexes qu'une saturation enzymatique. A titre d'exemple, l'arsenic et le cadmium qui n'altèrent pas l'expression génique des CYP450 induite par les HAP semblent impacter le processus de traduction ARNm en protéines ou induire la perte de l'hème essentielle au fonctionnement des CYP450 (Vakharia et al. 2001). De futures études devront évaluer l'influence des mélanges sur d'autres voies métaboliques, telle que la voie de l'o-quinone. En effet, nos résultats indiquent une saturation des voies métaboliques dépendantes des CYP450 et des EH. Cependant, le métabolisme des HAP, très complexe, implique une grande diversité d'enzymes et de réactions. Il est donc nécessaire de poursuivre l'étude de l'impact des mélanges complexes sur les différentes voies métaboliques.

La fraction de B[a]P et de HAP particuliers diffusant passivement à travers la peau humaine est très faible (< 2%), tandis que le FluA et le Pyr diffusent plus facilement (\approx 10%). Ces résultats concordent avec l'ensemble des études conduites sur cellules statiques, cellules dynamiques et organes transfusés (Hopf et al. 2018; Ng et al. 1992; Sartorelli et al. 2001; VanRooij et al. 1995). Ainsi en cas d'exposition cutanée, les HAP particuliers non-métabolisés ne participent que faiblement à la contamination de l'organisme. A l'inverse, leurs métabolites pourraient être des biomarqueurs pertinents pour la SBE aux HAP en milieu

professionnel. Avant de les mettre en œuvre, il est nécessaire de déterminer le moment de prélèvement le plus approprié du fait du retard de leur métabolisme mais aussi avoir vérifié que les méthodes analytiques développées sont assez sensibles. En outre, ces données étayent l'hypothèse déjà émise lors de l'étude sur l'absorption cutanée du B[a]P seul, à savoir que la cancérogénicité du B[a]P et des HAP particuliers semble être majoritairement locale au niveau du tissu cutané. Néanmoins, une toxicité systémique n'est pas à exclure, puisque les HAP et surtout les métabolites excrétés par voie biliaire peuvent subir un cycle entéro-hépatique et une nouvelle étape de bioactivation après déconjugaison par la flore intestinale (Bertram et al. 2013; Chipman et al. 1981; IARC 2010; Sousa et al. 2008).

L'étude des effets des rayonnements UV solaires sur l'absorption cutanée et le métabolisme des mélanges complexes de HAP est tout à fait original car une seule étude a été récemment publiée sur l'absorption des HAP parent mais elle ne s'est intéressée aux métabolites. Sous l'effet des UV, la pénétration du B[a]P et des HAP particuliers contenus dans le CTP est accrue alors que leur diffusion passive à travers la peau n'est pas modifiée ce qui indique que le réservoir cutané formé par les HAP dans le *stratum corneum* n'est pas altéré par les UV. Cette augmentation de la pénétration des HAP semble liée à une perméabilité plus grande de la peau envers les autres substances contenues dans le mélange, qui résulte d'une altération progressive des structures cutanées après l'irradiation (Jiang et al. 2006; Mortensen et al. 2013). Ainsi, lors d'une exposition aux UV solaires en l'absence d'une protection adaptée, l'absorption cutanée d'autres contaminants que les HAP pourrait être augmentée quelques jours après l'irradiation. Ceci va bien dans le sens du port de gant et de combinaison, de l'application de crème et surtout de l'adaptation des horaires afin d'éviter de travailler pendant les heures de plus grande intensité solaire.

Le métabolisme des HAP est inhibé en présence d'UV mais les mécanismes d'une telle inhibition de l'expression des enzymes du métabolisme restent inconnus. Il a été montré que les UV catalysent l'agrégation des protéines et l'excitation du NADPH, cofacteur nécessaire au fonctionnement des CYP450, ce qui pourrait expliquer l'inhibition du métabolisme des HAP par altération des CYP450 ou par inhibition de leur activité catalytique (Feo et al. 1984; Pattison and Davies 2006; Rittie and Fisher 2015). Toutefois, la majorité des études démontre l'induction de l'expression des CYP450 après irradiation de l'ordre de 20 mJ/cm² ou du DEM, que ce soit *in vitro* ou chez des volontaires (Gonzalez et al. 2008; Katiyar et al. 2000; Osanai and Lee 2011; Smith et al. 2003; Villard et al. 2002; Wei et al. 1999), ainsi qu'une augmentation de la génotoxicité du B[a]P *in vivo* (Saladi et al. 2003). Bien que la dose d'UV appliquée dans notre étude soit similaire à celle fréquemment rapportée dans la littérature

(Hung et al. 2012; McAuliffe and Blank 1991; Mortensen et al. 2013; Soeur et al. 2017), il n'est pas exclu qu'elle puisse être cytotoxique et induire ainsi une baisse de la viabilité des explants de peau (Gelis et al. 2002). Des études complémentaires avec des doses plus faibles d'UV seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus.

Les HAP sont photosensibles et deviennent phototoxiques lors d'une irradiation simultanée aux UV. Ces processus, identifiés en solution ou sur des cultures cellulaires *in vitro*, n'ont pas été caractérisés au cours de nos expérimentations, mais la phototoxicité des HAP, à l'instar de l'effet des UV solaires sur la bioactivation des HAP, doivent être étudiés sur des modèles plus complexes afin de mieux caractériser le risque cancérigène. De plus, les réactions photochimiques (photooxydation, phototransformation...) convertissent les HAP en quinones, qui pourraient constituer des biomarqueurs de certains processus phototoxiques (Yu 2002). Ces études pourraient ainsi permettre d'adapter la SBE des populations à la modulation de la cinétique d'excrétion, de la quantité et de la nature des métabolites des HAP par une irradiation cutanée concomitante.

Plusieurs perspectives de recherche s'ouvrent à la suite de ce travail. Tout d'abord, afin de déterminer l'importance de l'absorption cutanée des mélanges en conditions réalistes, il est nécessaire de caractériser les scénarios d'exposition (dose, véhicule, temps d'exposition) ce qui est encore parcellaire dans la littérature scientifique. Si après 8 heures d'exposition, la pénétration du B[a]P appliqué seul est massive, les mélanges complexes réduisent sa pénétration et des expériences supplémentaires devront être menées pour déterminer la quantité de HAP diffusant dans la peau sur la durée du temps de travail. En outre, nos recherches ont été réalisées sur des explants de peau saine. Or, la peau des salariés est régulièrement soumise à de nombreux stress, chimiques et mécaniques, impactant la barrière cutanée (sécheresse, chaleur, griffures, ...). De plus, les maladies de la peau, dont les dermatites de contact, constituent la seconde cause de maladie professionnelle (Kasemsarn et al. 2016). L'influence de ces atteintes et de ces pathologies sur l'absorption cutanée et le métabolisme des HAP est un élément également à prendre en compte.

De plus, la connaissance de l'absorption cutanée des mélanges complexes des HAP est encore fragmentaire. La variabilité de la composition des mélanges liée tant à la quantité qu'à la diversité des espèces chimiques apparaît comme l'un des facteurs déterminants de la pénétration cutanée et du métabolisme des HAP. La compréhension de ces phénomènes reste superficielle du fait d'une méconnaissance des proportions et des identités chimiques des différents constituants des mélanges. Il est ainsi essentiel d'améliorer la caractérisation chimique des mélanges complexes, mais aussi d'évaluer l'absorption cutanée de mélanges de

natures différentes puisque leurs comportements et leurs métabolismes sont susceptibles de différer. A titre d'exemple, l'essence ou le kérosène contiennent des additifs susceptibles d'altérer la barrière cutanée et d'accroître la pénétration des HAP (Jakasa et al. 2015). En outre, la caractérisation de la composition des mélanges devrait permettre d'apporter des informations sur les interactions entre xénobiotiques (induction, inhibition...). Il est de ce fait important de connaître les niveaux d'exposition à l'ensemble des HAP et non au B[a]P seul comme ceci est trop souvent le cas en France. Ceci s'explique par l'existence d'une seule valeur limite recommandée à ne pas dépasser pour le B[a]P.

Mais bien d'autres facteurs peuvent également intervenir dans l'absorption cutanée, le métabolisme et la toxicité des HAP tels que^o:

- L'inflammation. Les HAP et les UV induisent une inflammation locale, qui s'accompagne d'un œdème et d'un afflux sanguin accru, mais aussi une hyperperméabilité de la paroi des capillaires (Dreij et al. 2010; Huggenberger and Detmar 2011; Nicolaou et al. 2011). Des travaux complémentaires devraient être menés sur des modèles plus complexes pour caractériser l'impact de l'inflammation sur l'absorption et le métabolisme des HAP, puisque d'une part l'afflux sanguin local influence l'absorption des xénobiotiques (Farahmand and Maibach 2009), et d'autre part l'inflammation réduit l'expression des CYP450 (Zanger and Schwab 2013).
- L'alimentation. En effet, la peau stocke des composés apportés par l'alimentation, tels que les vitamines E et C (Richelle et al. 2009). Cette distribution des nutriments dans la peau n'est pas anodine, puisque les régimes alimentaires riches en antioxydants et en composés phytochimiques sont associés à une diminution de l'incidence des cancers et notamment des cancers cutanés (Steinmetz and Potter 1996; Vinceti et al. 2007). Ces composés, à l'exemple des allyles sulfides contenus dans l'ail, pourrait atténuer la cancérogénicité cutanée des HAP étant donné qu'ils réduisent la quantité d'adduits au BPDE au sein de kératinocytes primaires, par inhibition de l'activité des CYP450 (Chun et al. 2004).
- Les médicaments. La bioactivation des HAP et la liaison des métabolites réactifs aux macromolécules pourraient être largement affectées par des interactions entre xénobiotiques. Le vérapamil, la probénécide ou le PSC833, médicaments inhibiteurs des transporteurs ABC, augmentent ainsi la liaison du BPDE avec l'ADN, tandis que le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) induit l'expression du MRP4 et diminue la toxicité du B[a]P (Gelhaus et al. 2012; Myllynen et al. 2007).

- Le microbiote. De plus en plus de recherches dévoilent la capacité du microbiote à moduler l'état physiologique de l'hôte. Cet impact est tel que l'influence du microbiote sur la toxicité des xénobiotiques est progressivement prise en considération. Récemment, la perturbation du microbiote intestinal a été associée à une altération de la biotransformation et de la toxicité hépatique de l'arsenic (Chi et al. 2018). Le microbiote cutané ne déroge pas à la règle puisque certaines espèces tels que *Micrococcus luteus* et *Bacillus licheniformis* sont capables de dégrader et de bioactiver les HAP (Sowada et al. 2017; Sowada et al. 2014). De fait, l'importance et l'influence de la flore commensale cutanée sur l'absorption cutanée et la bioactivation des HAP devront être déterminées.

En milieu professionnel mais aussi environnemental, la voie cutanée est une voie d'exposition à de nombreux xénobiotiques. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail démontre la pertinence du modèle d'exposition cutané développé pour déterminer le devenir des HAP au sein de la peau. Ce modèle ainsi que les méthodes développées au cours de ce travail pourraient être adaptés à l'étude de nombreux autres xénobiotiques : composés organiques, métaux lourds...

