



HAL
open science

Etude des modifications du métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques en mélanges sur un modèle murin

Maguy El Hajjar

► **To cite this version:**

Maguy El Hajjar. Etude des modifications du métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques en mélanges sur un modèle murin. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALS017 . tel-04188578

HAL Id: tel-04188578

<https://theses.hal.science/tel-04188578v1>

Submitted on 26 Aug 2023

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 L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : ISCE - Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

Spécialité : MBS - Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Unité de recherche : Translational Innovation in Medicine and Complexity

Etude des modifications du métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques en mélanges sur un modèle murin

Study of changes in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in mixtures in a rat model

Présentée par :

Maguy EL HAJJAR

Direction de thèse :

Christine DEMEILLIERS

Maître de conférences HDR, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Anne MAITRE

Professeur des Univ. - Praticien hosp., Université Grenoble Alpes

Co-directrice de thèse

Rapporteurs :

BRIGITTE LE MAGUERESSE-BATTISTONI

Directeur de recherche, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

NANCY HOPF

Chargé de recherche HDR, Unisanté

Thèse soutenue publiquement le **26 juin 2023**, devant le jury composé de :

CHRISTINE DEMEILLIERS

Maître de conférences HDR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Directrice de thèse

BRIGITTE LE MAGUERESSE-BATTISTONI

Directeur de recherche, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Rapporteuse

ANNE MAITRE

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Co-directrice de thèse

STEPHANE REYNAUD

Professeur des Universités, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Président

LYDIE SPARFEL

Professeur des Universités, UNIVERSITE DE RENNES

Examinatrice

NANCY HOPF

Chargé de recherche HDR, Unisanté

Rapporteuse



Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier et exprimer ma gratitude envers ma directrice de thèse, Dr Christine Demeilliers, et ma co-directrice de thèse, Pr Anne Maitre, pour la confiance qu'elles m'ont accordée, et pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse.

Je vous remercie énormément pour tout le travail et le temps que vous m'avez consacrés pour la réalisation de cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

Dr Christine Demeilliers et Pr Anne Maitre merci de m'avoir accueilli au sein de votre équipe « Environnement et Prévention en Santé des Populations ». J'ai commencé ma carrière de recherche en France dans votre équipe durant mon M1, puis mon M2 pour finir avec ma thèse. Je vous remercie pour m'avoir accompagnée durant tout ce parcours tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. C'est grâce à vos conseils instructifs, votre engagement et votre aide que j'ai pu acquérir les compétences et les habilités du chercheur et d'enseignant que je suis actuellement.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury pour le travail et le temps consacré pour évaluer ce travail. Dr Nancy Hopf et Dr Brigitte LeMagueresse-Battistoni pour avoir accepté d'être rapporteuses de cette thèse. J'adresse également mes remerciements aux Pr Stéphane Reynaud et Pr Lydie Sparfel pour avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier les membres de comité de suivi de thèse Dr Jean Breton et Dr Muriel Raveton d'avoir accepté de faire partie de ce comité ainsi que pour leur accompagnement et leurs conseils tout au long de la thèse.

A l'ensemble de l'équipe EPSP, merci de m'avoir accueilli durant 4 ans depuis le stage de M1 jusqu'à la fin de la thèse. Je vous remercie pour tous les pauses-café, les souvenirs, les rires, les repas de midi et tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Travailler avec vous tous était une joie absolue et un véritable moment de confort durant mes années de thèse. Je tiens à remercier tous les doctorants, post-docs et stagiaires de passage à l'équipe EPSP et avec qui j'ai passé de très bons moments.

Sylvette, merci pour tes conseils et ton aide dans la rédaction de ma bibliographie. Tu as toujours été disponible pour répondre à mes questions. Et avec ton tour de magie, tu as toujours réussi à me gêner avec les articles qui m'étaient nécessaires !

Franck, notre « star-tisticien », je te remercie pour tes nombreux conseils et ton aide. Je suis désolée de t'avoir embêté tout au long de ma thèse avec mes petits échantillons.

« Les misérables de Jean-Roget » : Marie-Laure et Joanna, merci pour votre précieux soutien tout au long de 3 ans et jusqu'à la fin de ma thèse. Je vous remercie pour votre gentillesse, pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble, pour nos nombreuses conversations interminables. Je vous souhaite une bonne continuation pour votre thèse. Vous êtes des amies exceptionnelles et je suis bénie de vous avoir dans ma vie. Si jamais vous avez besoin de moi, sachez que je serai là pour vous, comme vous l'avez été pour moi.

Au laboratoire de « Toxicologie Professionnelle et Environnementale », Aurélie, Sarah, Justine, et Léïa, je vous remercie pour tous les moments qu'on a passés ensemble. Dr Renaud Persoons, merci pour tes conseils et à toutes les discussions qu'on a eu ensemble. Aurélie, merci d'avoir facilité toutes les tâches administratives auxquelles j'ai dû faire face.

Marie, quoi que j'écris ça ne suffirait pas à expliquer mes sentiments et ma gratitude vers toi. Ton soutien, tes conseils et ta présence à mes côtés ont été d'une grande aide pour que je sois aujourd'hui à la fin de ma thèse. Je me souviendrais toujours des moments passés devant l'écran en attendant LE FAMEUX PIC du 3-OHB[a]P!

Merci Karine pour toute l'aide que tu m'as fourni pour garder mes filles durant toutes mes années d'études, tu étais pour moi ma famille.

Je remercie aussi tous mes copains libanais à Grenoble. Merci pour votre soutien, votre encouragement et pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

Papa, Maman, si je suis là aujourd'hui, c'est à cause de vous et pour vous. Je vous remercie pour votre soutien, votre amour et votre aide surtout durant la rédaction de ma thèse. Votre soutien et votre aide ont été d'une grande aide pour moi et ont fait une grande différence dans ma vie. J'aurais bien aimé que vous soyez à mes côtés durant la soutenance de ma thèse pour voir la fierté dans vos yeux.

Je remercie mes beaux-parents; mes frères; ma grand-mère Samira, ma tante Raghida, mes belles-sœurs; mes beaux-frères et mes cousines qui malgré la grande distance qui nous sépare m'ont soutenue tout au long de ma thèse et qui n'ont pas arrêté de m'encourager pour aller jusqu'au bout.

Grand merci à mon mari qui a toujours été là pour moi dans les moments difficiles, pour me soutenir, me supporter et m'encourager durant cette thèse. Avec nos 2 filles, Aya et Mira, de belles aventures nous attendent !

Liste des abréviations

ABC : transporteurs à cassettes liant l'ATP

ABCC : famille C des ABC

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

AE : acétate d'éthyle

AhR : récepteur aux hydrocarbures aromatiques

AIP : AhR Interacting Protein

AKR : aldo-kéto-réductase

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARE : élément de réponse antioxydant

ARNT : AhR nuclear translocator

ATP : adénosine triphosphate

B[a]A : benzo[a]anthracène

B[a]P : benzo[a]pyrène

B[b]F : benzo[b]fluoranthène

B[e]P : benzo[e]pyrène

B[g,h,i]p : benzo[g,h,i]pérylène

bHLH/PAS : basic-loop-helix-PER-ARNT-SIM

B[k]F : benzo[k]fluoranthène

B[j]F : benzo[j]fluoranthène

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

BSTFA : le N, O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide

Cav-1 : cavéoline-1

CH : cyclohexane

C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha

Chr : chrysène

CIRC : Centre Internationale de Recherche sur le Cancer

CO₂ : dioxyde de carbone

CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France

c-src : thyrosine kinase src

CTP : coal tar pitch

CV : coefficient de variation

CYP : cytochrome P450

dA : déoxyadénosine

DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène

DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène

DB[def,p]C : dibenzo[def,p]chrysène

DD : dihydrodiol déhydrogénase

dG : déoxyguanosine

DMB[a]A : 7,12-diméthylbenz[a]anthracène

DSDP : début de semaine début de poste

dSPE : extraction solide en phase dispersive

ECHA : Agence européenne des produits chimiques

EFSA : autorité européenne de sécurité des aliments

EH : époxyde hydrolase

EPA : l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement

EPC : équipement de protection collective

EPI : équipement de protection individuelle

Er α : récepteur aux oestrogènes-alpha

ERO : espèces réactives à l'oxygène

ERS : évaluation des risques sanitaires

ERU : excès de risque unitaire

FABP4 : protéine de liaison aux acides gras 4

FAK : Focal Adhesion Kinase

FET : facteur d'équivalence toxique

Flua : fluoranthène

FPM : faible poids moléculaire

FSDP : fin de semaine début de poste

FSFP : fin de semaine fin de poste

GC : chromatographie gazeuse

GC-MSMS-NCI : GC couplée à un spectromètre de masse en mode tandem équipé d'une source d'ionisation chimique négative

GLP-1 : glucagon-like peptide-1

GST : glutathion-transférases

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

HPLC : chromatographie liquide haute performance

HPLC-Fluo : chromatographie liquide haute performance avec détection fluorescence

HPM : haut poids moléculaire

Hsp90 : protéine chaperonne du shock thermique

H₂O₂ : peroxyde hydrogène

IC : intervalle de confiance à 95 %

IgA : Immunoglobuline A

IL-1 β : interleukine-1 β

IL8 : interleukine 8

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des RISques

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène

KLF6 : facteur 6 de type Kruppel

Kow : coefficient de partage eau-octanol

LLE : extraction liquide-liquide

LOAEL : lowest observed adversed effect level

LQ : limite de quantification

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP-1 : protéine chimiotactique monocyttaire 1

MeOH : méthanol

MPO : myéloperoxydase

MRL : minimum risk level

MS/MS : spectrométrie de masse en mode tandem

MTBSTFA : N-(tert-Butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B : facteur nucléaire Kappa-B

NIH National Institutes of Health

NK : natural killer

NOAEL : no observed adverse effect level

NQO1 : NADPH quinone oxidoreductase 1

NTP : Programme National de Toxicologie

OCDE : l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OEHHA : Office of Environmental Health Hazard Assessment

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : odds ratio

O₂⁻ : anion superoxyde

PBPK : modèle pharmacocinétique physiologique

PHTA : Plateforme de Haute Technologie Animale

PKC : Protéine Kinase C

PM : poids moléculaire

POP : polluant organique persistant

PPAR α : proliférateur de peroxyosome α

PPAR γ : proliférateur de peroxyosome γ

PXR : pregnane X receptor

Pyr : pyrène

QSAR : modèle relation quantitative structure-activité

RB : protéine de Rétinoblastome

RIVM : institut national néerlandais pour la santé publique et l'environnement

SBE : surveillance biologique de l'exposition

SD : Sprague Dawley

SI : système immunitaire

SPE : extraction en phase solide

SULT : sulfotransférase

TGF- α : facteur de croissance α

TNF- α : facteur de nécrose tumorale α

UE : Union européenne

UGT : uridine diphosphate-glucuronyl-transférases

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

VBR : valeur biologique de référence

VLEP : valeurs limites d'exposition professionnelles

VTR : valeur toxicologique de référence

XAP2 : X-associated Protein 2

XRCC1 : X-Ray Repair Cross Complementing 1

XRE : Xenobiotic Response Element

W : Wistar

0,02-B[a]P : groupe de rats recevant le B[a]P seul à 0,02 mg.kg⁻¹.J⁻¹

0,2-B[a]P : groupe de rats recevant le B[a]P seul à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹

0,2-CTP : groupe recevant le mélange de HAP à base de CTP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P

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

1-OHChr : 1-hydroxychrysène

1-OHP : 1-hydroxypyrene

3-MC : 3-méthylcholanthrène

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

3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène

3-OHB[e]P : 3-hydroxybenzo[e]pyrène

3-OHChr : 3-hydroxychrysène

6-OHChr : 6-hydroxychrysène

8-OHB[b]F : 8-hydroxybenzo[b]fluoranthène

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

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

9-OHB[a]P : 9-hydroxybenzo[a]pyrène

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

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

Liste des tableaux

Tableau 1: Dénomination, numéro CAS, formule et caractéristiques des principaux HAP	25
Tableau 2 : Sources anthropiques des HAP.....	28
Tableau 3: Exposition de l'homme au B[a]P en Europe.....	30
Tableau 4 : Classification de la cancérogénicité définie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) des 16 HAP prioritaires de l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) et des HAP étudiés dans notre thèse	34
Tableau 5: Etudes in vivo chez les rongeurs sur l'absorption digestive du B[a]P et des autres HAP.....	42
Tableau 6: Etudes in vivo chez les rongeurs de la distribution du B[a]P et des autres HAP dans les différents organes	50
Tableau 7 : Etudes in vitro, ex vivo concernant l'effet de l'exposition au B[a]P ou autres HAP sur l'expression et l'activité des cytochromes P450 et de l'époxyde hydrolase.	54
Tableau 8: Etudes in vivo (chez des modèles rongeurs) concernant l'effet de l'exposition au B[a]P ou autres HAP sur l'expression et l'activité des cytochromes P450	57
Tableau 9 : Etudes in vitro, ex vivo du métabolisme du B[a]P et des autres HAP	68
Tableau 10 : Etudes in vivo (chez des modèles rongeurs) du métabolisme du B[a]P	73
Tableau 11 : Exemples de ligands exogènes et endogènes du AhR	76
Tableau 12 : Etudes in vitro et ex vivo des adduits à l'ADN après exposition au B[a]P et autres HAP	82
Tableau 13: Etudes in vivo des adduits à l'ADN après exposition au B[a]P et autres HAP	84
Tableau 14 : Effets sur l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme des HAP après une exposition in vitro et ex vivo à des mélanges binaires ou complexes de HAP	94
Tableau 15 : Effets sur l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme des HAP après une exposition in vivo à des mélanges binaires ou complexes de HAP	96
Tableau 16: Formation d'adduits à l'ADN après une exposition in vitro et ex vivo à des mélanges binaires ou complexes de HAP par rapport aux HAP individuels	99
Tableau 17: Formation d'adduits à l'ADN après une exposition in vivo à des mélanges binaires ou complexes de HAP par rapport aux HAP individuels	101
Tableau 18 : les valeurs des ERU du B[a]P par voie orale adoptée par différents organismes.....	115
Tableau 19 : Facteur d'équivalence toxique (FET) des HAP adoptés par l'INERIS	116
Tableau 20 : Quantité de croquettes consommées par jour et poids des fèces éliminés par jour chez des rats SD exposés pendant 10 semaines au B[a]P à 0,2 mg.kg-1.J-1 (0,2 B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP ajusté à 0,2 mg.kg-1.J-1 B[a]P (0,2 CTP)	152
Tableau 21: Elimination fécale des HAP parents exprimée en % de la dose administrée chez des rats Sprague Dawley (SD) (n = 5) et des rats Wistar (W) (n = 10), après exposition à un mélange de HAP	176
Tableau 22 : Paramètres de distribution du poids corporel, de la quantité des croquettes consommées et du poids des fèces chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP.....	186
Tableau 23 : Paramètres de distribution de l'élimination fécale des HAP exprimée en % de la dose administrée chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	188

Tableau 24 : Paramètres de distribution de l'élimination fécale du 1-hydroxypyène (1-OHP), 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHB[a]P) et tétraol-B[a]P exprimée en % de la dose administrée du pyrène et du benzo[a]pyrène chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	192
Tableau 25 : Paramètres de distribution de la quantité d'eau bue, du volume urinaire et de la créatinine urinaire chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	193
Tableau 26 : Paramètres de distribution de l'élimination urinaire des métabolites des HAP exprimée en % de la dose administrée chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP	195
Tableau 27 : Paramètres de distribution des pourcentages sanguins de la dose administrée des HAP chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	198
Tableau 28 : Variabilité inter-individuelle entre les rats Wistar pour la toxicocinétique des HAP	201

Liste des figures

Figure 1 : Différentes classifications des HAP	25
Figure 2 : Evolution des émissions de HAP des pays européens entre 1990 et 2019	28
Figure 3 : Graphique représentant les secteurs majoritaires dans la libération des HAP en France Métropolitaine en 2020	29
Figure 4: Les voies d'expositions (a) aux HAP et les effets sanitaires (b).....	33
Figure 5: Schéma de l'absorption, la distribution et l'élimination des HAP après absorption digestive	39
Figure 6: Absorption intestinale des HAP	39
Figure 7: Nomenclature des cytochromes P450 (exemple CYP 1A2)	53
Figure 8: Les principales voies de métabolisme du B[a]P	63
Figure 9: Formation des adduits stables (en rouge) et des adduits dépurinés (en bleu) par la voie du diol-époxyde et la voie de radical cation du B[a]P	65
Figure 10 : Schéma des différentes voies d'activation du AhR par le B[a]P.....	78
Figure 11: Biosurveillance de l'exposition à la maladie clinique avec les 3 types de biomarqueurs	105
Figure 12 : Chromatogrammes de 1,5 mL de suspension fécale surchargée avec des HAP à 850 ng.g ⁻¹ fèces extraite en LLE (en noir), ou extraite en LLE et dSPE (en bleu)	144
Figure 13: Chromatogrammes de 100 µl de sang témoin surchargé avec des HAP extraits par le cyclohexane (en noir) et l'acétate d'éthyle (en rouge)	145
Figure 14 : Chromatogrammes d'un même échantillon sanguin extrait 2 fois par LLE avec l'acétate d'éthyl et repris dans 200 µL ACN/acétone (v/v)	147
Figure 15 : Analyse des HAP et leurs métabolites dans les fèces, le sang et les organes.	150
Figure 16 : Elimination fécale du B[a]P chez des rats SD exposés au B[a]P à 0,2 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ (0,2 B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP ajusté à 0,2 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P (0,2 CTP) pendant 10 semaines	153
Figure 17 : Elimination fécale du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P chez des rats SD exposés au B[a]P à 0,2 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ (0,2 B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP ajusté à 0,2 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P (0,2 CTP) pendant 10 semaines	154
Figure 18 : Effet du mélange sur la toxicocinétique du benzo[a]pyrène	156
Figure 19 : Effet de l'exposition répétée sur la toxicocinétique des HAP	159
Figure 20 : Protocoles animaux pour l'étude de l'effet des facteurs génétiques et environnementaux sur la toxicocinétique des HAP	167
Figure 21 : Plan de présentation des résultats des facteurs pouvant avoir un effet sur la toxicocinétique des HAP	172
Figure 22 : Quantité de croquettes consommées par jour ajustée au poids corporel des rats chez les rats Sprague Dawley (SD) âgés de 6, 10 et 15 semaines (en blanc) et chez les rats Wistar (W) âgés de 11 semaines (en gris) exposés à un mélange de HAP	174
Figure 23 : Courbe de croissance des rats SD de l'âge de 6 semaines à l'âge de 15 semaines	174
Figure 24 : Poids des fèces éliminés par jour (a) et ajusté à la quantité des croquettes consommées par jour (b) chez les rats Sprague Dawley (SD) âgés de 6 semaines (en blanc) et chez les rats Wistar (W) âgés de 11 semaines (en gris) après 1 semaine d'exposition à un mélange de HAP	176

Figure 25 : Corrélation entre l'élimination fécale des HAP exprimée en % de la dose administrée et leur poids moléculaire chez des rats Sprague Dawley (SD) et des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP	177
Figure 26 : Profil d'élimination fécale des HAP exprimée en % de la dose administrée chez des rats Sprague Dawley (SD) et des rats Wistar (W) exposés à un mélange de HAP	178
Figure 27 : Elimination fécale du 1-OHP (a), du 3-OHB[a]P (b) et du tétraol-B[a]P (c) chez les rats Sprague Dawley (SD) (en blanc) et chez les rats Wistar (W) (en gris) exposés à un mélange de HAP, exprimée en % de la dose administrée du Pyr et du B[a]P respectivement.....	179
Figure 28 : Quantité d'eau bue, volume urinaire et créatinine urinaire chez les rats Sprague Dawley (SD) (en blanc) et chez les rats Wistar (W) (en gris) exposés à un mélange de HAP	180
Figure 29 : Élimination urinaire des métabolites des HAP chez les rats Sprague Dawley (SD) (en blanc) et chez les rats Wistar (W) (en gris) exposés à un mélange de HAP, exprimée en % de la dose administrée	182
Figure 30 : Variabilité inter-souche entre les rats Sprague Dawley (SD) et les rats Wistar (W) pour la toxicocinétique des HAP	184
Figure 31 : Somme des pourcentages des HAP parents éliminés dans les fèces des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	189
Figure 32 : Profil des pourcentages des HAP de haut poids moléculaire éliminés dans les fèces des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	189
Figure 33 : Matrice de corrélation entre les pourcentages de la dose administrée des HAP éliminée dans les fèces des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	190
Figure 34 : Matrice de corrélation entre l'élimination urinaire des différents métabolites des HAP exprimée en % de la dose administrée des HAP chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP	196
Figure 35 : Pourcentages de la dose administrée des HAP dans le sang des rats Wistar, 4 heures après l'exposition à un mélange de HAP	199
Figure 36 : Matrice de corrélation entre les pourcentages sanguins de la dose administrée des HAP chez des rats Wistar, 4 heures après l'exposition à un mélange de HAP	200
Figure 37 : Répartition des HAP à haut poids moléculaire dans le sang des rats Wistar, 4 heures après l'exposition à un mélange de HAP	200
Figure 38 : Pourcentage de variation du poids des fèces entre le 2ème (J2) et le 3ème (J3) jour d'exposition au B[a]P.....	203
Figure 39 : Pourcentage de variation de l'élimination fécale du B[a]P entre le 2ème (J2) et le 3ème (J3) jour d'exposition au B[a]P	204
Figure 40 : Pourcentage de variation de l'élimination fécale du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P entre le 2ème (J2) et le 3ème (J3) jour d'exposition au B[a]P.....	205
Figure 41 : Pourcentage de variation du volume urinaire, de la concentration urinaire de la créatinine et de la quantité urinaire de créatinine entre le 2ème (J2) et le 3ème (J3) jour d'exposition au B[a]P	206
Figure 42 : Pourcentage de variation de l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P entre le 2ème (J2) et le 3ème (J3) jour d'exposition au B[a]P.....	207
Figure 43 : Tétraol-B[a]P sanguin exprimé en pourcentage de la dose administrée du B[a]P dans le sang des rats Wistar 4 heures après l'exposition au B[a]P	208

Figure 44 : B[a]P sanguin exprimé en pourcentage de la dose administrée du B[a]P dans le sang des rats Wistar 4 heures après l'exposition au B[a]P	209
Figure 45 : Effet du jeûne sur la toxicocinétique du benzo[a]pyrène	209

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FIGURES	13
SOMMAIRE	17
PARTIE I : ETAT DE L'ART	23
CHAPITRE I : LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	24
1 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES HAP	24
2 SOURCES D'EMISSION	27
3 EXPOSITION DES POPULATIONS	29
3.1 <i>Exposition de la population générale</i>	<i>29</i>
3.2 <i>Exposition en milieu professionnel</i>	<i>31</i>
4 EFFETS SANITAIRES EN POPULATION HUMAINE ET CLASSIFICATION	32
CHAPITRE II : TOXICOCINETIQUE ET EFFETS TOXIQUES APRES MONOEXPOSITION AU B[A]P ET AUX AUTRES	
HAP : ETUDES CELLULAIRES ET CHEZ LE RONGEUR	37
1 TOXICOCINETIQUE APRES MONOEXPOSITION AU B[A]P ET AUX AUTRES HAP	37
1.1 Absorption du B[a]P et des autres HAP	37
1.1.1 Les différentes voies d'absorption du B[a]P et des autres HAP	37
1.1.2 Les étapes de l'absorption digestive des HAP	38
1.1.3 Facteurs influençant l'absorption digestive du B[a]P et des autres HAP chez le rongeur	41
1.2 Circulation sanguine et distribution dans les différents organes du B[a]P et des autres HAP chez le rongeur	49
1.3 Métabolisme du B[a]P et des autres HAP	52
1.3.1 Les cytochromes p450	52
1.3.1.1 Distribution des CYP dans les organes	53
1.3.1.2 CYP impliqués dans le métabolisme des HAP	53
1.3.1.3 Induction des CYP par le B[a]P et les autres HAP	53
1.3.2 L'époxyde hydrolase	61
1.3.3 Les enzymes de la phase II	61
1.3.4 Les différentes voies de bio-activation du B[a]P	62
1.3.4.1 La voie de diol-époxyde	64
1.3.4.2 La voie des o-quinones	65
1.3.4.3 La voie de radical cation	66
1.3.4.4 La voie de 9-OHB[a]P	67

1.3.5	Facteurs influençant le métabolisme du B[a]P et des autres HAP	67
1.4	<i>Elimination des HAP parents et de leurs métabolites chez le rongeur</i>	74
	Facteurs pouvant influencer l'élimination des HAP et de leurs métabolites	75
2	MECANISME DE REGULATION DU B[A]P ET DES AUTRES HAP VIA L'AhR.....	76
2.1	<i>Activation du récepteur AhR</i>	76
2.2	<i>Gènes modifiés via l'activation du récepteur AhR</i>	79
3	EFFETS CELLULAIRES ET CHEZ LE RONGEUR APRES MONOEXPOSITION AU B[A]P OU A UN HAP PARENT.....	81
3.1	<i>Effets génotoxiques au niveau cellulaire et chez le rongeur après exposition au B[a]P ou à un HAP parent</i>	81
3.2	<i>Effet reprotoxique du B[a]P chez le rongeur</i>	87
3.3	<i>Troubles métaboliques du B[a]P chez le rongeur</i>	88
3.4	<i>Autres effets toxiques du B[a]P et des autres HAP au niveau cellulaire et chez le rongeur</i>	88
CHAPITRE III : TOXICOCINETIQUE ET EFFETS COCKTAILS APRES EXPOSITION AUX HAP EN MELANGES : ETUDES CELLULAIRES ET CHEZ LE RONGEUR.....		91
1	TOXICOCINETIQUE DES HAP EN MELANGES	92
1.1	<i>Absorption des HAP en mélanges chez le rongeur</i>	92
1.2	<i>Distribution des HAP en mélanges chez le rongeur</i>	92
1.3	<i>Métabolisme des HAP en mélanges chez le rongeur</i>	93
	Induction / inhibition enzymatique des HAP en mélanges.....	93
1.4	<i>Elimination des HAP en mélanges chez le rongeur</i>	97
2	EFFETS TOXIQUES DES HAP EN MELANGES	98
2.1	<i>Effets génotoxiques des HAP en mélanges au niveau cellulaire et chez le rongeur</i>	98
2.2	<i>Effet immunotoxique des HAP en mélanges chez le rongeur</i>	102
CHAPITRE IV : SURVEILLANCE DES EXPOSITIONS ET EVALUATION DU RISQUE SANITAIRE		104
1	LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE D'EXPOSITION AUX HAP	104
1.1	<i>Biomarqueurs d'exposition chez l'homme</i>	105
1.2	<i>Biomarqueurs d'effet chez l'homme</i>	108
1.3	<i>Biomarqueurs de susceptibilité</i>	110
2	VALEURS TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE ET VALEURS LIMITES A NE PAS DEPASSER.....	112
2.1	<i>Effets toxiques à seuil</i>	112
2.2	<i>Effets toxiques sans seuil</i>	114
CHAPITRE V : CONTEXTE DU PROJET ET OBJECTIFS.....		119
PARTIE II : ETUDE DE L'EFFET DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET GENETIQUES SUR LA TOXICOCINETIQUE DES HAP EN MELANGES DANS DES MODELES MURINS		121

CHAPITRE I : ETUDE DE L'EFFET COCKTAIL SUR L'ELIMINATION URINAIRE DES METABOLITES DES HAP APRES EXPOSITION SUBCHRONIQUE DE RATS A DE FAIBLE DOSE DE BENZO[A]PYRENE SEUL OU INCLUS DANS UN MELANGE INDUSTRIEL D'HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES..... 122

1	OBJECTIF.....	122
2	ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	123
3	PRINCIPAUX RESULTATS.....	139
4	CONCLUSION	141

CHAPITRE II : MISE AU POINT DE L'ANALYSE DES HAP PARTICULAIRES ET DE LEURS METABOLITES DANS LE SANG, LES FECES ET LES ORGANES 143

1	MISE AU POINT DE L'ANALYSE DES HAP ET DE LEURS METABOLITES DANS LES FECES	143
1.1	<i>Analyse des HAP particulaires, du 3-OHB[a]P et du 1-OHP dans les fèces.....</i>	<i>143</i>
1.2	<i>Analyse du tétraol-B[a]P dans les fèces</i>	<i>144</i>
2	MISE AU POINT DE L'ANALYSE DES HAP ET DE LEURS METABOLITES DANS LE SANG	145
2.1	<i>Analyse des HAP dans le sang.....</i>	<i>145</i>
2.2	<i>Analyse du 1-OHP et du 3-OHB[a]P dans le sang.....</i>	<i>146</i>
2.3	<i>Analyse du tétraol-B[a]P dans le sang</i>	<i>147</i>
3	MISE AU POINT DE L'ANALYSE DES HAP DANS LES ORGANES.....	148
4	CONCLUSION	148

CHAPITRE III : ANALYSE DES HAP PARTICULAIRES ET LEURS METABOLITES DANS LES FECES ET LES ORGANES DE RATS EXPOSES AU B[A]P SEUL OU A UN MELANGE DE HAP..... 151

1	CALCUL DE DIFFERENTS PARAMETRES ET ANALYSES STATISTIQUES.....	151
2	EFFET DU MELANGE SUR LA TOXICOCINETIQUE DU B[A]P	152
2.1	<i>Effet du mélange sur l'alimentation de rats.....</i>	<i>152</i>
2.2	<i>Effet du mélange sur l'absorption intestinale du B[a]P.....</i>	<i>152</i>
2.3	<i>Effet du mélange sur le métabolisme intestinal du B[a]P</i>	<i>153</i>
2.4	<i>Conclusion générale sur l'effet du mélange sur la toxicocinétique du B[a]P.....</i>	<i>155</i>
3	EFFET DE L'EXPOSITION REPETEE SUR LA TOXICOCINETIQUE DES HAP.....	156
3.1	<i>Effet de l'exposition répétée sur l'alimentation de rats</i>	<i>156</i>
3.2	<i>Effet de l'exposition répétée sur l'absorption intestinale des HAP.....</i>	<i>157</i>
3.3	<i>Effet de l'exposition répétée sur le métabolisme intestinal des HAP</i>	<i>158</i>
3.4	<i>Conclusion générale sur l'effet de l'exposition répétée sur la toxicocinétique des HAP.....</i>	<i>158</i>

CHAPITRE IV : IMPACT DU CHOIX DU MODELE EXPERIMENTAL (MODELE ANIMAL) DANS LES ETUDES DE TOXICOLOGIE : INFLUENCE DES FACTEURS GENETIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA TOXICOCINETIQUE DU B[A]P SEUL OU INCLUS DANS UN MELANGE COMPLEXE 161

1	INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	161
2	MATERIELS ET METHODES.....	166

2.1	<i>Expérimentations animales</i>	166
2.2	<i>Protocoles animaux pour l'étude des effets génétiques et environnementaux sur la toxicocinétique du B[a]P</i>	167
2.3	<i>Analyse des HAP et de leurs métabolites dans les fèces, le sang et les urines</i>	169
2.4	<i>Calcul des différents paramètres</i>	169
2.5	<i>Analyses statistiques</i>	170
2.6	<i>Présentation des résultats</i>	170
3	RESULTATS ET DISCUSSION	173
3.1	<i>Facteurs génétiques</i>	173
3.1.1	Variabilité inter-souche (SD versus W) de la toxicocinétique des HAP	173
3.1.1.1	Variabilité inter-souche sur les paramètres généraux influençant l'absorption intestinale	173
3.1.1.2	Variabilité inter-souche de l'absorption intestinale des HAP parents.....	176
3.1.1.3	Variabilité inter-souche du métabolisme intestinal des HAP	178
3.1.1.4	Variabilité inter-souche sur les paramètres influençant l'élimination urinaire des métabolites des HAP	180
3.1.1.5	Variabilité inter-souche du métabolisme hépatique des HAP et de l'élimination urinaire de leurs métabolites	181
3.1.1.6	Conclusion de la variabilité inter-souche de la toxicocinétique des HAP	183
3.1.2	Variabilité inter-individuelle	185
3.1.2.1	Variabilité inter-individuelle sur les paramètres généraux influençant l'absorption intestinale .	185
3.1.2.2	Variabilité inter-individuelle de l'absorption intestinale des HAP.....	187
3.1.2.3	Variabilité inter-individuelle du métabolisme intestinal des HAP	191
3.1.2.4	Variabilité inter-individuelle des paramètres influençant l'élimination urinaire des métabolites des HAP	192
3.1.2.5	Variabilité inter-individuelle du métabolisme hépatique des HAP et de l'élimination urinaire de leurs métabolites.....	194
3.1.2.6	Variabilité inter-individuelle de l'absorption intestinale et du métabolisme hépatique des HAP par analyse des HAP sanguins	197
3.1.2.7	Conclusion générale de la variabilité inter-individuelle de la toxicocinétique des HAP	201
3.2	<i>Facteurs environnementaux</i>	202
3.2.1	Effet du jeûne sur la toxicocinétique du B[a]P.....	202
3.2.1.1	Effet du jeûne sur les paramètres généraux influençant l'absorption intestinale	203
3.2.1.2	Effet du jeûne sur l'absorption intestinale du B[a]P.....	203
3.2.1.3	Effet du jeûne sur le métabolisme intestinal du B[a]P	204
3.2.1.4	Effet du jeûne sur les paramètres influençant l'élimination urinaire des métabolites	205
3.2.1.5	Effet du jeûne sur le métabolisme hépatique du B[a]P et l'élimination urinaire de ses métabolites	206
3.2.1.6	Effet du jeûne sur l'absorption et le métabolisme hépatique du B[a]P	208
3.2.1.7	Conclusion générale sur l'effet du jeûne sur la toxicocinétique du B[a]P	209
4	CONCLUSION GENERALE SUR L'IMPACT DES FACTEURS GENETIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA TOXICOCINETIQUE DES HAP	210

PARTIE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	212
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	230
VALORISATION DE THESE	260
ANNEXES.....	262
ANNEXE 1 : MATRICE DE CORRELATION ENTRE L'ELIMINATION FECALE DES DIFFERENTS HAP EXPRIMEE EN % DE LA DOSE ADMINISTREE DU HAP ET LE POIDS CORPOREL DU RAT, LA QUANTITE DES CROQUETTES CONSOMMEES PAR JOUR (AJUSTEE OU NON AU POIDS CORPOREL), ET LE POIDS DES FECES ELIMINES PAR JOUR (AJUSTE OU NON A LA QUANTITE DES CROQUETTES CHEZ DES RATS WISTAR EXPOSES A UN MELANGE INDUSTRIEL DE HAP	263
ANNEXE 2 : MATRICE DE CORRELATION ENTRE L'ELIMINATION FECALE DU 1-OHP ET DU 3-OHB[A]P EXPRIMEE EN % DE LA DOSE ADMINISTREE DU HAP ET LE POIDS CORPOREL DU RAT, LA QUANTITE DES CROQUETTES CONSOMMEES PAR JOUR (AJUSTEE OU NON AU POIDS CORPOREL), LE POIDS DES FECES ELIMINES PAR JOUR (AJUSTE OU NON A LA QUANTITE DES CROQUETTES) ET LE HAP PARENT CHEZ DES RATS WISTAR EXPOSES A UN MELANGE INDUSTRIEL DE HAP	264
ANNEXE 3 : MATRICE DE CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES GENERAUX QUI REGULENT LA DIURESE CHEZ DES RATS WISTAR EXPOSES A UN MELANGE INDUSTRIEL DE HAP	265
ANNEXE 4 : MATRICE DE CORRELATION ENTRE L'ELIMINATION URINAIRE DES DIFFERENTS METABOLITES EXPRIMEE EN % DE LA DOSE ADMINISTREE DU HAP ET LA QUANTITE D'EAU BUE PAR JOUR, LE VOLUME URINAIRE ET LA CREATININE URINAIRE CHEZ DES RATS WISTAR EXPOSES A UN MELANGE INDUSTRIEL DE HAP	266

Partie I : Etat de l'art

Chapitre I : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

1 Caractéristiques physico-chimiques des HAP

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) constituent une large famille de composés (plus d'une centaine de molécules) constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène regroupés en plusieurs cycles contenant 5 ou 6 atomes de carbone. Les propriétés chimiques et physiques des molécules dépendent de la taille de la molécule et de leur forme. La tension de vapeur des HAP est généralement faible, et diminue avec le poids moléculaire (PM) [Achten 2015, Kim 2013]. De ce fait, on distingue classiquement 2 types d'HAP. Les HAP de faible poids moléculaire (FPM) (avec 2 ou 3 cycles) qui sont généralement non-cancérogènes et se trouvent à l'état gazeux dans l'air. A l'inverse, les HAP à haut poids moléculaire (HPM) (≥ 4 cycles) sont plus stables et plus toxiques et se trouvent sous forme particulaire dans l'air [Hussain 2018, Kim 2013, Yebra-Pimentel 2015]. Seuls le fluoranthène (Flua) (3 cycles aromatiques, $PM = 202 \text{ g.mol}^{-1}$) et le pyrène (Pyr) (4 cycles aromatiques, $PM = 202 \text{ g.mol}^{-1}$) se retrouvent à la fois dans la phase gazeuse et la phase particulaire de l'air et font partie des HAP à FPM [Rehwagen 2005].

Outre le PM, les HAP peuvent être classés selon le type de la disposition des cycles aromatiques (linéaire, angulaire ou en cluster) ou la structure des cycles (HAP alternatifs, qui comprennent une fusion unique d'anneaux benzéniques à six carbones et HAP non alternatifs qui comprennent la fusion d'atomes de benzène à six atomes de carbone avec un cycle supplémentaire de moins de six atomes de carbone) (Figure1) [Mallah 2022]. La structure angulaire des HAP est à la base de formation des régions spécifiques appelées région baie et région fjord ayant un potentiel cancérigène.

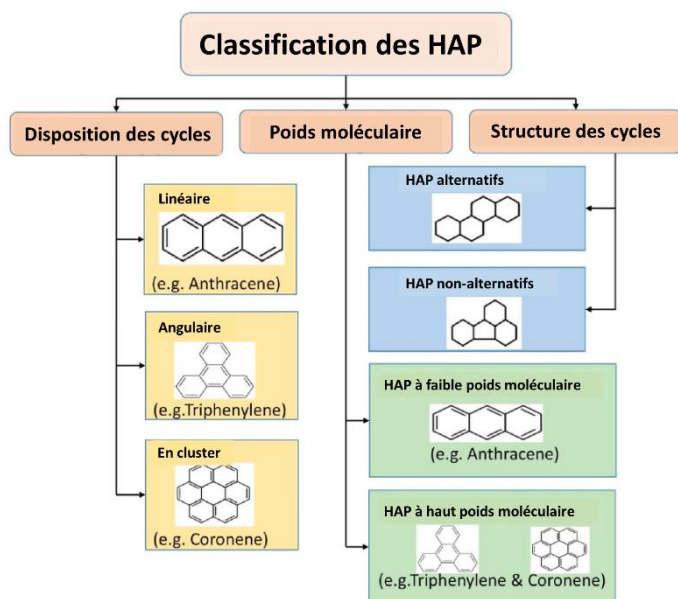

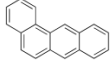
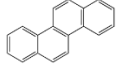
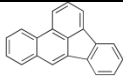
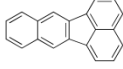


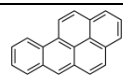
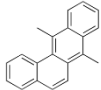
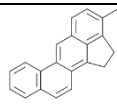

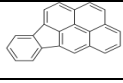
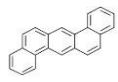


Figure 1 : Différentes classifications des HAP

Le coefficient de partage eau-octanol (K_{ow}) des HAP est généralement élevé, et augmente avec le PM (Tableau 1). Ainsi, les HAP sont des molécules lipophiles, solubles dans les graisses, insolubles dans les systèmes aqueux et inertes chimiquement [Yebra-Pimentel 2015].

Tableau 1: Dénomination, numéro CAS, formule et caractéristiques des principaux HAP

	N°CAS	Formule brute	Structure chimique	PM (g.mol ⁻¹)	Log K_{ow}	Solubilité dans l'eau (µg.L ⁻¹)
Naphtalène	91-20-3	C ₁₀ H ₈		128	3,30	31 000
Acénaphtylène	208-96-8	C ₁₂ H ₈		152	4,07	16 100
Acénaphtène	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀		154	3,98	3 800
2.6-diméthylnaphtalène	581-42-0	C ₁₂ H ₁₂		156	4,3	0.002
Fluorène	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀		166	4,18	1 900
Phénanthrène	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀		178	4,45	1 100
Anthracène	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀		178	4,45	43.4
Fluoranthène* (Flua)	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀		202	4,90	260
Pyrène* (Pyr)	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀		202	4,88	135

Triphénylène	217-59-4	C ₁₈ H ₁₂		228	4,9	43
Benz[a]anthracène* (B[a]A)	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂		228	5,61	9.4
Chrysène* (Chr)	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂		228	5,16	2
Benzo[b]fluoranthène* (B[b]F)	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂		252	6,04	1.5
Benzo[k]fluoranthène* (B[k]F)	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂		252	6,06	0.8
Benzo[j]fluoranthène * (B[j]F)	205-82-3	C ₂₀ H ₁₂		252	6,4	0,0000025
Benzo[e]pyrène* (B[e]P)	192-97-2	C ₂₀ H ₁₂		252	6,4	6,3
Benzo[a]pyrène* (B[a]P)	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂		252	6,06	1.62
7,12-diméthylbenz[a]anthracène	57-97-6	C ₂₀ H ₁₆		256	5.8	61
3-méthylcholanthrène	56-49-5	C ₂₁ H ₁₆		268	6.4	2.8
Benzo[g,h,i]pérylène* (B[g,h,i]P)	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂		276	6,50	0.26
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène* (IP)	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂		276	6,58	0.5
Dibenzo[a,h]anthracène* DB[a,h]A	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄		278	6,84	0.6

Kow : coefficient de partage eau-octanol, *PM* : poids moléculaire. Les HAP écrit en gras sont les 16 HAP prioritaires. Les HAP marqués par un * sont les HAP qu'on a analysés dans notre laboratoire. Les autres HAP sont les HAP étudiés dans la littérature.

Les HAP sont classés parmi les polluants organiques persistants (POP) car ils présentent les 4 propriétés suivantes : persistants, bioaccumulables, toxiques et mobiles.

- Toxicité : ce sont des molécules entraînant des effets toxiques sur la santé humaine [Mallah 2022, Sun 2021]
- Persistance dans l'environnement : même si les HAP peuvent subir des réactions de photolyse ou d'oxydation en milieu terrestre ou aquatique, ils sont stables dans l'environnement et peu dégradés par les conditions environnementales (température,

rayons, saturation en oxygène, pH, humidité, ...) ou par les organismes vivants [Akash 2023, Kończak 2023].

- Bioaccumulation : ces molécules peuvent s'accumuler facilement dans les tissus vivants car ce sont des molécules lipophiles et stables. Les coquillages accumulent les HAP présents dans le milieu aquatique, avec des facteurs de concentration parfois très élevés (phénomènes de bio-accumulation et de bioconcentration) [Mallah 2022]. Ainsi, le facteur de bio-accumulation des HAP dans les coquillages varie de 0,20 à 2,9 [Eça 2021]. Dans la chaîne trophique, les HAP contenus dans les proies sont ingérés et accumulés par les prédateurs, et ce phénomène de bio-amplification est à l'origine des fortes concentrations pouvant être mesurées chez les papillons [Luo 2022].
- Transport à longues distances : Le transport des HAP suit des voies très diversifiées, depuis les ruissellements, les déversements, les apports fluviaux, jusqu'aux transports atmosphériques sur de très longues distances et les précipitations. Ceci est dû au fait qu'ils peuvent être adsorbés sur des particules ce qui leur permet de se déplacer sur de longues distances et être transportés loin de leur source d'émission [Rehwagen 2005]. Ainsi, des HAP ont été mesurés dans des échantillons de glace des collines d'Allan de la chaîne Transantarctique [Becker 1997].

2 Sources d'émission

Les HAP sont ubiquitaires de l'environnement car ils sont principalement formés lors de la distillation du charbon et du pétrole et sont libérés lors de tous les processus de combustion incomplète de la matière organique ou de pyrolyse.

Les HAP sont émis par 2 types de sources : les sources naturelles et les sources anthropiques.

Parmi **les sources naturelles**, on peut citer les feux des volcans, les combustions fossiles et les combustions incomplètes des matières organiques telles que le charbon, le bois et la végétation. Aussi, on trouve la formation des HAP par des processus de pétrogenèse et biogenèse par les algues et les bactéries [Agrawal 2019, Kim 2013, Mallah 2022, Sun 2021].

Les sources anthropiques sont très variables et peuvent provenir de différentes activités domestiques (chauffage au bois, procédés de cuisson), des activités industrielles (distillation de

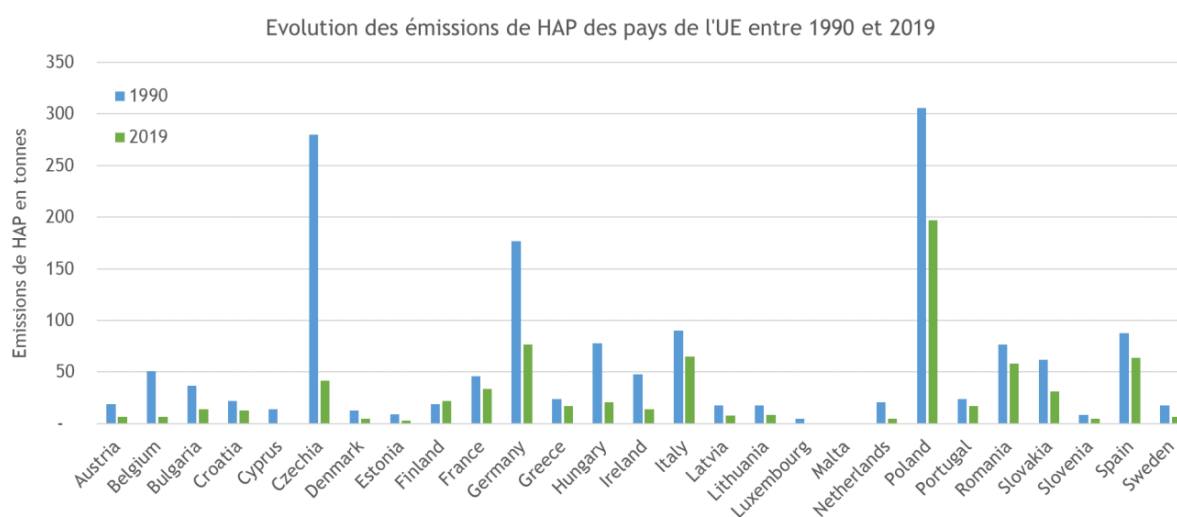
la houille et du pétrole, métallurgie, ...) et agricoles, et des moyens de transport, ... (Tableau 2).

Tableau 2 : Sources anthropiques des HAP

Sources stationnaires industrielles	Sources domestiques	Sources mobiles
-Production d'aluminium		
-Fabrication de pneu		
-Créosote et préservation du bois		
-Sidérurgie	-Chauffage (gaz naturel, GPL, bois, charbon)	-Voitures
-Industrie de bitume et goudrons	-Tabagisme	-Avions
-Cimenteries	-Cuisson des aliments (barbecue, friture)	-Trains
-Moteurs à combustion		-Bateaux
-Industries pétrochimiques et similaires		
-Chauffage et électricité		
-Incinérateurs de déchets ménagers et industriels		

D'après Sun et al. 2021.

Les émissions atmosphériques des HAP sont en réduction depuis les années 1990, suite notamment à l'introduction à grande échelle de la technologie des filtres à particules au niveau des moteurs, et à la mise en place de législations plus strictes concernant les rejets industriels et les concentrations admissibles des HAP dans l'air (Figure 2) [CITEPA 2022].



Source : European emission inventory report 1990-2019 - European Environment Agency

Figure 2 : Evolution des émissions de HAP des pays européens entre 1990 et 2019

D'après CITEPA 2022.

En France métropolitaine, le secteur résidentiel reste la source majeure des HAP du fait de la combustion de biomasse à des fins de chauffage (Figure 3) [CITEPA 2022]. Ainsi, les émissions atmosphériques varient considérablement **selon la saison** avec des émissions plus marquées en hiver [CITEPA 2022, Ifegwu 2015]. Ceci est expliqué par plusieurs facteurs : augmentation des émissions avec le chauffage domestique, dégradation moins importante durant l’hiver suite aux conditions météorologiques moins favorables (variation de la température, humidité, lumière solaire, ...), mauvaise dispersion des HAP du fait de la stabilité des basses couches et des phénomènes d’inversion thermique, phénomène fréquemment observé à Grenoble [Tomaz 2016].

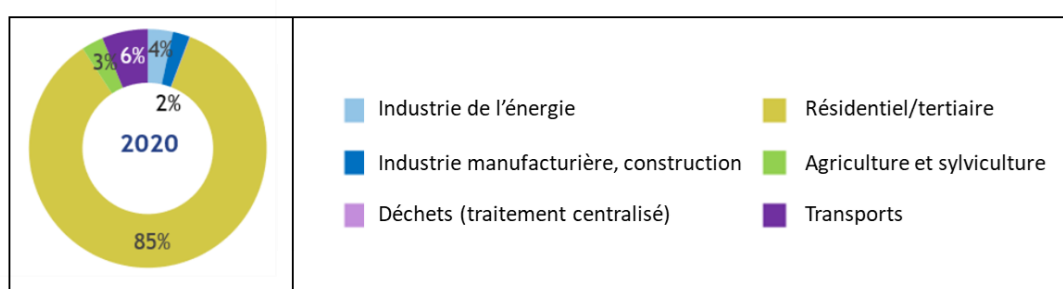


Figure 3 : Graphique représentant les secteurs majoritaires dans la libération des HAP en France Métropolitaine en 2020
D’après CITEPA 2022.

3 Exposition des populations

L’exposition aux HAP est différente entre la population générale et les travailleurs exposés pendant leur profession avec des niveaux 1 000 fois plus faible en environnement général [IARC 2010].

3.1 Exposition de la population générale

L’exposition aux HAP de la population générale se fait principalement via la voie digestive et est dû essentiellement à **l’alimentation** (Tableau 3).

Tableau 3: Exposition de l'homme au B[a]P en Europe

Voies d'exposition	B[a]P (ng.J ⁻¹)
Alimentation	185 – 255
Tabagisme actif	105
Tabagisme passif	40
Air inhalé	20
Eau potable	0,2 - 2

Pour **l'alimentation**, la transformation (comme le séchage et le fumage) et la cuisson des aliments à haute température (grillage, rôtissage et friture) sont les principales sources de d'exposition aux HAP chez les sujets non-fumeurs [ANSES 2011, Chen 2014]. Chez ces sujets, l'alimentation est responsable de plus de 90 % des apports journaliers en HAP [Polachova 2020].

Les HAP les plus abondants dans les aliments sont le Flua et le Pyr, et représentent environ la moitié du total des HAP ingérés [EFSA 2008, Ramesh 2004]. En 2008, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a conclu que le benzo[a]pyrène (B[a]P) ne peut pas être utilisé comme indicateur de la présence des HAP dans les aliments car il était absent dans certaines denrées alimentaires [EFSA 2008]. Pour cela, l'EFSA a fixé une somme de 4 HAP de HPM (B[a]P, benzo[a]anthracène (B[a]A), benzo[b]fluoranthène (B[b]F) et chrysène (Chr)) ou de 8 HAP de HPM (B[a]P, B[a]A, B[b]F, Chr, benzo[k]fluoranthène (B[k]F), benzo[g,h,i]pérylène (B[g,h,i]P), dibenzo[a,h]anthracène (DB[a,h]A) et indénol[1,2,3-cd]pyrène (IP)) comme indicateurs pour la contamination des aliments par les HAP.

Certaines cultures (comme le blé, le seigle et les lentilles) peuvent synthétiser des HAP ou les absorber via l'eau, l'air ou, le sol [Ciecierska 2013] mais les aliments les plus riches en HAP-4 sont les crustacés et les mollusques ($4,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$), l'huile ($1,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$) et la margarine ($1,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$) [ANSES 2011]. L'exposition moyenne journalière de la population française à la somme HAP-4 est de $1,48 \text{ ng.kg}^{-1}\text{pc.J}^{-1}$ (1,34 - 1,71) chez les adultes et de $2,26 \text{ ng.kg}^{-1}\text{pc.J}^{-1}$ (2,09 - 2,51) chez les enfants [ANSES 2011].

Le tabagisme (sous ses 2 formes active et passive) constitue une source importante d'exposition aux HAP de la population générale. Il multiplie de 10 à 15 le risque du cancer pulmonaire et est responsable de 83 % des cancers du poumon chez l'homme et de 69 % des chez les femmes [Santé.fr 2022]. De plus, l'exposition passive à la fumée de tabac augmente de 1,2 à 3,7 le risque du cancer des poumons avec une relation dose-réponse qui dépend du nombre d'année d'exposition et du nombre de cigarettes fumées par les personnes habitant dans

le même logement [Janerich 1990, Vineis 2005]. De plus, les fumeurs ont un risque de développer le cancer de la vessie 2,5 fois plus élevé que les non-fumeurs [Castelao 2001].

Les niveaux d'HAP et la composition des mélanges varient en fonction de la marque de cigarette et les conditions de fumage [Ding 2005]. La quantité totale des HAP mesurés dans la fumée peut aller de 1 à 1,6 µg par cigarette avec une dominance des HAP de FPM tels le naphthalène, l'acénaphthylène, l'acénaphène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le Flua et le Pyr [Ding 2005].

La pollution atmosphérique est une source d'exposition aux HAP mais ce type d'exposition varie selon le lieu d'habitation (milieu rural ou milieu urbain) et le mode de vie [EFSA 2008, Palazzi 2018, Park 2018]. Dans les zones urbaines, les concentrations atmosphériques d'HAP sont 3 à 5 fois plus élevées que celles observées dans les zones rurales [EFSA 2008].

L'apport des HAP par l'eau de boisson reste inférieur à 1 % chez l'homme (Tableau 3).

Il existe d'autres sources d'exposition aux HAP mais qui sont minoritaires comme l'ingestion des HAP à partir de sols contaminés (surtout pour les enfants) ou l'exposition cutanée suite au dépôt de particules après un feu ou incendie ou lors du contact avec de certains objets quotidiens souillés (poignée de porte, et jouets chez les enfants) [Wang 2012]. Enfin, l'exposition de la population générale a pu se faire à partir de certains produits cosmétiques ou certains produits pharmaceutiques à base de goudron de houille autrefois utilisés dans le traitement de certaines maladies comme le psoriasis et l'eczéma [Torsekar 2017]. Cependant, ce type de traitement n'est plus utilisé actuellement.

3.2 Exposition en milieu professionnel

En milieu professionnel, en 2017, près de 2,6 millions de travailleurs étaient exposés aux HAP en France dans de nombreux secteurs industriels tels que ceux utilisant des produits dérivés de la houille ou du pétrole, notamment en métallurgie [Rosankis 2022].

Les expositions professionnelles sont dues à des processus industriels où les matières carbonées telles que le coke, le goudron de houille, le brai de houille et les huiles étaient produits ou utilisés. Ainsi, la production de coke, la distillation du goudron de houille, le ramonage, les centrales thermoélectriques, l'étanchéité des toitures, la préservation du bois par créosote, la

production d'aluminium, ou la fabrication de cathode en carbone sont des secteurs industriels connus comme très exposants aux HAP [Maitre 2018].

La concentration atmosphérique des HAP varie selon le secteur industriel et la tâche effectuée et peut atteindre $100 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ [EFSA 2008, Maitre 2018]. Par exemple en métallurgie, la concentration urinaire du 1-hydroxypyrene (1-OHP), métabolite du Pyr, varie de $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine chez les travailleurs de maintenance (mécaniciens et électriciens) à $4.01 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine chez les travailleurs responsables du chargement des matières premières, du nettoyage des installations et du four, de la production des anodes [Barbeau 2014].

En plus de la nature du poste, l'année d'étude est importante du fait des améliorations techniques des procédés et du changement de la composition des matières premières qui ont eu lieu ces 30 dernières années. Par exemple, la modification des solvants de nettoyage (diesel et bio-diesel) a permis de réduire les concentrations du phénanthrène et de Pyr de 40 et 90 % [Cavallari 2012]. De plus, le remplacement du goudron de houille par du bitume lors du revêtement des routes a permis de diminuer d'un facteur 1 000 les émissions des HAP [McClean 2007].

L'exposition professionnelle des opérateurs se font par plusieurs voies d'absorption, essentiellement par inhalation et contact cutané, mais aussi par absorption digestive des particules inhalées qui sont dégluties. De ce fait, l'absorption des HAP en milieu professionnel dépend fortement de l'utilisation et de l'efficacité des équipements de protection collective (EPC) et des équipements de protection individuelle (EPI) tels que les masques respiratoires et les gants [Cavallari 2012, Crawford 2014]. Par exemple, dans le secteur de production d'aluminium, le taux de 1-OHP urinaire diminuait de $4,47$ à $3,16 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine avec le port de protection respiratoire [Alexandrie 2000].

4 Effets sanitaires en population humaine et classification

La toxicité principale des HAP est leur cancérogénicité. En plus de ces effets cancérogènes, les HAP peuvent aussi avoir des effets aigus ou des effets chroniques (Figure 4). Seuls les résultats des études récentes (à partir de 1980) seront rapportés.

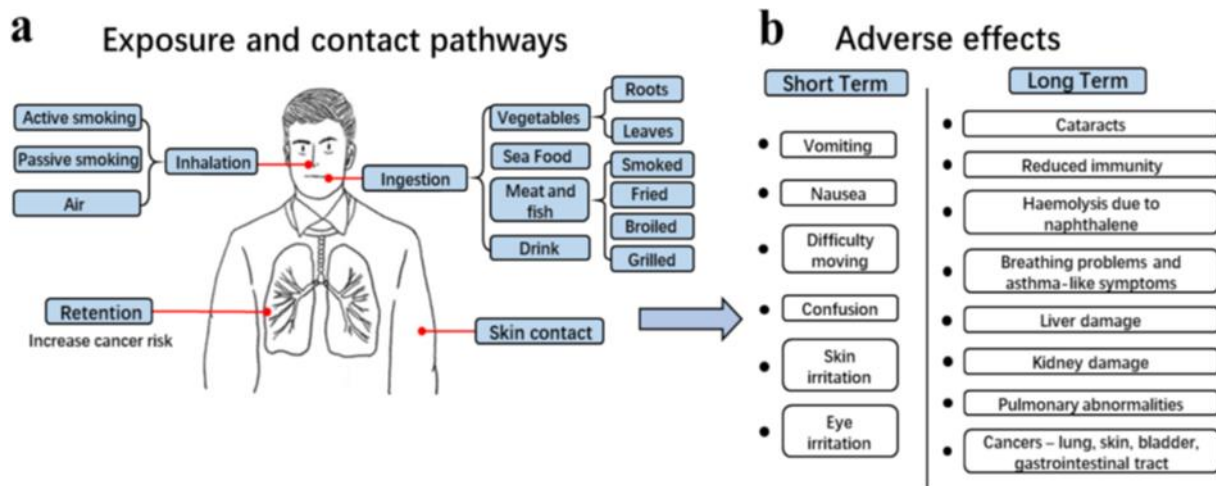


Figure 4: Les voies d'expositions (a) aux HAP et les effets sanitaires (b)
D'après Sun et al. 2021.

Parmi les effets aigus, des symptômes tels que nausées, vomissements, confusion et irritation de la peau et des yeux peuvent survenir après une exposition à court terme à de fortes concentrations de HAP chez les travailleurs mais ceci n'est pratiquement jamais rencontré actuellement [Goudarzi 2017].

Les HAP peuvent aussi avoir **un effet phototoxique**. Les HAP absorbent la lumière UV pour passer à des états d'excitation ce qui déclenche une série de réactions conduisant à la libération des espèces réactives à l'oxygène (ERO) et d'autres intermédiaires réactifs capables d'endommager l'acide désoxyribonucléique (ADN), les protéines et la membrane cellulaire [Yu 2006]. L'addition d'une irradiation aux UV à un traitement du psoriasis à la base de goudron de houille augmente de 2,4 le risque du développement du cancer de la peau [Stern 1980].

Parmi les effets chroniques, l'effet cancérigène des HAP a été le plus étudié. Selon le Centre Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC), le B[a]P est le seul HAP classé cancérigène certain pour l'homme (groupe 1). Les HAP de HPM sont classés comme cancérigènes probables (groupe 2A) ou possibles pour l'homme (groupe 2B), excepté le B[g,h,i]P qui est inclassable (groupe 3). Les HAP de FPM, le Flua et le Pyr sont inclassables quant à leur cancérigénicité (groupe 3), excepté le naphthalène qui est classé cancérigène possible (groupe 2B) (Tableau 4). L'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) a quant à elle classé 16 HAP comme prioritaires selon leur abondance dans l'environnement.

Tableau 4 : Classification de la cancérogénicité définie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) des 16 HAP prioritaires de l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) et des HAP étudiés dans notre thèse

	N°CAS	CIRC
Naphtalène	91-20-3	2B
Acénaphtylène	208-96-8	3
Acénaphène	83-32-9	3
Fluorène	86-73-7	3
Phénanthrène	85-01-8	3
Anthracène	120-12-7	3
Fluoranthène*	206-44-0	3
Pyrène*	129-00-0	3
Benz[a]anthracène*	56-55-3	2B
Chrysène*	218-01-9	2B
Benzo[b]fluoranthène*	205-99-2	2B
Benzo[k]fluoranthène*	207-08-9	2B
Benzo[j]fluoranthène*	205-82-3	2B
Benzo[a]pyrène*	50-32-8	1
Benzo[e]pyrène*	192-97-2	3
Benzo[g,h,i]pérylène*	191-24-2	3
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène*	193-39-5	2B
Dibenzo[a,h]anthracène*	53-70-3	2A

1 : cancérogène avéré pour l'homme, 2A : cancérogène probable pour l'homme, 2B : cancérogène possible pour l'homme, 3 : inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme.

*Les HAP marqués par un * sont les HAP qu'on a analysés dans notre laboratoire.*

Chez l'homme, de nombreuses études épidémiologiques ont étudié la relation entre l'exposition aux HAP et certains cancers. En milieu professionnel, l'exposition aux HAP est associée à plusieurs types de cancers et plus spécifiquement aux cancers des poumons, cancer de la peau et cancer de la vessie qui sont reconnus depuis de nombreuses années en tant que maladies professionnelles [Boffetta 1997, Bosetti 20007, Chen 2008, Kogevinas 2003, Rota 2014, Singh

2018]. Il a été également démontré en population générale que l'exposition aux HAP via le tabagisme et l'alimentation augmentait le risque des cancers. En plus du cancer du poumon en lien avec le tabagisme, Koutros et al. (2008) ont montré que la consommation de la viande très bien cuite augmentait de 1,3 à 2 fois le risque du cancer de la prostate. Une autre étude a montré que le risque de survenue du cancer colorectal était augmenté de 2,6 à 5,6 avec la consommation d'aliments riches en B[a]P [Sinha 2005].

Les HAP pourraient également avoir des effets **reprotoxiques**. Des études épidémiologiques ont trouvé une relation entre l'exposition pré-natale aux HAP et la diminution du poids de naissance, la diminution de la circonférence de la tête à la naissance et l'augmentation du nombre de naissances prématurées [Agarwal 2022, Choi 2006, Huang 2020, Suter 2019, Ye 2020]. Ces nombreuses études ne confirmaient pas ceux d'une étude plus ancienne qui n'avait pas trouvé d'association entre les concentrations placentaires de HAP et le poids de naissance [Gladden 2000].

Les HAP pourraient avoir **des effets neurotoxiques**. L'exposition pré-natale aux HAP pourrait induire des troubles du comportement chez les enfants à l'âge de 9 ans avec un déficit de l'attention et une hyperactivité [Perera 2018]. En milieu professionnel, il a été mis en évidence de mauvaises performances de la mémoire auditive et visuelle, de la vitesse de traitement de l'information et des troubles émotionnels chez les mineurs de charbon qui avaient des niveaux élevés d'exposition aux HAP [Wang 2020].

Les HAP pourraient aussi avoir des **effets immunotoxiques**. Chez des fumeurs, il a été trouvé une augmentation des cellules immunitaires B CD19 avec une augmentation du pourcentage des cellules B activées en comparaison avec des non-fumeurs (9,62 % *versus* 15,7 %) ce qui pourrait être à la base de l'augmentation des maladies auto-immunes chez les fumeurs [Burchiel 2019].

Enfin, les HAP pourraient avoir **des effets cardiovasculaires**. Des études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux HAP augmentait le risque de survenue de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, l'ischémie et la variabilité de la fréquence cardiaque [Li 2012, Lu 2023, Poursafa 2017]. De plus, certains facteurs connus comme marqueurs pour les maladies cardiovasculaires ont été trouvés augmentés chez des ramoneurs exposés aux HAP [Alhamdow 2017].

Conclusion du chapitre

Les HAP constituent une large famille de polluants environnementaux avec plus d'une centaine de molécules composés de plusieurs cycles aromatiques. Les HAP à FPM (de 2 à 4 cycles) sont présents dans la phase gazeuse de l'environnement alors que les HAP à HPM (plus de 4 cycles) sont sous forme particulaire.

La source d'exposition principale en population générale est l'alimentation (plus de 90% d'apport en HAP) chez les non-fumeurs. Certaines professions comme la production de coke, la distillation du goudron de houille, le ramonage, les centrales thermoélectriques, l'étanchéité des toitures, la préservation du bois par créosote, la production d'aluminium, ou la fabrication de cathode en carbone sont des secteurs industriels connus pour générer une forte exposition aux HAP.

Quelle que soit la source d'exposition, l'exposition aux HAP se fait sous forme de mélanges dont la composition varie selon la source d'émission.

Les HAP possèdent plusieurs effets sanitaires : ils sont phototoxiques, neurotoxiques, immunotoxiques, cardiotoxiques, mais surtout cancérigènes. Les HAP à HPM sont cancérigènes certains (B[a]P), probables (2A) ou possibles (2B) pour l'homme alors que les HAP à FPM ne sont généralement pas classés parmi les substances cancérigènes.

Chapitre II : Toxicocinétique et effets toxiques après monoexposition au B[a]P et aux autres HAP : études cellulaires et chez le rongeur

Ce chapitre est centré sur la toxicocinétique et les effets toxiques après exposition à un seul HAP dans des modèles *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* avec des modèles rongeurs (rats et souris).

1 Toxicocinétique après monoexposition au B[a]P et aux autres HAP

1.1 Absorption du B[a]P et des autres HAP

1.1.1 Les différentes voies d'absorption du B[a]P et des autres HAP

Les HAP peuvent être absorbés par voie cutanée, respiratoire ou digestive.

L'absorption cutanée dépend de plusieurs facteurs. La diffusion des HAP à travers la peau diminue avec l'augmentation du PM [Bourgart 2019b, Hopf 2018]. Elle varie aussi selon la matrice dans laquelle les HAP se trouvent. Par exemple, l'absorption cutanée du B[a]P après application *in vitro* sur de la peau humaine est de 56% lorsque le B[a]P est dissous dans l'acétone alors qu'elle est seulement de 15% lorsque la peau est exposée à du B[a]P adsorbé sur des particules de sol [Moody 2007]. De plus, quand le B[a]P est dissout dans un solvant liquide, son absorption par la peau de la souris diminue avec l'augmentation de la viscosité du solvant [Ingram 1995]. Enfin, la pénétration des HAP diminue avec l'augmentation de la dose appliquée et de la complexité des mélanges [Bourgart 2019a, 2019b].