Références bibliographiques

- Abdel-Shafy HI, Mansour MSM (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25(1):107-123 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Ademola JI, Sedik LE, Wester RC, Maibach HI (1993a) In vitro percutaneous absorption and metabolism in man of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamine-s-triazine (Atrazine). *Archives of Toxicology* 67(2):85-91 doi:10.1007/BF01973676
- Ademola JI, Wester RC, Maibach HI (1993b) Absorption and Metabolism of 2-Chloro-2,6-diethyl-N-(butoxymethyl)acetanilide (Butachlor) in Human Skin in Vitro. *Toxicology and applied pharmacology* 121(1):78-86 doi:<https://doi.org/10.1006/taap.1993.1131>
- AFSSE, IVS, AFSSAPS (2005) Ultra-violets - Etat des connaissances sur l'exposition et les risques sanitaires. p 191
- Akllillu E, Øvrebø S, Botnen IV, Otter C, Ingelman-Sundberg M (2005) Characterization of Common CYP1B1 Variants with Different Capacity for Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol Epoxide Formation from Benzo[a]pyrene. *Cancer research* 65(12):5105-5111 doi:10.1158/0008-5472.can-05-0113
- Albert MR, Ostheimer KG (2002) The evolution of current medical and popular attitudes toward ultraviolet light exposure: Part 1. *Journal of the American Academy of Dermatology* 47(6):930-937 doi:10.1067/mjd.2002.127254
- Albert MR, Ostheimer KG (2003a) The evolution of current medical and popular attitudes toward ultraviolet light exposure: Part 2. *Journal of the American Academy of Dermatology* 48(6):909-918 doi:10.1067/mjd.2003.272
- Albert MR, Ostheimer KG (2003b) The evolution of current medical and popular attitudes toward ultraviolet light exposure: part 3. *Journal of the American Academy of Dermatology* 49(6):1096-1106 doi:10.1016/S0190-9622(03)00021-5
- Ali D, Verma A, Mujtaba F, Dwivedi A, Hans RK, Ray RS (2011) UVB-induced apoptosis and DNA damaging potential of chrysene via reactive oxygen species in human keratinocytes. *Toxicology letters* 204(2):199-207 doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.04.033>
- Alomirah H, Al-Zenki S, Al-Hooti S, et al. (2011) Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control* 22(12):2028-2035 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.024>
- Amin S, Huie K, Hecht SS (1985) Mutagenicity and tumor initiating activity of methylated benzo[b]fluoranthenes. *Carcinogenesis* 6(7):1023-5

- Amin S, Hussain N, Brielmann H, Hecht SS (1984) A study of chemical carcinogenesis. 57. Synthesis and mutagenicity of dihydrodiol metabolites of benzo[b]fluoranthene. *The Journal of Organic Chemistry* 49(6):1091-1095 doi:10.1021/jo00180a026
- Amin S, LaVoie EJ, Hecht SS (1982) Identification of metabolites of benzo[b]fluoranthene. *Carcinogenesis* 3(2):171-4
- Andersson JT, Achten C (2015) Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycyclic Aromatic Compounds* 35(2-4):330-354 doi:10.1080/10406638.2014.991042
- Angerer J, Ewers U, Wilhelm M (2007) Human biomonitoring: State of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 210(3):201-228 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.01.024>
- Angerer J, Mannschreck C, Gundel J, Institute, Clinic of Occupational S, Environmental Medicine of the University of Erlangen Nürnberg. Erlangen DEU (1997) Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant : biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene. *International archives of occupational and environmental health* 69(5):323-331
- Araujo R, Dyer RS, Fortmann RC, et al. (2009) A Conceptual Framework for U.S. EPA's National Exposure Research Laboratory. vol EPA/600/R-09/003 (NTIS PB2010-103951). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- ATSDR (1995) Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: U.S:Department of Health and Human Services, Public Health Service
- Autrup H, Harris CC, Trump BF, Jeffrey AM (1978) Metabolism of Benzo(a)pyrene and Identification of the Major Benzo(a)pyrene-DNA Adducts in Cultured Human Colon. *Cancer research* 38(11 Part 1):3689-3696
- Backhaus T, Blanck H, Faust M (2010) Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH State of the Art, Gaps and Options for Improvement Swedish Chemicals Agency—www. kemi. se Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH State of the Art, Gaps and Options for Improv.
- Baek SO, Goldstone ME, Kirk PWW, Lester JN, Perry R (1991) Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere. *Chemosphere* 22(5):503-520 doi:[https://doi.org/10.1016/0045-6535\(91\)90062-I](https://doi.org/10.1016/0045-6535(91)90062-I)

- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and molecular mutagenesis* 45(2-3):106-114 doi:doi:10.1002/em.20095
- Barba C, Alonso C, Martí M, Manich A, Coderch L (2016) Skin barrier modification with organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858(8):1935-1943 doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.05.009
- Barbeau D (2013) 3-hydroxybenzo(a)pyrene as biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Université de Grenoble
- Barbeau D, Lutier S, Choisnard L, Marques M, Persoons R, Maitre A (2017) Urinary trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene as the most relevant biomarker for assessing carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons exposure. *Environ Int* 112:147-155 doi:10.1016/j.envint.2017.12.012
- Barbeau D, Maitre A, Marques M (2011) Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst* 136(6):1183-1191 doi:10.1039/C0AN00428F
- Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R (2012) Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology* 30(3):257-262 doi:https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K (2000) Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 9(1):3-28
- Bartsch N, Heidler J, Vieth B, Hutzler C, Luch A (2016) Skin permeation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A solvent-based in vitro approach to assess dermal exposures against benzo[a]pyrene and dibenzopyrenes. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 13(12):969-979 doi:10.1080/15459624.2016.1200724
- Berardesca E, Maibach H (2003) Ethnic skin: Overview of structure and function. *Journal of the American Academy of Dermatology* 48(6, Supplement):S139-S142 doi:https://doi.org/10.1067/mjd.2003.273
- Beriro DJ, Cave MR, Wragg J, Thomas R, Wills G, Evans F (2016) A review of the current state of the art of physiologically-based tests for measuring human dermal in vitro bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil. *Journal of Hazardous Materials* 305:240-259 doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.010

- Berry N, Charmeil C, Goujon C, et al. (2001) A Clinical, Biometrological and Ultrastructural Study of Xerotic Skin. *International Journal of Cosmetic Science* 21(4):241-252 doi:10.1046/j.1467-2494.1999.196570.x
- Bertram TA, Ludlow JW, Basu J, Muthupalani S (2013) Chapter 56 - Digestive Tract A2 - Haschek, Wanda M. In: Rousseaux CG, Wallig MA (eds) *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*. Academic Press, Boston, p 2277-2359
- Biniek K, Levi K, Dauskardt RH (2012) Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(42):17111-6 doi:10.1073/pnas.1206851109
- Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, et al. (2007) PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 620(1):49-61 doi:https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.02.022
- Bláha L, Kapplová P, Vondráček J, Upham B, Machala M (2002) Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicological Sciences* 65(1):43-51
- Blanpain C, Fuchs E (2006) Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annual review of cell and developmental biology* 22:339-373 doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104357
- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes & Control* 8(3):444-472 doi:10.1023/a:1018465507029
- Boniol M, Koechlin A, Boniol M, et al. (2015) Occupational UV Exposure in French Outdoor Workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 57(3):315-320 doi:10.1097/jom.0000000000000354
- Bos JD, Meinardi MMHM (2000) The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology* 9(3):165-169 doi:doi:10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x
- Boström C-E, Gerde P, Hanberg A, et al. (2002) Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives* 110(Suppl 3):451-488
- Botta C, Di Giorgio C, Sabatier AS, De Meo M (2009) Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzo[a]pyrene and pyrene. *Environ Toxicol* 24(5):492-505 doi:10.1002/tox.20455

- Bouchard M, Normandin L, Gagnon F, et al. (2009) Repeated measures of validated and novel biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in individuals living near an aluminum plant in Quebec, Canada. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 72(23):1534-49 doi:10.1080/15287390903129481
- Bourguet CC, Checkoway H, Hulka BS (1987) A case-control study of skin cancer in the tire and rubber manufacturing industry. *American Journal of Industrial Medicine* 11(4):461-473 doi:doi:10.1002/ajim.4700110409
- Bouwstra JA, Gooris GS, Vries MAS-d, van der Spek JA, Bras W (1992) Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study. *International Journal of Pharmaceutics* 84(3):205-216 doi:https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90158-X
- Boylard E, Sims P (1965) The metabolism of benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene and their 5,6-epoxy-5,6-dihydro derivatives by rat-liver homogenates. *The Biochemical journal* 97(1):7-16
- Braithwaite E, Wu X, Wang Z (1998) Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis* 19(7):1239-1246
- Brandt HCA, Watson WP (2003) Monitoring Human Occupational and Environmental Exposures to Polycyclic Aromatic Compounds. *The Annals of occupational hygiene* 47(5):349-378 doi:10.1093/annhyg/meg052
- Brinkmann J, Stolpmann K, Trappe S, et al. (2013) Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 131(2):351-9 doi:10.1093/toxsci/kfs316
- Bronaugh RL, Maibach HI (2005) *Percutaneous Absorption: Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*. CRC Press, Boca Raton
- Bronaugh RL, Stewart RF (1985a) Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *Journal of pharmaceutical sciences* 74(1):64-7
- Bronaugh RL, Stewart RF (1985b) Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies V: Permeation Through Damaged Skin. *Journal of pharmaceutical sciences* 74(10):1062-1066 doi:http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600741008
- Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER, Giles AL (1982) Methods for in vitro percutaneous absorption studies I. Comparison with in vivo results. *Toxicology and applied pharmacology* 62(3):474-480 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(82)90148-X

- Bronaugh RL, Stewart RF, Storm JE (1989) Extent of cutaneous metabolism during percutaneous absorption of xenobiotics. *Toxicology and applied pharmacology* 99(3):534-543 doi:[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(89\)90160-9](https://doi.org/10.1016/0041-008X(89)90160-9)
- Buening MK, Levin W, Wood AW, et al. (1980) Tumorigenic activity of benzo(e)pyrene derivatives on mouse skin and in newborn mice. *Cancer research* 40(2):203-6
- Buening MK, Levin W, Wood AW, et al. (1979) Tumorigenicity of the dihydrodiols of dibenzo(a,h)anthracene on mouse skin and in newborn mice. *Cancer research* 39(4):1310-4
- Buesen R, Mock M, Nau H, Seidel A, Jacob J, Lampen A (2003) Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo[a]pyrene metabolites. *Chemico-Biological Interactions* 142(3):201-221 doi:[https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00076-5)
- Burczynski ME, Lin H-K, Penning TM (1999) Isoform-specific Induction of a Human Aldo-Keto Reductase by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Electrophiles, and Oxidative Stress: Implications for the Alternative Pathway of PAH Activation Catalyzed by Human Dihydrodiol Dehydrogenase. *Cancer research* 59(3):607-614
- Burczynski ME, Penning TM (2000) Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ortho-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer research* 60(4):908-915
- Busbee DL, Norman JO, Ziprin RL (1990) Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Archives of Toxicology* 64(4):285-290 doi:10.1007/bf01972988
- Campo L, Rossella F, Fustinoni S (2008) Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 875(2):531-40 doi:10.1016/j.jchromb.2008.10.017
- Campo L, Rossella F, Pavanello S, et al. (2010) Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers. *Toxicology letters* 192(1):72-8
- Castro D, Slezakova K, Delerue-Matos C, Alvim-Ferraz MdC, Morais S, Pereira MdC (2011) Polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particulate phases of indoor environments influenced by tobacco smoke: Levels, phase distributions, and health risks. *Atmospheric Environment* 45(10):1799-1808 doi:<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.01.018>
- Cavalieri EL, Rogan EG (1992) The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation.

- Cavalieri EL, Rogan EG, Cremonesi P, Devanesan PD (1988) Radical cations as precursors in the metabolic formation of quinones from benzo[a]pyrene and 6-fluorobenzo[a]pyrene: Fluoro substitution as a probe for one-electron oxidation in aromatic substrates. *Biochemical Pharmacology* 37(11):2173-2182 doi:[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90578-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90578-3)
- Celleno L, Tamburi F (2009) Chapter 1 - Structure and Function of the Skin A2 - Tabor, Aaron. In: Blair RM (ed) *Nutritional Cosmetics*. William Andrew Publishing, Boston, p 3-45
- Chaloupka K, Steinberg M, Santostefano M, Rodriguez LV, Goldstein L, Safe S (1995) Induction of Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice. *Chemico-Biological Interactions* 96(3):207-221 doi:[https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)03586-W](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)03586-W)
- Chang RL, Levin W, Wood AW, et al. (1981) Tumorigenicity of the diastereomeric bay-region benzo(e)pyrene 9,10-diol-11,12-epoxides in newborn mice. *Cancer research* 41(3):915-8
- Chen M-R, Tsai P-J, Wang Y-F (2008) Assessing inhalatory and dermal exposures and their resultant health-risks for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contained in oil mists in a fastener manufacturing industry. *Environment International* 34(7):971-975 doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.02.008>
- Chi L, Xue J, Tu P, Lai Y, Ru H, Lu K (2018) Gut microbiome disruption altered the biotransformation and liver toxicity of arsenic in mice. *Archives of Toxicology* doi:[10.1007/s00204-018-2332-7](https://doi.org/10.1007/s00204-018-2332-7)
- Chipman JK, Hirom PC, Frost GS, Millburn P (1981) The biliary excretion and enterohepatic circulation of benzo (a)pyrene and its metabolites in the rat. *Biochemical Pharmacology* 30(9):937-944 doi:[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(81\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(81)90037-X)
- Chu I, Dick D, Bronaugh R, Tryphonas L (1996) Skin reservoir formation and bioavailability of dermally administered chemicals in hairless guinea pigs. *Food and Chemical Toxicology* 34(3):267-276 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00112-3](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(95)00112-3)
- Chuang JC, Callahan PJ, Lyu CW, Wilson NK (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 9(2):85-98

- Chun HS, Kim HJ, Kim Y, Chang HJ (2004) Inhibition of the benzo[a]pyrene-induced toxicity by allyl sulfides in human epidermal keratinocytes. *Biotechnology Letters* 26(22):1701-1706 doi:10.1007/s10529-004-3738-2
- CIR (2008) Final Safety Assessment of Coal Tar as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology* 27(2_suppl):1-24 doi:10.1080/10915810802244405
- Cooper CS, Ribeiro O, Hewer A, et al. (1980) The involvement of a 'bay-region' and a non-'bay-region' diol-epoxide in the metabolic activation of benz(a)anthracene in mouse skin and in hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 1(3):233-243 doi:10.1093/carcin/1.3.233
- Crebelli R, Carta P, Andreoli C, et al. (2002) Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 516(1):63-70 doi:https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00028-1
- Cremonesi P, Cavalieri EL, Rogan EG (1989) One-electron oxidation of 6-substituted benzo[a]pyrenes by manganic acetate. A model for metabolic activation. *The Journal of Organic Chemistry* 54(15):3561-3570 doi:10.1021/jo00276a013
- Cui L, Jia Y, Cheng Z-W, et al. (2016) Advancements in the maintenance of skin barrier/skin lipid composition and the involvement of metabolic enzymes. *Journal of Cosmetic Dermatology* 15(4):549-558 doi:10.1111/jocd.12245
- Dankovic DA, Wright CW, Zangar RC, Springer DL (1989) Complex mixture effects on the dermal absorption of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons from mouse skin. *Journal of applied toxicology : JAT* 9(4):239-44
- Denda M (2015) Epidermis as the "Third Brain"? *Dermatologica Sinica* 33(2):70-73 doi:https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.04.011
- Denda M, Nakatani M, Ikeyama K, Tsutsumi M, Denda S (2007) Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. *Experimental Dermatology* 16(3):157-161 doi:doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00529.x
- Denissenko MF, Pao A, Tang M-s, Pfeifer GP (1996) Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53. *Science* 274(5286):430-432 doi:10.1126/science.274.5286.430
- Dickel H, Blome O, Dickel B, Bruckner T, Stockfleth E, Soemantri SP (2016) Occupational syncarcinogenesis in the skin – combined effects of two carcinogens from the German occupational disease list. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 14(12):1284-1296 doi:10.1111/ddg.13003

- Diffey BL (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28(1):4-13 doi:[https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00204-9](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00204-9)
- Diffey BL, Elwood JM (1994) Tables of ambient solar ultraviolet radiation for use in epidemiological studies of malignant melanoma and other diseases. In: Gallagher RP, Elwood JM (eds) *Epidemiological Aspects of Cutaneous Malignant Melanoma*. Springer US, Boston, MA, p 81-105
- Dong S, Hwang HM, Harrison C, Holloway L, Shi X, Yu H (2000) UVA light-induced DNA cleavage by selected polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 64(4):467-474
- Douki T, Ksoury Z, Marie C, Favier A, Ravanat J-L, Maitre A (2008) Genotoxicity of Combined Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and UVA—A Mechanistic Study. *Photochemistry and Photobiology* 84(5):1133-1140 doi:[doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00361.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00361.x)
- Dreij K, Rhrissorrakrai K, Gunsalus KC, Geacintov NE, Scicchitano DA (2010) Benzo[a]pyrene diol epoxide stimulates an inflammatory response in normal human lung fibroblasts through a p53 and JNK mediated pathway. *Carcinogenesis* 31(6):1149-1157 doi:[10.1093/carcin/bgq073](https://doi.org/10.1093/carcin/bgq073)
- Dréno B (2009) Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 136(Supplement 6):S247-S251 doi:[https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(09\)72527-X](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(09)72527-X)
- Driskell RR, Jahoda CAB, Chuong C-M, Watt FM, Horsley V (2014) Defining dermal adipose tissue. *Experimental Dermatology* 23(9):629-631 doi:[doi:10.1111/exd.12450](https://doi.org/10.1111/exd.12450)
- Ebert B, Seidel A, Lampen A (2005) Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 26(10):1754-1763 doi:[10.1093/carcin/bgi139](https://doi.org/10.1093/carcin/bgi139)
- Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W (2013) Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(12):3471-3480 doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.010>
- Ehrenhauser FS (2015) PAH and IUPAC Nomenclature. *Polycyclic Aromatic Compounds* 35(2-4):161-176 doi:[10.1080/10406638.2014.918551](https://doi.org/10.1080/10406638.2014.918551)
- Ekunwe SIN, Hunter RD, Hwang H-M (2005) Ultraviolet radiation increases the toxicity of pyrene, 1-aminopyrene and 1-hydroxypyrene to human keratinocytes. *International journal of environmental research and public health* 2(1):58-62

- Erbagci Z, Erkiliç S (2002) Can smoking and/or occupational UV exposure have any role in the development of the morpheiform basal cell carcinoma? A critical role for peritumoral mast cells. *International Journal of Dermatology* 41(5):275-278 doi:doi:10.1046/j.1365-4362.2002.01487.x
- Esteban M, Castaño A (2009) Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environment International* 35(2):438-449 doi:https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.09.003
- Fallone F, Villard P-H, Decome L, et al. (2005) PPAR α activation potentiates AhR-induced CYP1A1 expression. *Toxicology* 216(2):122-128 doi:https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.07.020
- Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI (2007) Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 26(4):343-357 doi:10.1080/15569520701622951
- Farahmand S, Maibach HI (2009) Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. *International Journal of Pharmaceutics* 367(1–2):1-15 doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.11.020
- Feingold KR, Elias PM (2014) Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841(3):280-294 doi:https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.007
- Feldmann RJ, Maibach H (1967) Feldman RJ, Maibach HI Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisol in man. *J Invest Dermatol* 48:181-183, vol 48,
- Fent KW, Eisenberg J, Snawder J, et al. (2014) Systemic Exposure to PAHs and Benzene in Firefighters Suppressing Controlled Structure Fires. *Annals of Occupational Hygiene* 58(7):830-845 doi:10.1093/annhyg/meu036
- Feo F, Pirisi L, Pascale R, et al. (1984) Modulatory mechanisms of chemical carcinogenesis: the role of the NADPH pool in the benzo(a)pyrene activation. *Toxicol Pathol* 12(3):261-8 doi:10.1177/019262338401200309
- Fernando S, Shaw L, Shaw D, et al. (2016) Evaluation of Firefighter Exposure to Wood Smoke during Training Exercises at Burn Houses. *Environmental Science & Technology* 50(3):1536-1543 doi:10.1021/acs.est.5b04752
- Flaten GE, Palac Z, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Ž, Škalko-Basnet N (2015) In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 75:10-24 doi:https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.018

Flecknell P (2002) Replacement, reduction and refinement. *Altex* 19(2):73-78

Förster K, Preuss R, Roßbach B, Brüning T, Angerer J, Simon P (2008) 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occupational and environmental medicine* 65(4):224-229 doi:10.1136/oem.2006.030809

Fu PP, Xia Q, Sun X, Yu H (2012) Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 30(1):1-41 doi:10.1080/10590501.2012.653887

Fustinoni S, Campo L, Cirila PE, et al. (2010) Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in asphalt workers. *Occupational and environmental medicine* 67(7):456-463 doi:10.1136/oem.2009.050344

Gattu S, Maibach HI (2010) Enhanced Absorption through Damaged Skin: An Overview of the in vitro Human Model. *Skin Pharmacology and Physiology* 23(4):171-176

Geddie JE, Amin S, Huie K, Hecht SS (1987) Formation and tumorigenicity of benzo[b]fluoranthene metabolites in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 8(11):1579-84

Gelhaus SL, Gilad O, Hwang W-T, Penning TM, Blair IA (2012) Multidrug resistance protein (MRP) 4 attenuates benzo[a]pyrene-mediated DNA-adduct formation in human bronchoalveolar H358 cells. *Toxicology letters* 209(1):58-66 doi:https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.021

Gelis C, Mavon A, Delverdier M, Paillous N, Vicendo P (2002) Modifications of in vitro skin penetration under solar irradiation: evaluation on flow-through diffusion cells. *Photochem Photobiol* 75(6):598-604

Genies C, Maître A, Lefèbre E, Jullien A, Chopard-Lallier M, Douki T (2013) The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs. *PloS one* 8(11):e78356 doi:10.1371/journal.pone.0078356

Gibb HJ, Chen CW (1986) Multistage Model Interpretation of Additive and Multiplicative Carcinogenic Effects1. *Risk Analysis* 6(2):167-170 doi:doi:10.1111/j.1539-6924.1986.tb00204.x

Gies HP, Roy CR, Toomey S, MacLennan R, Watson M (1995) Solar UVR Exposures of Three Groups of Outdoor Workers on the Sunshine Coast, Queensland. *Photochemistry and Photobiology* 62(6):1015-1021 doi:doi:10.1111/j.1751-1097.1995.tb02402.x

- Glatt H, Seidel A, Bochnitschek W, et al. (1986) Mutagenic and cell-transforming activities of triol-epoxides as compared to other chrysene metabolites. *Cancer research* 46(9):4556-65
- Gonzalez MC, Marteau C, Franchi J, Migliore-Samour D (2008) Cytochrome P450 4A11 expression in human keratinocytes: effects of ultraviolet irradiation. *British Journal of Dermatology* 145(5):749-757 doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04490.x
- Grainger J, Huang W, Patterson DG, Jr., et al. (2006) Reference range levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in the US population by measurement of urinary monohydroxy metabolites. *Environmental research* 100(3):394-423 doi:10.1016/j.envres.2005.06.004
- Grimaldi G, Rajendra S, Matthews J (2018) The aryl hydrocarbon receptor regulates the expression of TIPARP and its cis long non-coding RNA, TIPARP-AS1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495(3):2356-2362 doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.113
- Grimmer G, Dettbarn G, Naujack KW, Jacob J (1991) Excretion of Hydroxy Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of the Masses 178, 202, 228 and 252 in the Urine of Coke and Road Workers. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 43(2-3):177-186 doi:10.1080/03067319108026974
- Grimmer G, Jacob J, Dettbarn G, Naujack KW (1997) Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *International archives of occupational and environmental health* 69(4):231-9
- Grova N, Salquebre G, Appenzeller BM (2013) Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 52 monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in hairs of rats after controlled exposure. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405(27):8897-911 doi:10.1007/s00216-013-7317-z
- Grova N, Salquebre G, Schroeder H, Appenzeller BM (2011) Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. *Chemical research in toxicology* 24(10):1653-67 doi:10.1021/tx2003596
- Grubauer G, Feingold KR, Elias PM (1987) Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function. *Journal of Lipid Research* 28(6):746-52
- Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, et al. (2006) Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Annales de Biologie Clinique* 64(6):13 doi:10.1684/abc.2006.0015

- Gundel J, Angerer J (2000) High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenz[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 738(1):47-55
- Győrffy E, Anna L, Győri Z, et al. (2004) DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by ³²P-postlabelling and immunoassay. *Carcinogenesis* 25(7):1201-1209 doi:10.1093/carcin/bgh131
- Hadgraft J, Lane ME (2005) Skin permeation: The years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics* 305(1):2-12 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.07.014
- Hall M, Parker DK, Hewer AJ, Phillips DH, Grover PL (1988) Further metabolism of diol-epoxides of chrysene and dibenz[a,c]anthracene to DNA binding species as evidenced by ³²P-postlabelling analysis. *Carcinogenesis* 9(5):865-8
- Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57(5):715S-725S doi:10.1093/ajcn/57.5.715S
- Harvey RG (1981) Activated metabolites of carcinogenic hydrocarbons. *Accounts of Chemical Research* 14(7):218-226 doi:10.1021/ar00067a004
- Harvey RG (2011) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Chemistry and Carcinogenicity*. Cambridge Monographs on Cancer Research
- Hecht SS, Carmella SG, Villalta PW, Hochalter JB (2010) Analysis of Phenanthrene and Benzo[a]pyrene Tetraol Enantiomers in Human Urine: Relevance to the Bay Region Diol Epoxide Hypothesis of Benzo[a]pyrene Carcinogenesis and to Biomarker Studies. *Chemical research in toxicology* 23(5):900-908 doi:10.1021/tx9004538
- Hecht SS, Rivenson A, Amin S, et al. (1996) Mammary carcinogenicity of diol epoxide metabolites of benzo[j]fluoranthene in female CD rats. *Cancer letters* 106(2):251-5
- Henriksen T, Dahlback A, Larsen SHH, Moan J (1990) Ultraviolet-radiation and skin cancer. Effect of an ozone layer depletion. *Photochemistry and Photobiology* 51(5):579-582 doi:doi:10.1111/j.1751-1097.1990.tb01968.x
- Hessel S, Lampen A, Seidel A (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons in food – Efflux of the conjugated biomarker 1-hydroxypyrene is mediated by Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 62:797-804 doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.007