L'absorption respiratoire des HAP dépend de leur état physique dans l'air. Alors que les HAP gazeux de FPM sont rapidement absorbés [IARC 2010], l'absorption des HAP particuliers de HPM dépend de la taille des particules sur lesquelles ils sont fixés. En effet, les HAP adsorbés sur les plus petites particules ($< 1\mu\text{m}$) vont arriver jusqu'aux voies aériennes inférieures (les alvéoles) et seront rapidement absorbés, alors que les HAP adsorbés sur les particules les plus grosses vont rester au niveau des voies aériennes supérieures [ATSDR 1995, EC 2002, IARC 2010]. Ainsi, l'absorption du B[a]P adsorbé sur des particules $< 1\mu\text{m}$ est 4 fois plus rapide que celle du B[a]P adsorbé sur des particules de 15 et 30 μm [ATSDR 1995]. L'absorption pulmonaire se produit souvent parallèlement à la clairance mucociliaire, où les HAP qui sont

adsorbés sur des particules inhalées sont éliminés de l'arbre pulmonaire et ensuite avalés, ce qui change la voie d'exposition de l'inhalation à la voie digestive [ATSDR 1995, Bevan 1991, IARC 2010].

L'absorption respiratoire peut varier aussi avec l'espèce animale utilisée. Une étude a montré qu'après une administration intra-trachéale du B[a]P, l'absorption suivait l'ordre croissant suivant : hamster (54,6 %) < rats Gunn (59,4 %) < cochon d'inde (61,7 %) < rats Sprague Dawley (SD) (70,3 %) [Weyand 1987].

L'absorption digestive des HAP est due à l'alimentation ou l'absorption d'eau contaminée mais aussi par le contact direct main-bouche ou la déglutition de particules inhalées. Du fait de l'importance de cette voie dans notre travail, nous allons la détailler dans les chapitres ci-après.

1.1.2 Les étapes de l'absorption digestive des HAP

L'absorption digestive des HAP se fait essentiellement au niveau de l'intestin par les entérocytes [Ramesh 2004]. Ainsi, les HAP vont passer dans la circulation lymphatique ou la circulation sanguine via la veine porte pour être distribués dans l'organisme (Figure 5) [Gershkovich 2005, Laurent 2002].

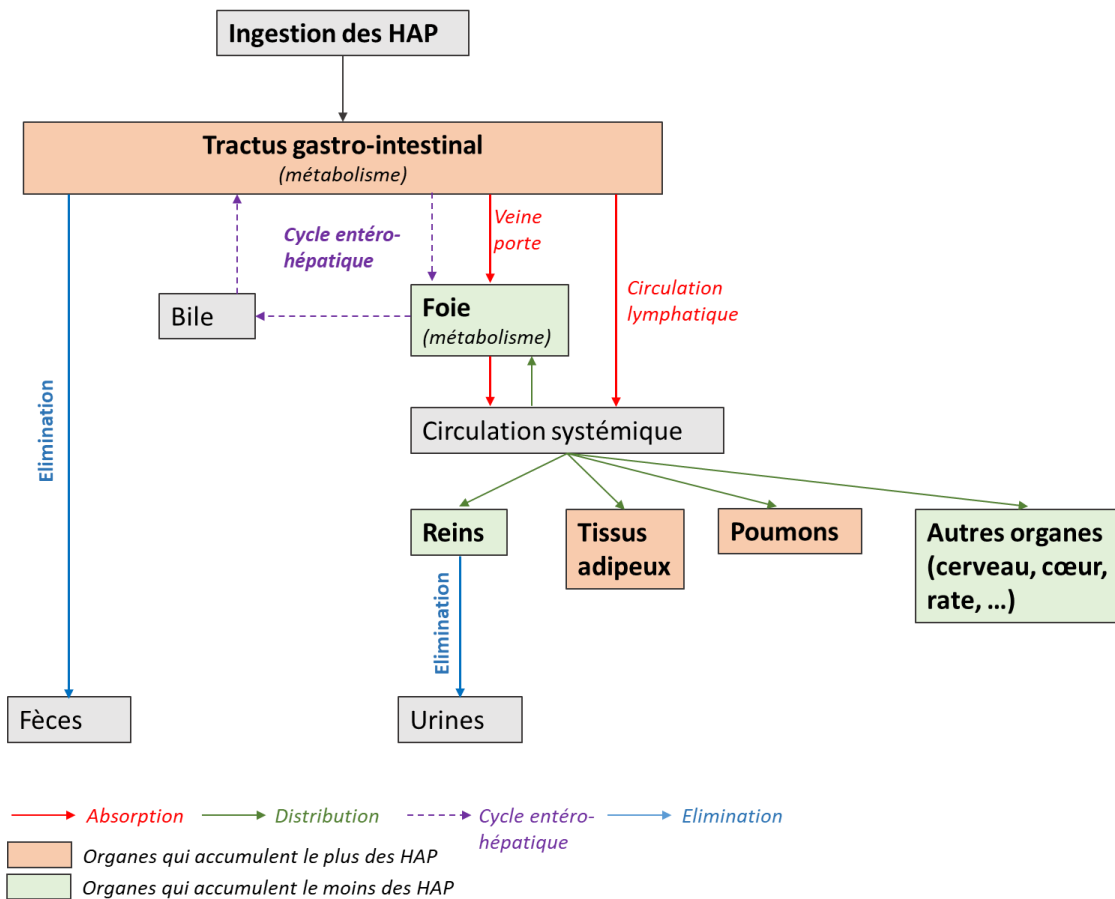


Figure 5: Schéma de l'absorption, la distribution et l'élimination des HAP après absorption digestive
 D'après Harris et al. 2013, Ramesh et al. 2004. HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Comme pour l'absorption des lipides, l'absorption intestinale des HAP se fait par l'intermédiaire des micelles (Figure 6) [Kelly 2004].

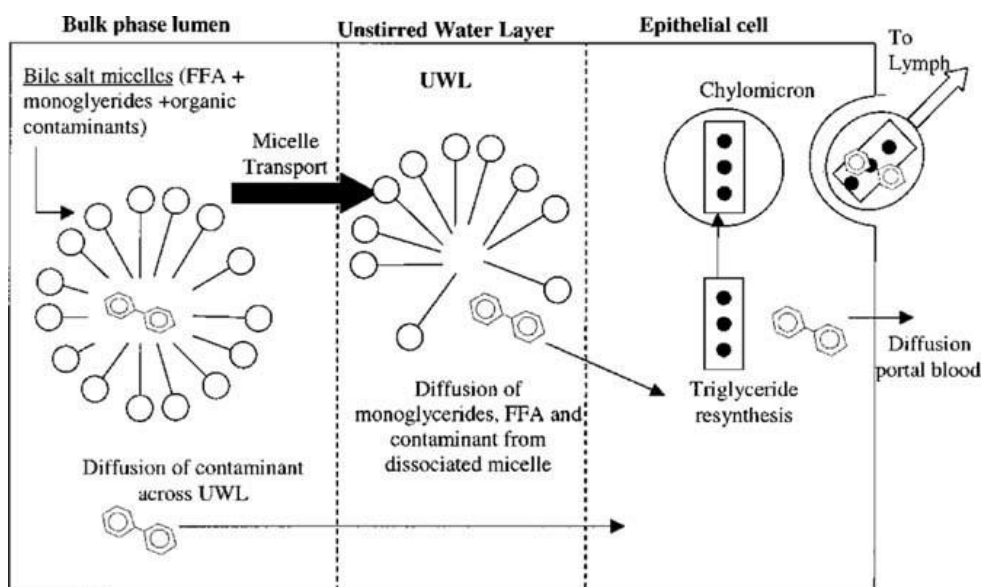


Figure 6: Absorption intestinale des HAP
 D'après Kelly et al. 2004. FFA : acide gras libre, UWL : couche d'eau stagnante.

L'absorption digestive des lipides passe par 2 étapes : la digestion des lipides par les enzymes digestives (lipase gastrique, lipase pancréatique, cholestérol estérase et phospholipase) et la dispersion micellaire des produits de lipolyse par les acides biliaires. En effet, les sels biliaires vont s'aligner autour des monoglycérides, des acides gras libres et du cholestérol pour former les micelles qui conduisent les lipides vers la bordure intestinale en brosse. A cause de leur nature amphiphile, ces micelles vont permettre aux composés lipophiles de passer la couche d'eau stagnante qui est présente autour des entérocytes [Marcil 2004]. Dans les entérocytes, les produits lipidiques (acides gras et monoglycérides) sont transformés en triglycérides, qui sont ensuite intégrés aux phospholipides et aux apoprotéines pour former des vésicules lipidiques appelées lipoprotéines ou chylomicrons. Les vésicules lipidiques migrent ensuite vers les membranes basolatérales où elles sont libérées par exocytose dans la lymphe, le sang veineux ou les deux.

Ainsi, l'absorption digestive des HAP commence par leur incorporation dans les micelles formées par les acides biliaires et les produits de lipolyse des lipides afin d'arriver dans les entérocytes. Dans les entérocytes, les HAP peuvent être incorporés dans les chylomicrons pour passer dans la circulation lymphatique ou passent dans la circulation sanguine via la veine porte par diffusion passive [Kelly 2004].

Au niveau des entérocytes, les HAP peuvent être métabolisés puis redirigés avec leurs métabolites vers la lumière intestinale diminuant ainsi leur absorption intestinale. Pour comprendre ce transfert, des études *in vitro* utilisant les cellules Caco-2 ont été faites. Buesen et al. (2002, 2003) ont montré que le transfert du B[a]P et ses métabolites des entérocytes vers la lumière intestinale dépendait du métabolisme du B[a]P dans les entérocytes et de l'adénosine triphosphate (ATP) mais pas des transporteurs à cassettes liant l'ATP (ABC) comme la p-glycoprotéine, la MRP1 et MRP2 [Buesen 2002, 2003]. Alors que l'addition d'un inducteur des cytochromes P450 (CYP) 1A1 et 1B1 (β -naphthoflavone) augmentait 3 fois le transport du B[a]P et ses métabolites vers la lumière intestinale, l'addition d'un inhibiteur des CYP (α -naphthoflavone) diminuait ce transport de 78 % [Cavret 2005, Ebert 2005]. De plus, l'ajout d'un agent chélateur (iodoacétamide) pour supprimer les réserves d'ATP cellulaires aboutissait à une diminution de 94 % du transfert.

Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires impliquées dans le transport actif de différents substrats (ions, peptides, polysaccharides, lipides, vitamines, toxines, xénobiotiques) à travers la membrane cytoplasmique. Ils peuvent être classés en importateurs (impliqués dans l'absorption des nutriments) ou en exportateurs. Ils sont formés de deux domaines transmembranaires, responsables de la liaison et de la translocation du substrat, et de deux domaines de liaison aux nucléotides, qui lient et hydrolysent l'ATP. De plus, ils participent à d'autres fonctions comme la réparation de l'ADN, la régulation des canaux ioniques, l'homéostasie du fer dans les mitochondries, ...

Par contre, l'addition des inhibiteurs des ABC (vérapamil, cyclosporine, probénicide ou MK571) n'avait aucun effet sur le transport du B[a]P et ses métabolites vers la lumière intestinale. Mais d'autres familles des ABC comme la famille C des ABC (ABCC) pourraient jouer un rôle dans le transport des métabolites du B[a]P des entérocytes vers le côté apical ou vers le côté basolatéral des cellules Caco2 dans les études *in vitro*. Par exemple, la protéine ABCC1 sera plus incriminée dans le passage du BPDE conjugué dans la circulation systémique, alors que la protéine ABCC2 effectuera le transport du BPDE vers la lumière intestinale [Hessel 2013].

Donc, le métabolisme des HAP dans les entérocytes est important pour l'absorption intestinale. Cependant, la participation des transporteurs membranaires ABC dans l'élimination des HAP et leurs métabolites dans la lumière intestinale n'est pas totalement connue.

1.1.3 Facteurs influençant l'absorption digestive du B[a]P et des autres HAP chez le rongeur

L'absorption intestinale des HAP est influencée par de nombreux facteurs en lien avec la molécule (dose, masse molaire, lipophilie, solubilité dans l'eau), ou avec d'autres facteurs (alimentation, présence d'autres xénobiotiques). Le tableau 5 synthétise l'ensemble des études sur l'absorption des HAP par voie digestive chez les rongeurs.

Tableau 5: Etudes in vivo chez les rongeurs sur l'absorption digestive du B[a]P et des autres HAP

Etude	Animal traité	HAP étudié	Dose de HAP	Matrice pour dissolution de HAP	Voie d'exposition	Taux d'absorption
Moreau 2015b	Rats SD à jeun 2 heures avant exposition	B[a]P	10 mg.kg ⁻¹	Huile de maïs	Gavage	86 %
Kim 2012	Rats SD	B[a]P	1 mg (3,3 mg.kg ⁻¹)	Emulsion lipidique de cholestérol et trioléine	Intra-duodénale	Absorption lymphatique : 14,4 %
			1 mg (3,3 mg.kg ⁻¹)	Emulsion lipidique avec 76,1 mg d'extrait de thé vert	Intra-duodénale	Absorption lymphatique : 7,6 %
Cao 2005	Rats SD	B[a]P	20 mg.kg ⁻¹	huile d'arachide	Gavage	Biodisponibilité : 54 %
		B[a]P	20 mg.kg ⁻¹	huile d'arachide avec 200 mg.kg ⁻¹ aloe	Gavage	Biodisponibilité : 34 %
		B[a]P	20 mg.kg ⁻¹	huile d'arachide avec 200 mg.kg ⁻¹ aloésine	Gavage	Biodisponibilité : 34 %
		B[a]P	20 mg.kg ⁻¹	huile d'arachide avec 200 mg.kg ⁻¹ propolis	Gavage	Biodisponibilité : 51 %
Kadry 1995	Rats SD	Phénanthrène	150 µL à 5µCi	solution de gomme d'acacia à 5%	Gavage	73 %
		Phénanthrène	150 µL à 5µCi	Adsorbé à un sol sableux	Gavage	76 %
		Phénanthrène	150 µL à 5µCi	Adsorbé à un sol argileux	Gavage	78 %
Foth 1988	Rats SD mis à jeun 12H avant exposition	B[a]P	0,8 et 1 µg (2 et 2,6 µg.kg ⁻¹)	Huile d'arachide	Gavage	25 – 30 %
Rahman 1986	Rats SD	2,6-diméthylnaphtalène	1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale	48 %
			1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale avec addition de bile exogène	52 %
		Phénanthrène	1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale	70 %

			1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale avec addition de bile exogène	73 %
		Anthracène	1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale	54 %
			1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale avec addition de bile exogène	76 %
		DMB[a]A	1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale	11 %
			1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale avec addition de bile exogène	24 %
		B[a]P	1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale	7 %
			1 mg (3,6 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Intra-duodénale avec addition de bile exogène	30 %
Bartosek 1984	Rats SD	B[a]A	22,8 mg (134 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Gavage	94 %
		Chr	22,8 mg (134 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Gavage	75 %
		Triphénylène	22,8 mg (134 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Gavage	97 %
Jacob 1989	Rats W	Pyr	50 µg	DMSO et l'huile de maïs (33/66)	Gavage	93 %
Grimmer 1988	Rats W	Chr	50 µg (0,2 mg.kg ⁻¹)	Huile de maïs	Gavage	87 %
Kawamura 1988	Rats W	B[a]P	8.68 µg (0,04 mg.kg ⁻¹)	200 mg de 12 matrices alimentaires différentes	Gavage	26,2 - 60,6 %
Walker 2007	Rats Fischer F-344	Flua	50 ou 100 µg.kg ⁻¹	Huile mono-insaturée	Gavage	68 – 72 %

			50 ou 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Huile poly-insaturée	Gavage	65 – 70 %
			50 ou 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Huile saturée	Gavage	59 – 63 %
Hecht 1979	Rat Fischer F-344	B[a]P	0,01- 0,1 et 1 mg (0,04- 0,4 et 4 mg.kg^{-1})	Huile d'arachide	Gavage	87 – 94 %
		B[a]P	52,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de viande	Viande grillée au charbon	Voie orale	89 %
Chang 1943	Rats	Naphtalène	200 mg (66 mg.kg^{-1})	Suspension d'amidon à 1 %	Gavage	100 %
		Acénaphthène	200 mg (66 mg.kg^{-1})	Suspension d'amidon à 1 %	Gavage	87 – 94 %
		Anthracène	200 mg (66 mg.kg^{-1})	Suspension d'amidon à 1 %	Gavage	26 – 36 %
		Phénanthrène	200 mg (66 mg.kg^{-1})	Suspension d'amidon à 1 %	Gavage	93 – 94 %
		Chr	200 mg (66 mg.kg^{-1})	Suspension d'amidon à 1 %	Gavage	13 – 18 %
		B[a]P	200 mg (66 mg.kg^{-1})	Suspension d'amidon à 1 %	Gavage	42 – 45 %
Mirvish 1981	Hamsters syriens dorés	B[a]P	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de croquettes pendant 10 jours	croquettes contenant de cellulose	Voie orale	99,6 %
		B[a]P	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de croquettes pendant 10 jours	croquette contenant de son de blé	Voie orale	94 %
		3-MC	100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de croquettes pendant 10 jours	croquettes contenant de cellulose	Voie orale	84 %

La présentation des études est faite pour chaque souche de rats par ordre chronologique puis pour les autres espèces.

L'étude de l'absorption des HAP est différente selon les études. Les valeurs présentées sous forme de % correspondent aux valeurs obtenues par la soustraction de % de HAP éliminé dans les fèces. Pour l'absorption lymphatique, les HAP étaient analysés dans la lymphe prélevée du conduit supérieur lymphatique mésentérique. La biodisponibilité est calculée en divisant l'aire sous la courbe de la concentration sanguine (AUC) par voie intra-veineuse à l'AUC de la concentration sanguine par voie orale.

B[a]A : benzo[a]anthracène, B[a]P : benzo[a]pyrène, Chr : chrysène, DMB[a]A : 7,12-diméthylbenzo[a]anthracène, DMSO : diméthylsulfoxyde, Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, SD : Sprague Dawley, W : wistar, 3-MC : 3-méthylcholanthrène, μ ci : microcurie (unité de mesure de radioactivité).

L'absorption intestinale des HAP diminue avec **la dose utilisée**. Une étude chez des rats Fischer F-344 a montré que la biodisponibilité du Flua diminuait de 5 % en augmentant la dose utilisée de 50 à 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [Walker 2007]. Une autre étude chez les rats Fischer F-344 a montré que l'absorption du B[a]P diminuait de 7 % en augmentant la dose de 40 à 4000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [Hecht 1979].

L'absorption intestinale diminue quand la **masse molaire** de la molécule augmente [Chang 1943, Mirvish 1981]. Par exemple, lors de l'administration orale de croquettes contenant du B[a]P (252,3 g.mol^{-1}) ou du 3-méthylcholanthrène (3-MC) (268,3 g.mol^{-1}) chez le hamster, le taux d'absorption était respectivement de 99,6 et 84 % [Mirvish 1981]. Une étude chez des chèvres montrait que l'absorption orale des HAP dissouts dans l'huile suivait l'ordre suivant : 78,3 % pour le phénanthrène (178,2 g.mol^{-1}) > 74,5 % pour le Pyr (202,3 g.mol^{-1}) > 11,8 % pour le B[a]P (252,3 g.mol^{-1}) [Grova 2002]. Une étude chez les cochons a montré que l'absorption du phénanthrène ajouté au lait était de 95 % alors que celle du B[a]P n'était que de 33% [Laurent 2002].

L'absorption augmente également quand la **solubilité** de la molécule dans l'eau augmente ou quand **la lipophilie** de la molécule diminue. Par exemple, chez des rats SD, l'absorption du B[a]A était plus élevée que celle du Chr (94 % *versus* 75 % respectivement) alors qu'ils ont le même PM (228,3 g.mol^{-1}) et une lipophilie comparable ($\log K_{ow}$ 5,16 et 5,61) mais la solubilité dans l'eau du B[a]A (9,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$) est 5 fois plus élevée que celle du Chr (2 $\mu\text{g.L}^{-1}$) [Bartosek 1984]. Dans une étude sur les cochons, après administration du lait contenant soit du B[a]P ($\log K_{ow}$ 6,04) soit du phénanthrène ($\log K_{ow}$ 4,5) marqués au ^{14}C radioactif, l'absorption était 3 fois plus élevée pour le phénanthrène en comparaison avec le B[a]P 24 heures après l'exposition (86,1 % pour le phénanthrène *versus* 30,5 % pour le B[a]P) [Cavret 2003, Laurent 2002].

De plus, comme pour les lipides, l'absorption des HAP augmente avec la **présence de bile** qui est nécessaire à la formation de micelles qui facilitent leur absorption. En effet, la couche aqueuse entourant la membrane de la bordure en brosse intestinale constitue une barrière importante à l'absorption des composés lipophiles tels que les HAP. Cependant, les sels biliaires qui sont amphiphiles permettent le passage des composés lipophiles à travers cette couche aqueuse [Vetter 1994]. En effet, Rahman et Barrowman (1986) ont montré que l'absorption de l'anthracène, du 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMB[a]A) et du B[a]P chez des rats SD, diminuait respectivement de 76 à 54 %; de 24 à 11 % et de 30 à 7 % en présence ou en l'absence

de bile et de sels biliaires exogènes [Rahman 1986]. Par contre, l'absorption du 2,6-diméthylnaphtalène et du phénanthrène ne variait pas selon l'ajout ou non de bile exogène [Rahman 1986]. Ainsi, la présence de la bile est importante pour l'absorption des HAP à HPM (4 cycles ou plus) ou de HAP à FPM ayant une faible solubilité (3 cycles aromatiques avec une solubilité dans l'eau ($< 70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)).

L'absorption intestinale des HAP dépend aussi du **type d'alimentation**.

L'addition de **certains compléments alimentaires** peut modifier l'absorption intestinale des HAP. Par exemple, la présence du son de blé dans l'alimentation entraîne une diminution de l'absorption du B[a]P avec l'augmentation de son élimination fécale. En effet, l'addition du son de blé à la nourriture des hamsters contenant du B[a]P à $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ entraînait une augmentation de 13 fois la quantité du B[a]P éliminée sous forme inchangée dans les fèces ($2,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ versus $86,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) [Mirvish 1981]. Ceci peut être expliqué par la capacité du son de blé à augmenter la proportion d'eau dans l'intestin diminuant ainsi l'absorption des molécules lipophiles comme le B[a]P ou par l'adsorption du B[a]P dans le son du blé. Une autre étude, chez des rats SD, a montré que l'absorption intestinale du B[a]P diminuait avec l'ajout de certains compléments alimentaires selon l'ordre suivant : acide chlorogénique > quercétine > charbon [Stavric 1994]. Cao et al. (2005) ont montré que l'effet de l'addition de certains compléments alimentaires sur la bio-disponibilité du B[a]P était variable : diminution de la biodisponibilité avec l'aloé et l'aloésine (54% versus 34%) mais aucun effet avec le propolis (54% versus 51%). Une autre étude a montré que l'extrait du thé vert augmentait de 2 fois l'élimination fécale du B[a]P chez des rats SD en diminuant son absorption intestinale lymphatique de $14,4\%$ à $7,6\%$ et en augmentant son excrétion biliaire de $24,3\%$ à $31,5\%$ [Kim 2012]. Ceci peut être expliqué par la capacité de certaines molécules à former des complexes avec les HAP ce qui diminue le taux des HAP libres disponibles pour l'absorption intestinale.

Les aliments solides peuvent adsorber les HAP rendant ainsi leur absorption intestinale plus difficile [Hecht 1979, Kadry 1995, Stavric 1994, Kawamura 1988]. Par exemple, chez le rat SD, l'absorption intestinale du B[a]P incorporé dans différents types de matrice alimentaire diminuait selon l'ordre suivant : nourriture standard du rat > petits pois > viande de bœuf [Stavric 1994]. Une autre étude a montré que l'absorption du B[a]P chez des rats Wistar (W) variait selon le type d'aliment contaminé par le B[a]P selon l'ordre suivant : trioléine ($60,6\%$) > huile de soja ($47,3\%$) > cellulose ($35,4\%$) = pain ($32,1\%$) = galette de riz (32%) = lignine (29%) = eau ($30,8\%$) = amidon ($28,9\%$) = pomme de terre ($26,2\%$) [Kawamura 1988].

Une alimentation riche en lipide augmente l'absorption des HAP [Harris 2008, Ramesh 2004, Stavric 1994, Walker 2007] mais le type de lipide utilisé a un effet sur la biodisponibilité des HAP. Ainsi, la biodisponibilité du Flua chez des rats Fischer F-344 diminuait de 72 % lorsqu'il était dissout dans de l'huile mono ou poly-insaturée à 63 % lorsqu'il était dissout dans de l'huile saturée [Walker 2007].

Enfin, le microbiote intestinal joue un rôle dans l'absorption des HAP. En effet, chez des souris, après un co-traitement de B[a]P et de Lactobacillus, l'élimination fécale du B[a]P augmente de 50 % par rapport à l'exposition au B[a]P seul [Liu 2021].

Le microbiote intestinal appelé aussi **flore intestinale** est constitué de l'ensemble des micro-organismes recouvrant la surface de la muqueuse intestinale. Il est constitué de champignons, virus, levures, archées, helminthes et surtout de bactéries. Le nombre de bactérie augmente en allant de l'estomac jusqu'au colon suite à différents paramètres (pH, concentration biliaire, teneur en oxygène, disponibilité des nutriments, temps de transit, ...). De plus de la densité bactérienne, le type de bactérie abondant varie selon les différentes parties de l'intestin. De plus, la composition du microbiote intestinale est variable en fonction de différents facteurs comme l'âge, l'alimentation, le mode de vie, l'hygiène, la localisation géographique, Le microbiote intestinal vit en symbiose avec l'organisme humain et assure plusieurs fonctions : fonctions protectrices (effet barrière protecteur de l'épithélium intestinal), fonctions structurales (structuration de l'épithélium intestinal, différenciation et prolifération des cellules intestinales), fonctions immunitaires (maturation du système immunitaire, activité anti-inflammatoire), fonctions métaboliques (métabolisme des lipides, protéines et glucides; production des vitamines, absorption des électrolytes), fonction de neuromodulation (développement et fonctionnement du cerveau, production des neuromédiateurs). Cependant, la dysbiose intestinale caractérisée par un déséquilibre des la flore intestinale est responsable de plusieurs pathologies : digestives (syndrome de l'intestin irritable, perturbation de l'absorption digestive), métaboliques (obésité, diabète type II), immunitaires (maladie inflammatoire chronique intestinale, eczéma, psoriasis, polyarthrite rhumatoïde), cardiaques (hypertension artérielle), neurologiques et psychiatriques (anxiété, dépression, schizophrénie, parkinson), et cancéreuses (cancer colorectal).

1.2 Circulation sanguine et distribution dans les différents organes du B[a]P et des autres HAP chez le rongeur

Après absorption, les HAP atteignent la circulation systémique pour être distribués dans l'organisme. Ils atteignent les différents organes par la voie sanguine via la veine porte ou par la voie lymphatique par l'intermédiaire des chylomicrons mais la voie sanguine représente la voie principale d'absorption (Figure 5) [Harris 2013, Laher 1984, 1987, Ramesh 2004].

Le temps d'obtention du pic sanguin ainsi que son intensité dépendent de la vitesse et du taux d'absorption de chaque composé. Chez le rat, après une exposition orale, le pic sanguin des HAP à FPM (phénanthrène, Pyr) est obtenu 1 heure après l'exposition alors que celui des HAP à HPM (B[a]P, Chr, B[a]A, triphénylène) est obtenu seulement 3 à 6 heures après [Bartosek 1984, Laurent 2002, Moreau 2015b].

De plus, les concentrations maximales sanguines de HAP augmentent avec la solubilité de la molécule. Ainsi, chez les rats SD, la concentration sanguine du B[a]A (ayant une solubilité dans l'eau de $9,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) était 4 à 8 fois plus élevée que celle du Chr (ayant une solubilité dans l'eau de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$) [Bartosek 1984]. Pour le B[a]P, le pic sanguin correspondait à 0,01 – 0,05 % de la dose administrée par gavage chez des rats SD [Marie 2010, Moreau 2015b, Ramesh 2001].

Le tableau 6 synthétise les différentes études faites sur la distribution des HAP dans les différents organes chez les rongeurs.

Tableau 6: Etudes in vivo chez les rongeurs de la distribution du B[a]P et des autres HAP dans les différents organes

Auteurs	Espèce animale	Exposition	Récupération des organes pour analyses	Résultats
Marie 2010	Rats SD	-B[a]P -1 dose de 10 mg.kg ⁻¹ -Voie IV	2 heures après l'exposition	Poumons : 6 % Tissu adipeux péri-rénal : 1 % Foie : 0,01 % Reins : 0,001 %
Bartosek 1984	Rats SD	B[a]A - 22,8 mg (134 mg.kg ⁻¹) par gavage	1 heure 30 minutes après le gavage	Tissu adipeux mammaire : 45 µg.g ⁻¹ Foie : 15 µg.g ⁻¹
		Chr - 22,8 mg (134 mg.kg ⁻¹) par gavage	1 heure 30 minutes après le gavage	Tissu adipeux mammaire : 5 µg.g ⁻¹ Foie : 3 µg.g ⁻¹
		Triphénylène -22,8 mg (134 mg.kg ⁻¹) par gavage	1 heure 30 minutes après le gavage	Tissu adipeux mammaire : 130 µg.g ⁻¹ Foie : 15 µg.g ⁻¹
Wiersma 1983	Rats SD	-B[a]P -1 dose de 3 mg.kg ⁻¹ -Voie IV	5 heures après l'exposition	Poumons : 0,25 % Graisse épидидymaire: 0,19 % Foie : 0,09 % Reins : 0,04 % Muscle du diaphragme : 0,02 %
Ramesh 2001	Rats Fischer F-344	-B[a]P -1 dose de 100 mg.kg ⁻¹ -Gavage	24 heures après le gavage	Reins : 10 % Poumons : 8%
Jin 2021	Souris ApoE-KO	-B[a]P incorporé dans la nourriture -8,5 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ pendant 24 semaines	A la fin de l'exposition	Duodénum : 15 - 30 ng.g ⁻¹ Graisse épидидymaire : 15 - 30 ng.g ⁻¹ Poumons : 15 - 30 ng.g ⁻¹ Reins : 6 - 10 ng.g ⁻¹ Foie : 6 - 10 ng.g ⁻¹

					Cerveau : 6 – 10 ng.g ⁻¹
Li 2020	Souris C57BL/6	-B[a]P -100 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ pendant 3 jours -Gavage		24 heures après la 3 ^{ème} exposition	Intestin : 1,5 µg.g ⁻¹ Graisse épидидymaire: 1,3 µg.g ⁻¹ Poumons : 0,5 µg.g ⁻¹ Reins : 0,5 µg.g ⁻¹ Rate : 0,25 µg.g ⁻¹ Foie : 0,13 µg.g ⁻¹

*La présentation des études est faite pour chaque souche de rats par ordre chronologique puis pour toutes les souches de souris par ordre chronologique.
Les valeurs présentées en % correspondent au % de la dose administrée du HAP. B[a]A : benzo[a]anthracène, B[a]P : benzo[a]pyrène, Chr : chrysène, IV : intra-veineuse,
SD : Sprague Dawley.*

Les HAP peuvent être distribués dans différents organes (Tableau 6). Après exposition orale, on distingue 2 groupes d'organes : un groupe comprenant l'estomac, le duodénum, la graisse épидидymaire et le poumon qui présente les concentrations en HAP les plus élevées, et un deuxième groupe comprenant le foie, le cerveau et les reins qui présente des concentrations de HAP 3 à 5 fois plus faibles [Bartosek 1984, Jin 2021, Li 2020, Ramesh 2001]. Après exposition par voie intra-veineuse, la distribution des HAP n'était pas étudiée dans les organes du tube digestif, cependant pour les autres organes, la distribution du B[a]P entre les organes était identique à celle de la voie orale [Marie 2010, Wiersna 1983].

Comme pour l'absorption, la concentration des HAP dans les organes augmente avec la solubilité des molécules dans l'eau. Ainsi, la concentration du B[a]A était 3 à 5 fois plus élevée que celle du Chr dans le foie et le tissu adipeux mammaire chez des rats SD [Bartosek 1984].

1.3 Métabolisme du B[a]P et des autres HAP

Le métabolisme des HAP est divisé en deux phases : la phase I ou phase de fonctionnalisation et la phase II ou phase de conjugaison.

Durant la phase I, les HAP sont métabolisés en un mélange complexe de époxydes, phénols, quinones, diols, diols époxydes, et tétraols. Les enzymes de la phase I sont : les CYP, l'époxyde hydrolase (EH), l'aldo-kéto-réductase (AKR), la dihydrodiol déhydrogénase (DD), la NADPH quinone oxidoréductase 1 (NQO1). Le schéma général du métabolisme des HAP implique l'oxydation en une gamme de produits primaires (époxydes, phénols, et diols) et secondaires (diols époxydes, tétraols, et phénols époxydes) à la phase I qui seront ensuite conjugués avec le glutathion, l'acide glucuronique, et le sulfate pour donner les métabolites de la phase II.

1.3.1 Les cytochromes p450

Les CYP sont des hémoprotéines. Selon la protéine fixée sur l'hème, on distingue plusieurs isoformes réparties en familles et sous-familles. Pour une même famille de CYP, on a 40 % d'analogie dans leurs séquences d'acides aminés. Pour la sous-famille, l'homologie de la chaîne d'acides aminés est supérieure à 55 %. Les isoformes présentent moins de 3% de différence de séquence (Figure 7).