- Hodgson RM, Seidel A, Bochnitschek W, Glatt HR, Oesch F, Grover PL (1986) Metabolism of the bay-region diol-epoxide of chrysene to a triol-epoxide and the enzyme-catalysed conjugation of these epoxides with glutathione. *Carcinogenesis* 7(12):2095-8
- Hodgson RM, Weston A, Grover PL (1983) Metabolic activation of chrysene in mouse skin: evidence for the involvement of a triol-epoxide. *Carcinogenesis* 4(12):1639-43
- Hopf NB, Carreón T, Talaska G (2009) Biological Markers of Carcinogenic Exposure in the Aluminum Smelter Industry—A Systematic Review. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 6(9):562-581 doi:10.1080/15459620903094810
- Hopf NB, Spring P, Hirt-Burri N, et al. (2018) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) skin permeation rates change with simultaneous exposures to solar ultraviolet radiation (UV-S). *Toxicology letters* 287:122-130 doi:https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.024
- Hsu WT, Lin EJ, Fu PP, Harvey RG, Weiss SB (1979) Comparative reactivities of diolepoxide metabolites of carcinogenic hydrocarbons with ØX174 viral DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88(1):251-257 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(79)91723-6
- Huggenberger R, Detmar M (2011) The Cutaneous Vascular System in Chronic Skin Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 15(1):24-32 doi:10.1038/jidsymp.2011.5
- Hung CF, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Yang SY, Fang JY (2012) Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. *Journal of dermatological science* 68(3):135-48 doi:10.1016/j.jdermsci.2012.09.005
- Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, et al. (2004) GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *International Journal of Cancer* 110(4):598-604 doi:doi:10.1002/ijc.20157
- Hwa C, Bauer EA, Cohen DE (2011) Skin biology. *Dermatologic Therapy* 24(5):464-470 doi:doi:10.1111/j.1529-8019.2012.01460.x
- IARC (1985) Polynuclear Aromatic Compounds, Part 4, Bitumens, Coal-tars and Derived Products, Shale-oils and Soots, vol 35. World Health Organization
- IARC (1992) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Solar and ultraviolet radiation. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to

humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 55:1-316

IARC (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, vol 82. World Health Organization

IARC (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 92:1-853

IARC (2012) Radiation. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 100(Pt D):7-303

IARC (2013) Bitumens and bitumen emissions, and some N-and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons, vol 103. World Health Organization

Ibrahim SA, Li SK (2009) Effects of solvent deposited enhancers on transdermal permeation and their relationship with Emax. *Journal of Controlled Release* 136(2):117-124 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.023>

ICNIRP (2004) Guidelines on Limits of Exposure to Ultraviolet Radiation of Wavelength between 180 nm and 400 nm (Incoherent Optical Radiation). *Health Physics* 87(2):171-186

ICNIRP (2010) ICNIRP statement-Protection of Workers Against Ultraviolet Radiation. *Health Physics* 99(1):66-87 doi:[10.1097/HP.0b013e3181d85908](https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181d85908)

Ifegwu OC, Anyakora C (2015) Chapter Six - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part I. Exposure. In: Makowski GS (ed) *Advances in Clinical Chemistry*. vol 72. Elsevier, p 277-304

Iliakis G, Wang H, Perrault AR, et al. (2004) Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenetic and Genome Research* 104(1-4):14-20 doi:[10.1159/000077461](https://doi.org/10.1159/000077461)

Ingram AJ, Lee R, Phillips JC (1995) Factors affecting the bioavailability of benzo[a]pyrene from oils in mouse skin: Oil viscosity, grooming, activity and its prevention. *Journal of Applied Toxicology* 15(3):175-182 doi:[10.1002/jat.2550150307](https://doi.org/10.1002/jat.2550150307)

Ingram AJ, Phillips JC (1993) The dermal bioavailability of radiolabelled benzo[a]pyrene from acetone or from oils of differing viscosity, assessed by DNA and protein binding. *Journal of Applied Toxicology* 13(1):25-32 doi:[10.1002/jat.2550130107](https://doi.org/10.1002/jat.2550130107)

- Intarakumhaeng R, Li SK (2014) Effects of solvent on percutaneous absorption of nonvolatile lipophilic solute. *International Journal of Pharmaceutics* 476(1–2):266-276 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.034>
- J. Carrell C, Carrell H, Glusker J, Abu-Shaqara E, Cortez C, Harvey R (1995) Bay- and fjord-region distortions in dibenz[a,j]anthracene and tetrabenz[de,hi,mn,qr]naphthacene, vol 15,
- Jacob J, Grimmer G, Raab G, Emura M, Riebe M, Mohr U (1987) Comparison of chrysene metabolism in epithelial human bronchial and Syrian hamster lung cells. *Cancer letters* 38(1-2):171-80
- Jacob J, Schmoldt A, Grimmer G (1983) Benzo[e]pyrene metabolism in rat liver microsomes: dependence of the metabolite profile on the pretreatment of rats with various monooxygenase inducers. *Carcinogenesis* 4(7):905-10
- Jacobi U, Kaiser M, Toll R, et al. (2007) Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology* 13(1):19-24 doi:[doi:10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x)
- Jacques C, Perdu E, Dorio C, Bacqueville D, Mavon A, Zalko D (2010a) Percutaneous absorption and metabolism of [14C]-ethoxycoumarin in a pig ear skin model. *Toxicology in Vitro* 24(5):1426-1434 doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.006>
- Jacques C, Perdu E, Duplan H, et al. (2010b) Disposition and biotransformation of 14C-Benzo(a)pyrene in a pig ear skin model: ex vivo and in vitro approaches. *Toxicology letters* 199(1):22-33 doi:[10.1016/j.toxlet.2010.08.001](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.08.001)
- Jacques C, Perdu E, Jamin EL, et al. (2014) Effect of Skin Metabolism on Dermal Delivery of Testosterone: Qualitative Assessment using a New Short-Term Skin Model. *Skin Pharmacology and Physiology* 27(4):188-188
- Jakasa I, Kezic S, Boogaard PJ (2015) Dermal uptake of petroleum substances. *Toxicology letters* 235(2):123-139 doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.03.012>
- James P. Whitlock J (1999) Induction of Cytochrome P4501A1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39(1):103-125 doi:[10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103](https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103)
- Jarvis IWH, Dreij K, Mattsson Å, Jernström B, Stenius U (2014) Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology* 321:27-39 doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.012>
- Jernström B, Funk M, Frank H, Mannervik B, Seidel A (1996) CARCINOGENESIS: Glutathione S-transferase A1–1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol

- epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione. *Carcinogenesis* 17(7):1491-1498 doi:10.1093/carcin/17.7.1491
- Jiang SJ, Chen JY, Lu ZF, Yao J, Che DF, Zhou XJ (2006) Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. *Journal of dermatological science* 44(1):29-36 doi:10.1016/j.jdermsci.2006.05.012
- Jiang SJ, Chu AW, Lu ZF, Pan MH, Che DF, Zhou XJ (2007) Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. *Exp Dermatol* 16(12):985-92 doi:10.1111/j.1600-0625.2007.00619.x
- Jongeneelen FJ (2001) Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Annals of occupational hygiene* 45(1):3-13 doi:10.1093/annhyg/45.1.3
- Kammer R, Tinnerberg H, Eriksson K (2011) Evaluation of a tape-stripping technique for measuring dermal exposure to pyrene and benzo(a)pyrene. *Journal of Environmental Monitoring* 13(8):2165-2171 doi:10.1039/C1EM10245A
- Kao J, Hall J, Helman G (1988) In vitro percutaneous absorption in mouse skin: influence of skin appendages. *Toxicology and applied pharmacology* 94(1):93-103
- Kao J, Patterson FK, Hall J (1985) Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicology and applied pharmacology* 81(3 Pt 1):502-16
- Karan A, Alikhan A, Maibach HI (2009) Toxicologic implications of cutaneous barriers: a molecular, cellular, and anatomical overview. *Journal of Applied Toxicology* 29(7):551-559 doi:doi:10.1002/jat.1461
- Kasemsarn P, Bosco J, Nixon RL (2016) The role of the skin barrier in occupational skin diseases *Skin Barrier Function*. vol 49. Karger Publishers, p 135-143
- Katiyar SK, Mukhtar H, Matsui MS (2000) Ultraviolet-B Exposure of Human Skin Induces Cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Journal of Investigative Dermatology* 114(2):328-333 doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00876.x
- Kim JH, H SK, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT, Sutter TR (1999) Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 20(3):515-515 doi:10.1093/carcin/20.3.515

- King HWS, Thompson MH, Brookes P (1976) The role of 9-hydroxybenzo(a)pyrene in the microsome mediated binding of benzo(a)pyrene to dna. *International Journal of Cancer* 18(3):339-344 doi:doi:10.1002/ijc.2910180311
- Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C (2011) Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 3(6):366 doi:10.1097/JDN.0b013e31823cccbe
- Korting HC, Schäfer-Korting M (2010) Carriers in the Topical Treatment of Skin Disease. In: Schäfer-Korting M (ed) *Drug Delivery*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 435-468
- Kubasiewicz M, Starzynski Z (1989) Case-referent study on skin cancer and its relation to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. I. Study design. *POL J OCCUP MED* 2(3):221-228
- Kubasiewicz M, Starzynski Z, Szymczak W (1991) Case-referent study on skin cancer and its relation to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. II. Study results. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 4(2):141-147
- Labib S, Williams A, Guo CH, et al. (2016) Comparative transcriptomic analyses to scrutinize the assumption that genotoxic PAHs exert effects via a common mode of action. *Archives of Toxicology* 90(10):2461-2480 doi:10.1007/s00204-015-1595-5
- Lahmann C, Young AR, Wittern K-P, Bergemann J (2001) Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation¶. *Photochemistry and Photobiology* 73(6):657-663 doi:doi:10.1562/0031-8655(2001)0730657IOMFMM2.0.CO2
- Lan Q, Mumford JL, Shen M, et al. (2004) Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis* 25(11):2177-2181 doi:10.1093/carcin/bgh240
- LaVoie EJ, Amin S, Hecht SS, Furuya K, Hoffmann D (1982) Tumour initiating activity of dihydrodiols of benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, and benzo[k]fluoranthene. *Carcinogenesis* 3(1):49-52
- LaVoie EJ, He Z-M, Wu Y, Meschter CL, Weyand EH (1994) Tumorigenic Activity of the 4,5- and 9,10-Dihydrodiols of Benzo[j]fluoranthene and Their syn- and anti-Diol Epoxides in Newborn Mice. *Cancer research* 54(4):962-968
- LaVoie EJ, Hecht SS, Amin S, Bedenko V, Hoffmann D (1980) Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites of benzo(j)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene. *Cancer research* 40(12):4528-32

- Lecoq S, Perin F, Plessis MJ, Strapelias H, Duquesne M (1989) Comparison of the in vitro metabolisms and mutagenicities of dibenzo[a,c]anthracene, dibenzo[a,h]anthracene and dibenzo[a,j]anthracene: influence of norharman. *Carcinogenesis* 10(3):461-9
- Lee C-H, Ito Y, Yanagiba Y, et al. (2007) Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR. *Toxicology* 238(2):147-156 doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.05.026>
- Lehman PA, Raney SG, Franz TJ (2011) Percutaneous Absorption in Man: In vitro-in vivo Correlation. *Skin Pharmacology and Physiology* 24(4):224-230
- Lehr RE, Kumar S, Levin W, et al. (1985) The Bay Region Theory of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis. ACS Symposium Series, vol 283. American Chemical Society, p 63-84
- Lesko S, Caspary W, Lorentzen R, Ts'o POP (1975) Enzymic formation of 6-oxobenz[a]pyrene radical in rat liver homogenates from carcinogenic benzo[a]pyrene. *Biochemistry* 14(18):3978-3984 doi:10.1021/bi00689a008
- Levin W, Thakker DR, Wood AW, et al. (1978a) Evidence That Benzo(a)anthracene 3,4-Diol-1,2-Epoxyde Is an Ultimate Carcinogen on Mouse Skin. *Cancer research* 38(6):1705-1710
- Levin W, Wood AW, Chang RL, et al. (1978b) Evidence for bay region activation of chrysene 1,2-dihydrodiol to an ultimate carcinogen. *Cancer research* 38(6):1831-4
- Lewtas J (2007) Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 636(1):95-133 doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.003>
- Li C-T, Lin Y-C, Lee W-J, Tsai P-J (2003) Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their carcinogenic potencies from cooking sources to the urban atmosphere. *Environmental Health Perspectives* 111(4):483-487
- Li J, Tang M-s, Liu B, Shi X, Huang C (2004) A critical role of PI-3K/Akt/JNKs pathway in benzo[a]pyrene diol-epoxyde (B[a]PDE)-induced AP-1 transactivation in mouse epidermal C141 cells. *Oncogene* 23:3932 doi:10.1038/sj.onc.1207501
- Li X, Feng Y, Deng H, et al. (2012) The dose-response decrease in heart rate variability: any association with the metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in coke oven workers? *PloS one* 7(9):e44562 doi:10.1371/journal.pone.0044562

- Li Z, Sandau CD, Romanoff LC, et al. (2008) Concentration and profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population. *Environmental research* 107(3):320-31 doi:10.1016/j.envres.2008.01.013
- Líbalová H, Krčková S, Uhlířová K, et al. (2014) Genotoxicity but not the AhR-mediated activity of PAHs is inhibited by other components of complex mixtures of ambient air pollutants. *Toxicology letters* 225(3):350-357 doi:https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.028
- Líbalová H, Uhlířová K, Kléma J, et al. (2012) Global gene expression changes in human embryonic lung fibroblasts induced by organic extracts from respirable air particles. *Particle and Fibre Toxicology* 9(1):1 doi:10.1186/1743-8977-9-1
- Liddle C, Goodwin BJ, George J, Tapner M, Farrell GC (1998) Separate and Interactive Regulation of Cytochrome P450 3A4 by Triiodothyronine, Dexamethasone, and Growth Hormone in Cultured Hepatocytes I. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(7):2411-2416 doi:10.1210/jcem.83.7.4877
- Lutier S (2017) Development and selection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons urinary metabolites as exposure biomarkers for human biomonitoring. Université Grenoble Alpes
- Ma Q (2011) Influence of light on aryl hydrocarbon receptor signaling and consequences in drug metabolism, physiology and disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7(10):1267-93 doi:10.1517/17425255.2011.614947
- MacLeod MC, Cohen GM, Selkirk JK (1979) Metabolism and Macromolecular Binding of the Carcinogen Benzo(a)pyrene and Its Relatively Inert Isomer Benzo(e)pyrene by Hamster Embryo Cells. *Cancer research* 39(9):3463
- MacLeod MC, Levin W, Conney AH, et al. (1980) Metabolism of benzo(e)pyrene by rat liver microsomal enzymes. *Carcinogenesis* 1(2):165-73
- MacLeod MC, Mansfield BK, Selkirk JK (1982) Time course of metabolism of benzo[e]pyrene by hamster embryo cells and the effect of chemical modifiers. *Chemico-biological interactions* 40(3):275-85
- MacNicol AD, Grover PL, Sims P (1980) The metabolism of a series of polycyclic hydrocarbons by mouse skin maintained in short-term organ culture. *Chemico-Biological Interactions* 29(2):169-188 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797(80)90031-9

- Magnusson BM, Anissimov YG, Cross SE, Roberts MS (2004) Molecular Size as the Main Determinant of Solute Maximum Flux Across the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 122(4):993-999 doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22413.x>
- Mahadevan B, Marston CP, Luch A, et al. (2007) Competitive inhibition of carcinogen-activating CYP1A1 and CYP1B1 enzymes by a standardized complex mixture of PAH extracted from coal tar. *International Journal of Cancer* 120(6):1161-1168 doi:[doi:10.1002/ijc.22466](https://doi.org/10.1002/ijc.22466)
- Mahadevan B, Parsons H, Musafia T, et al. (2004) Effect of artificial mixtures of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons present in coal tar, urban dust, and diesel exhaust particulates on MCF-7 cells in culture. *Environmental and molecular mutagenesis* 44(2):99-107 doi:[doi:10.1002/em.20039](https://doi.org/10.1002/em.20039)
- Manevski N, Swart P, Balavenkatraman KK, et al. (2015) Phase II Metabolism in Human Skin: Skin Explants Show Full Coverage for Glucuronidation, Sulfation, N-Acetylation, Catechol Methylation, and Glutathione Conjugation. *Drug Metabolism and Disposition* 43(1):126-139 doi:[doi:10.1124/dmd.114.060350](https://doi.org/10.1124/dmd.114.060350)
- Manno M, Viau C, Cocker J, et al. (2010) Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology letters* 192(1):3-16 doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.001>
- Marchand LL, Sivaraman L, Pierce L, et al. (1998) Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 Polymorphisms with Lung Cancer Suggest Cell Type Specificities to Tobacco Carcinogens. *Cancer research* 58(21):4858-4863
- Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, Viau C, Maitre A (2010) A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. *Journal of applied toxicology : JAT* 30(5):402-10 doi:[doi:10.1002/jat.1511](https://doi.org/10.1002/jat.1511)
- Marr LC, Dzepina K, Jimenez JL, et al. (2006) Sources and transformations of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico City. *Atmos Chem Phys* 6(6):1733-1745 doi:[doi:10.5194/acp-6-1733-2006](https://doi.org/10.5194/acp-6-1733-2006)
- Marshall MV, He ZM, Weyand EH, Rice JE, LaVoie EJ (1993) Mutagenic activity of the 4,5- and 9,10-dihydrodiols of benzo[j]fluoranthene and their syn- and anti-dihydrodiol epoxides in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and molecular mutagenesis* 22(1):34-45
- Marston CP, Pereira C, Ferguson J, et al. (2001) Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 22(7):1077-1086

- Marzulli FN, Callahan JF, Brown D (1965) Chemical structure and skin penetrating capacity of a short series of organic phosphates and phosphoric acid. *Journal of Investigative Dermatology* 44(5):339-344
- Mass MJ, Abu-Shakra A, Roop BC, et al. (1996) Benzo[b]fluoranthene: tumorigenicity in strain A/J mouse lungs, DNA adducts and mutations in the Ki-ras oncogene. *Carcinogenesis* 17(8):1701-4
- McAuliffe DJ, Blank IH (1991) Effects of UVA (320-400 nm) on the barrier characteristics of the skin. *J Invest Dermatol* 96(5):758-62
- Mcclean M, Rinehart R, Herrick R (2006) Dermal Exposure and Urinary 1-Hydroxypyrene Among Asphalt Roofing Workers. *Epidemiology* 17(6):S134-S135
- McClellan MD, Rinehart RD, Ngo L, et al. (2004) Urinary 1-hydroxypyrene and polycyclic aromatic hydrocarbon exposure among asphalt paving workers. *Annals of Occupational Hygiene* 48(6):565-578 doi:10.1093/annhyg/meh044
- McCoull KD, Rindgen D, Blair IA, Penning TM (1999) Synthesis and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon o-Quinone Depurinating N7-Guanine Adducts. *Chemical research in toxicology* 12(3):237-246 doi:10.1021/tx980182z
- Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM (1999) Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis* 20(10):1885-1891 doi:10.1093/carcin/20.10.1885
- Mensing T, Marczynski B, Engelhardt B, et al. (2005) DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 208(3):173-178 doi:https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.01.023
- Miselnicky SR, Lichtin JL, Sakr A, Bronaugh RL (1988) The influence of solubility, protein binding, and percutaneous absorption on reservoir formation in skin. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 39(3):169-177
- Mishra N, Ayoko GA, Morawska L (2016) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban environment: Occurrence, toxicity and source apportionment. *Environmental Pollution* 208:110-117 doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.015
- Moen BE, Nilsson R, Nordlinder R, et al. (1996) Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine rooms by measurement of urinary 1-hydroxypyrene. *Occupational and environmental medicine* 53(10):692-696

- Montagna W, Parakkal PF (1974) *The Structure & Function of Skin* (Third Edition). Academic Press
- Monteiro-Riviere N, Gardner D, Hayes A, Thomas J (2010) *Toxicology of the Skin*, 1st Edition edn, Boca Raton
- Moody RP, Joncas J, Richardson M, Chu I (2007) Contaminated soils (I): In vitro dermal absorption of benzo[a]pyrene in human skin. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 70(21):1858-65 doi:10.1080/15287390701459296
- Moody RP, Nadeau B, Chu I (1995) In vivo and in vitro dermal absorption of benzo[a]pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. *Journal of dermatological science* 9(1):48-58
- Moody RP, Tytchino AV, Yip A, Petrovic S (2011) A Novel “By Difference” Method for Assessing Dermal Absorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil at Federal Contaminated Sites, vol 74,
- Moody RP, Yip A, Chu I (2009) Effect of Cold Storage on In Vitro Human Skin Absorption of Six ¹⁴C-Radiolabeled Environmental Contaminants: Benzo[a]Pyrene, Ethylene Glycol, Methyl Parathion, Naphthalene, Nonyl Phenol, and Toluene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72(8):505-517 doi:10.1080/15287390802328713
- Moorthy B, Chu C, Carlin DJ (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 145(1):5-15 doi:10.1093/toxsci/kfv040
- Moreau M, Bouchard M (2014) Comparison of the kinetics of various biomarkers of benzo[a]pyrene exposure following different routes of entry in rats. *Journal of Applied Toxicology* 35(7):781-790 doi:https://doi.org/10.1002/jat.3070
- Moreau M, Ouellet N, Ayotte P, Bouchard M (2015) Effects of Intravenous Benzo[a]Pyrene Dose Administration on Levels of Exposure Biomarkers, DNA Adducts, and Gene Expression in Rats, vol 78,
- Morison WL (2005) *Phototherapy and photochemotherapy of skin disease*. CRC Press
- Mortensen LJ, Jatana S, Gelein R, et al. (2013) Quantification of quantum dot murine skin penetration with UVR barrier impairment. *Nanotoxicology* 7(8):1386-98 doi:10.3109/17435390.2012.741726

- Motta S, Monti M, Sesana S, Mellesi L, Ghidoni R, Caputo R (1994) Abnormality of water barrier function in psoriasis: Role of ceramide fractions. *Archives of Dermatology* 130(4):452-456 doi:10.1001/archderm.1994.01690040056007
- Mujtaba SF, Dwivedi A, Yadav N, et al. (2015) Superoxide mediated photomodification and DNA damage induced apoptosis by Benz(a)anthracene via mitochondrial mediated pathway. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 142:92-102 doi:https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.006
- Muñoz B, Albores A (2011) DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons: mechanisms and markers Selected Topics in DNA Repair. InTech
- Myllynen P, Kurttila T, Vaskivuo L, Vähäkangas K (2007) DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MCF-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833. *Toxicology letters* 169(1):3-12 doi:https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.11.006
- Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS (2014) Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature Chemical Biology* 10:542 doi:10.1038/nchembio.1548
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *Journal of Biological Chemistry* 279(23):23847-23850
- Nesnow S, Mass MJ, Ross JA, et al. (1998) Lung tumorigenic interactions in strain A/J mice of five environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives* 106(suppl 6):1337-1346 doi:doi:10.1289/ehp.98106s61337
- Nesnow S, Ross JA, Stoner GD, Mass MJ (1995) Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice. *Toxicology* 105(2-3):403-13
- Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA (1992) Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicology and applied pharmacology* 115(2):216-23
- Ng KME, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA (1991) Percutaneous absorption/metabolism of phenanthrene in the hairless guinea pig: Comparison of in vitro and in vivo results. *Fundamental and Applied Toxicology* 16(3):517-524 doi:https://doi.org/10.1016/0272-0590(91)90092-I
- Nicolaou A, Pilkington SM, Rhodes LE (2011) Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chemistry and Physics of Lipids* 164(6):535-543 doi:https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.005