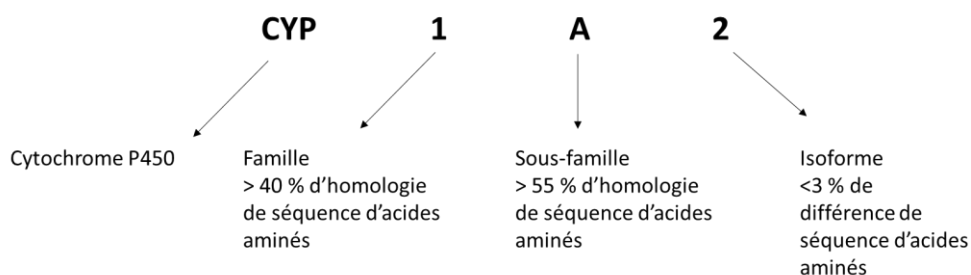


Figure 7: Nomenclature des cytochromes P450 (exemple CYP 1A2)

1.3.1.1 Distribution des CYP dans les organes

La quantité de CYP varie en fonction du type de CYP, de l'espèce et des organes au sein d'une même espèce. Chez le rat, les CYP les plus exprimés au niveau intestinal sont les CYP1A1, 1B1 et 3A1 et à moindre niveau 2C6 et 2C11. D'autres CYP (1A2, 2A1, 2B2, 2E1, 3A2 et 4A1) présents dans le foie du rat ne sont pas exprimés dans l'intestin [Zhang 1996]. Chez l'homme, les CYP les plus exprimés dans l'intestin sont les CYP 3A4 et 2C et 1A1 avec aussi l'expression des CYP 1B1, 2D6, 2E1, et 3A5 à moindre niveau, alors qu'au niveau hépatique, le CYP 1A2 est le plus exprimé [Ding 2003, Murray 2001, Obach 2001, Zhang 1999].

1.3.1.2 CYP impliqués dans le métabolisme des HAP

Les CYP les plus importants pour le métabolisme des HAP sont les CYP 1A1 et 1B1 [Arlt 2008, Shimada 2006]. Le CYP 1B1 est impliqué à la fois dans la voie de détoxification et de bio-activation des HAP, alors que le CYP 1A1 est surtout impliqué dans la voie de détoxification du B[a]P [Reed 2018, Shiizaki 2017, Sparfel 2006, Uno 2004, 2006]. Ceci est aussi vrai pour le dibenzo[a,l]pyrène (DB[a,l]P) et le DMB[a]A [Buters 1999, 2002]. D'autres isoformes peuvent intervenir dans le métabolisme des HAP à moindre niveau comme les CYP 1A2, 2C8, 2C9, 2C19 et 3A4 [Shiizaki 2017, Sulc 2016].

1.3.1.3 Induction des CYP par le B[a]P et les autres HAP

De nombreuses études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* chez l'animal se sont intéressées à l'**induction des CYP** par les HAP (Tableaux 7, 8).

Tableau 7 : Etudes *in vitro*, *ex vivo* concernant l'effet de l'exposition au B[a]P ou autres HAP sur l'expression et l'activité des cytochromes P450 et de l'époxyde hydrolase.

<i>Etudes in vitro</i>			
Etudes	Modèles cellulaires	Exposition	Résultats
Gao 2022	Cellules pulmonaires humaine A549	B[a]P à 1- 5 et 25 µM pendant 48 heures	•Augmentation dose-dépendante de l'expression des CYP 1A1 (2,5- 3,5 et 3,8 fois), 1B1 (50%, 75% et 80%), 3A4 (20%, 25% et 30 %), EH (10%, 18% et 20 %)
	Cellules tumorales mammaires MCF-7		•Augmentation dose-dépendante de l'expression des CYP 1A1 (2- 3,5 et 3,8 fois), 1B1 (25%, 35% et 60 %), 3A4 (15%, 20% et 30%) •Augmentation de 15% de l'expression de l'EH à la dose de 25 µM uniquement
Genies 2016	Cellules pulmonaires humaines A549	0,2 µM de B[a]P / B[e]P / B[b]F / B[k]F / B[j]F / B[a]A / B[g,h,i]P / DB[a,h]A / I[1,2,3-cd]P / Chr / Flua / Pyr / Naph pendant 2 heures	•Induction de l'expression du CYP 1A1 (entre 2 et 40 fois) et du CYP 1B (entre 2 et 5 fois) avec tous les HAP sauf pour le Pyr et le Naph selon l'ordre suivant : DB[a,h]A> B[k]F> B[b]F> I[1,2,3-cd]P> B[j]F> B[a]A> B[a]P> Chr> Flua> B[g,h,i]P> B[e]P
Shah 2016	Cellules d'hépatocarcinomes humains HepG2	1 et 2 µM de B[a]P pendant 24 heures	•Induction de 20 fois de l'expression des CYP 1A1 et 1A2 à 2 µM •Pas d'effet sur l'expression du CYP 1B1
	Lignée cellulaire de lymphoblastoïdes humains MCL-5		•Induction de 30 fois de l'expression du CYP 1A1 et de 5 fois de l'expression du CYP 1A2 de 10 fois de l'expression du CYP 1B1 à 2 µM
	Lignée cellulaire de lymphoblastoïdes humains AHH-1		•Pas d'effet sur l'expression des CYP 1A1, 1A2 et 1B1
	Lignée cellulaire de lymphoblastoïdes humains TK6		•Pas d'effet sur l'expression des CYP 1A1, 1A2 et 1B1
Libalova 2014	Cellules épithéliales pulmonaires	B[a]P à 10 ⁻³ - 10 ⁻² - 0,1- 0,25- 0,5- 1- 10 µM pendant 24 heures	•Induction de 2 à 100 fois de l'expression du CYP 1A1 à partir de 0,1 µM •Induction de 2 à 10 fois de l'expression du CYP 1B1 à partir de 0,1 µM
		B[k]F à 10 ⁻³ - 10 ⁻² - 0,05- 0,1- 0,25- 0,5- 1- 10 µM pendant 24 heures	•Augmentation de 2 à 100 fois de l'expression du CYP 1A1 à partir de 10 ⁻² µM •Augmentation de 2 à 10 fois de l'expression du CYP 1B1 à partir de 10 ⁻² µM

Genies 2013	Cellules d'hépatomes humains HepG2	B[a]P à 2 et 5µM pendant 14 heures	•Augmentation de 60 et 200 fois de l'expression du CYP 1A1 à 2 et 5 µM de B[a]P
	Cellules humaines de la vessie T24		•Augmentation de 8 fois de l'expression du CYP 1B1 à 5 µM de B[a]P
	Cellules pulmonaires humaine A549		Pas de modification de l'expression des CYP 1A1 et 1B1
Luckert 2013	Cellules d'hépatomes humains HepG2	0,5- 1 et 1,5 µM du B[a]P pendant 48 heures	• Augmentation de 60 fois de l'expression du CYP 1A1 à 2 et 5 µM de B[a]P
	Cellules rénales embryonnaires humaines HEK-293		•Augmentation de 9 fois de l'expression du CYP 1B1 à 2 et 5 µM de B[a]P
Endo 2008	Cellules d'hépatomes humains HepG2	1 µM B[a]P pendant 24 heures	Augmentation de 2 fois de l'expression du CYP 3A4 à 0,5 et 1 µM et de 4 fois à 1,5 µM
	Cellules humaines rénales HEK293		Pas de modification de l'expression du CYP 3A4 avec le B[a]P
Cherng 2006	Cellules d'hépatomes humains HepG2	10 µM du B[a]P pendant 18 heures	Induction de l'expression du CYP 1A1, 1A2
Etudes <i>ex vivo</i>			
Etudes	Modèles cellulaires	Exposition	Résultats
Pushparajah 2008	Coupes du foie humain	1- 5- 10- 50 et 100 µM du B[a]P / DB[a,h]A / Flua / DB[a,l]A / B[b]F / 1-méthylphénanthrène pendant 24 heures	Augmentation de l'activité enzymatique de l'EH :
	Coupes du foie de rats		<ul style="list-style-type: none"> • de 8 fois avec le B[a]P à partir de 1 µM •de 6 fois avec le DB[a,h]A et le Flua à partir de 5 µM •de 4 fois avec le B[b]F à partir de 10 µM
			<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation de l'activité enzymatique de l'EH avec le B[a]P et avec le DB[a,h]A à partir de 5 µM •L'activité enzymatique de l'EH (avant application des HAP) était 4 fois moins élevée chez le rat que chez l'homme
Harrigan 2006	Coupes du foie de rats SD	1- 10- et 80 µM du B[a]P pendant 24 heures	<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation de 50 fois de l'expression du CYP 1A1 à 80 µM •Augmentation de 26 fois de l'expression du CYP 1B1 à 80 µM

	Coupes des poumons de rats SD		<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation de 10 fois de l'expression du CYP 1A1 à 10 µM •Augmentation de 5 fois de l'expression du CYP 1B1 à 10 µM
Keshava 2005	Cellules épithéliale mammaire humaine	B[a]P à 4 µM pendant 12 heures	<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation de 10 à 48 fois de l'expression du CYP 1A1 •Augmentation de 7 à 20 fois de l'expression du CYP1B1

B[a]A :benzo[a]anthracène, B[a]P : benzo[a]pyrène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[g,h,i]P :benzo[g,h,i]pérylène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène B[k]F : benzo[k]fluoranthène, Chr : chrysène, CYP : cytochrome P450, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène, EH : époxyde hydrolase, Flua : fluoranthène, I[1,2,3-cd]P : indénol[1,2,3-cd]pyrène, Naph : naphtalène, Pyr : pyrène, SD : Sprague Dawley..

Tableau 8: Etudes *in vivo* (chez des modèles rongeurs) concernant l'effet de l'exposition au B[a]P ou autres HAP sur l'expression et l'activité des cytochromes P450

Etudes	Modèle animal	Exposition	Exposition
Floreani 2012	Rats SD	3 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P pendant 3 jours par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> • Induction de l'expression du CYP 1A1 (50 pmol.mg⁻¹ protéine) et 1A2 (300 pmol.mg⁻¹ protéine) dans le foie • Augmentation de 15 fois de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1A2 (800 pmol.mg⁻¹ protéine.min⁻¹)
Harrigan 2006	Rats SD	10 et 50 mg (33 et 165 mg.kg ⁻¹) de B[a]P par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de 6 600 fois de l'expression du CYP 1A1 et de 500 fois de l'expression du CYP 1B1 dans le foie avec 10 et 50 mg du B[a]P • Augmentation de 14 fois de l'expression du CYP 1A1 et de 60 fois de l'expression du CYP 1B1 dans les poumons avec 10 et 50 mg du B[a]P
Borek-Dohalska 2016	Rat W	150 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par gavage	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de 8, 4 et 2 fois de l'expression du CYP 1A1 dans les microsomes hépatiques, rénaux et pulmonaires respectivement • Augmentation de 8 fois de l'activité enzymatique du CYP 1A1 dans les microsomes hépatiques • Augmentation de 50 % de l'activité enzymatique des CYP 3A1 et 3A2 dans les microsomes hépatiques
Hodek 2013	Rats W	150 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par gavage	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression des CYP 1A1 et 1A2 dans les microsomes hépatiques et intestinaux • Augmentation de 40 et 9 fois de l'activité des CYP 1A1 et 1A2 dans les microsomes hépatiques • Augmentation de 280 et de 66 fois de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1A2 dans les microsomes intestinaux
Floreani 2012	Rats W	3 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P pendant 3 jours par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> • Induction de l'expression du CYP 1A1 (100 pmol.mg⁻¹ protéine) et 1A2 (400 pmol.mg⁻¹ protéine) dans le foie • Augmentation de 10 fois de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1A2 (450 pmol.mg⁻¹ protéine.min⁻¹)
Bentsen-Farmen 1999	Rats W	10 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de 3 fois de l'activité du CYP 1A1 dans les microsomes hépatiques
Li 2020	Souris C57BL/6	100 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P pendant 3 jours par gavage	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de 4 fois de l'expression du CYP 1A2 dans les microsomes hépatiques

			<ul style="list-style-type: none"> •Pas d'effet du B[a]P sur l'expression des CYP 1A1 et 1B1 dans les microsomes hépatiques •Augmentation de 25 fois de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 dans les microsomes hépatiques
Arlt 2015	Souris C57B16	0,5 mg (20 mg.kg ⁻¹)B[a]P par voie IT	<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation de 2 et 5 fois de l'expression du CYP 1A1 dans les microsomes pulmonaires et hépatiques •Pas d'effet du B[a]P sur l'expression du CYP 1B1 dans les microsomes pulmonaires
Diggs 2013	Souris Apc	100 µg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P dissout dans du tricarpryline pendant 60 jours	•Augmentation de 3 et 4 fois de l'expression du CYP 1A1 dans les microsomes du foie et du colon
		100 µg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P dissout dans l'huile d'arachide pendant 60 jours	•Augmentation de 3 et 2 fois de l'expression du CYP 1A1 dans les microsomes du foie et du colon
		100 µg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P dissout dans l'huile de coco pendant 60 jours	<ul style="list-style-type: none"> •Diminution de 50 % de l'expression du CYP 1A1 dans les microsomes hépatiques •Augmentation de 2 fois de l'expression du CYP 1A1 dans les microsomes du colon
Shi 2010	Souris C57BL/6J	125 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P pendant 30 jours par gavage	<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation de 100 fois de l'expression de CYP 1A1 dans les intestins pendant toute l'exposition •Augmentation de 500 fois de l'expression du CYP 1A1 dans le foie pendant 24 heures après le premier gavage puis retour à la normale durant le reste de l'exposition
Courter 2007a	Souris Sencar	50,4 µg de B[a]P par application cutanée	•Induction de l'expression des CYP 1A1 et 1B1 dans les microsomes des cellules épidermiques
		0,6 µg de DB[a,l]P par application cutanée	•Induction de l'expression des CYP 1A1 et 1B1 dans les microsomes des cellules épidermiques
Shimada 2003	Souris C57BL/6J	100 mg.kg ⁻¹ de B[a]P / DMB[a,l]A / 3-MC par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> •Induction de l'expression des CYP 1A1, 1B1 avec les HAP dans les microsomes hépatiques et pulmonaires •Induction de l'expression du CYP 1A2 avec les HAP dans les microsomes hépatiques
Shimada 2002	Souris C57BL/6J	100 mg.kg ⁻¹ de B[a]P / DB[a,l]A / DMB[a,l]A / 3-MC / B[b]F / B[a]A	•Pas d'induction de l'expression des CYP 1A1, 1A2 et 1B1 avec le Pyr, Flua et Anth

		/ Chr / B[e]P / Pyr / Anth / Flua par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> •Induction de l'expression des CYP 1A1, 1B1 et 1A2 avec les HAP dans les microsomes hépatiques •Induction de l'expression des CYP 1A1, 1B1 avec les HAP dans les microsomes pulmonaires •Les plus forts inducteurs : B[a]P, DB[a,l]A, DMB[a,l]A, 3-MC •Augmentation de 15 à 160 fois de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 dans les microsomes hépatiques
Uno 2001	Souris C57BL/6J	500 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation de l'expression des CYP 1A1 et 1A2 dans les microsomes hépatiques •Augmentation de 6 fois de l'activité enzymatique du CYP 1A1 dans les microsomes hépatiques

Anth : anthracène, B[a]A :benzo[a]anthracène, B[a]P : benzo[a]pyrène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, Chr : chrysène, CYP : cytochrome P450, DB[a,l]A : dibenzo[a,l]anthracène, DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène, DMB[a,l]A :7,12-diméthylbenzo[a,l]anthracène, Flua : fluoranthène, HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique, IP : intra-péritonéale , IT : intra-trachéale, Pyr : pyrène, SD : Sprague Dawley. W : Wistar, 3-MC : 3-méthylcholanthrène.

L'induction des CYP est variable **selon l'HAP**. Certains HAP de HPM (DB[a,h]A, B[k]F, B[b]F, IP, benzo[j]fluoranthène (B[j]F), B[a]A, B[a]P, Chr, B[g,h,i]P) sont de forts inducteurs des CYP 1A1 et 1B1 et 1A2 alors que d'autres (Flua, Pyr, anthracène ou benzo[e]pyrène (B[e]P)) ne le sont pas [Courter 2007a, Genies 2016, Keshava 2005, Libalova 2014, Pushparajah 2008, Shimada 2002, 2003, Uno 2001, Williams 2000]. De plus, certains métabolites comme les o-quinones peuvent aussi induire l'expression des CYP 1A1 [Burczynski 2000]. A l'inverse, les HAP ayant des chaînes acétyléniques (comme le 1-(1-propynyl)pyrène, le 2-(1-propynyl)phénanthrène et le 2-éthynylpyrène) semblent avoir **une action inhibitrice** sur l'activité des CYP 1A1, 1A2 et 1B1 humains [Shimada 1998, 2007].

Le taux d'induction de l'expression des CYP après exposition aux HAP est variable selon le **type de cellules** (dans les modèles *in vitro*) ou **l'organe étudié** (dans les modèles *in vivo*). Certaines cellules comme les cellules lymphoblastoïdes humaines (AHH1 et TK6) et les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK 293) ne répondent pas à l'induction des CYP par les HAP [Endo 2008, Luckert 2013, Shah 2016] car elles ne présentent pas les récepteurs régulés par les HAP comme le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) ou le « pregnane X receptor » (PXR). Bien que le degré d'induction du CYP 1A1 était inférieur au niveau intestinal par rapport au foie, le taux des CYP 1A1 obtenues était plus élevé dans l'intestin avec une activité enzymatique plus élevée étant donné que le niveau basal du CYP 1A1 est plus élevé au niveau intestinal par rapport au niveau hépatique [Arlt 2015, Borek-Dohalaska 2016, Harrigan 2006, Hodek 2013, Shi 2010].

L'induction enzymatique des CYP dépend **du véhicule dans lequel est dissout l'HAP**. Par exemple, après exposition des souris Apc au B[a]P pendant 60 jours, l'induction du CYP 1A1 hépatique était 3 fois plus élevée quand le B[a]P était dissout dans l'huile insaturée par comparaison avec le B[a]P dissout dans l'huile saturée (ceci pourrait être liée à l'augmentation de l'absorption du B[a]P avec l'huile insaturée) [Diggs 2013].

Enfin, l'induction des CYP est **dose-dépendante** et peut rester **une certaine durée** pour revenir ensuite aux valeurs de base [Gao 2022, Genies 2013, Harrigan 2006, Libalova 2014, Luckert 2013, Shah 2016, Shi 2010]. Par exemple, après exposition des souris à $125 \text{ m.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P pendant 30 jours par gavage, l'induction enzymatique des CYP 1A1, et 1B1 au niveau hépatique est observée seulement durant les 5 premiers jours du gavage alors qu'au niveau intestinal cette induction est observée durant toute la durée d'exposition [Shi 2010].

1.3.2 L'époxyde hydrolase

Les EH sont une classe de protéines qui catalysent l'hydratation d'époxydes chimiquement réactifs en leurs produits dihydrodiols correspondants. Chez les mammifères, il existe au moins cinq formes d'EH : la 5,6-oxyde de cholestérol hydrolase microsomale, l'hepoxiline A3 hydrolase, la leucotriène A4 hydrolase, l'EH soluble, et l'époxyde hydrolase microsomale qui est la forme impliquée dans la bio-activation des HAP [Fretland 2000].

L'activité enzymatique de l'EH varie **selon l'espèce**. En effet, elle est 4 fois plus élevée chez l'homme que chez le rat [Cornet 1995, Pushparajah 2008].

Contrairement au CYP, les études de l'effet du B[a]P et des autres HAP sur l'expression et l'activité de l'EH sont peu nombreuses.

L'EH est **induite par les HAP** (B[a]P, DB[a,h]A, B[b]F) [Pushparajah 2008], et cette induction est **dose-dépendante** comme pour les CYP [Gao 2022].

De plus, l'induction de l'activité enzymatique de l'EH varie en fonction **du type d'alimentation**. Au niveau des microsomes hépatiques de rats, son activité augmente quand les rats sont nourris avec une alimentation riche en lipides mais cette augmentation varie selon le type de lipides : elle est de 60 % pour les lipides saturés, de 100 % pour les lipides mono-insaturés et 200 % pour les lipides polyinsaturés [Gower 1986].

1.3.3 Les enzymes de la phase II

Le métabolisme de la phase II implique la conjugaison des métabolites de la phase I avec de petites molécules (glutathion, acide glucuronique, acide sulfurique) catalysées par des enzymes spécifiques comme les sulfotransférases (SULT), les GST et les uridine diphosphate-glucuronyl-transférases (UGT) pour former des conjugués polaires plus volumineux qui sont solubles dans l'eau et facilement excrétés.

En général, le catéchol est conjugué par la SULT et les époxydes par les GST [Ewa 2017]. Tandis que les métabolites phénoliques et les diols sont conjugués par les UGT et les SULT [Shimada 2006]. La conjugaison de ces groupements (glutathion, acide glucuronique, acide sulfurique) aux différents métabolites entraîne une augmentation de leur hydrophilie facilitant ainsi leur élimination.

1.3.4 Les différentes voies de bio-activation du B[a]P

Pour le B[a]P, durant la phase I, il existe plusieurs voies de bio-activation et une voie de détoxification (Figure 8). La phase de détoxification permet la formation de phénols et des diols. Le 3-hydroxybenzo[a]pyrène (3-OHB[a]P) est le métabolite majoritairement formé.

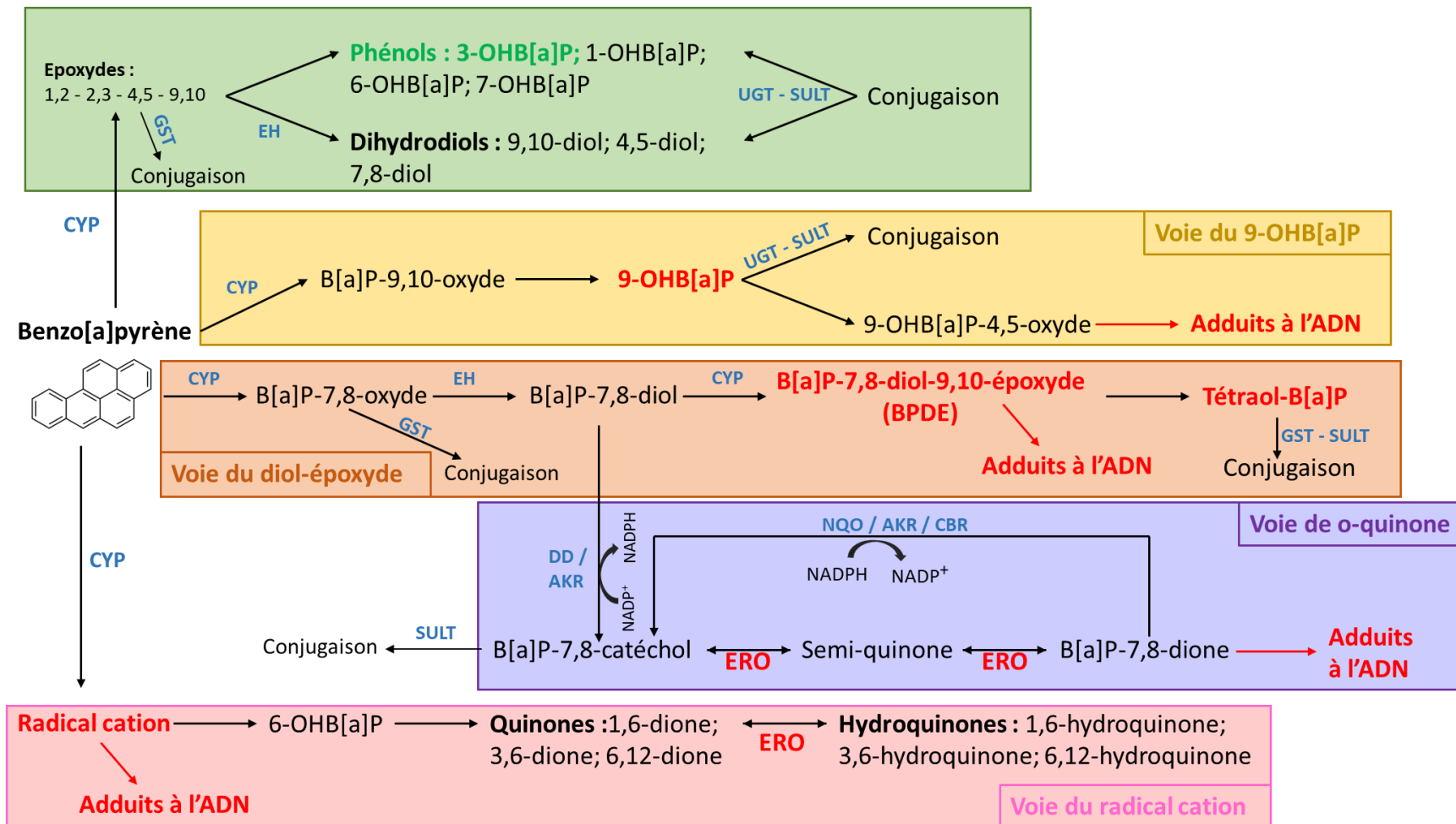


Figure 8: Les principales voies de métabolisme du B[a]P

ADN : acide désoxyribonucléique, AKR : Aldo-Kéto Réductase, B[a]P : Benzo[a]pyrène, BPDE : B[a]P-diol-époxydes, CBR : carbonyl réductase, CYP : Cytochrome P450, DD : dihydrodiol déhydrogénase, EH : Epoxyde Hydrolase, ERO : espèces réactives d'oxygène, GST : Gluthathion S-transférase, NQO : NADPH quinone oxidoréductase, SULT : Sulfotransférase, UGT : UDT-Glucuronyltransférase, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène, 9-OHB[a]P : 9-hydroxybenzo[a]pyrène.

Il existe 4 voies de bio-activation principales du B[a]P : la voie de diol-époxyde, la voie de o-quinone, la voie du radical cation et la voie du 9-hydroxybenzo[a]pyrène (9-OHB[a]P).

Il existe aussi une voie peu documentée qui est la voie d'ester benzylique. Cette voie d'activation des HAP se déroule en trois étapes : 1) une bioalkylation de la molécule de HAP résultant d'une substitution d'un groupement méthyle au niveau de sa position de plus forte densité électronique (dans le cas du B[a]P, cette substitution s'effectue en C6 [Flesher 1990]) ; 2) oxydation du groupement méthyle ; 3) estérification du groupement hydroxyméthyle par transfert d'un acétate ou d'un sulfate conduisant à la formation d'un ester benzylique pouvant former des adduits stables à l'ADN [Okuda 1989, Rogan 1983, Stansbury 1994].

1.3.4.1 La voie de diol-époxyde

Cette voie de bio-activation constitue la voie majeure de bio-activation de B[a]P [Kim 2013, Mallah 2022, Xue 2005].

La formation des diol-époxydes se fait en 3 étapes : (1) oxydation de la double liaison avec les CYP pour la formation des époxydes; (2) hydrolyse des époxydes par l'EH pour former des diols; (3) deuxième oxydation de la double liaison adjacente pour les diols formés et obtention des diols-époxydes avec 4 configurations isomériques : 2 paires d'énantiomères \pm -anti et 2 paires d'énantiomères \pm -syn. Les diols-époxydes cancérigènes sont ceux qui sont formés au niveau de la région « bay » ou « fjord » [Kumar 2001, Xue 2005]. Pour le B[a]P, l'époxyde formé est le B[a]P-7,8-époxyde qui sera hydrolysé en B[a]P-7,8-diol qui par oxydation va former 4 énantiomères dont le majoritaire est le (+)-anti-B[a]P-7R,8S-diol-9S,10R-époxyde ou BPDE qui est le plus réactif vis-à-vis de l'ADN [Barbeau 2018, Zhong 2011].

En interagissant avec l'ADN, il résulte une liaison entre le C10 du benzo[a]pyrène-7,8-*trans*-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) avec le groupe N2 de la désoguanosine (dG) pour former un adduit stable, le BPDE-10-N2dG [Stowers 1985] et le C10 du BPDE avec le groupe N6 de la déoxyadénosine (dA) pour former un adduit stable, le BPDE-10-N6dAde (Figure 9). A noter aussi que, le BPDE peut donner des adduits dépurinés par interaction entre le C10 du BPDE et le N7 de l'adénosine ou le N7 du guanosine pour former respectivement le BPDE-10-N7 Ade et le BPDE-10-N7 Gua mais qui sont très minoritaires (Figure 9) [Chen 1996].

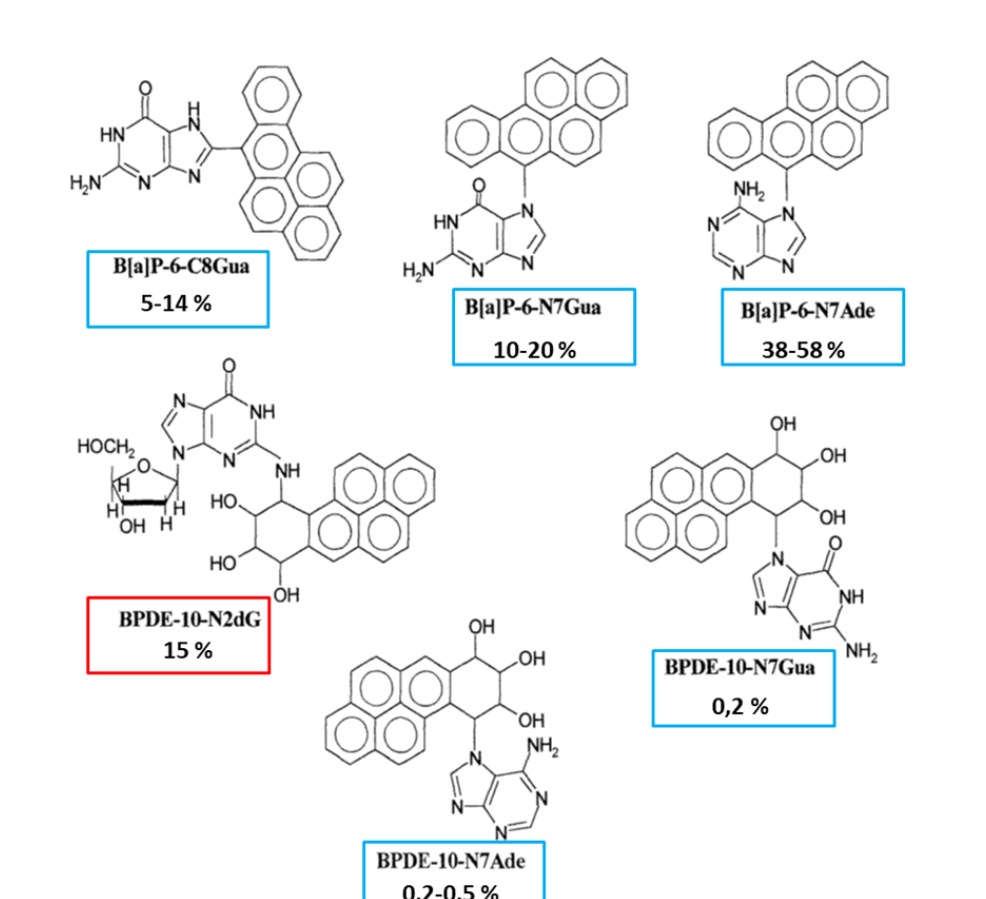


Figure 9: Formation des adduits stables (en rouge) et des adduits dépurinés (en bleu) par la voie du diol-époxyde et la voie de radical cation du B[a]P

D'après Devanesan et al. 1992.

1.3.4.2 La voie des o-quinones

La formation des o-quinones se fait par réaction d'oxydation catalysées par les DD qui sont des membres de la superfamille des AKR. Le mécanisme de cette oxydation dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) implique la formation d'un catéchol, suivie de 2 auto-oxydation du catéchol instable en o-quinone. Ces 2 oxydations libèrent les ERO comme le peroxyde hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂⁻) [Penning 2014]. Parmi les différents AKR, AKR1C9 jouait un rôle important dans la voie de o-quinone chez le rat pour l'activation du DMB[a]A, B[a]A et Chr [Smithgall 1986, 1988]. Chez l'homme, AKR1C1 et AKR 1C4 disposait de l'activité la plus importante dans la voie de o-quinone [Palackal 2002]. AKR est stéréosélectif et agit au niveau des diols présents dans les régions « bay » [Penning 2014, Smithgall 1986]. De plus, les gènes AKR (plus spécifiquement AKR1C) sont parmi les gènes les plus régulés par l'élément de réponse antioxydant (ARE). Ceci soulève la perspective que les ERO produits dans le cycle d'oxydoréduction des o-quinones puissent entraîner une

induction supplémentaire des enzymes AKR1C pour amplifier l'activation métabolique des HAP via une boucle de rétroaction positive [Burczynski 1999].

Ainsi, les ERO générés vont causer des dommages à l'ADN en générant des désoxynucléosides oxydés tels que le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxo-dG). La formation de 8-oxo-dG diminue avec le nombre de cycle aromatique des HAP et suit l'ordre suivant : naphthalène-1,2-dione > B[a]A-3,4-dione > DMB[a]A-3,4-dione > B[a]P-7,8-dione [Xue 2005]. De plus, le o-quinone peut former des adduits à l'ADN stables et dépurinants instables engendrant des transversions G → T lors de la réplication. De plus, les ERO libérés peuvent avoir une fonction nucléase et provoquer des cassures des brins simples et doubles de l'ADN.

In vitro, le taux des métabolites issus des 3 voies de bio-activation du B[a]P dans les cellules humaines broncho-alvéolaire H358 était identique [Lu 2011]. Une autre étude a montré que l'incubation des hépatocytes de rats avec le B[a]P-7,8-diol conduisait à la formation du B[a]P-7,8-dione (o-quinone) et du tétraol-B[a]P en quantité similaire, ce qui permet de dire que l'activation du B[a]P-7,8-diol par le CYP (voie des diol-époxydes) ou par la DD (voie des o-quinones) était identique [Flowers-Geary 1995].