- Nisbet ICT, LaGoy PK (1992) Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 16(3):290-300 doi:[https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90009-X)
- Nordqvist M, Thakker DR, Levin W, et al. (1979) The highly tumorigenic 3,4-dihydrodiol is a principal metabolite formed from dibenzo[a,h]anthracene by liver enzymes. *Molecular pharmacology* 16(2):643-55
- Nordqvist M, Thakker DR, Vyas KP, et al. (1981) Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol epoxides by rat liver enzymes. *Molecular pharmacology* 19(1):168-78
- O. Potts R, Guy R (1992) *Predicting Skin Permeability*, vol 9,
- OECD (2004) Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. OECD Publishing
- Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R (2014) Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology* 88(12):2135-2190 doi:[10.1007/s00204-014-1382-8](https://doi.org/10.1007/s00204-014-1382-8)
- Oesch F, Fabian E, Landsiedel R (2018) Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology* doi:[10.1007/s00204-018-2232-x](https://doi.org/10.1007/s00204-018-2232-x)
- Oesch F, Fabian E, Oesch-Bartlomowicz B, Werner C, Landsiedel R (2007) Drug-Metabolizing Enzymes in the Skin of Man, Rat, and Pig. *Drug Metabolism Reviews* 39(4):659-698 doi:[10.1080/03602530701690366](https://doi.org/10.1080/03602530701690366)
- Onyemauwa F, Rappaport SM, Sobus JR, Gajdosova D, Wu R, Waidyanatha S (2009) Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 877(11-12):1117-25 doi:[10.1016/j.jchromb.2009.02.067](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.067)
- Osanai M, Lee GH (2011) Enhanced expression of retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 in sunlight-damaged human skin. *Med Mol Morphol* 44(4):200-6 doi:[10.1007/s00795-010-0528-x](https://doi.org/10.1007/s00795-010-0528-x)
- Palackal NT, Burczynski ME, Harvey RG, Penning TM (2001) The Ubiquitous Aldehyde Reductase (AKR1A1) Oxidizes Proximate Carcinogen trans-Dihydrodiols to o-Quinones: Potential Role in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation. *Biochemistry* 40(36):10901-10910 doi:[10.1021/bi010872t](https://doi.org/10.1021/bi010872t)

- Pannatier A, Jenner P, Testa B, Etter JC (1978) The Skin as a Drug-Metabolizing Organ. *Drug Metabolism Reviews* 8(2):319-343 doi:10.3109/03602537808993791
- Paris A, Ledauphin J, Poinot P, Gaillard J-L (2018) Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables: Origin, analysis, and occurrence. *Environmental Pollution* 234:96-106 doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.028
- Park J-H, Gopishetty S, Szewczuk LM, Troxel AB, Harvey RG, Penning TM (2005) Formation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-Oxo-dGuo) by PAH o-Quinones: Involvement of Reactive Oxygen Species and Copper(II)/Copper(I) Redox Cycling. *Chemical research in toxicology* 18(6):1026-1037 doi:10.1021/tx050001a
- Park J-H, Troxel AB, Harvey RG, Penning TM (2006) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) o-Quinones Produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) Generate Abasic Sites, Oxidized Pyrimidines, and 8-Oxo-dGuo via Reactive Oxygen Species. *Chemical research in toxicology* 19(5):719-728 doi:10.1021/tx0600245
- Partanen T, Boffetta P (1994) Cancer risk in asphalt workers and roofers: Review and meta-analysis of epidemiologic studies, vol 26,
- Paschke M, Hutzler C, Brinkmann J, Henkler F, Luch A (2015) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Newspaper Inks: Migration, Metabolism, and Genotoxicity in Human Skin. *Polycyclic aromatic compounds : PAC* 35(1):32-40
- Pattison DI, Davies MJ (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*(96):131-57
- Payan J-P, Lafontaine M, Simon P, et al. (2008) In vivo and in vitro percutaneous absorption of [¹⁴C]pyrene in Sprague Dawley male rats: skin reservoir effect and consequence on urinary 1-OH pyrene excretion. *Archives of Toxicology* 82(10):739 doi:10.1007/s00204-008-0300-3
- Payan JP, Lafontaine M, Simon P, et al. (2009) 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol* 83(9):873-83 doi:10.1007/s00204-009-0440-0
- Penning TM (2014) Human Aldo-Keto Reductases and the Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical research in toxicology* 27(11):1901-1917 doi:10.1021/tx500298n
- Penning TM (2017) Genotoxicity of ortho-quinones: reactive oxygen species versus covalent modification. *Toxicology Research* 6(6):740-754 doi:10.1039/C7TX00223H

- Perin-Roussel O, Saguem S, Ekert B, Zajdela F (1983) Binding to DNA of bay region and pseudo bay region diol-epoxides of dibenzo[a,e]fluoranthene and comparison with adducts obtained with dibenzo[a,e]fluoranthene or its dihydrodiols in the presence of microsomes. *Carcinogenesis* 4(1):27-32 doi:10.1093/carcin/4.1.27
- Phillips DH, Hewer A, Grover PL (1987) Formation of DNA adducts in mouse skin treated with metabolites of chrysene. *Cancer letters* 35(2):207-14
- Pittelkow MR, Perry HO, Muller SA, Maughan WZ, O'Brien PC (1981) Skin cancer in patients with psoriasis treated with coal tar: A 25-year follow-up study. *Archives of Dermatology* 117(8):465-468 doi:10.1001/archderm.1981.01650080019020
- Pivarcsi A, Kemény L, Dobozy A (2004) Innate Immune Functions of the Keratinocytes. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 51(3):303-310 doi:10.1556/AMicr.51.2004.3.8
- Plakunov I, Smolarek TA, Fischer DL, Wiley JC, Jr., Baird WM (1987) Separation by ion-pair high-performance liquid chromatography of the glucuronide, sulfate and glutathione conjugates formed from benzo[a]pyrene in cell cultures from rodents, fish and humans. *Carcinogenesis* 8(1):59-66
- Potter D, Booth ED, Brandt HCA, et al. (1999) Studies on the dermal and systemic bioavailability of polycyclic aromatic compounds in high viscosity oil products. *Archives of Toxicology* 73(3):129-140 doi:10.1007/s002040050597
- Pukkala E, Martinsen JI, Weiderpass E, et al. (2014) Cancer incidence among firefighters: 45 years of follow-up in five Nordic countries. *Occupational and environmental medicine* 71(6):398-404 doi:10.1136/oemed-2013-101803
- Raja, Sivamani R, Shirakawa Garcia M, Isseroff R (2007) Wound re-epithelialization: Modulating keratinocyte migration in wound healing, vol 12,
- Randall King J, Monteiro-Riviere NA (1991) Effects of organic solvent vehicles on the viability and morphology of isolated perfused porcine skin. *Toxicology* 69(1):11-26 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(91)90149-U
- Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R (2008) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 42(13):2895-2921 doi:https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010
- Rehwagen M, Müller A, Massolo L, Herbarth O, Ronco A (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Science of The Total Environment* 348(1):199-210 doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.050

- Reif AE (1984) Synergism in Carcinogenesis. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 73(1):25-39 doi:10.1093/jnci/73.1.25
- Rembiesa J, Ruzgas T, Engblom J, Holefors A (2018) The Impact of Pollution on Skin and Proper Efficacy Testing for Anti-Pollution Claims. *Cosmetics* 5(1):4
- Renwick AG, Drasar BS (1976) Environmental carcinogens and large bowel cancer. *Nature* 263:234 doi:10.1038/263234a0
- Rice JE, Geddie NG, Lavoie EJ (1987a) Identification of metabolites of benzo[j]fluoranthene formed in vitro in rat liver homogenate. *Chemico-Biological Interactions* 63(3):227-237 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797(87)90043-3
- Rice JE, Weyand EH, Geddie NG, DeFloria MC, LaVoie EJ (1987b) Identification of tumorigenic metabolites of benzo[j]fluoranthene formed in vivo in mouse skin. *Cancer research* 47(23):6166-70
- Richelle M, Steiling H, Castiel I (2009) Chapter 6 - Bioavailability and Skin Bioefficacy of Vitamin C and E. In: Tabor A, Blair RM (eds) *Nutritional Cosmetics*. William Andrew Publishing, Boston, p 115-138
- Rittie L, Fisher GJ (2015) Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(1):a015370 doi:10.1101/cshperspect.a015370
- Ro BI, Dawson TL (2005) The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 10(3):194-197 doi:10.1111/j.1087-0024.2005.10104.x
- Rossella F, Campo L, Pavanello S, Kapka L, Siwinska E, Fustinoni S (2009) Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers. *Occupational and environmental medicine* 66(8):509-16 doi:10.1136/oem.2008.042796
- Saladi R, Austin L, Gao D, et al. (2003) The Combination of Benzo[a]pyrene and Ultraviolet A Causes an In Vivo Time-related Accumulation of DNA Damage in Mouse Skin ¶. *Photochemistry and Photobiology* 77(4):413-419 doi:doi:10.1562/0031-8655(2003)0770413TCOBAU2.0.CO2
- Sartorelli P, Cenni A, Matteucci G, Montomoli L, Novelli MT, Palmi S (1999) Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from lubricating oil. *International archives of occupational and environmental health* 72(8):528-532 doi:10.1007/s004200050411

- Sartorelli P, Montomoli L, Sisinni AG, Bussani R, Cavallo D, Foa V (2001) Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from coal dust. *Toxicology and industrial health* 17(1):17-21
- Schaefer H, Zesch A, Stättgen G (1982) *Skin Permeability*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 541-845
- Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, et al. (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Archives of Dermatological Research* 283(8):506-511 doi:10.1007/bf00371923
- SCHER, SCCS, SCENIHR (2012) *Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures*.
- Scherer G, Frank S, Riedel K, Meger-Kossien I, Renner T (2000) Biomonitoring of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of Nonoccupationally Exposed Persons. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 9(4):373-380
- Schinkel AH, Jonker JW (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(1):3-29 doi:https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00169-2
- Schwarz D, Kisselev P, Cascorbi I, Schunck WH, Roots I (2001) Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* 22(3):453-9
- Scott Claire A, Kelsell David P (2011) Key functions for gap junctions in skin and hearing. *Biochemical Journal* 438(2):245-254 doi:10.1042/bj20110278
- Sen B, Mahadevan B, DeMarini DM (2007) Transcriptional responses to complex mixtures— A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 636(1):144-177 doi:https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.002
- Shen H, Huang Y, Wang R, et al. (2013) Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environmental science & technology* 47(12):6415-6424 doi:10.1021/es400857z
- Shimada T (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 21(4):257-76
- Shimada T, Fujii-Kuriyama Y (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer science* 95(1):1-6

- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, et al. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer research* 56(13):2979-84
- Shimada T, Murayama N, Tanaka K, et al. (2008) Interaction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Human Cytochrome P450 1B1 in Inhibiting Catalytic Activity. *Chemical research in toxicology* 21(12):2313-2323
- Shirakata Y (2010) Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *Journal of dermatological science* 59(2):73-80 doi:10.1016/j.jdermsci.2010.05.002
- Shou M, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV (1996) Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,h]anthracene by cDNA-expressed human cytochromes P450. *Archives of biochemistry and biophysics* 328(1):201-7 doi:10.1006/abbi.1996.0161
- Siddens LK, Larkin A, Krueger SK, et al. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: Comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicology and applied pharmacology* 264(3):377-386 doi:https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.014
- Silva CL, Topgaard D, Kocherbitov V, Sousa JJS, Pais AACC, Sparr E (2007) Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768(11):2647-2659 doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.028
- Sims P (1970a) The metabolism of some aromatic hydrocarbons by mouse embryo cell cultures. *Biochemical Pharmacology* 19(1):285-297 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(70)90348-5
- Sims P (1970b) Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydrocarbons by rat-liver preparations. *Biochemical Pharmacology* 19(3):795-818 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(70)90243-1
- Singh DK, Gupta T (2016) Effect through inhalation on human health of PM1 bound polycyclic aromatic hydrocarbons collected from foggy days in northern part of India. *Journal of Hazardous Materials* 306:257-268 doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.049
- Sjögren M, Ehrenberg L, Rannug U (1996) Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 358(1):97-112 doi:https://doi.org/10.1016/0027-5107(96)00175-3

- Slaga TJ, Huberman E, Selkirk JK, Harvey RG, Bracken WM (1978) Carcinogenicity and mutagenicity of benz(a)anthracene diols and diol-epoxides. *Cancer research* 38(6):1699-704
- Slezakova K, Castro D, Delerue-Matos C, Alvim-Ferraz MdC, Morais S, Pereira MdC (2013) Impact of vehicular traffic emissions on particulate-bound PAHs: Levels and associated health risks. *Atmospheric Research* 127:141-147 doi:<https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2012.06.009>
- Smith CJ, Walcott CJ, Huang W, Maggio V, Grainger J, Patterson DG, Jr. (2002) Determination of selected monohydroxy metabolites of 2-, 3- and 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by solid-phase microextraction and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 778(1-2):157-64
- Smith G, Wolf CR, Deeni YY, et al. (2003) Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *The Lancet* 361(9366):1336-1343 doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13081-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13081-4)
- Smith LH, Holland JM (1981) Interaction between benzo[a]pyrene and mouse skin in organ culture. *Toxicology* 21(1):47-57 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(81\)90015-9](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(81)90015-9)
- Sobus JR, McClean MD, Herrick RF, et al. (2009) Comparing Urinary Biomarkers of Airborne and Dermal Exposure to Polycyclic Aromatic Compounds in Asphalt-Exposed Workers. *Annals of Occupational Hygiene* 53(6):561-571 doi:10.1093/annhyg/mep042
- Soeur J, Belaïdi J-P, Chollet C, et al. (2017) Photo-pollution stress in skin: Traces of pollutants (PAH and particulate matter) impair redox homeostasis in keratinocytes exposed to UVA1. *Journal of dermatological science* 86(2):162-169 doi:10.1016/j.jdermsci.2017.01.007
- Solomon AE, Lowe NJ (1979) Percutaneous absorption in experimental epidermal disease. *British Journal of Dermatology* 100(6):717-722 doi:[doi:10.1111/j.1365-2133.1979.tb08078.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1979.tb08078.x)
- Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW (2008) The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 363(1):1-25 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.009>
- Sowada J, Lemoine L, Schön K, Hutzler C, Luch A, Tralau T (2017) Toxication of polycyclic aromatic hydrocarbons by commensal bacteria from human skin. *Archives of Toxicology* 91(6):2331-2341 doi:10.1007/s00204-017-1964-3

- Sowada J, Schmalenberger A, Ebner I, Luch A, Tralau T (2014) Degradation of benzo[a]pyrene by bacterial isolates from human skin. *FEMS Microbiology Ecology* 88(1):129-139 doi:10.1111/1574-6941.12276
- Sparber F (2014) Langerhans cells: an update. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 12(12):1107-1111 doi:doi:10.1111/ddg.12506
- Sparr E, Wennerström H (2001) Responding Phospholipid Membranes—Interplay between Hydration and Permeability. *Biophysical Journal* 81(2):1014-1028 doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75759-1
- Spink DC, Wu SJ, Spink BC, et al. (2008) Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicology and applied pharmacology* 226(3):213-24 doi:10.1016/j.taap.2007.08.024
- Srivastava SK, Watkins SC, Schuetz E, Singh SV (2002) Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Molecular Carcinogenesis* 33(3):156-162 doi:doi:10.1002/mc.10032
- Srogi K (2007) Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* 5(4):169-195 doi:10.1007/s10311-007-0095-0
- Steinmetz KA, Potter JD (1996) Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention. *Journal of the American Dietetic Association* 96(10):1027-1039 doi:10.1016/S0002-8223(96)00273-8
- Stenehjem JS, Robsahm TE, Bråtveit M, Samuelsen SO, Kirkeleit J, Grimsrud TK (2017) Aromatic hydrocarbons and risk of skin cancer by anatomical site in 25 000 male offshore petroleum workers. *American Journal of Industrial Medicine* 60(8):679-688 doi:10.1002/ajim.22741
- Stogiannidis E, Laane R (2015) Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. In: Whitacre DM (ed) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer International Publishing, Cham, p 49-133
- Storm JE, Collier SW, Stewart RF, Bronaugh RL (1990) Metabolism of xenobiotics during percutaneous penetration: role of absorption rate and cutaneous enzyme activity. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 15(1):132-41

- Stumpe-Vīksna I, Bartkevičs V, Kukāre A, Morozovs A (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chemistry* 110(3):794-797 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.004>
- Surber C, Wilhelm KP, Maibach HI, Hall LL, Guy RH (1990) Partitioning of chemicals into human stratum corneum: implications for risk assessment following dermal exposure. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 15(1):99-107
- Svoboda M, Bílková Z, Muthný T (2016) Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? *Journal of dermatological science* 81(3):147-152 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.009>
- Szaniszlo J, Ungvary G (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and burden of outdoor workers in Budapest. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 62(5):297-306 doi:10.1080/152873901300017995
- Takenaka S, Itoh T, Fujiwara R (2013) Expression pattern of human ATP-binding cassette transporters in skin. *Pharmacology research & perspectives* 1(1):e00005-e00005 doi:10.1002/prp2.5
- Tauchi M, Hida A, Negishi T, et al. (2005) Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Molecular and cellular biology* 25(21):9360-9368 doi:10.1128/MCB.25.21.9360-9368.2005
- Thakker DR, Levin W, Yagi H, et al. (1979) Metabolism of benzo[a]anthracene to its tumorigenic 3,4-dihydrodiol. *Molecular pharmacology* 15(1):138-53
- Tilton SC, Siddens LK, Krueger SK, et al. (2015) Mechanism-Based Classification of PAH Mixtures to Predict Carcinogenic Potential. *Toxicological Sciences* 146(1):135-145 doi:10.1093/toxsci/kfv080
- Tolbert PE (1997) Oils and cancer. *Cancer Causes & Control* 8(3):386-405 doi:10.1023/a:1018409422050
- Tolosa I, Bayona JM, Albaigés J (1996) Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Sulfur/Oxygen Derivatives in Northwestern Mediterranean Sediments: Spatial and Temporal Variability, Fluxes, and Budgets. *Environmental Science & Technology* 30(8):2495-2503 doi:10.1021/es950647x
- Tsai P-J, Shieh H-Y, Lee W-J, Lai S-O (2001) Health-risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a carbon black manufacturing industry. *Science of The Total Environment* 278(1):137-150 doi:[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00643-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00643-X)

- Tsakovska I, Pajeva I, Al Sharif M, et al. (2017) Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology* 387(Supplement C):27-42
doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.008>
- Tung EWY, Philbrook NA, Belanger CL, Ansari S, Winn LM (2014) Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: A possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 760:64-69
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.003>
- Unwin J, Cocker J, Scobbie E, Chambers H (2006) An Assessment of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the UK. *The Annals of occupational hygiene* 50(4):395-403 doi:[10.1093/annhyg/mel010](https://doi.org/10.1093/annhyg/mel010)
- Upadhyaya P, Hochalter JB, Balbo S, McIntee EJ, Hecht SS (2010) Preferential Glutathione Conjugation of a Reverse Diol Epoxide Compared with a Bay Region Diol Epoxide of Benzo[a]pyrene in Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 38(9):1397-1402 doi:[10.1124/dmd.110.034181](https://doi.org/10.1124/dmd.110.034181)
- Vakharia DD, Liu N, Pause R, et al. (2001) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon/Metal Mixtures: Effect on PAH Induction of CYP1A1 in Human HepG2 Cells. *Drug Metabolism and Disposition* 29(7):999-1006
- van de Sandt JJM, van Burgsteden JA, Cage S, et al. (2004) In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39(3):271-281
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.02.004>
- van Smeden J, Bouwstra JA (2016) Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients, vol 49,
- van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA (2014) The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841(3):295-313
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>
- VanRooij JG, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ (1993a) Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *British Journal of Industrial Medicine* 50(7):623-632
- VanRooij JG, Van Lieshout EM, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ (1993b) Effect of the reduction of skin contamination on the internal dose of creosote workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*(3):200-207 doi:[10.5271/sjweh.1322](https://doi.org/10.5271/sjweh.1322)

- VanRooij JG, Vinke E, De Lange J, et al. (1995) Dermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons in the blood-perfused pig ear. *Journal of applied toxicology : JAT* 15(3):193-200
- VanRooij JGM, Bodelier-Bade MM, De Looff AJA, Dijkmans APG, Jongeneelen F (1992) Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among primary aluminium workers. *La Medicina del lavoro* 83(5):519-529
- VanRooij JGM, De Roos JHC, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ (1993c) Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons through human skin: Differences between anatomical sites and individuals. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 38(4):355-368 doi:10.1080/15287399309531724
- Veenhuis RT, van Horssen J, Bos RP, Anzion RB, van der Valk PG (2002) Highly increased urinary 1-hydroxypyrene excretion rate in patients with atopic dermatitis treated with topical coal tar. *Archives of Dermatological Research* 294(4):168-171 doi:10.1007/s00403-002-0311-5
- Vernez D, Koechlin A, Milon A, et al. (2015) Anatomical UV Exposure in French Outdoor Workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 57(11):1192-1196 doi:10.1097/jom.0000000000000537
- Viau C, Carrier G, Vyskočil A, Dodd C (1995) Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *Science of The Total Environment* 163(1):179-186 doi:https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04494-L
- Vijayalakshmi KP, Suresh CH (2008) Theoretical studies on the carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry* 29(11):1808-1817 doi:doi:10.1002/jcc.20939
- Villard PH, Sampol E, Elkaim JL, et al. (2002) Increase of CYP1B1 Transcription in Human Keratinocytes and HaCaT Cells after UV-B Exposure. *Toxicology and applied pharmacology* 178(3):137-143 doi:https://doi.org/10.1006/taap.2001.9335
- Vinceti M, Pellacani G, Malagoli C, et al. (2007) A population-based case-control study of diet and melanoma risk in northern Italy. *Public Health Nutrition* 8(8):1307-1314 doi:10.1079/PHN2005754
- Virich G, Gudi V, Canal A (2008) Extramammary Paget's disease – occupational exposure to used engine oil and a new skin grafting technique. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 61(12):1528-1529 doi:10.1016/j.bjps.2007.04.015
- von Koschembahr A, Youssef A, Béal D, et al. (2018) Solar simulated light exposure alters metabolism and genotoxicity induced by benzo[a]pyrene in human skin. *Scientific Reports* 8(1):14692 doi:10.1038/s41598-018-33031-8

- Wang C, Wu S, Zhou S, Shi Y, Song J (2017) Characteristics and Source Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Urban Soils: A Review. *Pedosphere* 27(1):17-26 doi:[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60293-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60293-5)
- Wang H, Chen W, Zheng H, et al. (2007a) Association between plasma BPDE-Alb adduct concentrations and DNA damage of peripheral blood lymphocytes among coke oven workers. *Occupational and environmental medicine* 64(11):753-758 doi:10.1136/oem.2006.030445
- Wang R, Liu G, Zhang J (2015) Variations of emission characterization of PAHs emitted from different utility boilers of coal-fired power plants and risk assessment related to atmospheric PAHs. *Science of The Total Environment* 538(Supplement C):180-190 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.043>
- Wang S, Sheng Y, Feng M, et al. (2007b) Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: relationship between phototoxicity and excited state properties. *Environ Toxicol* 22(3):318-27 doi:10.1002/tox.20241
- Wang Y, Gao D, Atencio DP, et al. (2005) Combined subcarcinogenic benzo[a]pyrene and UVA synergistically caused high tumor incidence and mutations in H-ras gene, but not p53, in SKH-1 hairless mouse skin. *International Journal of Cancer* 116(2):193-199 doi:10.1002/ijc.21039
- Wei Y-D, Rannug U, Rannug A (1999) UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chemico-Biological Interactions* 118(2):127-140 doi:[https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(98\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(98)00118-5)
- Weis LM, Rummel AM, Masten SJ, Trosko JE, Upham BL (1998) Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of Gap junctional intercellular communication. *Environmental health perspectives* 106(1):17-22 doi:10.1289/ehp.9810617
- Weston A, Hodgson RM, Hewer AJ, Kuroda R, Grover PL (1985) Comparative studies of the metabolic activation of chrysene in rodent and human skin. *Chemico-biological interactions* 54(2):223-42
- Weyand EH, Amin S, Huie K, et al. (1989) Effects of fluorine substitution on the DNA binding and tumorigenicity of benzo[b]fluoranthene in mouse epidermis. *Chemico-biological interactions* 71(2-3):279-90
- Weyand EH, Bryla P, Wu Y, He ZM, LaVoie EJ (1993a) Detection of the major DNA adducts of benzo[j]fluoranthene in mouse skin: nonclassical dihydrodiol epoxides. *Chemical research in toxicology* 6(1):117-24