1.3.4.3 La voie de radical cation

La formation du radical-cation consiste en une élimination d'un électron suite à une oxydation électronique des HAP. Elle est catalysée par les peroxydases comme la prostaglandine H synthase ou par certains CYP ayant une fonction peroxydase [Moorthy 2015].

Les radical-cations des HAP 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 (Figure 9). 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 2005]. Alors que la voie du radical cation représentait respectivement 80 et 99 % des adduits à l'ADN au B[a]P et DMB[a]A formés par des microsomes de rat *in vitro* [Cavaliere 1992], l'abstraction d'un seul électron ne semblait être qu'un mécanisme de bio-activation mineur ne comptant que pour une fraction limitée des adduits totaux formés *in vivo* [Xue 2005].

1.3.4.4 La voie de 9-OHB[a]P

La formation des phénols commence par une oxydation par les CYP. Ainsi, selon la stabilité des époxydes (selon la région), les époxydes les plus stables sont transformés en dihydrodiols sous l'action de l'EH. Tandis que les époxydes instables subissent un réarrangement pour donner les phénols. Ainsi, la voie des phénols est considérée surtout comme voie de détoxification.

Cependant, le 9-OHB[a]P est le précurseur de 9-OHB[a]P-4,5-époxyde qui est capable de former des adduits stables à l'ADN [Banasiewicz 2004, Fang 2001]. Toutefois, le taux de 9-OHB[a]P formé dans des microsomes hépatiques du rat étaient 6 fois inférieur par rapport à celui du 3-OHB[a]P [Selkirk 1976]. De plus, une autre étude chez la souris a montré qu'après une exposition intra-péritonéale au B[a]P, le taux des adduits à l'ADN dûs au 9-OHB[a]P-4,5-oxide était 8 fois moins élevé que ceux dûs au BPDE (578 fmol.µg⁻¹ ADN *versus* 74 fmol.µg⁻¹ ADN) [Banasiewicz 2004]. Ce qui montre que cette voie de bio-activation du B[a]P est minoritaire.

1.3.5 Facteurs influençant le métabolisme du B[a]P et des autres HAP

Les tableaux 9 et 10 montrent les différentes études concernant le métabolisme du B[a]P et des autres HAP faites avec des modèles cellulaires ou avec des modèles rongeurs

Tableau 9 : Etudes *in vitro*, *ex vivo* du métabolisme du B[a]P et des autres HAP

Etudes <i>in vitro</i>			
Etude	Modèle cellulaire	Exposition	Résultats
Stiborova 2016	Microsomes hépatiques de rats W	10 ⁵ µM B[a]P pendant 20 minutes	Les métabolites du B[a]P formés par ordre décroissant sont : 3-OHB[a]P > B[a]P-3,6-dione > B[a]P-1,6-dione > B[a]P-9,10-diol > B[a]P-4,5-diol > B[a]P-7,8-diol = 9-OHB[a]P
Šulc 2016	Supersomes™ exprimant un CYP recombinant humain spécifique (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2 ^E 1, 3A4 et 3A5)	50 µM B[a]P pendant 20 min	<ul style="list-style-type: none"> •Les métabolites du B[a]P formés sont : B[a]P-9,10-diol, B[a]P-4,5-diol, B[a]P-7,8-diol, B[a]P-1,6-dione, B[a]P-3,6-dione, 9-OHB[a]P, 3-OHB[a]P, avec un métabolite dont l'identité n'était pas déterminée (M) •Le taux de métabolisme du B[a]P avec les différents CYP variait selon l'ordre suivant : 1A1 > 1B1 > 2C19 > 3A4 = 2B6 > 2C9 = 3A5 •le profil des métabolites formé est différent selon le CYP : <ul style="list-style-type: none"> - CYP 1A1 : 3-OHB[a]P > B[a]P-7,8-diol > B[a]P-9,10-diol = M > B[a]P-3,6-dione = 9-OHB[a]P > B[a]P-1,6-dione - CYP 1B1 : B[a]P-7,8-diol > 3-OHB[a]P > B[a]P-3,6-dione > B[a]P-9,10-diol > M > B[a]P-1,6-dione > 9-OHB[a]P - CYP 2C19 : 3-OHB[a]P > B[a]P-4,5diol = B[a]P-7,8-dol > 9-OHB[a]P > B[a]P-1,6-dione = B[a]P-3,6-dione > M > B[a]P-9,10-diol
Lu 2011	Cellules bronchoalvéolaires humaines H358	4 µM B[a]P pendant pendant 3, 6, 12 et 24 heures	<ul style="list-style-type: none"> •Le pic des métabolites est obtenu à 12 heures •Les métabolites formés par ordre décroissant sont : 3-OHB[a]P > B[a]P-9,10-diol = B[a]P-7,8-diol > tétraol-B[a]P = B[a]P-7,8-dione > B[a]P-3,6-dione > B[a]P-1,6-dione
Smith 2007	Microsomes hépatiques et testiculaires de singe, taureau, mouton, sanglier, hamster, rat et souris.	5 µM B[a]P pendant 15 min	<ul style="list-style-type: none"> •La quantité totale des métabolites du B[a]P formée dans les microsomes hépatiques et testiculaires variaient selon l'ordre suivant : singe > taureau > mouton > sanglier > hamster > rat > souris. •Dans toutes les espèces, la quantité des métabolites formés était 10 fois plus élevée dans les microsomes hépatiques par comparaison aux microsomes testiculaires. •Dans toutes les espèces, il n'y avait pas de différences notables entre les microsomes hépatiques et testiculaires dans la distribution des métabolites du B[a]P. Leurs distributions variaient selon l'ordre suivant :

			<p>Chez le singe, le taureau, le mouton et le sanglier: B[a]P-7,8-diol > B[a]P-4,5-diol = 3-OHB[a]P > B[a]P-9,10-diol = 9-OHB[a]P</p> <p>Chez les rongeurs : B[a]P-4,5-diol > B[a]P-9,10-diol > B[a]P-7,8-diol > 3-OHB[a]P > 9-OHB[a]P</p>
Walker 2006	Microsomes hépatiques et intestinaux de l'homme, du singe, de la vache, de la chèvre, du mouton, du chien, du cochon, du hamster, du rat et de la souris	5 µM Flua pendant 15 min	<ul style="list-style-type: none"> •La quantité totale des métabolites du Flua formés dans les microsomes hépatiques et intestinaux variaient selon l'ordre suivant : homme > singe > vache > chèvre > mouton > chien > cochon > hamster > rat > souris. •Dans toutes les espèces, la quantité des métabolites formés était 10 fois plus élevée dans les microsomes hépatiques par comparaison aux microsomes intestinaux. •Dans toutes les espèces, il n'y avait pas de différences notables entre les microsomes hépatiques et intestinaux dans la distribution des métabolites FLA formés qui variaient selon l'ordre suivant : Flua-2,3-diol-1,10-époxyde > Flua-2,3-diol > 3-OHFlua > 8-OHFlua
Cavret 2005	Cellules Caco-2	Phénanthrène à 34 mCi.mL ⁻¹ pendant 15- 90- 180 et 360 min	45 % de la dose est métabolisée après 360 min
		Pyr à 34 mCi.mL ⁻¹ pendant 15- 90- 180 et 360 min	65 % de la dose est métabolisée après 360 min
		B[a]P à 34 mCi.mL ⁻¹ pendant 15- 90- 180 et 360 min	96 % de la dose est métabolisée après 360 min
Raineri 1983	Cellules hépatiques de rats SD	4,4 µM B[a]P pendant 1- 3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •380 pmol à 1920 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 8,4 % des phénols (3OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 49,8 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et 41,9 % des quinones
	Cellules pulmonaires de rats SD	4,4 µM B[a]P pendant 1- 3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •100 pmol à 170 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 14,1 % des phénols (3-OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 17,6 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et 68,4 % des quinones

	Cellules intestinales de rats SD	4,4 µM B[a]P pendant 1-3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •28 pmol à 180 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 16,6 % des phénols (3OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 16,7 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et 66,7 % des quinones
	Cellules rénales de rats SD	4,4 µM B[a]P pendant 1-3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •49 pmol à 64 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 17,5 % des phénols (3OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 15,2 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et 67,4 % des quinones
	Cellules hépatiques de hamsters syriens dorés	4,4 µM B[a]P pendant 1-3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •480 pmol à 1470 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 7,3 % des phénols (3OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 51,6 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et % des 41,2 % quinones
	Cellules pulmonaires de hamsters syriens dorés	4,4 µM B[a]P pendant 1-3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •160 pmol à 320 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 23,6 % des phénols (3OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 26,9 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et 54,8 % des quinones
	Cellules intestinales de hamsters syriens dorés	4,4 µM B[a]P pendant 1-3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •240 pmol à 520 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 11,2 % des phénols (3OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 61,7 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et 27,2 % des quinones
	Cellules rénales de hamsters syriens dorés	4,4 µM B[a]P pendant 1-3- 6 heures	<ul style="list-style-type: none"> •110 pmol à 310 pmol de B[a]P étaient métabolisés •Répartition des métabolites formés après 6 heures d'incubation : 6,9 % des phénols (3OHB[a]P + 9-OHB[a]P); 59,4 % des diols (B[a]P-9,10-diol + B[a]P-4,5-diol + B[a]P-7,8-diol) et 33,8 % des quinones
Selkirk 1976	Microsomes hépatiques de rat SD	100 µM B[a]P pendant 15 minutes	Répartition des métabolites : <ul style="list-style-type: none"> •3-OHB[a]P : 47,3 % •9-OHB[a]P : 8,0 % •B[a]P-9,10-diol : 15,3 % •B[a]P-4,5-diol : 6,2 % •B[a]P-7,8-diol : 11,3 % •Quinones : 11,7 %

	Microsomes hépatiques de hamster syrien	100 µM B[a]P pendant 15 minutes	<p>Répartition des métabolites :</p> <ul style="list-style-type: none"> •3-OHB[a]P : 55,6 % •9-OHB[a]P : 1,7 % •B[a]P-9,10-diol : 5,4 % •B[a]P-4,5-diol : 28,9 % •B[a]P-7,8-diol : 4,6 % •Quinones : 3,7 %
	Microsomes hépatiques de souris Swiss	100 µM B[a]P pendant 15 minutes	<p>Répartition des métabolites :</p> <ul style="list-style-type: none"> •3-OHB[a]P : 60,4 % •9-OHB[a]P : 15,0 % •B[a]P-9,10-diol : 9,0 % •B[a]P-4,5-diol : 1,2 % •B[a]P-7,8-diol : 10,4 % •Quinones : 9,3 %
	Cellules embryonnaires de hamster syrien	100 µM B[a]P pendant 30 minutes	<p>Répartition des métabolites :</p> <ul style="list-style-type: none"> •3-OHB[a]P : 18,0 % •9-OHB[a]P : 44,8 % •B[a]P-9,10-diol : 5,7 % •B[a]P-4,5-diol : 0 % •B[a]P-7,8-diol : 4,6 % •Quinones : 19,1 %
	Cellules embryonnaires de souris Swiss	100 µM B[a]P pendant 30 minutes	<p>Répartition des métabolites :</p> <ul style="list-style-type: none"> •3-OHB[a]P : 21 % •9-OHB[a]P : 39,5 % •B[a]P-9,10-diol : 7,5 % •B[a]P-4,5-diol : 0 % •B[a]P-7,8-diol : 10,8 % •Quinones : 17,3 %
Holder 1975	Microsomes hépatiques de souris C57BL/6J	95 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> •1,08 % de la dose de B[a]P est métabolisé •Répartition des métabolites formés : 47,2 % des phénols; 6,5 % des diols et 46,3 des quinones
		40 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> •2,11 % de la dose de B[a]P est métabolisé •Répartition des métabolites formés : 49,5 % des phénols; 7,9 % des diols et 42,5 des quinones

	9,5 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> •11 % de la dose de B[a]P est métabolisé •Répartition des métabolites formés : 58,5 % des phénols; 12,2 % des diols et 29,3 des quinones
	2 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> •27,5 % de la dose de B[a]P est métabolisé •Répartition des métabolites formés : 53.8 % des phénols ; 15,3 % des diols et 30.8 des quinones
Microsomes hépatiques de souris DBA/2J	95 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> • 5,34 % de la dose de B[a]P est métabolisé •Répartition des métabolites formés : 54,5 % des phénols; 13,1 % des diols et 32,4 % des quinones
	40 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> •11,1 % de la dose de B[a]P est métabolisé •Répartition des métabolites formés : 50,9 % des phénols; 13,5 % des diols et 34 % des quinones
	9,5 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> •48,8 % de la dose de B[a]P est métabolisé •Répartition des métabolites formés : 54.4 % des phénols; 15,8 % des diols et 29,8 % des quinones
	2 µM B[a]P pendant 10 minutes	<ul style="list-style-type: none"> • Quantité des métabolites formés inférieure à la limite de quantification

Etudes *ex vivo*

Etude	Modèle cellulaire	Exposition	Résultats
Mollière 1987	Perfusion de poumons isolés de rat SD	1 123 nM de B[a]P dans le flux entrant dans l'organe	Concentration des métabolites dans le flux sortant des organes : <ul style="list-style-type: none"> •3-OHB[a]P : 64,5 nM (5,7 %) •9-OHB[a]P : 35,8 nM (3,2 %) •B[a]P-9,10-diol : 38,1 nM (3,4 %) •B[a]P-4,5-diol : 16,9 nM (1,5 %) •B[a]P-7,8-diol : 23,7 nM (2,11 %)
	Perfusion du foie isolé de rat SD	872 nM de B[a]P dans le flux entrant dans l'organe	Concentration des métabolites dans le flux sortant des organes : <ul style="list-style-type: none"> •3-OHB[a]P : 8,8 nM (1 %) •9-OHB[a]P : 4,9 nM (0,56 %) •B[a]P-9,10-diol : 6,6 nM (0,75 %) •B[a]P-4,5-diol : 2,2 nM (0,25 %) •B[a]P-7,8-diol : 3,1 nM (0,35 %)

B[a]P : benzo[a]pyrène, *CYP* : cytochrome P450, *Flua* : fluoranthène, *Pyr* : pyrène, *SD* : Sprague Dawley, *W* : Wistar, *3-OHB[a]P* : 3-hydroxybenzo[a]pyrène, *3-OHFlua* : 3-hydroxyfluoranthène, *8-OHFlua* : 8-hydroxyfluoranthène, *9-OHB[a]P* : 9-hydroxybenzo[a]pyrène.

Tableau 10 : Etudes *in vivo* (chez des modèles rongeurs) du métabolisme du B[a]P

Etude	Espèce animale	Traitement	Résultats
Weyand 1986	Rats SD	Une dose de 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ B[a]P par voie IT	<ul style="list-style-type: none"> • Au niveau du poumon, les métabolites formés par ordre décroissant : B[a]P-3,6-quinone > B[a]P-1,6-quinone > B[a]P-6,12-quinone > B[a]P-9,10-diol > 3-OHB[a]P > B[a]P-7,8-diol > 9-OHB[a]P > B[a]P 4,5-diol • Au niveau hépatique, les métabolites formés par ordre décroissant : B[a]P-1,6-quinone > B[a]P-6,12-quinone > B[a]P-3,6-quinone > B[a]P-9,10-diol > B[a]P-7,8-diol > 3-OHB[a]P > B[a]P-4,5-diol > 9-OHB[a]P • Au niveau intestinal, les métabolites formés par ordre décroissant : B[a]P-4,5-diol > B[a]P-3,6-quinone > B[a]P-9,10-diol > B[a]P-1,6-quinone = B[a]P-6,12-quinone > B[a]P-7,8-diol > 3-OHB[a]P > 9-OHB[a]P
Chipman 1983	Rats W	Une dose de 0,75 et 10 mg.kg^{-1} B[a]P par voie IV	<ul style="list-style-type: none"> • Au niveau biliaire, les métabolites trouvés sont : B[a]P-4,5-diol, B[a]P-3,6-quinone, B[a]P-1,6-quinone, B[a]P-6,12-quinone, 9-OHB[a]P
Ramesh 2001	Rats Fischer F-344	Une dose de 10 mg.kg^{-1} B[a]P par gavage	<ul style="list-style-type: none"> • Au niveau du poumon, les métabolites formés après 24 heures par ordre décroissant : 3-OHB[a]P = B[a]P-7,8-diol > B[a]P-4,5-diol > 9-OHB[a]P • Au niveau du foie, les métabolites formés après 24 heures par ordre décroissant : B[a]P-7,8-diol = 9-OHB[a]P > B[a]P-9,10-diol > B[a]P-4,5-diol > 3-OHB[a]P
Diggs 2013	Souris Apc	100 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P dissout dans du tricarpryline, par gavage pendant 60 jours	Concentration des métabolites du B[a]P : <ul style="list-style-type: none"> • Dans le plasma : 6 ng.mL^{-1} • Dans le colon : 7 ng.g^{-1} • Dans le foie : 10 ng.g^{-1}
		100 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P dissout dans l'huile d'arachide par gavage pendant 60 jours	Concentration des métabolites du B[a]P : <ul style="list-style-type: none"> • Dans le plasma : 8 ng.mL^{-1} • Dans le colon : 10 ng.g^{-1} • Dans le foie : 12 ng.g^{-1}
		100 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P dissout dans l'huile de coco par gavage pendant 60 jours	Concentration des métabolites du B[a]P : <ul style="list-style-type: none"> • Dans le plasma : 10 ng.mL^{-1} • Dans le colon : 15 ng.g^{-1} • Dans le foie : 20 ng.g^{-1}

La présentation des études est faite pour chaque souche de rats par ordre chronologique puis pour toutes les souches de souris par ordre chronologique. B[a]P : benzo[a]pyrène, IT : intra-trachéale, IV : intra-veineuse, SD : Sprague Dawley, W : Wistar, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène, 9-OHB[a]P : 9-hydroxybenzo[a]pyrène.

Le métabolisme des HAP varie **selon l'organe étudié**. Le métabolisme des HAP peut se faire dans différents organes (foie, poumons, intestins, reins, peau, ...), mais le foie reste l'organe principal pour le métabolisme des HAP [Diggs 2013, Mollière 1987, Raineri 1983].

De plus, la distribution des métabolites formés varie **selon l'organe**. *Ex vivo*, avec un poumon perfusé de rat, la formation des B[a]P-diols (4,5 – 7,8 – 9,10) étaient plus élevée par rapport à celle des métabolites monohydroxylés (3-OH et 7-OHB[a]P), alors qu'avec le foie, la formation des diols et des métabolites monohydroxylés était identique [Mollière 1987]. Cependant, *in vivo*, après un gavage de 10 mg.kg⁻¹ de B[a]P de rats Fischer F-344, la formation des diols (4,5 – 7,8 – 9,10) était dominante par rapport aux monohydroxy (3-OH et 9-OHB[a]P) dans le foie alors qu'au niveau pulmonaire la formation de diols était identique à celle des monohydroxy [Ramesh 2001].

Le taux de HAP métabolisé varie selon **la molécule** étudiée. Une étude *in vitro* a montré que le taux du B[a]P métabolisé était 2,8, 6,5 et 6,7 fois plus élevée que celui du dibenzo[def,p]chrysène (DB[def,p]C) avec des microsomes humains, de rats SD et de souris respectivement [Crowell 2014]. Une autre étude a montré qu'au niveau des cellules Caco-2, le B[a]P était l'HAP le plus métabolisé suivi du Pyr et du phénanthrène [Cavret 2005].

Le métabolisme varie aussi avec **l'espèce animale** [Crowell 2014, Raineri 1983, Selkirk 1976, Smith 2007, Walker 2006]. En effet, les métabolites formés *in vitro* au niveau des microsomes hépatiques de souris et de rats exposés aux mêmes doses de B[a]P diffèrent. Alors la formation des diols est plus faible chez la souris que chez le rat, celle des phénols et des quinones est plus élevée [Holder 1975]. Une autre étude *in vitro* sur des microsomes hépatiques et testiculaires a montré que la quantité de métabolites du B[a]P augmentait en fonction de l'espèce animale : rat = souris < hamster < mouton < sanglier < singe [Smith 2007]. De plus, la production de métabolites monohydroxylés (3-OHB[a]P et 9-OHB[a]P) était plus importante que celle des diols chez les mammifères, alors que la production des diols (4,5-diol, 7,8-diol et 9,10-diol) était plus importante chez les rongeurs [Smith 2007].

1.4 Élimination des HAP parents et de leurs métabolites chez le rongeur

L'élimination des HAP et leurs métabolites peut se faire dans différentes matrices comme les urines, les fèces et le lait maternel avec une excrétion majoritaire par **les fèces, notamment via le cycle entéro-hépatique** [Ramesh 2004].

L'élimination fécale des HAP varie inversement à l'absorption, c'est-à-dire qu'elle diminue avec l'augmentation de l'absorption intestinale des HAP. De plus, vu que les HAP ont un cycle entéro-hépatique, l'élimination fécale des HAP dépend aussi de la sécrétion biliaire des HAP qui étaient absorbés mais non métabolisés dans le foie.

Chez des rats SD, l'élimination fécale du B[a]P administré par voie orale était de 0,4 % de la dose administrée, et celle du 3-OHB[a]P est de 12,9 % [Marie 2010]. Chez les rats W, suite à une administration orale du Chr, 13 % de la dose administrée est éliminée dans les fèces sous forme inchangée alors que 59,2 % se retrouvait sous forme des métabolites monohydroxylés (En C6, C5, C4, C3, C2 et C1) [Grimmer 1988].

Après exposition de hamster au B[a]P incorporé dans leur nourriture, son élimination fécale augmentait de 0,45 à 6 % de la dose administrée lorsque du son de blé est rajouté à la matrice alimentaire [Mirvish 1981]. Après administration de différents HAP marqués radio-activement chez des chèvres en lactation, les taux de radio-activité observés dans les fèces augmentait selon l'ordre suivant : le phénanthrène de (21,7%) < le Pyr (25,5%) < le B[a]P (88,2%) [Grova 2002].

L'élimination urinaire des HAP est plus étudiée que l'élimination fécale car l'urine est la matrice la plus facile à récupérer pour étudier l'élimination des HAP et car elle dépend de la quantité d'HAP absorbés. Après administration orale du Pyr chez des rats SD, 2,6 à 3,2 % de la dose du Pyr est éliminée dans les urines sous forme de 1-OHP [Bouchard 1998b, 2002, Viau 1995]. Le 3-OHB[a]P représente le métabolite urinaire majeur du B[a]P mais il ne représente que 0,22 - 0,35 % de la dose administrée [Jongeneelen 1984, Marie 2010, Moreau 2015b]. L'élimination urinaire du 3-OHB[a]P se fait en 2 phases avec un temps de demi-vie de la phase initiale de 8 heures [Bouchard 1996, Marie 2010]. Chez des rats SD, suite à une exposition de 10 mg.kg⁻¹ du B[a]P par voie orale, le tétraol-B[a]P urinaire restait inférieur au seuil de quantification [Moreau 2015b]. Pour le Chr, après une exposition orale, 0,12 % de la dose était éliminé sous forme inchangée dans les urines, et 1,39 % de la dose était éliminé sous forme de métabolites monohydroxylés avec une prédominance de 3-hydroxychrysène (3-OHChr) et 1-hydroxychrysène (1-OHChr) [Grimmer 1988].

Facteurs pouvant influencer l'élimination des HAP et de leurs métabolites

Le type de boisson administrée au rat a un effet sur la diurèse et ainsi sur l'élimination urinaire des métabolites des HAP. Bouchard et Viau (1998b) ont montré que l'addition de glucose à

l'eau de boisson (40 g.L⁻¹), ou du glucose avec des électrolytes augmentait la diurèse et l'élimination urinaire du 1-OHP de 2 et 3 fois respectivement.

Toutes ces études montrent la complexité de la toxicocinétique des HAP. Ainsi, chaque étape de la toxicocinétique dépend de l'autre. Par exemple, le taux de métabolites formé ne dépend pas uniquement du métabolisme de la molécule mais aussi de la quantité absorbée. De plus, différents facteurs peuvent agir sur les différentes étapes de la toxicocinétique comme les propriétés physico-chimiques de la molécules, l'apport alimentaire, la dose et la voie d'exposition, l'espèce animale étudiée,

2 Mécanisme de régulation du B[a]P et des autres HAP via l'AhR

2.1 Activation du récepteur AhR

Le AhR est un facteur de transcription de la famille de basic-loop-helix-PER-ARNT-SIM (bHLH/PAS). Il est impliqué dans différents mécanismes biologiques comme le cycle cellulaire, l'apoptose, les enzymes de métabolisme des xénobiotiques (CYP, enzymes de conjugaison), certaines protéines transmembranaires, les facteurs de croissance (TGF α), les facteurs inflammatoires (Interleukine-1 β (IL-1 β), facteur de nécrose tumorale α (TNF α)) ... [Bock 2019, Murray 2014].

Il existe 2 types de ligands pour les AhR : les ligands endogènes et les ligands exogènes [Beischlag 2008, Hubbard 2015, Stejskalova 2011] (Tableau 11).

Tableau 11 : Exemples de ligands exogènes et endogènes du AhR

Exogènes		Endogènes
Composants naturels	Composants synthétiques	
Polyphénols (resvératrol, diosmine, quercétine)	Polluants environnementaux (HAP, PCB, TCDD)	Dérivés du tryptophane (Tryptamine, acide indole-acétique, FICZ)
Alcaloïdes	Pesticides (diuron)	Métabolites hémiques (bilirubine, biliverdine, hémine)
Caroténoïdes	Médicaments (oméprazole)	Eicosanoïdes
	Inhibiteurs de kinase	
	Flavonoïdes synthétiques (TMF, α -naphthoflavone)	
	Ligands synthétiques (CH223191, VAF347)	

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, PCB : polychlorobiphényles, FICZ : 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, TMF : 6,2',4'-Triméthoxyflavone

Parmi les ligands exogènes synthétiques, on trouve les HAP. Les HAP de FPM, notamment le Flua, le phénanthrène ou le Pyr, sont connus comme de mauvais ou de faibles agonistes des AhR [Machala 2001], alors que les HAP de HPM, comme le DB[a,h]A, le B[b]F, le B[k]F, le benzo[b]chrysène ou l'IP, sont des ligands efficaces de l'AhR et des agonistes plus puissants que le B[a]P pour ce récepteur [Binkova 2000, Jones 1999, Machala 2001, Pieterse 2013, Vondráček 2017]. Il est intéressant de noter que la métabolisation de certains HAP de FPM, comme le naphthalène en quinones, notamment en 1,2-naphtoquinone, peut augmenter leur affinité pour l'AhR [Abiko 2015, 2016, Penning 2014].

L'AhR se trouve sous forme inactive dans le cytoplasme et est constitué d'un complexe de plusieurs protéines : protéine chaperonne du shock thermique (Hsp90) et co-chaperone p23, et « X-associated Protein 2 » (XAP2) ou « AhR Interacting Protein » (AIP) et thyrosine kinase src (c-src). Chaque protéine de ce complexe a un rôle dans le maintien de la stabilité et de la conformation du récepteur pour qu'il puisse fixer son ligand et échapper à la dégradation des protéosomes [Rothhammer 2019].

Il existe 2 mécanismes pour activer l'AhR : l'activation canonique et l'activation non canonique (Figure 10).

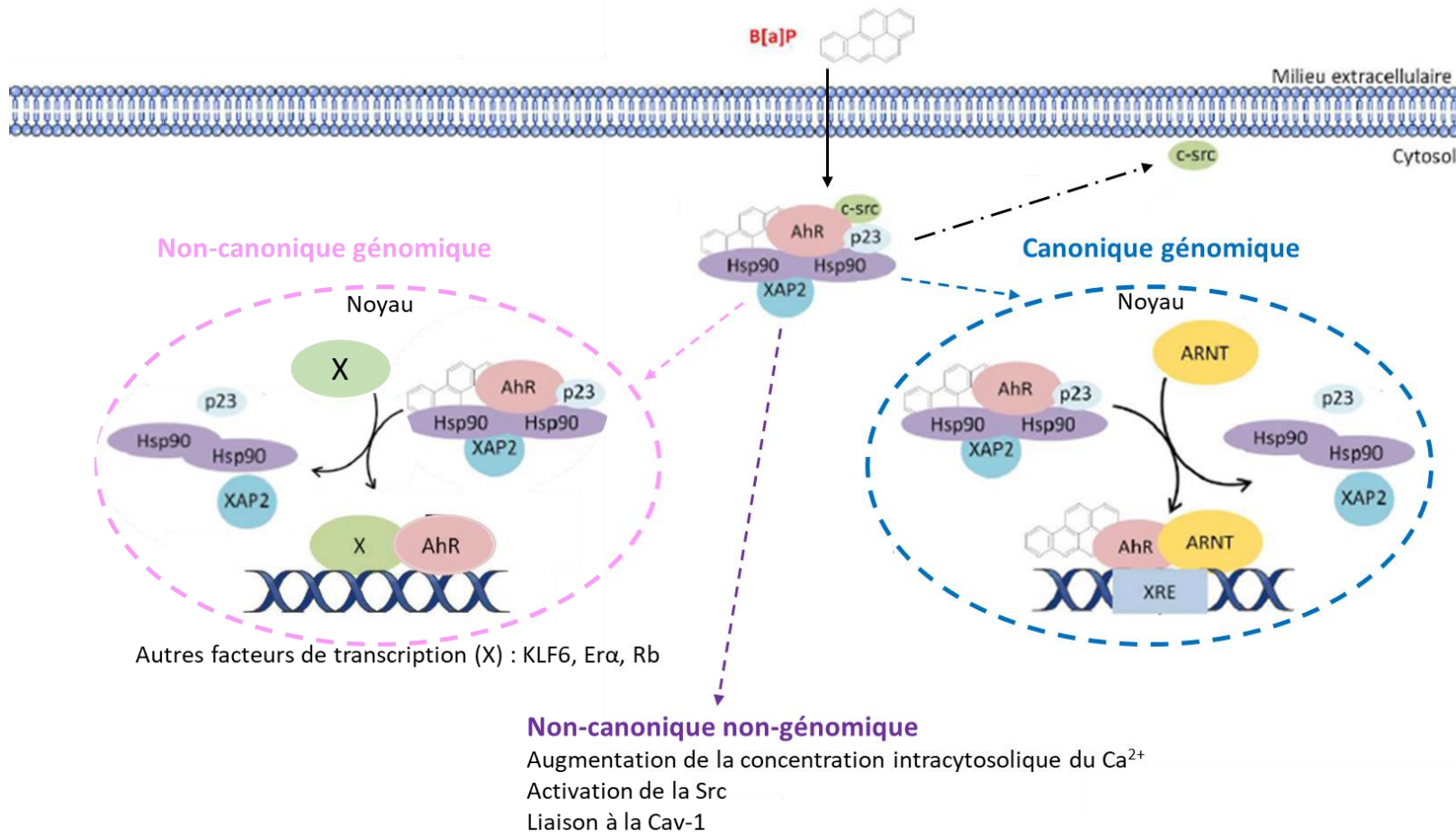


Figure 10 : Schéma des différentes voies d'activation du AhR par le B[a]P

D'après Riaz et al. 2022. AhR : récepteur d'aryl hydrocarbone, ARNT : AhR nuclear translocator, B[a]P : benzo[a]pyrène, Cav-1 : cavéoline-1, Era : récepteur aux oestrogènes-alpha, Hsp90 : protéine du shock thermique, KLF6 : facteur 6 de type Kruppel, RP : protéine de Rétinoblastome, SRC : thyrosine kinase, XAP2 : X-associated Protein 2, XRE : élément de réponse aux xénobiotiques.

Pour l'activation canonique, le ligand (comme le B[a]P) va se lier dans le cytoplasme à l'AhR ce qui va modifier sa conformation et permettre au complexe d'être transloqué vers le noyau cellulaire où il se lie à l'«AhR nuclear translocator» (ARNT). Le complexe ainsi formé (ligand + AhR +ARNT) va se fixer sur les éléments de réponse aux xénobiotiques ou «Xenobiotic Response Element» (XRE) présents dans les séquences promotrices des gènes cibles afin de les activer [Beischlag 2008].

L'activation non canonique du AhR ne fait pas intervenir l'ARNT. Il existe 2 types d'activation non canonique : génomique et non-génomique. Ainsi, l'AhR peut induire l'expression de gènes par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription non canoniques comme le facteur 6 de type Kruppel (KLF6), le récepteur aux oestrogènes-alpha (E α), la protéine de Rétinoblastome (RB) [Jackson 2015, Riaz 2022]. Pour l'activation non canonique non génomique, plusieurs mécanismes peuvent être impliqués. Ainsi l'activation du AhR provoque une augmentation de la concentration intracytosolique du calcium (Ca²⁺) ou l'activation de la c- Src ou la liaison à la Cavéoline-1 (Cav-1), ce qui a pour conséquence une activation d'autres protéines comme la « Focal Adhesion Kinase » (FAK), le Protéine Kinase C (PKC), la « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK) [Riaz 2022].

2.2 Gènes modifiés via l'activation du récepteur AhR

L'activation du récepteur à l'AhR peut interagir avec différents gènes ce qui induit différents effets en lien avec l'exposition aux HAP.

Les gènes les plus connus qui sont activés par l'AhR sont **les gènes du métabolisme des xénobiotiques** et plus précisément ceux des CYP 1A1, 1A2 et 1B1 et NQO1 [Abiko 2016, Beischlag 2008, Cherng 2001, Hockley 2007, Murray 2001, Nebert 2004, Shimada 2002, 2003]. Il existe des différences inter-espèces de la réponse des AhR aux HAP. Par exemple, l'induction des CYP 1A1 et 1A2 était respectivement 15 fois et 8 fois plus élevée chez des souris présentant l'AhR murin par comparaison aux souris humanisées avec un gène d'AhR humain [Moriguchi 2003].