- Weyand EH, Cai ZW, Wu Y, Rice JE, He ZM, LaVoie EJ (1993b) Detection of the major DNA adducts of benzo[b]fluoranthene in mouse skin: role of phenolic dihydrodiols. *Chemical research in toxicology* 6(4):568-77
- Weyand EH, Geddie N, Rice JE, Czech A, Amin S, LaVoie EJ (1988) Metabolism and mutagenic activity of benzo[k]fluoranthene and 3-, 8- and 9-fluorobenzo[k]fluoranthene. *Carcinogenesis* 9(7):1277-81
- Weyand EH, Patel S, LaVoie EJ, Cho B, Harvey RG (1990) Relative tumor initiating activity of benzo[a]fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, naphtho[1,2-b]fluoranthene and naphtho[2,1-a]fluoranthene on mouse skin. *Cancer letters* 52(3):229-33
- Wickett RR, Visscher MO (2006) Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control* 34(10, Supplement):S98-S110
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>
- Wincent E, Le Bihanic F, Dreij K (2016) Induction and inhibition of human cytochrome P4501 by oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology Research* 5(3):788-799 doi:10.1039/C6TX00004E
- Withey JR, Law FCP, Endrenyi L (1993) Percutaneous uptake, distribution, and excretion of pyrene in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 40(4):601-612
doi:10.1080/15287399309531821
- Wood AW, Chang RL, Huang MT, et al. (1980) Mutagenicity of benzo(e)pyrene and triphenylene tetrahydroepoxides and diol-epoxides in bacterial and mammalian cells. *Cancer research* 40(6):1985-9
- Wood AW, Levin W, Chang RL, et al. (1977) Tumorigenicity of five dihydrodiols of benz(a)anthracene on mouse skin: exceptional activity of benz(a)anthracene 3,4-dihydrodiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(8):3176-9
- Wood AW, Levin W, Thakker DR, et al. (1979) Biological activity of benzo[e]pyrene. An assessment based on mutagenic activities and metabolic profiles of the polycyclic hydrocarbon and its derivatives. *The Journal of biological chemistry* 254(11):4408-15
- Wu M, Yan S, Patel DJ, Geacintov NE, Broyde S (2002) Relating repair susceptibility of carcinogen-damaged DNA with structural distortion and thermodynamic stability. *Nucleic acids research* 30(15):3422-3432
- Wynder EL, Hoffmann D (1959) The carcinogenicity of benzofluoranthenes. *Cancer* 12(6):1194-1199
doi:10.1002/1097-0142(195911/12)12:6<1194::AID-CNCR2820120614>3.0.CO;2-R

- Xia Q, Chiang HM, Yin JJ, et al. (2015) UVA photoirradiation of benzo[a]pyrene metabolites: induction of cytotoxicity, reactive oxygen species, and lipid peroxidation. *Toxicology and industrial health* 31(10):898-910 doi:10.1177/0748233713484648
- Xu S, Weerachayaphorn J, Cai S-Y, Soroka CJ, Boyer JL (2010) Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 299(1):G126-G135 doi:10.1152/ajpgi.00522.2010
- Xu X, Zhang J, Zhang L, Liu W, Weisel CP (2004) Selective detection of monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 18(19):2299-308 doi:10.1002/rcm.1625
- Xue W, Warshawsky D (2005) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and applied pharmacology* 206(1):73-93 doi:https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.006
- Yang JJ, Roy TA, Krueger AJ, Neil W, Mackerer CR (1989) In vitro and in vivo percutaneous absorption of benzo[a]pyrene from petroleum crude-fortified soil in the rat. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 43(2):207-14
- Yang JJ, Roy TA, Mackerer CR (1986) Percutaneous absorption of benzo[a]pyrene in the rat: comparison of in vivo and in vitro results. *Toxicology and industrial health* 2(4):409-16
- Yang M (2011) A Current Global View of Environmental and Occupational Cancers. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 29(3):223-249 doi:10.1080/10590501.2011.601848
- Yu D, Berlin JA, Penning TM, Field J (2002) Reactive Oxygen Species Generated by PAH o-Quinones Cause Change-In-Function Mutations in p53. *Chemical research in toxicology* 15(6):832-842 doi:10.1021/tx010177m
- Yu H (2002) Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 20(2):149-83 doi:10.1081/GNC-120016203
- Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E (2011) Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82(3):424-430 doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.058
- Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138(1):103-141 doi:https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007

- Zhang L, Jin Y, Huang M, Penning TM (2012) The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones. *Frontiers in pharmacology* 3:193-193 doi:10.3389/fphar.2012.00193
- Zhang Y, Tao S (2009) Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* 43(4):812-819 doi:<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.10.050>
- Zhang Y, Wu X, Guo D, Rechkoblit O, Geacintov NE, Wang Z (2002) Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases η and κ . *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 510(1):23-35 doi:[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00249-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00249-X)
- Zhao H, Spitz MR, Gwyn KM, Wu X (2002) Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in non-Hispanic whites. *Molecular Carcinogenesis* 33(2):99-104 doi:10.1002/mc.10023
- Zhong Y, Carmella SG, Hochalter JB, Balbo S, Hecht SS (2011) Analysis of r-7,t-8,9,c-10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in Human Urine: A Biomarker for Directly Assessing Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure plus Metabolic Activation. *Chemical research in toxicology* 24(1):73-80 doi:10.1021/tx100287n
- Zouboulis CC (2000) Human Skin: An Independent Peripheral Endocrine Organ. *Hormone Research in Paediatrics* 54(5-6):230-242

Valorisation des travaux de thèse

Articles scientifiques :

Etienne Bourgart, Damien Barbeau, Marie Marques, Anne Von Koschembahr, David Béal, *et al.*. A realistic human skin model to study benzo[a]pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure. *Archives of Toxicology*, Springer Verlag, 2018, [〈10.1007/s00204-018-2329-2〉](https://doi.org/10.1007/s00204-018-2329-2).

Anne Von Koschembahr, Antonia Youssef, David Béal, Clément Calissi, Etienne Bourgart, *et al.*. Solar simulated light exposure alters metabolization and genotoxicity induced by benzo[a]pyrene in human skin. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, 2018, 8 (1), [〈10.1038/s41598-018-33031-8〉](https://doi.org/10.1038/s41598-018-33031-8).

Etienne Bourgart, Renaud Persoons, Marie Marques, Alex Rivier, Franck Balducci, Anne von Koschembahr, David Béal, Marie-Thérèse Leccia, Thierry Douki, Anne Maitre. Influence of Exposure dose, Complex Mixture and Ultraviolet Radiation on Skin Absorption and Bioactivation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Soumise dans Archives of Toxicology. Under review.*

Congrès scientifiques internationaux :

- Communications orales :

Etienne Bourgart, Marie Marques, Anne Von Koschembahr, David Béal, Renaud Persoons, *et al.*. Human skin model to study the impact of ultraviolet radiation on skin permeation and metabolism of complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons.. *20th International Congress on In Vitro Toxicology (ESTIV2018)*, Oct 2018, Berlin, Germany.

- Posters :

Etienne Bourgart, Damien Barbeau, Marie Marques, David Béal, Marie-Thérèse Leccia, *et al.*. Realistic Human Skin Model for the Understanding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Cutaneous Absorption and Metabolism. *16th Perspectives in Percutaneous Penetration Conference*, Apr 2018, La Grande Motte, France.

Métabolisme cutané et biomarqueurs d'exposition aux mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des cancérigènes ubiquitaires, produits en mélanges complexes dont la composition varie en fonction de la source d'émission. Classées substances prioritaires de par leur abondance et leur génotoxicité, l'exposition aux HAP des populations se fait notamment par voie cutanée au cours des activités professionnelles. La surveillance biologique de l'exposition (SBE) tient compte de l'absorption cutanée en plus de l'inhalation et identifie les situations d'exposition à risque. Pour estimer l'exposition au Benzo[*a*]pyrène (B[*a*]P), cancérigène certain pour l'homme, le dosage du 3-hydroxybenzo[*a*]pyrène (3-OHB[*a*]P) et du (±)trans-anti-B[*a*]P-tétraol (B[*a*]P-tétraol) a été récemment proposé. L'objectif de cette thèse était d'étudier l'absorption et le métabolisme cutanés du B[*a*]P mais aussi des mélanges d'HAP en vue de d'améliorer la compréhension de leur génotoxicité et de développer des biomarqueurs pertinents pour estimer les risques sanitaires. La première partie de ce travail a consisté au développement d'un modèle cutané *ex vivo* simple mais réaliste à partir d'explants de peau humaine. Après la mise au point des méthodes d'extraction et d'analyse adéquates, la toxicocinétique et le métabolisme cutané de faibles doses de B[*a*]P ont été étudiés. La pénétration cutanée et le métabolisme du B[*a*]P sont inversement proportionnels à la dose appliquée. Cependant, les voies de métabolisation sont impactées différemment. Alors que la production du 3-OHB[*a*]P issu des voies de détoxification est dose-dépendante, la formation du B[*a*]P-tétraol, produit de l'hydrolyse du métabolite cancérigène ultime du B[*a*]P, est rapidement saturée. Le B[*a*]P-tétraol est donc le biomarqueur le plus pertinent pour estimer le risque cancérigène au B[*a*]P. De plus, la proportion de B[*a*]P non-métabolisé traversant la peau est extrêmement limitée indiquant que la toxicité de ce composé s'exprime essentiellement localement. La deuxième partie de ce travail a consisté en une synthèse bibliographique centrée sur la biotransformation de 7 autres HAP cancérigènes permettant d'identifier 16 métabolites d'intérêt commercialisés. *In fine*, le dosage de 10 de ces métabolites, impliqués dans les voies de bioactivation ou de détoxification de 5 HAP, a pu être développé en GC-MS/MS. Le dosage urinaire de ces nouveaux biomarqueurs devrait permettre d'améliorer la SBE des populations aux HAP cancérigènes. Dans la dernière partie de ce travail, l'impact de la composition de mélanges synthétiques ou industriels (extraits de brai de houille et de coke de pétrole) à différentes doses sur l'absorption et le métabolisme cutanés des HAP furent évalués en présence ou non de rayonnements ultraviolets (UV). La pénétration des HAP diminue quand la complexité du mélange et la dose augmentent. Alors que les UV amplifient la pénétration des HAP lors de l'application des mélanges industriels, ils n'ont pas d'effet sur le B[*a*]P appliqué seul ou sur les mélanges synthétiques. Leur bioactivation décroît sous l'influence des mélanges et des UV, provoquant une accumulation de HAP non-métabolisés dans la peau ce qui pourrait retarder la survenue des effets génotoxiques. A l'instar du B[*a*]P, la toxicité des autres HAP cancérigènes semble être essentiellement locale et dépendre du scénario d'exposition cutanée. Ce travail souligne l'importance de l'étude des mélanges du fait d'interactions plus complexes que de simples effets additifs.

Mots clefs : Métabolisme cutané, Indicateurs biologiques d'exposition, Hydrocarbures aromatiques polycycliques, Mélanges.

Cutaneous Metabolism and biomarkers of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Mixtures

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous carcinogens emitted as complex mixtures whose composition depends on emission sources. Because of their abundance and genotoxicity, PAHs are classified as priority substances, to which people can be exposed via dermal absorption during occupational activities. Biomonitoring takes into account skin absorption as well as inhalation and allows the identification of hazardous exposure situations. To assess Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) exposure, which is classified as carcinogenic to human, quantification of 3-hydroxybenzo[*a*]pyrene (3-OHB[*a*]P) and (±)trans-anti-B[*a*]P-tetrol (B[*a*]P-tetrol) was recently proposed. This PhD thesis aimed at studying the skin absorption and metabolism of B[*a*]P and PAH mixtures to improve the understanding of their genotoxicity and develop relevant biomarker for health risk assessment. The first part of this work consisted in developing a simple and realistic skin model from human skin explants. Further to the development of adequate extraction and analytical methods, cutaneous toxicokinetic and metabolism from low B[*a*]P doses were studied. B[*a*]P skin penetration and metabolism were inversely proportional to applied dose. Nevertheless, metabolic pathways are impacted differently. While 3-OHB[*a*]P production formed during detoxification was dose-dependent, the formation of B[*a*]P-tetrol, resulting from the hydrolysis of B[*a*]P ultimate carcinogenic metabolite, saturates rapidly. Therefore, B[*a*]P-tetrol is the most relevant biomarker for estimating B[*a*]P carcinogenic risk. In addition, unmetabolized B[*a*]P poorly diffused through skin indicating that B[*a*]P toxicity is mainly local. The second part of this work consisted of a literature review focusing on 7 other carcinogenic PAH biotransformation to identify 16 marketed metabolites of interest. *In fine*, GC-MS/MS analysis was developed for 10 previously identified metabolic intermediates that are either involved in bioactivation or detoxification pathways of 5 PAH. Urinary quantification of those new biomarkers should improve the biomonitoring of populations to carcinogenic PAH. Finally, we evaluated the impact of synthetic or industrial mixtures (coal tar pitch and petroleum coke extracts) composition at different doses on carcinogenic PAH skin absorption and metabolism combined or not with ultraviolet radiations (UVR). PAH penetration diminished when mixture complexity and dose increased. While UVR increased PAH penetration when industrial complex mixtures were applied, no effect was observed on pure B[*a*]P or synthetic mixtures. PAH bioactivation decreased with mixtures and UVR, inducing unmetabolized PAH accumulation in the skin which may delay the occurrence of genotoxic effects. Similarly to B[*a*]P, other carcinogenic PAH toxicity seems to be mainly local and depends on skin exposure scenario. This work underlines the importance of mixtures study owing to more complex chemical interactions than simple additive effects.

Key words: Cutaneous metabolism, Biological exposure indicators, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Mixtures.