L'AhR interagit avec **les gènes impliqués dans la différenciation et l'apoptose cellulaire** [Barouki 2007]. *In vitro*, après exposition des cellules MCF-7, 3 gènes (CDKN1A, CCNG1, et BTG2) liés à l'inhibition du cycle cellulaire étaient augmentés [Hockley 2007].

De plus, l'AhR induit **des gènes impliqués dans l'immunité et la réaction inflammatoire**. Le récepteur Fc α RI/CD89 est un récepteur glycoprotéique transmembranaire pour les Immunoglobuline A (IgA) monomères et polymères, participant à divers processus cellulaires de la réponse immunitaire, tels que la phagocytose des complexes immuns IgA, la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps, la génération des ERO et la libération de cytokines et de médiateurs inflammatoires. Une étude *in vitro* avec des macrophages humains exposés au B[a]P a montré que l'augmentation de l'expression du gène Fc α RI/CD89 dépendait de l'activation de l'AhR [Sparfel 2010, Pinel-Marie 2011]. De plus, l'activation de l'AhR permet d'augmenter la sécrétion des médiateurs d'inflammation comme l'interleukine 8 (IL8) [Podechard 2008].

Enfin, l'AhR participe au métabolisme énergétique et réagit avec des **gènes impliqués dans les troubles métaboliques**. Une étude a montré qu'après activation du AhR, ce dernier va se lier au gène mINDY et augmenter 8 fois son expression. Ainsi, l'expression du transporteur SLC13A5 (produit du gène mINDY) va augmenter ce qui a pour conséquence une augmentation du transport du citrate du sang au foie avec ainsi une augmentation de la synthèse d'acides gras dans le foie avec apparition d'une stéatose hépatique [Neuschäfer-Rube 2015]. De plus, l'activation du AhR par les HAP jouerait un rôle sur l'homéostasie du glucose par différents mécanismes : augmentation de la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans responsables de la sécrétion d'insuline, altération de la sécrétion d'insuline via la perturbation des voies de MAPK, modification de la différenciation des adipocytes en régulant la voie des proliférateurs de peroxydase α (PPAR α), et augmentation des médiateurs d'inflammation (TNF- α) responsable de la résistance à l'insuline [Sayed 2022].

L'AhR joue aussi un rôle dans l'apparition de **la stéatose hépatique et l'obésité**. Avec un régime alimentaire riche en graisse, le poids corporel, le poids du tissu adipeux, et la stéatose hépatique étaient 22, 55 et 90 % plus faibles chez les souris knock-out pour le AhR au niveau des pré-adipocytes et des adipocytes en comparaison aux souris témoins exprimant l'AhR suite à une augmentation de l'expression de l'UCP1 [Gourronc 2020, Xu 2015].

Cependant, l'expression de l'AhR au niveau hépatique présente un effet protecteur contre la stéatose hépatique induite par l'alimentation riche en graisse via l'augmentation de l'expression du Socs3 [Wada 2016].

3 Effets cellulaires et chez le rongeur après monoexposition au B[a]P ou à un HAP parent

3.1 Effets génotoxiques au niveau cellulaire et chez le rongeur après exposition au B[a]P ou à un HAP parent

L'initiation du cancer induit par les HAP peut être due à différents mécanismes. Le mécanisme majoritaire est la formation **des adduits à l'ADN** avec les métabolites diol-époxydes des HAP. En cas d'absence de réparation de ces adduits, des erreurs de lecture parviennent lors de la réplication de l'ADN avec les ADN polymérases avec une transversion $G \rightarrow T$ ou une transversion $G \rightarrow C$ [Xue 2005]. De plus, la libération des ERO avec la voie des o-quinones génère des cassures aux brins de l'ADN ce qui engendre des mécanismes de réparation qui peuvent être à la base de erreurs de remplacement des nucléotides. De plus, les ERO peuvent attaquer les nucléotides et génèrent des bases oxydées. Parmi les bases oxydées, le 8-oxo-dG est la base la plus étudiée dans le stress oxydatif des HAP qui peut donner des transversions $G \rightarrow T$. Finalement, les quinones formées génèrent des adduits stables à l'ADN et des adduits dépurinants instables [Penning 2014].

Plusieurs études ont étudié la formation des adduits à l'ADN après exposition à un HAP (Tableaux 12, 13).

Tableau 12 : Etudes *in vitro* et *ex vivo* des adduits à l'ADN après exposition au B[a]P et autres HAP

<i>Etudes in vitro</i>			
Etudes	Modèle cellulaire	Exposition	Effet génotoxique
Libalova 2014	Cellules épithéliales pulmonaires humaines	DB[a,l]P à 100 nM pendant 24 heures	Formation d'adduits à l'ADN (1000 adduits.10 ⁻⁸ nucléotide)
		B[a]P à 1- 10- 50- 100- 250- 500- 1000- 10 000 nM pendant 24 heures	Augmentation dose-dépendant du taux d'adduits à l'ADN : de 0,8 adduits.10 ⁻⁸ nucléotide à 1nM à 100 adduits.10 ⁻⁸ nucléotide à 1 et 10 µM
		B[k]F à 1 et 10 µM pendant 24 heures	Formation d'adduits à l'ADN : 1 adduit.10 ⁻⁸ nucléotide à 1 et 10 µM
Genies 2013	Cellules d'hépatocarcinomes humains HepG2	B[a]P : 0,2- 2 et 5 µM pendant 14 heures	Augmentation dose-dépendant du taux d'adduits à l'ADN au BPDE : formation de 9 adduits.10 ⁻⁶ nucléotides à 5 µM
	Cellules pulmonaires humaines A549	B[a]P : 0,2- 2 et 5 µM pendant 14 heures	Formation de 2 adduits.10 ⁻⁶ nucléotides avec uniquement la dose de 0,2 µM
	Cellules humaines de la vessieT24	B[a]P : 0,2- 2 et 5 µM pendant 14 heures	Pas de formation d'adduits à l'ADN
Marie 2008	Cellules d'hépatoblastome humain HepG2	B[a]P à 0- 1- 10 et 50 µM pendant 24 heures	A 10 µM, le taux d'adduits à l'ADN était de 940 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides
	Lignée cellulaire de kératinocytes HaCat	B[a]P à 0- 100- 200 et 400 µM pendant 24 heures	A 100 µM, le taux d'adduits à l'ADN était de 27 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides
Keshava 2005	Cellules épithéliales mammaires humaines normales obtenues à partir de tissus de réduction de mammoplastie chez 23 femmes	B[a]P à 4 µM pendant 12 heures	Le taux d'adduits à l'ADN variait selon le donneur de non détecté à 15 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides
Binkova 2004	Fibroblastes pulmonaires diploïdes humains	B[a]P, DB[a,l]P, B[b]F, Chr, B[k]F, B[a]A, DB[a,h]A, I[1,2,3-cd]P, B[g,h,i]P à 0,1;	<ul style="list-style-type: none"> •Augmentation dose dépendante du taux d'adduits à l'ADN •Formation des adduits à l'ADN avec les différents HAP testés selon l'ordre suivant : DB[a,l]P > B[a]P > B[b]F = Chr = B[k]F= B[a]A = DB[a,h]A= I[1,2,3-cd]P > B[g,h,i]P

		0,4; 1; 4 et 10 µM pendant 24 heures	
Fang 2001	Microsomes hépatiques de rats SD	B[a]P à 50 µM pendant 1 heure	Formation de 2 types d'adduits à l'ADN : le premier avec le BPDE et le 2 ^{ème} avec le 9-OHB[a]P-4,5-époxyde
Williams 2000	Tissus d'hyperplasie bénigne de la prostate	B[a]P à 50 µM pendant 22 heures	<ul style="list-style-type: none"> •Formation de 1 adduit.10⁻⁸ nucléotide •Diminution de 64 à 96 % de la formation des adduits à l'ADN après addition d'un inhibiteur du CYP1 (α-naphtoflavone)
Devanesan 1996	Noyau des cellules hépatique de rats W	B[a]P à 50 µM pendant 20 minutes	Formation des adduits à l'ADN à 7,7 µmol.mol ⁻¹ d'ADN dont 82 % étaient des adduits dépurinés et 18 % étaient des adduits stables

Etudes *ex vivo*

Etudes	Modèle cellulaire	Exposition	Effet génotoxique
Staal 2007b	Coupes de foie de rats SD	DB[a,l]P à 3- 10 et 30 µM pendant 6 et 24 heures	Augmentation dose-dépendante du taux d'adduits à l'ADN après 24 heures d'exposition : de 130 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides à 3 µM à 912 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides à 30 µM
		B[a]P à 3- 10 et 30 µM pendant 6 et 24 heures	Augmentation dose-dépendante du taux d'adduits à l'ADN après 24 heures d'exposition : de 2,4 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides à 3 µM à 35 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides à 30 µM
		DB[a,h]A à 3- 10 et 30 µM pendant 6 et 24 heures	Augmentation dose-dépendante du taux d'adduits à l'ADN après 24 heures d'exposition : de 8,7 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides à 3 µM à 15 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides à 30 µM
		B[b]F à 3- 10 et 30 µM pendant 6 et 24 heures	Augmentation identique du taux d'adduits à l'ADN 24 heures après l'exposition aux différentes doses à 15 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides
		Flua à 3- 10 et 30 µM pendant 6 et 24 heures	Augmentation du taux d'adduits à l'ADN 24 heures après exposition à 30 µM à 9,2 adduits.10 ⁻⁸ nucléotides

ADN : acide désoxyribonucléique, B[a]P : benzo[a]pyrène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, BPDE : benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-époxyde, Chr : chrysène, CYP : cytochrome P450, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène, DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène, IP[1,2,3-cd]P : indénol[1,2,3-cd]pyrène, SD : Sprague Dawley, W : Wistar, 9-OHB[a]P-4,5-époxyde : 9-hydroxybenzo[a]pyrène-4,5-époxyde.

Tableau 13: Etudes *in vivo* des adduits à l'ADN après exposition au B[a]P et autres HAP

Etudes	Modèles animal	Exposition	Effet génotoxique
Marie-Desvergne 2010	Rats SD	Une dose de 10 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IV	<ul style="list-style-type: none">•Apparition des adduits à l'ADN au BPDE dans le foie, les poumons et les CMNSP•Le taux total des adduits à l'ADN suivait l'ordre suivant : poumons > CMNSP > foie
Qu 1996	Rats SD	Une dose de 10 mg.kg ⁻¹ de B[a]P, 3 fois.semaine ⁻¹ pendant 2 semaines par voie IP	<ul style="list-style-type: none">•Apparition des adduits à l'ADN dans le foie, les poumons et la rate et les CMNSP•Les types des adduits à l'ADN étaient différents entre les organes avec 5 types différents•Le taux total des adduits à l'ADN suivait l'ordre suivant : poumons > CMNSP > rate > foie
Nesnow 1993	Rats SD	Une dose de 100 mg.kg ⁻¹ de B[b]F par voie IP	<ul style="list-style-type: none">•Apparition des adduits à l'ADN dans les poumons (01,3*10⁻⁶ µmol adduits.mg⁻¹ ADN), le foie (10⁻⁶ µmol adduits.mg⁻¹ ADN) et lymphocytes blancs (0,3*10⁻⁶ µmol adduits.mg⁻¹ ADN)•Formation de 3 types d'adduits à l'ADN : le plus abondant était celui dû au BPDE, le second était celui dû au 9-OHB[a]P-4,5-oxide, le moins abondant n'était pas connu à quel métabolite il était dû.
		Une dose de 100 mg.kg ⁻¹ de B[b]F par voie IP	<ul style="list-style-type: none">•Apparition des adduits à l'ADN dans les poumons (0,25*10⁻⁶ µmol adduits.mg⁻¹ ADN), le foie (0,06*10⁻⁶ µmol adduits.mg⁻¹ ADN) et lymphocytes blancs (0,06*10⁻⁶ µmol adduits.mg⁻¹ ADN)
Hodek 2013	Rats W	Une dose de 150 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par gavage	<ul style="list-style-type: none">•Formation de 3 types d'adduits à l'ADN dans l'intestin et le foie dont un est dû au BPDE et un au 9-OHB[a]P-4,5-époxyde•Le taux des adduits à l'ADN formés dans l'intestin était 5 fois plus élevé que celui formé dans le foie
Bentsen-Farmen 1990	Rats W	Une dose de 100 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IP	Formation des adduits à l'ADN au BPDE plus élevée au niveau pulmonaire qu'au niveau hépatique
Godschalk 2000	Rats Lewis	Une dose de 10 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IT, orale et cutanée	<ul style="list-style-type: none">•Dans les globules blancs, le taux d'adduits à l'ADN variait selon la voie d'administration selon l'ordre suivant : IT (4,3 adduits.10⁻⁸ nucléotides) > orale (3,6 adduits.10⁻⁸ nucléotides) > cutanée (0,3 adduits.10⁻⁸ nucléotides)

			<ul style="list-style-type: none"> • Dans les poumons, le taux d'adduits à l'ADN variait selon la voie d'administration selon l'ordre suivant : IT (20,5 adduits.10⁻⁸ nucléotides) > oral (6,9 adduits.10⁻⁸ nucléotides) > cutanée (0,5 adduits.10⁻⁸ nucléotides) • Quelle que soit la voie d'exposition, le taux d'adduits à l'ADN était plus élevé dans les poumons en comparaison aux globules blancs • Par voie cutanée, le site avec le plus de formation d'adduits à l'ADN est la peau (70 adduits.10⁻⁸ nucléotides)
Diggs 2013	Souris Apc	50; 100 µg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ de B[a]P pendant 60 jours par gavage	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation dose dépendante de taux d'adduits à l'ADN dans le colon et dans le foie • Le taux d'adduits à l'ADN était plus élevé dans le colon en comparaison au foie
Banasiewicz 2004	Souris A/J	Une dose de 50 µg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IP	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du taux d'adduits à l'ADN au BPDE à 0,6 – 0,83 *10⁻⁶ µmol adduits.mg⁻¹ ADN • Le taux d'adduits à l'ADN au 9-OHB[a]P-4,5-époxyde était 10 fois inférieur que celui au BPDE
Marston 2001	Souris Sencar	Une dose de 50,4 µg de B[a]P par application cutanée	Augmentation de la formation d'adduits à l'ADN à 15,7*10 ⁻⁶ µmol adduits.mg ⁻¹ ADN
		Une dose de 0,6 µg DB[a,1]P par application cutanée	Augmentation de la formation d'adduits à l'ADN à 4*10 ⁻⁶ µmol adduit.mg ⁻¹ ADN
Uno 2001	Souris CYP 1A1 (-/-) – Souris CYP 1A1 (+/-)	Une dose de 500 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IP	Formation d'adduits à l'ADN plus élevée chez les souris (-/-) par rapport aux souris (+/-)
Ginsberg 1990	Souris B6C3F1	Une dose de 200 mg.kg ⁻¹ de B[a]P par voie IP	Le taux maximal d'adduits à l'ADN obtenu après 24 heures était identique entre les différents organes : foie, reins, poumons, estomac et rate
Cohen 1979	Souris Sencar	Une dose de 25 µg de B[a]P par application cutanée	Augmentation de formation des adduits à l'ADN de 4,8 – 9 *10 ⁻⁶ µmol adduits.mg ⁻¹ ADN entre 3 et 24 heures après l'exposition

Une dose de 2,5 µg de
DMB[a]A par application
cutanée

Augmentation de formation des adduits à l'ADN à $2,7 \cdot 10^{-6}$ µmol
adduits.mg⁻¹ ADN 3 heures après l'exposition

La présentation des études est faite pour chaque souche de rats par ordre chronologique puis pour toutes les souches de souris par ordre chronologique.

ADN : acide désoxyribonucléique, B[a]P : benzo[a]pyrène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, BPDE : benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-époxyde, CMNSP : cellules mono-nucléaires du sang périphérique, DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène, , DMB[a]A : 7,12-diméthylbenzo[a]anthracène, IP : intrapéritonéale, IT : intra-trachéale, IV : intraveineuse SD : Sprague Dawley, W : Wistar, 9-OHB[a]P-4,5-époxyde : 9-hydroxybenzo[a]pyrène-4,5-époxyde.

La capacité des HAP à induire des adduits à l'ADN *in vitro* dépend **de la molécule mais aussi du temps d'exposition**. Staal et al. (2007b) ont montré que l'exposition de coupes de foie de rats aux HAP induisait plus d'adduits à l'ADN après 24 heures d'exposition par rapport à 6 heures d'exposition selon l'ordre suivant DB[a,l]P >> B[a]P > B[b]F > DB[a,h]A > Flua [Staal 2007b]. A concentration égale, l'exposition de cellules humaines d'adénocarcinome alvéolaire au B[a]P induisait 50 fois plus d'adduits à l'ADN qu'avec l'exposition au B[k]F [Libalova 2014].

La formation des adduits à l'ADN peut varier selon **le type des cellules**. Suite à une exposition au B[a]P, la formation des adduits était 2 fois plus élevée avec les cellules d'hépatoblastome humain HepG2 qu'avec les kératinocytes humains HaCat [Marie 2008].

L'apparition des adduits à l'ADN varie aussi selon **l'organe et la dose de HAP**. *In vitro*, à faible dose de B[a]P (0,2 µM), le taux d'adduits à l'ADN était plus élevé dans les cellules pulmonaires que dans les cellules hépatiques. Cependant, pour des concentrations plus fortes de B[a]P > 1µM, la formation des adduits à l'ADN était supérieure dans les cellules hépatiques [Genies 2013].

La localisation des adduits à l'ADN dépend de **la voie d'exposition**. Après exposition au B[a]P intra-trachéale ou intra-péritonéale, le taux d'adduits d'ADN était plus élevé au niveau pulmonaire qu'au niveau hépatique, alors qu'après une exposition par gavage, le taux d'adduits d'ADN était plus élevé au niveau intestinal qu'au niveau hépatique, [Bentsen-Farmen 1990, Diggs 2013, Ginsberg 1990, Godschalk 2000, Hodek 2013, Marie-Desvergne 2010, Qu 1996].

3.2 Effet reprotoxique du B[a]P chez le rongeur

Après exposition aiguë ou subchronique au B[a]P, des effets sur la fertilité et le développement foetal ont été observés.

L'inhalation de B[a]P à 25, 75 ou 100 µg.m⁻³ 4 heures.J⁻¹ pendant 10 jours chez des rats Fischer F-344 mâles générant une réduction des taux de testostérone, une diminution du poids des testicules, une diminution du nombre des spermatozoïdes et leur motilité [Inyang 2003]. L'exposition de rats W à 100 µg.kg⁻¹.J⁻¹ du B[a]P pendant 60 jours par voie intra-péritonéale induisait une diminution de 11 à 36 % du poids des testicules, des vésicules séminales, de la

prostate et de l'épididyme et une diminution de 37 à 45 % du nombre, de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes [Reddy 2016].

L'exposition de rates Fischer F-344 gestantes au B[a]P induisait une diminution de la survie fœtale de façon proportionnelle à la dose (78,3 % pour la dose 25 g.m⁻³, 38 % pour la dose 75 g.m⁻³, 33,8 % pour la dose 100 g.m⁻³) [Archibong 2002].

3.3 Troubles métaboliques du B[a]P chez le rongeur

L'exposition de souris au B[a]P a montré que ce dernier avait un rôle sur la lipogenèse des tissus adipeux et induisait une résistance à l'insuline par l'intermédiaire de la formation des facteurs d'inflammation [Lou 2022]. Ainsi, l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse comme le « CCAAT/enhancer-binding protein alpha » (C/EBP α), le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ), la protéine de liaison aux acides gras 4 (FABP4) était diminuée. De plus, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'énergie à partir des acides gras comme le PPAR γ /co-activateur 1 α , et le récepteur activé par les PPAR α était diminuée. Enfin, l'augmentation de l'inflammation au niveau des tissus adipeux via l'augmentation de l'expression des facteurs d'inflammation comme le facteur nucléaire Kappa-B (NF- κ B), la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (MCP-1) et le TNF- α induisait une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline en interférant avec son récepteur [Lou 2022].

L'exposition de souris nourries avec un régime riche en graisse contenant du B[a]P induisait une augmentation de la sécrétion de l'Il-1 β et du TNF α (marqueurs d'inflammation) dans le foie et une diminution de l'expression du glucagon-like peptide-1 (GLP-1), hormone qui stimule la sécrétion d'insuline [Khalil 2010].

3.4 Autres effets toxiques du B[a]P et des autres HAP au niveau cellulaire et chez le rongeur

Les HAP parents ont un **effet phototoxique pour les cellules de la peau** [Ekunwe 2015, Wang 2007b, Xia 2015]. L'anthracène et les HAP à 4 ou 5 cycles aromatiques (à l'exception du Chr) généraient un effet phototoxique sur les kératinocytes humains [Wang 2007b]. Après une exposition à 5 μ M pendant 24 heures, le taux des cellules vivantes était inférieur à 20 % suite à

une irradiation au spectre de la lumière solaire [Wang 2007b]. De plus, cet effet varie entre les métabolites. Pour le B[a]P, le 3-OHB[a]P est le métabolite le plus phototoxique [Xia 2015].

Les effets sur le système immunitaire (SI) sont très variables et dépendent de la concentration et du modèle de l'étude.

L'exposition aux HAP peut induire une **stimulation du SI**. L'exposition de cellules T de la souris au B[a]P, B[a]P-7,8-quinone, B[a]P-1,6-quinone, B[a]P-3,6-quinone et B[a]P-6,12-quinone à 1 µM induisait une augmentation de la prolifération des cellules T [Burchiel 2004]. Par contre, d'autres études ont montré un **effet suppresseur sur le SI** qui varie selon l'HAP. L'exposition de rats au B[a]P à différentes doses (3, 10, 30 et 90 mg.kg⁻¹) pendant 35 jours induisait une immunotoxicité avec une diminution de la masse du thymus et une diminution des différents paramètres de la défense immunitaire (lymphocytes, éosinophiles, monocytes, immunoglobulines, cellules natural killer (NK)) mais il existait des variations des effets en fonction de la dose [De Jong 1999]. L'effet immunosuppresseur est également lié à l'HAP selon l'ordre croissant suivant : anthracène < B[a]A = B[e]P < DB[a,h]A < B[a]P, 3-MC, DMB[a]A [Davila 1996, van Grevenynghe 2003, Laupeze 2002]. Pour certains HAP non immunotoxiques, l'effet est observé avec les métabolites (1-naphtol et 1,4-naphtoquinone) [Kawabata 1990]. Pour des HAP immunotoxiques (B[a]P, 7,12-DMB[a]A), les métabolites avaient un effet immunotoxique plus important que le HAP lui-même [Li 2010].

Enfin, l'exposition aux HAP peut entraîner des **effets neurotoxiques** [Olasehinde 2022]. Une exposition post-natale de rats SD au B[a]P a entraîné une altération du développement moteur et des réponses sensorielles qui sont apparues à l'âge adulte [Chen 2012]. Une autre étude chez le rat a montré que l'effet neurotoxique du B[a]P était dû au stress oxydatif généré dans le cerveau en lien avec une inhibition des enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase [Saunders 2006].

Les HAP peuvent aussi avoir un effet neurotoxique par action sur le système cholinergique. L'acétylcholine estérase régule le taux d'acétylcholine (neurotransmetteur) dans la fente synaptique. Une étude *in vitro* a montré que les HAP ont un effet inhibiteur pour l'acétylcholine estérase [Hauser-Davis 2019].

Conclusion du chapitre

Différentes études (*in vitro* et *in vivo*) se sont intéressées à l'étude de la toxicocinétique et la toxicodynamie des HAP en monoexposition.

L'absorption digestive des HAP se fait principalement dans l'intestin et dépend de plusieurs facteurs : les caractéristiques physico-chimiques de la molécule, le type d'alimentation, du microbiote intestinal, Les HAP à FPM sont absorbés par diffusion passive, alors que l'absorption des HAP à HPM se fait par l'intermédiaire des micelles pour traverser la couche d'eau stagnante et arriver dans les entérocytes. A ce niveau, les HAP peuvent être métabolisés. Les HAP et leurs métabolites ont alors 2 possibilités : soit passer dans la circulation sanguine via la veine porte (pour arriver au foie) ou via la circulation lymphatique, soit être éliminés dans la lumière intestinale par transport actif par l'intermédiaire des transporteurs ABC.

La distribution des HAP administrés par voie orale peut se faire dans différents organes mais préférentiellement dans les organes du système digestif, le tissu adipeux et les poumons.

Le métabolisme des HAP peut se faire dans différents organes mais le foie reste l'organe principal du métabolisme des HAP. Quand les HAP sont administrés par voie orale, ils peuvent être métabolisés dans les intestins. Plusieurs enzymes sont impliquées dans le métabolisme des HAP. Les plus étudiées sont les CYP et l'EH qui interviennent surtout dans la voie de détoxification et la voie des diol-époxydes de la bio-activation des HAP. L'activation du AhR par les HAP induit l'expression de certains gènes parmi lesquels les CYP (1A1 et 1B1) qui sont les plus étudiés. Le métabolisme des HAP varie selon l'organe, la molécule et l'espèce animale.

L'élimination des HAP et leurs métabolites se fait surtout par les fèces car ils ont un cycle entéro-hépatique. Ainsi, 12,9 % et 0,22 % du B[a]P administré par voie orale sont éliminés sous forme de 3-OHB[a]P respectivement dans les fèces et les urines.

Dans les études *in vitro* et *in vivo* dans de modèles rongeurs après monoexposition aux HAP, **plusieurs effets toxiques** ont été rapportés : effet génotoxique, effet reprotoxique, effet immunotoxique, effet phototoxique, troubles métaboliques, ... La gravité de ces effets variant selon la molécule, la dose, le temps d'exposition, l'organe cible,

Chapitre III : Toxicocinétique et effets cocktails après exposition aux HAP en mélanges : études cellulaires et chez le rongeur

Comme déjà dit, les HAP sont toujours présents dans l'environnement sous forme de mélanges dont la composition varie selon la source d'émission. Cependant, les nombreuses études cellulaires ou chez les rongeurs que nous avons décrites dans le Chapitre II ont toutes été réalisées après exposition à un seul HAP parent.

Ce chapitre recense les études réalisées à l'aide de modèles *in vitro* ou d'expérimentations animales avec des mélanges de HAP pour comprendre la toxicocinétique et les effets des HAP. Pour répondre à cette question, les chercheurs ont utilisé soit des mélanges synthétiques soit des mélanges réels de HAP.

Mélanges synthétiques de HAP : mélanges fabriqués en laboratoire à partir de solutions pures de différents HAP parents et dont les concentrations et les proportions de chacun des HAP sont parfaitement maîtrisées.

Mélanges réels de HAP : mélanges de polluants prélevés sur des sites connus pour être contaminés par les HAP (site industriel de métallurgie, sol pollué de HAP, émissions atmosphériques des véhicules, ...). Les concentrations de certains HAP (généralement les 16 classés par l'EPA) sont connues mais leur proportion n'est pas maîtrisée. D'autres polluants peuvent être présents mais ne sont pas identifiés ni quantifiés (dioxines, polychlorobiphényles, métaux, ...)

L'étude de l'effet mélange ou « effet cocktail » sur la toxicocinétique ou la toxicodynamie des substances est très important en toxicologie et constitue un enjeu majeur de la santé publique car il peut y avoir plusieurs possibilités d'interactions entre les substances : effet additif, effet synergique ou effet antagoniste. Actuellement, en cas de manque de données ce qui est généralement le cas, l'effet additif est appliqué. Pour les HAP, comme pour les dioxines, des facteurs d'équivalence toxique (FET) sont utilisés pour tenir compte de la toxicité relative de chaque HAP par rapport au B[a]P. Cependant, cette approche n'est pas très adaptée à ces composés car des interactions sont possibles entre les différents HAP quand ils sont en mélanges et des mécanismes d'actions différents sont possibles.

Effet additif : effet combiné d'au moins deux produits chimiques qui est égal à la somme des effets de chaque produit chimique pris individuellement (aucune interaction directe).

Effet synergique : effet combiné d'au moins deux produits chimiques qui est plus toxique ou supérieur à la somme des effets de chaque produit chimique pris individuellement

Effet antagoniste : c'est le contraire de la synergie. Il survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux composés est moins toxique ou inférieur à la somme des effets individuels des substances.

Ce chapitre est consacré aux différentes études réalisées avec des modèles *in vitro* et *in vivo* chez des modèles rongeurs après exposition à des mélanges de HAP (synthétiques ou réels).

1 Toxicocinétique des HAP en mélanges

1.1 Absorption des HAP en mélanges chez le rongeur

L'absorption intestinale est diminuée avec la **présence d'autres HAP**. Alors que l'absorption du B[a]A, Chr ou triphénylène administrés seuls par gavage était respectivement 94, 75 et 97 %, l'absorption du B[a]A diminuait à 87 % alors que celle du Chr restait à 75 % quand le B[a]A et le Chr étaient administrés ensemble. De plus, lorsque le B[a]A et le triphénylène étaient administrés ensemble, l'absorption du triphénylène diminuait de 97 à 94 % et celle du B[a]A de 94 à 84 % [Bartosek 1984].

1.2 Distribution des HAP en mélanges chez le rongeur

Une seule étude a été publiée pour comparer la distribution du B[a]P après exposition orale de rats SD au B[a]P seul à $150 \mu\text{g.kg}^{-1}$ à celle de rats SD exposés à un mélange de B[a]P ($150 \mu\text{g.kg}^{-1}$) de phénanthrène ($4\,300 \mu\text{g.kg}^{-1}$) et de Pyr ($1\,700 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Aucune différence n'a été retrouvée dans la distribution du B[a]P dans le foie, les muscles et le tissu adipeux (sans précision de quel type de muscle et de tissu adipeux) [Kang 2007].

D'autres études ont été faites sur des pièces d'autopsies humaines. Comme pour les HAP seuls, le tissu adipeux abdominal était l'organe le plus contaminé suivi par le cerveau et les plus faibles concentrations étaient trouvées dans le foie, les poumons, le cœur et les reins [Pastor Belda 2019]. Les HAP les plus abondants étaient le Flua, le phénanthrène, l'anthracène et le B[b]F

qui sont pour les 3 premiers des HAP de FPM, HAP généralement en concentration plus élevée dans les mélanges environnementaux [Hernández 2009, Pastor Belda 2019, Yamamoto 2015].

1.3 Métabolisme des HAP en mélanges chez le rongeur

Très peu d'études se sont intéressées à l'effet des mélanges sur le métabolisme des HAP.

Une étude a montré que l'administration des HAP en mélanges exerçait un effet compétitif sur leur métabolisme. En effet, l'administration simultanée du B[a]P et du DB[def,p]C dans des microsomes hépatiques humains induisait une diminution de 2 à 4 fois de leur métabolisme par rapport à leur administration séparée [Smith 2022].

Des résultats comparables ont été trouvés par Bourgart et al. (2019) où après application des HAP sur une peau humaine, le métabolisme du B[a]P diminuait avec le mélange et avec la complexité du mélange par comparaison avec le B[a]P seul. Ainsi après 48 heures d'exposition, la concentration du tétraol-B[a]P était 5 fois plus faible en cas d'exposition à un mélange synthétique de HAP, et 45 fois plus faible avec l'exposition à un mélange industriel de HAP par comparaison avec le B[a]P seul [Bourgart 2019b].

Ainsi la présence des autres HAP dans le mélange pourrait aboutir à une diminution du métabolisme des HAP par rapport à leur administration seule.

Induction / inhibition enzymatique des HAP en mélanges

Différentes études ont montré l'effet des mélanges synthétiques ou réels sur l'expression et l'activité des enzymes impliqués dans le métabolisme des HAP (Tableaux 14, 15).

Tableau 14 : Effets sur l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme des HAP après une exposition *in vitro* et *ex vivo* à des mélanges binaires ou complexes de HAP

Etudes <i>in vitro</i>			
Etudes	Modèles cellulaire	Exposition	Résultats
Genies 2016	Cellules alvéolaires humaines A549	<ul style="list-style-type: none"> •B[a]P à 1 µM •Mélange binaire B[a]P à 1 µM + 1 HAP (B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[a]A, B[g,h,i]P, DB[a,h]A, I[1,23-cd]P, Chr, Flua, Pyr, Naph) à 1 µM •5 mélanges synthétiques de 12 HAP de compositions différentes ajustés à une somme de 2 µM de HAP 	Diminution de l'induction de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 avec tous les mélanges binaires et les 5 mélanges synthétiques par rapport au B[a]P seul
Libalova 2014	Cellules épithéliales pulmonaires A549	<ul style="list-style-type: none"> •B[a]P à 250 nM •Extrait organique des particules PM 2,5 de 4 sites différents à 10- 30 – 60 et 100 µg.mL⁻¹ pendant 24 heures 	<ul style="list-style-type: none"> •Induction de 30 à 50 fois l'expression des CYP 1A et 1B1 avec tous les mélanges •Augmentation de 12 fois l'induction de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 avec tous les mélanges par rapport au B[a]P seul
Courter 2007b	Cellules mammaires humaines MCF-10	<ul style="list-style-type: none"> •1 mM B[a]P •1 mM B[a]P + 400 µg gaz d'échappement de véhicules diesel •0,8 µM DB[a,l]P •0,8 µM DB[a,l]P + 400 µg gaz d'échappement de véhicules diesel 	<ul style="list-style-type: none"> •Induction de 6 fois de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 avec le mélange •Augmentation de 2 fois l'induction de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 avec le mélange par rapport à celle observée avec le B[a]P seul •Induction de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 identique entre l'exposition au DB[a,l]P seul avec celle du mélange
Staal 2007a	Cellules d'hépatocarcinome humain HepG2	<ul style="list-style-type: none"> •B[a]P à 30 µM •Mélange binaire équimolaire B[a]P + 1 HAP (DB[a,l]P, DB[a,h]A, B[b]F, Flua,) à 1 µM 	<ul style="list-style-type: none"> •Induction de l'expression du CYP 1A1 identique entre l'exposition au B[a]P seul avec les mélanges binaires •Augmentation de l'expression du CYP 1A2 avec le mélange binaire (B[a]P + DB[a,l]P ou DB[a,h]A) par rapport au B[a]P seul
Cherng 2001	Cellules d'hépatocarcinome humain HepG2	<ul style="list-style-type: none"> •B[a]P à 1 µM •B[a]P à 1 µM + B[g,h,i]P à 0,1 – 1 et 10 µM 	Augmentation de l'expression du CYP 1A1 avec le mélange binaire à 1 et 10 µM par rapport au B[a]P seul
Etudes <i>ex vivo</i>			

Etudes	Modèles cellulaire	Exposition	Résultats
von Koschembahr 2020	peau humaine obtenue à la suite d'une chirurgie mammaire	<ul style="list-style-type: none"> •B[a]P à 2 mM pendant 48 heures •Mélange synthétique de HAP ajusté à 2 mM de B[a]P •Mélange réel de HAP à base de brai de houille ajusté à la même composition du mélange synthétique 	Induction de l'expression des CYP 1A1, 1A2 et 1B1 avec les 3 expositions selon l'ordre suivant : mélange réel > mélange synthétique > B[a]P seul
Pushparajah 2018	Coupe de foie de rats	<ul style="list-style-type: none"> •B[a]P à 0,5 µM •B[a]P à 0,5 µM + B[c]C à 1 – 5 – 10 – 25 et 50 µM •B[a]P à 0,5 µM + B[g]C à 1 – 5 – 10 – 25 et 50 µM •B[a]P à 0,5 µM + B[b]C à 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1 – 2 et 5 µM •B[a]P à 0,5 µM + DB[a,c]A à 1 – 5 – 10 – 25 et 50 µM 	<p>Augmentation de l'induction de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 par rapport à celle observée avec le B[a]P seul avec les mélanges :</p> <ul style="list-style-type: none"> •B[a]P + B[c]C à 1 et 5 µM •B[a]P + B[g]C à 1 µM •B[a]P + B[b]C à 0,5 – 0,75 – 1 – 2 et 5 µM <p>Diminution de l'induction de l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 par rapport à celle observée avec le B[a]P seul avec les mélanges :</p> <ul style="list-style-type: none"> •B[a]P + B[c]C à 10 - 25 et 50 µM •B[a]P + B[g]C à 5 – 10 – 25 et 50 µM •B[a]P + B[b]C à 0,1 µM •B[a]P + DB[a,c]A à 1 – 5 – 10 – 25 et 50 µM

B[a]A : benzo[a]anthracène, B[a]P : benzo[a]pyrène, B[b]C : benzo[b]chrysène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[c]C : benzo[c]chrysène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[g]C : benzo[g]chrysène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, Chr : chrysène, CYP : cytochrome P450, DB[a,c]A : dibenzo[a,c]anthracène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène, DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène, Flua : fluoranthène, HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, I[1,2,3-cd]P : indénol[1,2,3-cd]pyrène, PM : particules fines <2,5 µm, Pyr : pyrène, Naph : naphthalène.

Tableau 15 : Effets sur l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme des HAP après une exposition *in vivo* à des mélanges binaires ou complexes de HAP

Etudes	Modèles cellulaire	Exposition	Résultats
Roos 2002	Rats SD	Sols contaminés contenant 60 à 4700 mg.kg ⁻¹ de HAP par voie orale	<ul style="list-style-type: none"> • Induction de l'activité et de l'expression du CYP 1A1 avec tous les mélanges au niveau du duodénum et avec les mélanges contenant 169 mg.kg⁻¹ de HAP et plus au niveau du foie • L'induction de l'activité et de l'expression du CYP 1A1 dans le duodénum, le foie et le rein dépend surtout de la concentration des HAP à 5 et 6 cycles aromatiques
Chahin 2013	Rats W	Phénanthrène + Pyr + B[a]P chacun à 6 et 600 µg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ pendant 28 jours par gavage	<ul style="list-style-type: none"> • L'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 est augmentée de respectivement de 91, 152 et 94 fois dans les microsomes des lymphocytes, du foie et du cerveau après exposition à 6 µg.kg⁻¹.J⁻¹ • L'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1B1 est augmentée de respectivement de 205, 333 et 194 fois dans les microsomes des lymphocytes, du foie et du cerveau après exposition à 600 µg.kg⁻¹.J⁻¹
Bentsen-Farmen 1999	Rats W	100 mg. kg ⁻¹ .J ⁻¹ de 3-MC pendant 4 jours suivi de 10 mg.kg ⁻¹ B[a]P par voie IP	Augmentation de l'induction de l'activité enzymatique du CYP 1A1 de 2,4 fois après un pré-traitement au 3-MC par rapport au B[a]P seul
Gate 2006	Rats Fisher 344	6 heures.J ⁻¹ de fumée de bitumes pendant 5 jours par voie respiratoire	Augmentation de 23, 22 et 5 fois de l'expression des CYP 1A1, 1B1 et du NQO1 au niveau pulmonaire
Marston 2001	Souris Sencar	Application cutanée de : <ul style="list-style-type: none"> • 50,4 µg B[a]P • 50,4 µg B[a]P + 1 mg de MS de 10 HAP • 0,6 µg DB[a,l]P • 0,6 µg DB[a,l]P + 1 mg de MS de 10 HAP 	Augmentation de l'expression des CYP 1A1 et 1B1 avec l'addition du MS par rapport B[a]P seul ou au DB[a,l]P seul
Courter 2007a	Souris Sencar	Application cutanée de : <ul style="list-style-type: none"> • 50,4 µg B[a]P • 50,4 µg B[a]P + 1 mg particule • 0,6 µg DB[a,l]P • 0,6 µg DB[a,l]P + 1 mg particule 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression du CYP 1A1 avec l'addition des particules par rapport au B[a]P seul ou au DB[a,l]P seul au niveau des microsomes de la peau • Augmentation de l'expression du CYP 1B1 avec l'addition des particules par rapport au DB[a,l]P seul mais diminution de l'expression du CYP 1B1 avec l'addition des particules par rapport au B[a]P seul

La présentation des études est faite pour chaque souche de rats par ordre chronologique puis pour toutes les souches de souris par ordre chronologique.

B[a]P : benzo[a]pyrène, CYP : cytochrome P450, DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène, HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, IP : intra-péritonéale, Pyr : pyrène, MS : mélange synthétique NQO1 : NADPH quinone oxidoreductase 1, SD : Sprague Dawley, W : wistar, 3-MC : 3-méthylcholanthréne.

Avec tous les mélanges utilisés (Tableaux 14 et 15), une induction de l'expression des CYP (1A1 et 1B1) et du NQO1 est observée.

Cependant, l'induction induite par le mélange par comparaison à un HAP administré seul est très variable. Parfois, la présence d'autres HAP peut avoir un effet synergique sur l'induction de l'expression et de l'activité des CYP [Bentsen-Farmen 1999, Cherng 2001, Courter 2007a, Libalova 2014, Marston 2001, Pushparajah 2018, Staal 2007a, 2007b, von Koschimbahr 2021] et parfois elle peut avoir un effet antagoniste [Courter 2007b, Genies 2016, Pushparajah 2018].

De plus, la présence d'autres types de polluants a un effet sur l'induction de l'activité enzymatique induit par le B[a]P. Par exemple, le cadmium et le cuivre inhibe l'induction enzymatique induite par le B[a]P alors que le mercure augmente l'induction observée avec le B[a]P dans des modèles *in vitro* et *in vivo* [Benedetti 2007, Vakharia 2001].

1.4 Élimination des HAP en mélanges chez le rongeur

L'élimination fécale de certains HAP est augmentée lorsqu'ils sont en mélange. L'élimination du B[a]A, Chr ou triphénylène administrés seuls par gavage était respectivement 6, 25 et 3 %. Lorsque le B[a]A et le Chr étaient administrés ensemble, l'élimination du B[a]A augmentait à 13 % alors que celle du Chr restait à 25 %. De plus, lorsque le B[a]A et le triphénylène étaient administrés ensemble, l'élimination fécale du triphénylène augmentait à 6 % et celle du B[a]A de 16 % [Bartosek 1984].

Comme pour les HAP administrés seuls, l'élimination fécale des HAP en mélange varie selon la matrice dans laquelle sont présents les HAP. L'élimination fécale du Pyr (0,5 %), de l'anthracène (0,5 %) et du B[a]P (1 %) adsorbés sur un sol était 2 à 3 fois supérieurs à celle des HAP dissous dans l'huile (0,2; 0,4 et 0,3 % respectivement) [van Schooten 1997].

D'après les quelques études faites chez le rat, il semble que **l'élimination urinaire** du 1-OHP ne soit pas modifiée lorsqu'il est administré en mélanges à faibles doses [Bouchard 1998a, 2002]. Les quantités de métabolites monohydroxylés des HAP éliminées dans l'urine après administration par gavage de mélanges synthétiques chez le rat présentaient une corrélation forte avec la dose administrée des HAP parents ce qui confirme leur importance pour l'évaluation de l'exposition à leur composé parent [Grova 2017].

En conclusion, alors que de très nombreuses études tant cellulaires qu'animales ont été conduites avec des HAP seuls, il manque des données quant à l'effet des mélanges sur leur toxicocinétique.

2 Effets toxiques des HAP en mélanges

2.1 Effets génotoxiques des HAP en mélanges au niveau cellulaire et chez le rongeur

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* se sont intéressées à l'étude de l'apparition des adduits à l'ADN suite à l'exposition aux mélanges de HAP (Tableaux 16 et 17).

Tableau 16: Formation d'adduits à l'ADN après une exposition *in vitro* et *ex vivo* à des mélanges binaires ou complexes de HAP par rapport aux HAP individuels

Etudes <i>in vitro</i>			
Référence	Modèle utilisé	Mélange utilisé	Formation des adduits par comparaison au HAP seul
Libalova 2014	Cellules A549	B[a]P / PA	Diminuée de 50 à 88 %
Tarantini 2011	Cellules HepG2	B[a]P/ B[a]P + B[b]F	Augmentée de 40 %
		B[a]P / B[a]P + DB[a,h]A	Augmentée de 30 %
		B[a]P /B[a]P + IP	Augmentée de 50 %
		B[a]P / B[a]P + B[k]F	Diminuée de 66 %
Binkova 2007	ADN de thymus de veau + Fraction microsomiale de foie de rat	B[a]P / mélange synthétique de 8 HAP	Diminuée de 23 à 78 %
Courter 2007b	Cellules épithéliales MCF-10A	B[a]P /PD	Augmentée de 75 %
		DB[a,l]P / PD	Augmentée de 50 %
Mahadevan 2007	Cellules V79	B[a]P / BH	Diminuée de 85 %
		DB[a,l]P /BH	Diminuée de 66 %
Staal 2007a	Cellules HepG2	B[a]P / B[a]P + DB[a,l]P	Augmentée de 100 %
		B[a]P / B[a]P + DB[a,h]A	Augmentée de 150 %
		B[a]P / B[a]P + B[b]F	Augmentée de 300 %
		B[a]P / B[a]P + Flua	Augmentée de 400 %
Cherng 2006	Cellules HepG2	B[a]P / B[a]P + 1-nitropyrene	Diminuée de 50 %

Binkova 2004	Fibroblastes pulmonaires diploïdes humains	•B[a]P / B[a]P + B[b]F	Diminuée de 49 %
		•B[a]P / B[a]P + Chr	Diminuée de 73,5 %
		•B[a]P / B[a]P + B[k]F	Diminuée de 96,9 %
		•B[a]P / B[a]P + B[a]A	Diminuée de 34,8 %
		•B[a]P / B[a]P + DB[a,h]A	Diminuée de 99,2 %
		•B[a]P / B[a]P + IP	Diminuée de 75,8 %
		•B[a]P / B[a]P + B[g,h,i]P	Diminuée de 27,9 %
		•DB[a,l]P / DB[a,l]P + B[b]F	Diminuée de 51 %
		•DB[a,l]P / DB[a,l]P + Chr	Diminuée de 16,6 %
		•DB[a,l]P / DB[a,l]P + B[k]F	Diminuée de 70,7 %
		•DB[a,l]P / DB[a,l]P + B[a]A	Diminuée de 45,8 %
		•DB[a,l]P / DB[a,l]P + DB[a,h]A	Diminuée de 99,4 %
		•DB[a,l]P / DB[a,l]P + IP	Diminuée de 43,5 %
		•DB[a,l]P / DB[a,l]P + B[g,h,i]P	Diminuée de 62,4 %
B[a]P / B[a]P + PA	Diminuée de 78 – 90 %		
Cherng 2001	Cellules HepG2	B[a]P / B[a]P + B[g,h,i]P	Augmentée de 200 %

Études *ex vivo*

Étude	Modèle utilisé	Mélange utilisé	Formation des adduits en comparaison au HAP seul
Staal 2008	Coupes de foie de rat W	•B[a]P / B[a]P + DB[a,h]A	Diminuée de 10 %
		•B[a]P / B[a]P + DB[a,l]P	Augmentée de 60 %
		•B[a]P / B[a]P + B[b]F	Diminuée de 10 %
		•B[a]P / B[a]P + Flua	Diminuée de 50 %
		•DB[a,h]A / DB[a,h]A + DB[a,l]P	Diminuée de 66 %
		•DB[a,h]A / DB[a,h]A + Flua	Diminuée de 66 %

ADN : acide désoxyribonucléique, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[a]P : benzo[a]pyrène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, BH : extrait organique de brai de houille, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, Chr : chrysène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène, DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène, Flu : fluoranthène, HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, PA : extrait organique des particules aériennes de différents sites pollués, PD : extrait organique des particules de diesel, W : wistar.

Tableau 17: Formation d'adduits à l'ADN après une exposition *in vivo* à des mélanges binaires ou complexes de HAP par rapport aux HAP individuels

Etude	Espèce animale	Exposition	Formation des adduits en comparaison au HAP seul
Bentsen-Farmen 1999	Rats W	B[a]P / 3-MC + B[a]P	Augmentée de 50 %
Courter 2008	Souris Sencar	B[a]P / PD	Augmentée de 70 %
Courter 2007a	Souris Sencar	B[a]P / PD	Augmentée de 30 %
		DB[a,l]P / PD	Non modifiée
Marston 2001	Souris Sencar	B[a]P / BH	Diminuée de 50 %
		DB[a,l]P / BH	Diminuée de 60 %
Rice 1988	Souris CD-1	B[a]P / B[a]P + Flua	Augmentée de 76 %

La présentation des études est faite pour le rat en premier puis pour toutes les souches de souris par ordre chronologique.

B[a]P : benzo[a]pyrène, BH : extrait organique de brai de houille, DB[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène, Flu : fluoranthène, PA : extrait organique des particules aériennes de différents sites pollués, PD : extrait organique des particules de diesel, W : wistar, 3-MC : 3-méthylcholanthrène.

La présence des HAP en mélanges synthétiques peut avoir un effet synergique ou antagoniste sur la formation des adduits selon le type de la cellule et la composition du mélange. Par exemple, dans les cellules d'hépatocarcinome humain HepG2, l'addition du B[b]F, DB[a,h]A, IP générerait une augmentation de la formation des adduits à l'ADN par rapport au B[a]P seul alors que l'addition du B[k]F générerait une diminution de la formation des adduits à l'ADN par rapport au B[a]P seul [Cherng 2006, Staal 2007, Tarantini 2001]. Dans les fibroblastes pulmonaires diploïdes humains, l'addition du B[b]F, DB[a,h]A, IP entraînait une diminution de la formation des adduits à l'ADN par rapport au B[a]P seul [Binkova 2004]. L'effet de l'exposition à ces mélanges synthétiques sur l'apparition des adduits pourrait être liée à l'effet du mélange sur l'induction des enzymes de métabolisme. Au niveau des cellules d'hépatocarcinome humain HepG2, l'induction du CYP 1A1 (connu dans la voie de détoxification du B[a]P) est augmentée avec les mélanges en comparaison au B[a]P seul et il existe une diminution de la formation des adduits à l'ADN avec le mélange [Staal 2007a].

Pour les mélanges réels de HAP, l'apparition des adduits à l'ADN avec les mélanges est souvent diminuée. Dans les études *in vitro* et *in vivo*, les mélanges extraits des particules fines atmosphériques ou les mélanges extraits de brai de houille génèrent une diminution de la formation des adduits à l'ADN en comparaison au B[a]P ou au DB[a,l]P seul [Binkova 2004, Libalova 2014, Mahadevan 2007, Marston 2001]. Toutefois, le mélange extrait de particules de diesel induisait une augmentation de la formation des adduits à l'ADN en comparaison au DB[a,l]P seul [Courter 2007a, 2007b, 2008]. Ces variations dans la formation des adduits à l'ADN ne sont pas liées à l'effet du mélange sur l'induction des CYP car avec tous ces mélanges, l'induction enzymatique des CYP (1A1 et 1B1) étaient augmentée avec le mélange en comparaison au B[a]P ou au DB[a,l]P seul (Tableaux 16 et 17).

Ceci confirme la composition des mélanges des HAP qui est très variable selon la source d'émission joue un rôle majeur dans la cancérogénicité du mélange.

2.2 Effet immunotoxique des HAP en mélanges chez le rongeur

Les mélanges des HAP peuvent avoir des effets immunotoxiques. L'exposition de souris à des rejets d'échappement de diesel pendant 6 mois entraînait une diminution de la prolifération des cellules T immunitaires par rapport aux souris témoins [Burchiel 2004]. Une autre étude chez les souris a montré que l'effet immunotoxique des HAP en mélange était surtout dû aux HAP avec au moins 4 cycles aromatiques [Harper 1996].

Conclusion du chapitre

La revue bibliographique des expositions aux HAP en mélanges est très limitée par rapport aux études avec une monoexposition aux HAP. De plus, la plupart des études de toxicocinétique des HAP en mélange est faite avec des mélanges synthétiques.

L'exposition aux HAP en mélanges entraîne une diminution de l'absorption des différents HAP, et une augmentation de leur élimination fécale quand ils sont administrés par voie orale.

Le métabolisme du B[a]P diminue avec l'augmentation de la complexité du mélange.

Toutefois, la présence d'autres HAP peut avoir un effet tant synergique qu'antagoniste par rapport à un HAP de référence comme le B[a]P ou le DB[a,l]P sur l'induction de l'expression et de l'activité des CYP. En ce qui concerne l'effet du mélange sur **l'élimination urinaire** des métabolites, très peu d'études se sont intéressées à l'élimination urinaire du 1-OHP mais il semblerait qu'elle ne soit pas modifiée chez le rat. Aucune étude *in vivo* n'a étudié l'effet mélange sur les métabolites du B[a]P.

De plus, **les effets sanitaires** après exposition aux mélanges de HAP sont très variables selon la composition du mélange. Ainsi, la formation des adduits à l'ADN peut être augmentée ou diminuée selon le mélange utilisé (études *in vitro* et *in vivo*) et les effets immunotoxiques seraient plus en relation avec les HAP de HPM.

Ceci reflète la **complexité dans la compréhension et l'évaluation de l'effet des mélanges lors d'exposition environnementale ou professionnelle des populations**, d'autant que la composition des mélanges varie considérablement selon la source d'émission.

Chapitre IV : Surveillance des expositions et évaluation du risque sanitaire

Ce chapitre est consacré aux études épidémiologiques faites chez l'homme pour l'étude des effets sanitaires des HAP ainsi qu'à la surveillance biologique d'exposition (SBE) des populations et aux valeurs toxicologiques de référence (VTR) définies pour les HAP.

1 La surveillance biologique d'exposition aux HAP

Du fait du potentiel toxique et notamment cancérigène des HAP, la surveillance de l'exposition humaine est une préoccupation majeure en santé publique. La SBE aux HAP est préférée à d'autres types de mesures, notamment à la métrologie atmosphérique, car elle présente l'avantage de prendre en compte toutes les voies d'absorption, les moyens de protection individuelle et les facteurs individuels. Cette SBE consiste à mesurer, dans les matrices biologiques (tissus, excréments, sécrétions ou air expiré) de personnes exposées des indicateurs appelés biomarqueurs. La difficulté réside dans le choix du ou des bon(s) biomarqueur(s) qui soit représentatif de l'exposition aux molécules cancérigènes car la composition des mélanges varie selon la source d'émission [Gendre 2002, Lafontaine 2004]. Différentes considérations doivent être prises en compte lors du choix du biomarqueur telles que :

- La pertinence de l'étude utilisée (modèle animal choisi, doses de HAP, mode d'exposition, voie d'administration, ...)
- Les caractéristiques du biomarqueur choisi (cinétique d'élimination, forme conjuguée ou libre, stabilité du biomarqueur dans la matrice utilisée, sensibilité et spécificité du biomarqueur, méthodes analytiques validées, absence de modification de l'élimination du biomarqueur en cas de présence d'autres xénobiotiques, importance de l'HAP parent de point de vue sanitaire, ...).

Il existe 3 types de biomarqueurs selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (Figure 11):

- **Biomarqueurs d'exposition** : substance exogène, métabolite primaire ou réponse à une interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou cellule-cible, mesurée dans un compartiment de l'organisme

- **Biomarqueur d'effet** : altération biochimique, physiologique, comportementale ou autre, mesurable dans un organisme, qui, selon son ampleur, peut être reconnue comme étant associée à une atteinte confirmée ou possible de l'état de santé ou à une maladie
- **Biomarqueur de susceptibilité** : indicateur de la capacité innée ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à une substance xénobiotique spécifique.

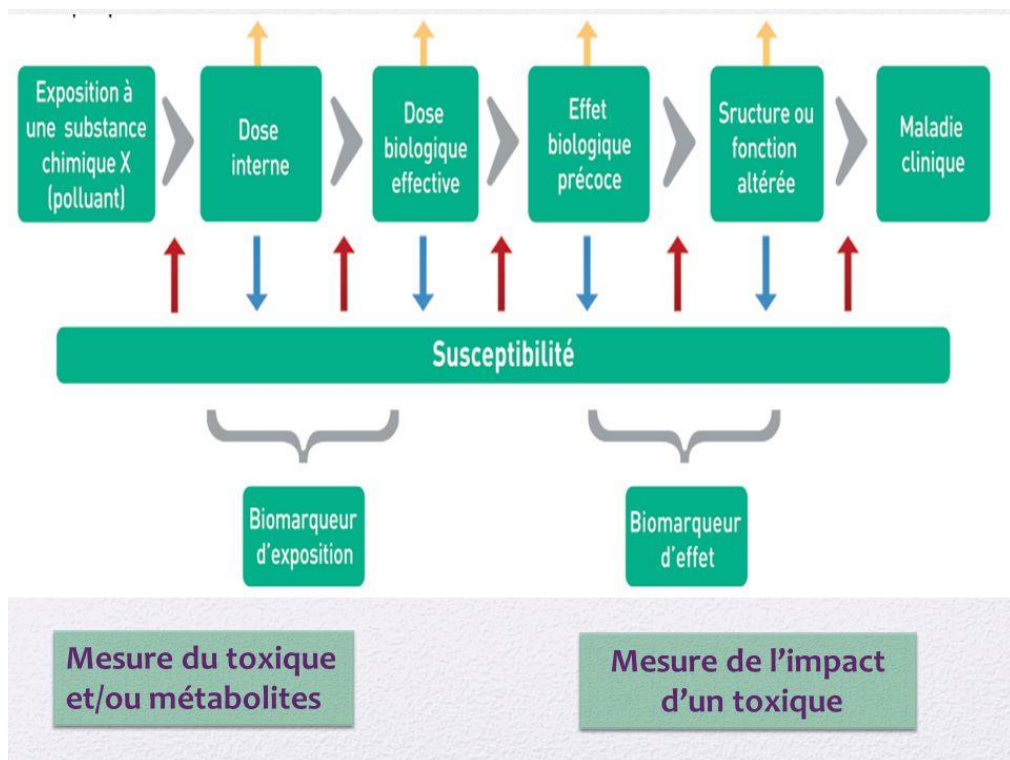


Figure 11: Biosurveillance de l'exposition à la maladie clinique avec les 3 types de biomarqueurs

1.1 Biomarqueurs d'exposition chez l'homme

Il est nécessaire de bien choisir le ou les biomarqueurs à doser en fonction de la matrice utilisée afin d'éliminer tout risque de contamination. Par exemple, le dosage des HAP parents au niveau urinaire est possible mais il présente l'inconvénient de la contamination potentielle des échantillons suite à la pollution environnementale du milieu du prélèvement [Campo 2011]. Même si l'élimination des HAP et de leurs métabolites se fait majoritairement par voie biliaire, différents biomarqueurs d'exposition dans les urines sont proposés car la collecte et l'analyse des fèces n'est pas facile à mettre en œuvre en routine chez l'humain.

En plus du choix d'un biomarqueur pertinent, il faut définir les moments de prélèvements optimaux en fonction de la cinétique d'élimination des biomarqueurs. Lors des campagnes de SBE, la stratégie la plus adaptée au milieu industriel, consiste à prélever les mictions de début

de semaine début de poste (DSDP) pour évaluer l'imprégnation environnementale du salarié, et de fin de semaine fin de poste (FSFP) en cas d'exposition essentiellement respiratoire, ou de fin de semaine début de poste (FSDP) (soit 16 heures après la fin de poste de la veille) en cas d'exposition majoritairement cutanée car l'exposition cutanée ralentit la pénétration des HAP et l'élimination de leurs métabolites par rapport à l'exposition respiratoire [Hopf 2010, Moreau 2015b, Viau 1999]. Ce schéma de prélèvements présente l'intérêt de prendre en compte les expositions répétées tout au long de la semaine de travail mais peut varier en fonction des métabolites sélectionnés.

Parmi les biomarqueurs urinaires d'exposition, le 1-OHP (métabolite monohydroxylé du Pyr) est utilisé comme marqueur de l'exposition aux HAP depuis une trentaine d'années du fait de la facilité de sa technique de dosage et de la grande sensibilité de ce biomarqueur [Jongeneelen 1985]. Il n'existe pas de valeur limite biologique mais une valeur sans effet biologique de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine a été proposée pour le 1-OHP urinaire mesuré en FSFP. Elle correspond à un niveau d'exposition sans effet cytogénétique retrouvé en cokerie où le ratio pyrène/B[a]P est de 2,5 [Buchet 1995, Jongeneelen 2014]. Du fait du caractère non cancérigène du Pyr, certains auteurs proposent de pondérer la concentration de 1-OHP urinaire par le ratio des concentrations atmosphériques B[a]P/Pyr afin de tenir compte de la variation de la composition des mélanges des HAP entre les différentes situations professionnelles [Viau 1999]. Mais cette approche nécessite le dosage des HAP atmosphériques en plus de celui du 1-OHP et admet que les facteurs individuels influencent de la même façon le métabolisme de ces deux HAP. En population générale, les valeurs biologiques de référence (VBR) sont de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ chez les non-fumeurs et de $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ chez les fumeurs pour le 1-OHP. Ces valeurs correspondent au 90^{ème} percentile de la distribution des niveaux mesurés dans les études réalisées en Europe [Bartolomé 2015].

Plus récemment, l'analyse de biomarqueurs spécifiques de l'exposition au B[a]P a été développée : celle du 3-OHB[a]P, métabolite monohydroxylé du B[a]P qui reflète la voie de détoxification [Barbeau 2014, Marie 2010], et celle du tétraol-B[a]P qui reflète la voie de bio-activation du B[a]P [Barbeau 2018]. La valeur limite biologique proposée par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) est de $0,95 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ créatinine ou $0,4 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine pour le 3-OHB[a]P mesuré en FSDP, et correspond à l'exposition à une concentration atmosphérique de B[a]P de $150 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ (valeur limite recommandée en France) [Lafontaine 2004]. En population générale, les VBR du 3-OHB[a]P sont de $0,02 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ créatinine chez

les non-fumeurs et de 0,06 nmol.mol⁻¹ créatinine chez les fumeurs. Pour le tétraol-B[a]P, le dosage dans les urines se fait en FSFP. Il n'existe pas de VLB et les VBR sont de 0,007 nmol.mol⁻¹ créatinine chez les non-fumeurs et de 0.032 nmol.mol⁻¹ créatinine chez les fumeurs [Barbeau 2018].

Ces 2 derniers biomarqueurs (3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P) dérivent uniquement du B[a]P ce qui peut poser un problème de représentativité dans l'analyse du risque cancérigène des mélanges complexes de HAP dont leur composition varie considérablement.

En environnement général, de nombreuses équipes ont développé l'analyse des métabolites des HAP de FPM car ces composés sont majoritaires par rapport aux HAP de HPM dans les mélanges et sont donc plus facilement détectables.

Certaines études ont étudié les métabolites du naphthalène qui est l'HAP le plus abondant au sein des mélanges [Ding 2005, Unwin 2006]. Le 1-hydroxynaphthalène a été analysé mais l'interprétation des niveaux de ce métabolite est difficile car il provient aussi du métabolisme du carbaryl [Meeker 2007]. Le 2-hydroxynaphthalène a aussi été proposé car il présentait les plus hautes corrélations avec les HAP totaux [Yamano 2014]. Un autre biomarqueur du naphthalène est le naphthalène-1,2-diol qui est le précurseur du 1,2-naphtoquinone connu dans l'induction des dommages à l'ADN [Kapuci 2014, Klotz 2011].

D'autres études ont analysé deux dihydrodiols du phénanthrène (phénanthrène-1,2-diol et phénanthrène-3,4-diol) dans les urines de fumeurs et de non-fumeurs. Dans les urines collectées pendant 6 heures, les quantités de phénanthrène-1,2-diol étaient respectivement de 2 et 1,35 nmol.6H⁻¹, et celles du phénanthrène-3,4-diol de 0,51 et 0,27 nmol.6H⁻¹. De plus, le rapport phénanthrène-3,4-diol/phénanthrène-1,2-diol augmentait de 0,2 chez les non-fumeurs à 0,28 chez les fumeurs, ce qui montrait que les voies de métabolisme étaient influencées par la fumée de cigarettes [Luo 2020].

Enfin, l'analyse urinaire des métabolites des HAP cancérigènes (essentiellement les HAP de HPM) a été proposée pour la SBE en milieu professionnel mais les niveaux des métabolites monohydroxylés sont très faibles et souvent inférieurs aux seuils de quantification analytique. Pour le B[a]A, les 1-hydroxybenzo[a]anthracène (1-OHB[a]A), 3-hydroxybenzo[a]anthracène (3-OHB[a]A) étaient inférieurs aux seuils de quantification [Bouchard 2009, Li 2008, Xu 2004]. Les mêmes problèmes ont été observés pour le 3-OHChr et le 6-hydroxychrysène (6-OHChr) [Bouchard 2009, Campo 2010, Li 2008, Smith 2002] mais aussi le 10-hydroxybenzo[b]fluoranthène (10-OHB[b]F), 8-hydroxybenzo[b]fluoranthène (8-OHB[b]F),

et 9 hydroxybenzo[k]fluoranthène (9-OHB[k]F) [Marques 2021]. Toutefois dans cette dernière étude conduite chez des travailleurs d'une entreprise de production d'aluminium, les concentrations des dihydrodiols des HAP (provenant essentiellement de la voie de bio-activation des HAP) avaient des niveaux plus élevés que celles des monohydroxy-HAP. Les valeurs moyennes des dihydrodiols (B[a]A-8,9-diol, Chr-1,2-diol, B[e]P-4,5-diol) variaient entre 0,86 et 2,34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ alors que les concentrations des métabolites monohydroxylés des HAP (3-hydroxybenzo[a]anthracène (3-OHB[a]A), 3-hydroxybenzo[e]pyrène (3-OHB[e]P), 3-OHChr, 6-OHChr) variaient entre 0,03 et 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Ces dosages ne sont pas encore utilisés en routine car ils nécessitent plusieurs étapes de préparation des échantillons ainsi qu'une technique d'analyse complexe en chromatographie gazeuse munie d'une double détection de masse [Grimmer 1997, Marques 2021].

1.2 Biomarqueurs d'effet chez l'homme

Plusieurs **biomarqueurs d'effet génotoxique** en lien avec l'exposition aux HAP sont décrits dans la littérature. Parmi ces biomarqueurs, **les adduits à l'ADN** sont les plus étudiés.

Un adduit à l'ADN est le résultat de la fixation d'une molécule à un site nucléophile de l'ADN par liaison covalente. Ces adduits peuvent modifier la réplication et la transcription des gènes et participer à la carcinogénèse.

Un adduit aux protéines est le résultat de la fixation d'une molécule sur une protéine. Ces adduits peuvent entraîner des changements de la conformation spatiale de la protéine, affecter son activité enzymatique ou sa capacité à interagir avec autre protéines, former des agrégats toxiques pour la cellule.

Ces adduits peuvent être considérés à l'intersection entre les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet car ils proviennent des métabolites actifs des HAP absorbés. De plus, ils présentent l'avantage d'être liés aux effets cancérigènes. Cependant, l'analyse de ces adduits présentent différents inconvénients :

- Les méthodes d'analyse des adduits par des méthodes enzymatiques ou par marquage au phosphore 32 sont sensibles mais présentent une grande variabilité inter-laboratoires et manquent surtout de spécificité [Ewa 2017, Hu 2008, Taioli 2007]. Pour être plus spécifique, on peut quantifier les adduits au BPDE par GC-MSMS ce qui nécessite des

étapes supplémentaires comme l'hydrolyse acide des adduits pour libérer le tétraol-B[a]P. Cette méthode est spécifique mais malheureusement pas assez sensible au vu du nombre potentiel d'adduits au BPDE formés.

- Une des difficultés de ces analyses, c'est le caractère invasif du prélèvement. Ainsi, pour remédier à ce problème, les adduits ne sont pas étudiés dans les organes cibles mais dans des matrices plus faciles à prélever comme le sang, où ils sont analysés soit dans les **cellules mononucléées du sang**, soit **dans les protéines sanguines** (albumine et hémoglobine). Chez des salariés exposés aux HAP, le taux d'adduits à l'albumine augmente avec l'exposition. Toutefois il passait de 21,9 fmol.mg⁻¹ d'albumine après une faible exposition à 34,4 fmol.mg⁻¹ d'albumine après une forte exposition [Wang 2007a] et aucune différence n'a été trouvée entre les taux des fumeurs et des non-fumeurs [Ragin 2008].
- De plus, les taux des adduits ne sont pas toujours corrélés aux concentrations atmosphériques des HAP ou aux concentrations urinaires des biomarqueurs d'exposition [Brandt 2003]. Dans leur revue, Hopf et al. (2009) ont étudié la variation de l'élimination urinaire du 1-OHP dans le temps parallèlement aux taux d'adduits à l'ADN mesurés dans les cellules sanguines périphériques chez des travailleurs de l'industrie de l'aluminium et n'ont pas trouvé une corrélation entre les concentrations urinaires du 1-OHP et le taux d'adduits à l'ADN. Tuominen et al. (2002) n'ont pas trouvé de différence significative du taux des adduits totaux entre les travailleurs d'une fonderie d'aluminium exposés aux HAP et les travailleurs témoins (non exposés aux HAP) (6,7 adduits.10⁻⁸ nucléotides *versus* 8,10 adduits.10⁻⁸ nucléotides respectivement, $p = 0,19$) [Tuominen 2002]. Ceci peut être dû à de nombreux facteurs : polymorphisme des enzymes de métabolisme, dose interne, statut tabagique, temps de demi-vie des cellules sanguines, mécanismes de réparation des adduits, mesure des adduits totaux, Pour cela, d'autres études se sont intéressées au dosage des adduits à l'ADN dans les cellules provenant des organes cibles comme la vessie. Certaines ont trouvé une corrélation entre les niveaux de 1-OHP urinaire et le taux d'adduits à l'ADN présents dans les cellules urothéliales exfoliées dans l'urine [Peters 2008].

D'autres biomarqueurs génotoxiques sont également dosés tels que : les cassures de l'ADN mesurées par les tests des comètes, les micronoyaux, les aberrations chromosomiques, les lésions oxydatives, ... Mais les résultats disponibles concernant ces biomarqueurs sont limités et ne permettent pas de confirmer toujours une corrélation entre les taux mesurés de ces

biomarqueurs et les niveaux environnementaux d'HAP ou de métabolites urinaires [Marie 2009, Singh 2007]. De plus, il existe une importante variabilité inter-individuelle des résultats, et l'augmentation du taux de ces biomarqueurs n'est observée qu'avec de fortes expositions [Brandt 2003, Crebelli 2000].

Enfin, certains biomarqueurs d'effets sont à l'étude aujourd'hui comme **les microARN** et la modification dans l'expression des protéines (**la protéomique**).

Les microARN sont des petits ARN produits par la cellule qui ne sont pas traduits en protéine. Leur rôle est de réguler l'expression de gènes en bloquant la traduction de l'ARN messager de ces derniers en protéine.

La protéomique est la science qui étudie le protéome ou l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un tissu, d'un organe, d'un fluide biologique à un moment donné.

Mais les résultats disponibles concernant ces biomarqueurs sont limités et variables selon les études. Deng et al. (2014) ont trouvé une différence de l'expression des microARN entre les travailleurs exposés aux HAP et les personnes contrôles avec 3 microARN augmentés et 68 diminués. De plus, certains microARN (miR-27a-3p, miR-142-5p, miR-28-5p, miR-150-5p) étaient corrélés à certains métabolites urinaires d'HAP de FPM (4-hydroxyphénanthrène, 2-hydroxynaphtalène) [Deng 2014]. Certaines études ont analysé le protéome chez des travailleurs exposés aux HAP. Elles ont montré que les protéines les plus dérégulées étaient les protéines anti-oxydantes nécessaires pour la lutte contre le stress oxydant généré par les HAP, les protéines liées au cancer ou les protéines ayant un rôle dans les mouvements cellulaires, l'adhésion cellulaire et la migration cellulaire [Alhamdow 2019, Kap-Soon 2004, Kim 2004]. De plus, des corrélations positives ont été observées entre certaines protéines plasmatiques (Kallitréine 13) et le taux du 3-OHB[a]P urinaire des ramoneurs [Alhamdow 2019].

1.3 Biomarqueurs de susceptibilité

La susceptibilité génétique ou la prédisposition génétique d'un individu peut affecter cette prédisposition au cancer induit par les agents cancérigènes. La susceptibilité génétique résulte du polymorphisme génétique des enzymes de la phase I et la phase II (par exemple, les CYP, l'EH, les GST, les variations dans les gènes de réparation des adduits de l'ADN, ...).

Plusieurs études ont montré que les risques sanitaires liés aux HAP diffèrent selon le type de **l'allèle des gènes responsables du métabolisme des HAP.**

Chez des personnes d'origine caucasienne, japonaise ou hawaïenne, la présence d'au moins une copie de l'allèle Mspl du CYP1A1 était associée à une augmentation de 2,4 fois du risque de cancer épidermoïde des poumons lorsque ce gène était considéré seul et à une augmentation de 3,1 fois lorsqu'il était associé à une délétion de GSTM1 [Le Marchand 1998]. Cependant, une autre étude a montré que ni le polymorphisme de l'allèle Mspl du CYP1A1 ni de l'allèle Ile(462)Val du CYP1A1 n'étaient associés à un plus grand risque de cancer du poumon chez les caucasiens ou les afro-Américains [Wenzlaff 2005]. En revanche, chez les caucasiens, la modification du codon 432 du CYP1B1 Leu(432)Val était associé de manière significative à la prédisposition au cancer du poumon avec un odds ratio (OR) de 2,87 (avec un intervalle de confiance à 95 % (IC) de 1,63 – 5,07) . Les combinaisons de ce polymorphisme enzymatique de phase I et de certains polymorphismes enzymatiques de phase II (GSTM1 nul, GSTP1 Ile(105)Val et NQO1 C(609)T) ont été évaluées. La combinaison de CYP1B1 Leu(432)Val et de NQO1 C(609)T semblait être associée au risque le plus élevé de cancer du poumon (OR = 4,14 avec un IC de 1,6 – 10,74)[Wenzlaff 2005].

Dans une étude menée chez une population américaine-africaine, l'association entre le génotype nul de GSTM1 était plus élevée pour le carcinome épidermoïde (avec un OR de 2,98 et un IC de 1,09 – 8,19) que pour l'adénocarcinome (OR 1,95 avec un IC de 0,81 – 4,66). De plus, une association plus forte est observée entre le génotype nul de GSTM1 et le cancer du poumon chez les gros fumeurs avec un OR 4,35 avec un IC de 1,16 – 16,23. Cette association a également été constatée pour le carcinome épidermoïde (OR 6,26 avec un IC de 1,31 – 29,91). Ce qui montre, que le risque du cancer pulmonaire augmentait avec les paquets-années de cigarettes chez les sujets ayant un génotype nul pour la GSTM1 [Ford 2000].

De plus, le polymorphisme des gènes impliqués dans **la réparation d'ADN** augmente aussi le risque d'apparition des cancers.

Le polymorphisme 5'UTR-T/C du gène « X-Ray Repair Cross Complementing 1 » (XRCC1) qui est impliqué dans la réparation de l'excision des nucléotides induisait une augmentation de l'apparition des adduits à l'ADN dûs à l'exposition aux HAP au niveau des spermatozoïdes [Ji 2010].

Cependant d'autres polymorphismes peuvent avoir un effet protecteur contre l'apparition des cancers. Chez les Caucasiens, une association a été démontrée avec un risque de cancer du poumon diminué par un polymorphisme G → A dans le gène de la myéloperoxydase (MPO) avec un OR de 0,52 et un IC de 0,3 – 0,9 [Schabath 2000, Williams 2001].

2 Valeurs toxicologiques de référence et valeurs limites à ne pas dépasser

L'évaluation des risques sanitaires (ERS) vise à prévenir et à gérer, sur le long terme, le risque potentiel encouru par une population vivant à proximité d'une source de pollution. Elle consiste en une méthodologie formée de 4 étapes : identification et caractérisation des dangers, définition des relations dose-réponse et dose-effet, estimation des expositions et caractérisation des risques. Cette évaluation est nécessaire pour établir un plan de management et de la gestion du risque comme par exemple la sensibilisation des personnes aux dangers et aux risques, la détermination des personnes exposées aux dangers, la mise en place des mesures de prévention, de protection et de maîtrise du risque, les recommandations visant la diminution de l'intensité des expositions et par la suite la survenue des effets sanitaires, ...

L'objectif de la deuxième étape de l'ERS est d'estimer la relation entre la dose d'exposition et l'effet indésirable. Il existe 2 types d'effet : un effet à seuil ou effet déterministe et un effet sans seuil ou effet stochastique.

2.1 Effets toxiques à seuil

Effet toxique à seuil est un effet qui se déclenche à partir d'une dose d'une substance pour une durée d'exposition donnée. La gravité de l'effet est proportionnelle à la dose interne. En-dessous de la dose minimale, il est considéré que l'effet ne surviendra pas.

Pour les effets déterministes, des VTR sont établies par des agences ou des organismes spécifiques comme l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) en France ou l'US-EPA.

La VTR correspond à la quantité minimale pour que l'effet apparaisse. Cette VTR est nommée « minimum risk level » (MRL) pour les effets à seuil. Elle a la même unité que celle de l'exposition : mg.m^{-3} pour la voie respiratoire et $\text{mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour la voie orale. Elles sont

déterminées à partir d'études épidémiologiques chez l'homme quand celles-ci existent mais dérivent plus fréquemment d'études expérimentales chez l'animal avec extrapolation des doses : « no observed adverse effect level » NOAEL ou « lowest observed adverse effect level » LOAEL. Afin de tenir compte des incertitudes liées à la variabilité inter-espèces (animal – homme), la variabilité inter-individuelle, la voie d'exposition, et le faible nombre de données, des facteurs de sécurité sont appliqués [ANSES 2017].

L'ANSES en France et l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) en Europe n'ont pas encore proposé de VTR pour le B[a]P ou les HAP du fait du manque de données et de la complexité des mélanges auxquels les populations sont exposées.

L'US-EPA a proposé des MRL pour le B[a]P en population générale qui sont de 2 ng.m^{-3} pour l'inhalation chronique et $0.3 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour l'exposition orale chronique. Ces valeurs ont été calculées à partir de données animales et à partir du taux d'augmentation de la mortalité embryo-fœtale après exposition respiratoire de rats femelles Fischer F-344 à 25, 75 et $100 \text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$ de B[a]P 4 heures par jour pendant 10 jours [Archibong 2002], et à partir des altérations neuro-comportementales persistantes à l'âge adulte après exposition orale de rats SD âgés de 5 jours à 0,02; 0,2 et $2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P pendant 2 mois [Chen 2012, INERIS 2020].

Toutefois, il existe des niveaux de B[a]P et/ou d'HAP à ne pas dépasser dans les milieux auxquels sont exposés les populations :

Au niveau atmosphérique, la directive européenne 2004/107/EC a fixé en 2004 la valeur de 1 ng.m^{-3} pour le B[a]P comme niveau annuel moyen à ne pas dépasser et la valeur de 0.1 ng.m^{-3} comme valeur guide à atteindre. En France, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) a recommandé une concentration annuelle moyenne de 0.7 ng.m^{-3} de B[a]P à ne pas dépasser dans l'air et un objectif de qualité de 0.1 ng.m^{-3} [Airparif 2021].

Pour les aliments, l'ANSES propose de retenir une valeur de $5 \text{ ng TEQ.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour une exposition par voie orale à 11 HAP (B[a]A, B[a]P, B[b]F, Chr B[g,h,i]P, B[k]F, DB[a,h]A, IP, anthracène, B[j]F, Flua) [ANSES 2016].

La directive UE n° 2020/1255 de la commission du 7 septembre 2020 a fixé une valeur de $5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le B[a]P et $20 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les HAP4 dans les viandes fumées et les produits de pêche fumés.

Pour les eaux destinées à la consommation humaine, le décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001, a imposé une concentration inférieure à $0,1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ pour la somme des quatre composés suivants : B[b]F, B[k]F, B[g,h,i]P et IP, et une valeur limite de $0,01 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le B[a]P.

Au niveau professionnel, les VTR sont appelées valeurs limites d'exposition professionnelles (VLEP). Ces VLEP correspondent aux valeurs atmosphériques de certains polluants que peut respirer un travailleur durant un délai de temps déterminé sans avoir un risque sanitaire. Il existe 2 types de VLEP : la première pour 15 minutes d'exposition concernant les effets aigus (VLCT-15 min) et la deuxième pour 8 heures de travail pendant 40 ans concernant les effets chroniques (VLEP-8H).

En Europe et en France, il n'y a pas de valeur réglementaire. Il existe seulement en France une recommandation de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie qui incite à ne pas dépasser 150 ng.m⁻³ de B[a]P pendant 8 heures en milieu professionnel.

2.2 Effets toxiques sans seuil

Effet toxique sans seuil est un effet qui survient quelle que soit la dose reçue, même infime. La gravité de l'effet n'est pas proportionnelle à la dose. Cependant, la probabilité de survenue de l'effet augmente avec la dose et la durée d'exposition.

Pour les effets sans seuil, la VTR désigne la probabilité additionnelle de survenue de l'effet avec une exposition toute la vie à une unité de dose d'exposition. Cette VTR est nommée excès de risque unitaire (ERU) dont l'unité est l'inverse de celle de l'exposition. Comme les VTR, les ERU sont établis à partir d'études épidémiologiques et/ou expérimentales chez l'animal. Dans ce dernier cas, l'extrapolation est réalisée par des modèles mathématiques.

Seuls le B[a]P et le naphthalène possèdent des ERU basés sur des études expérimentales.

Selon l'OMS, l'**ERU du B[a]P** est de $8,7 \times 10^{-2} (\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3})^{-1}$ pour la voie respiratoire. Cette valeur a été établie à partir des données épidémiologiques chez des travailleurs d'une cokerie ce qui explique que cet ERU soit considéré comme indicateur représentatif d'un mélange de HAP.

Selon l'ANSES, l'**ERU du B[a]P** en population général est de $10^{-3} (\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3})^{-1}$ pour la voie respiratoire et l'**ERU des HAP11** de $0,02 (\text{mg TEQ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{J}^{-1})^{-1}$ pour la voie orale [ANSES 2023].

Selon l'ANSES, l'**ERU du naphthalène** est de $5,6 \times 10^{-6} (\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3})^{-1}$. Il a été déterminé à partir d'étude de cancérogenèse chez le rat et la souris [NTP 1992, 2000].

Différents organismes ont fixé des ERU pour le B[a]P par voie orale : ANSES, US-EPA, l'institut national néerlandais pour la santé publique et l'environnement (RIVM), l'Institut National de l'Environnement industriel et des RISques (INERIS), Santé Canada, l'«Office of Environmental Health Hazard Assessment » (OEHHA) (Tableau 18).

Tableau 18 : les valeurs des ERU du B[a]P par voie orale adoptée par différents organismes

Agence	ERU du B[a]P	Etude utilisée	Animal utilisé	Exposition orale du B[a]P	Effet critique
US-EPA	1 (mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹) ⁻¹	Kroese 1999	Rat W	0, 3, 10 et 30 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ 5 jours.semaine ⁻¹ pendant 2 ans	Tumeurs du système digestif (estomac, œsophage, langue, larynx)
RIVM	5 (mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹) ⁻¹	Kroese 1999	Rat W	0, 3, 10 et 30 mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹ 5 jours.semaine ⁻¹ pendant 2 ans	Tumeurs du système digestif
OEHHA	12 (mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹) ⁻¹	Neal 1967	Souris	50 à 250 mg B[a]P.kg ⁻¹ de nourriture durant 4 à 6 mois	Tumeurs gastriques, adénomes pulmonaires et leucémies
Santé Canada	2,3 (mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹) ⁻¹	Neal 1967	Souris	50 à 250 mg B[a]P.kg ⁻¹ de nourriture durant 4 à 6 mois	Tumeurs gastriques, adénomes pulmonaires et leucémies
INERIS	1 (mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹) ⁻¹	US-EPA			
ANSES	1 (mg.kg ⁻¹ .J ⁻¹) ⁻¹	US-EPA			

Le tableau 18 montre les différents organismes responsables de l'élaboration des VTR pour le B[a]P. Cependant, les valeurs fixées sont différentes entre elles, et cela dépend de l'étude utilisée pour fixer la VTR ou par la méthode d'extrapolation des résultats de l'animal à l'homme. Ainsi, certaines valeurs sont plus protectrices que d'autres. L'INERIS et l'ANSES ont adopté l'ERU fixé par l'US-EPA et qui est de 1(mg.kg⁻¹.J⁻¹)⁻¹ et qui correspond à un excès de risque de 10⁻⁵ avec une exposition à 0,01 µg.kg⁻¹.J⁻¹.

La détermination des ERU des autres HAP se fait par une méthode de calcul sur la base d'une valeur de référence multipliée par le FET de chaque HAP.

Le principe du FET est fondé sur les hypothèses selon lesquelles l'organe cible et l'activité toxique sont identiques pour chaque molécule apparentée et qu'il n'y a pas d'interaction

toxicocinétique ni d'interaction toxicodynamique. Ceci autorise l'addition des risques cancérigènes liés à une co-exposition de plusieurs molécules et permet de quantifier le pouvoir cancérigène d'un mélange de substances en fonction du pouvoir cancérigène d'une substance dite de référence, appartenant à la même famille chimique. Dans le cas des HAP, la molécule référence est le B[a]P avec un FET de 1. Le FET de chaque HAP est ensuite évalué par rapport à la toxicité du B[a]P. Cette étape est basée sur l'hypothèse selon laquelle le FET entre deux HAP estimé chez l'animal est identique ou similaire chez l'homme. Les valeurs ainsi obtenues permettent de réaliser un classement des HAP en fonction de leur risque cancérigène : risque élevé avec un FET = 1, risque moyen avec un FET = 0,1 et risque faible avec un FET = 0,01. Une valeur de 0,001 a été attribuée aux HAP non cancérigènes (Tableau 19).

Tableau 19 : Facteur d'équivalence toxique (FET) des HAP adoptés par l'INERIS

	N°CAS	FET
Acénaphthylène	208-96-8	0.001
Acénaphthène	83-32-9	0.001
Fluorène	86-73-7	0.001
Phénanthrène	85-01-8	0.001
Anthracène	120-12-7	0.01
Fluoranthène*	206-44-0	0.001
Pyrène*	129-00-0	0.001
Benz[a]anthracène*	56-55-3	0.1
Chrysène*	218-01-9	0.01
Benzo[b]fluoranthène*	205-99-2	0.1
Benzo[k]fluoranthène*	207-08-9	0.1
Benzo[a]pyrène*	50-32-8	1
Benzo[g,h,i]pérylène*	191-24-2	0.01
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène*	193-39-5	0.1
Dibenzo[a,h]anthracène*	53-70-3	1

*Les HAP marqués par un * sont les HAP étudiés dans la thèse.*

Ainsi la détermination du potentiel toxique d'un mélange se fait selon le calcul du B[a]P_{eq} qui est calculé selon l'équation suivante :

$$B[a]P_{eq} = \sum_{i=1}^n C_i \times FE_i$$

Avec n étant le nombre total d'HAP et C_i correspondant à la concentration du i ème HAP et FET _{i} au FET du i ème HAP.

Le choix des HAP dépend du risque sanitaire étudié. Par exemple, pour le cancer du poumon, les FET des 6 HAP (B[a]P, DB[a,h]A, B[a]A, B[b]F, B[k]F et Chr) sont utilisés.

Cette approche prenant en compte l'effet mélange présente plusieurs limitations :

- La composition variable des mélanges de HAP : elle est en effet fonction des sources d'émission mais aussi du lieu échantillonné, de l'heure et de la saison de l'échantillonnage, ... Une option pour restreindre cette limitation a été suggérée, impliquant l'identification de profils de HAP typiques ou d'empreintes digitales corrélés aux différentes sources [Howsam 1998, Ravindra 2008].
- L'absence de mécanisme commun pour les HAP : des mécanismes hétérogènes sont susceptibles de se produire pour différents HAP [Jarvis 2014]. De plus, les effets additifs, synergiques ou antagonistes sur la bio-activation et la formation de dommages à l'ADN varient considérablement en fonction des différents mélanges étudiés, et également en fonction des différents systèmes d'essai utilisés [Jarvis 2014]. Bien qu'un certain nombre de HAP se lient au récepteur AhR, cet effet n'est pas le seul à déterminer le pouvoir cancérigène des HAP. La liaison à l'ADN et l'induction de mutations sont d'autres effets importants dans la cancérogénèse des HAP, et rien n'indique que différents HAP sont activés par la même voie métabolique, se lient à l'ADN dans les mêmes positions et induisent les mêmes types de mutations dans les mêmes organes ou tissus [Schneider 2002].
- La disparité des valeurs des FET : selon la référence utilisée, la valeur de FET pour chaque HAP peut varier ce qui entraîne une mauvaise estimation du risque lors du calcul du B[a]P_{eq}. Cela peut alors aboutir à une sous-estimation de risque où seulement certains HAP seraient pris en considération.

Finalement, l'application des FET pour la détermination des risques sanitaires des mélanges de HAP reste la méthode la plus appliquée malgré les inconvénients qu'elle présente, d'où l'importance des études épidémiologiques et expérimentales chez l'animal pour la fixation des VTR. Cependant, le choix de l'étude et l'extrapolation des résultats de l'animal à l'homme est très variable selon l'agence sanitaire.

Conclusion du chapitre

La SBE des populations aux HAP se fait surtout par l'analyse des biomarqueurs d'exposition dans les urines. Ces biomarqueurs sont constitués des métabolites des HAP, parmi lesquels, les plus analysés sont le 1-OHP (métabolite du Pyr), le 3-OHB[a]P pour les fortes expositions en environnement professionnel, et les métabolites monohydroxylés des HAP gazeux en environnement général. Notre équipe a récemment développé le dosage du tétraol-B[a]P, biomarqueur de la voie de bio-activation du B[a]P. Le problème de ces métabolites, c'est qu'ils ne sont pas représentatifs de tous les HAP particuliers et qu'il n'existe pas de valeurs limites réglementaires.

Différents biomarqueurs d'effets pour l'exposition aux HAP ont été proposés, comme les adduits à l'ADN, les adduits aux protéines, les lésions oxydatives, mais ils présentent plusieurs inconvénients : manque de spécificité et/ou sensibilité, difficulté de les analyser dans les organes cibles, manque de corrélation avec les biomarqueurs d'exposition, ... Ainsi, l'utilisation de ces biomarqueurs d'effet est surtout utilisée dans le domaine de la recherche.

Les VTR n'ont été établies que pour quelques HAP, principalement à partir de données provenant d'études expérimentales de monoexposition chez l'animal. Ainsi, pour l'estimation des risques sanitaires des mélanges de HAP, les FET sont utilisés. Cependant, l'application des FET dans l'estimation du risque sanitaire présentent plusieurs limites : composition variable des mélanges, absence de mécanisme commun d'action pour les HAP, disparité des valeurs des FET, ... Des études complémentaires sont nécessaires afin de définir des VTR pour les différents mélanges.

Chapitre V : Contexte du projet et objectifs

Les HAP constituent une famille de composés organiques. Les HAP peuvent avoir une origine naturelle mais aussi une origine anthropique impliquant des processus de combustion et de pyrolyse de la matière organique, mais aussi de distillation du charbon ou du pétrole. Du fait de cette répartition ubiquiste, les expositions humaines aux HAP sont non seulement d'origine professionnelle (cokeries, fonderies, production d'électrodes et de silicium et d'aluminium, raffinage du pétrole, pose d'enrobés et de bitumes), mais également d'origine domestique, *via* le tabagisme mais aussi l'alimentation qui représente près de 90% des expositions quotidiennes chez les sujets non-fumeurs [ANSES 2011, Polachova 2020].

L'exposition aux HAP se fait toujours sous forme de mélanges dont la composition varie selon la source d'émission. Ces mélanges sont formés de différents HAP à FPM qui sont les plus nombreux mais les moins toxiques et des HAP à HPM qui sont les plus toxiques pour l'homme. Parmi ces derniers, le B[a]P est le seul composé classé cancérigène certain pour l'homme par le CIRC [IARC 2010]. De plus d'autres HAP à HPM sont classés comme cancérigènes probables (DB[a,h]A) ou possibles (B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[j]F, Chr, IP) pour l'homme. Pour exercer leur effet cancérigène, les HAP doivent être métabolisés dans l'organisme.

La SBE aux HAP se fait actuellement par la mesure de biomarqueurs urinaires d'exposition qui sont des métabolites des HAP : le 1-OHP, le 3-OHB[a]P et les métabolites de certains HAP gazeux (naphtalène, phénanthrène). Récemment, notre équipe a mis au point l'analyse du tétraol-B[a]P qui représente la voie de bio-activation du B[a]P, et l'analyse des diols et des métabolites monohydroxylés d'autres HAP particuliers classés en 2B (B[a]A, B[b]F, B[k]F et Chr) [Barbeau 2018, Marques 2021]. Actuellement, et par manque de données, il n'existe pas de valeurs réglementaires pour ces biomarqueurs et la détermination des effets toxiques d'un mélange repose sur des effets additifs avec utilisation des FET au B[a]P. En effet, la plupart des études portant sur l'élimination urinaire de ces métabolites chez l'animal était faite avec une exposition au Pyr ou au B[a]P seul [Bouchard 1996, Grimmer 1988, Lipniak-Gawlik 1998, Marie 2010, Moreau 2015a, 2015b, Jongeneelen 1984, Ramesh 2001, Ruzgite 2006] alors que l'exposition de la population générale et des travailleurs aux HAP se fait toujours aux HAP sous forme de mélanges.

Ainsi, **l'objectif principal de mon travail de thèse a été d'étudier l' « effet cocktail » en lien avec l'exposition à des mélanges réels d'HAP sur la toxicocinétique du B[a]P mais également sur celle d'autres HAP (Flua, Pyr et HAP de HPM).**

Pour répondre à cet objectif, des rats ont été exposés par gavage pendant 10 semaines au B[a]P seul ou à un mélange de HAP prélevé sur site industriel. Le mélange a été extrait d'un produit industriel à base de brai de goudron de houille entrant dans la composition des électrodes de four consommées lors de la production de métaux. En plus d'être au plus près de la composition chimique d'un mélange d'HAP trouvé lors d'une exposition professionnelle, nous avons utilisé de très faibles doses ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P seul ou en mélange) afin d'être le plus représentatif de l'exposition humaine.

Dans un premier temps, nous avons étudié, après exposition de rats au B[a]P seul ou au mélange de HAP prélevé sur site industriel, *l'excrétion urinaire des métabolites* du B[a]P produits par la voie de détoxification (3-OHB[a]P) et par la voie de cancérogénicité (tétraol-B[a]P) ainsi que celle des métabolites des HAP particuliers présents dans le mélange. Cette partie a fait l'objet d'un premier article publié dans Archives of Toxicology.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité compléter cette approche par l'étude de *l'influence du mélange sur l'absorption et la distribution du B[a]P et des autres HAP*. Cette 2^{ème} partie du travail a nécessité la *mise au point préalable des méthodes d'analyse des HAP et de leurs métabolites dans le sang, les fèces et les organes* (foie et reins).

Enfin, la revue bibliographique réalisée dans la partie précédente a montré qu'une partie de la variabilité de la toxicocinétique des HAP (et plus spécifiquement du Pyr et du B[a]P) pouvait être expliquée par les protocoles d'exposition des animaux utilisés : espèce ou souche animale, dose administrée, voie d'exposition, l'apport alimentaire, ... Ainsi, **le 2^{ème} objectif de la thèse a été d'étudier l'effet des facteurs génétiques (variabilité inter-souches, variabilité inter-individuelle) et des facteurs environnementaux (le jeûne) sur la toxicocinétique des HAP en mélanges.** En effet, la connaissance et la compréhension de l'influence de ces facteurs est un élément essentiel pour choisir de la manière la plus éclairée possible les modalités expérimentales les plus pertinentes lors d'une étude de toxicologie.

Partie II : Etude de l'effet des facteurs environnementaux et génétiques sur la toxicocinétique des HAP en mélanges dans des modèles murins

Chapitre I : Etude de l'effet cocktail sur l'élimination urinaire des métabolites des HAP après exposition subchronique de rats à de faible dose de benzo[a]pyrène seul ou inclus dans un mélange industriel d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

1 Objectif

Les HAP constituent une famille complexe de nombreuses molécules présentes partout dans l'environnement sous forme de mélanges et dont la composition est très variable selon la source d'émission [IARC 2010].

Les HAP à HPM sont classés comme cancérigènes sûrs, probables ou possibles pour l'homme [IARC 201]. Ils nécessitent une activation métabolique pour exercer leurs effets cancérigènes. Le CYP 1B1 et, dans une moindre mesure, le CYP 1A1, sont responsables de l'activation de la plupart des HAP cancérigènes en intermédiaires époxydes, qui sont réarrangés spontanément pour former des phénols ou convertis par l'EH en diol-époxydes plus réactifs [Shimada 2003]. La plupart des études faites chez le rat portent sur l'étude du métabolisme du B[a]P lorsqu'il est administré seul ou dans des mélanges synthétiques ne comprenant que quelques HAP. Pourtant, la présence simultanée de plusieurs HAP et même potentiellement d'autres types de polluants en mélange complexe peut influencer toutes les étapes de la toxicocinétique des HAP et par voie de conséquence la toxicodynamie. L'étude de la toxicocinétique et plus particulièrement du métabolisme des HAP dans le cadre de ces mélanges complexes (effet cocktail) constitue actuellement un enjeu majeur en termes d'évaluation du risque sanitaire lié aux expositions aux HAP et même de façon plus large en lien avec les expositions à des mélanges complexes.

Le but de l'étude était d'étudier le métabolisme du B[a]P après exposition réaliste de rats à du B[a]P administré de façon répétée (impact de l'exposition chronique), seul ou inclus dans un mélange complexe (effet cocktail). L'originalité de ce protocole résidait dans le fait que ce mélange complexe était extrait d'un produit collecté directement sur site industriel. Ce produit, à base de brai de goudron de houille ou « coal tar pitch » (CTP), entrainé dans la composition des électrodes de four de métallurgie.

De plus, les doses utilisées (0,02 et 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹) ont été soigneusement choisies pour être assez élevées pour permettre la quantification des métabolites des HAP dans les urines de rats sur la base des données publiées par Grova et al. (2017) tout en étant représentatives de

l'exposition professionnelle aux HAP. En effet, après gavage de rats avec un mélange synthétique de HAP 3 jours par semaine pendant 90 jours, la plus faible dose à laquelle le 3-OHB[a]P urinaire avait pu être détecté par Grova et al. (2017) était de $0,08 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$. La quantité de 3-OHB[a]P excrétée sur 24 heures était égale à 10 ng, ce qui correspondait à une concentration urinaire de $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$. La limite de quantification (LQ) de la méthode analytique qui avait été développée dans notre laboratoire étant supérieure à ce niveau [Barbeau 2011], la dose la plus faible utilisée dans le présent travail a pu être diminuée à $0,02 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ pour correspondre à l'exposition professionnelle la plus élevée de la base de données Exporisq - HAP [Maitre 2018]. Cette dose d'exposition est bien inférieure à celles classiquement utilisées chez le rat dans la littérature, qui sont majoritairement comprises entre 0,3 et $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ [Bouchard 1995, Godschalk 2000, Jongeneelen 1984, 1985, Kang 2007, Marie 2010, Moreau 2015a, 2015b], pouvant même atteindre 100 mg.kg^{-1} [Ramesh 2001]. L'utilisation de doses dans la même gamme que celles de l'exposition humaine était importante dans le cadre de ce travail pour comprendre les différentes voies métaboliques des HAP dans des conditions d'expositions réalistes.

Nous avons dans un premier temps étudié l'excrétion urinaire des métabolites du B[a]P produits par la voie de détoxification (3-OHB[a]P) et par la voie de cancérogénicité (tétraol-B[a]P) (Partie I, Chapitre II, Paragraphes 1.3 et 1.4) ainsi que celle des métabolites monohydroxylés et des diols des HAP à HPM.

2 Article scientifique



Metabolism of benzo[a]pyrene after low-dose subchronic exposure to an industrial mixture of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in rats: a cocktail effect study

Maguy El Hajjar¹ · Anne Maître^{1,2} · Marie Marques^{1,2} · Renaud Persoons^{1,2} · Christine Demeilliers^{1,2}

Received: 23 June 2022 / Accepted: 9 January 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are interesting environmental pollutants for understanding cocktail effects. High-molecular-weight-PAHs (HMW-PAHs) are classified as probable or possible carcinogens; only benzo[a]pyrene (B[a]P) is a certain carcinogen in humans. Their toxicity depends on their metabolic activation. While 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHB[a]P) represents its detoxification pathway, trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (tetrol-B[a]P) represents the carcinogenicity pathway. The objective was to study the metabolism of B[a]P and HMW-PAHs during chronic low-dose exposure to B[a]P or a PAH mixture. Rats were exposed orally 5 times/week for 10 weeks to low-levels of B[a]P (0.02 and 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹) or to an industrial mixture extracted from coal tar pitch (CTP) adjusted to 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹ B[a]P. Urinary levels of monohydroxy-, diol-, and tetrol-PAH were measured during weeks 1 and 10 by HPLC-fluorescence and GC-MS/MS. After 1 week, the percentages of B[a]P eliminated as 3-OHB[a]P and tetrol-B[a]P were not different depending on the dose of B[a]P, whereas they were reduced by half in the CTP group. Repeated exposure led to an increase in the percentages of the 2 metabolites for the 0.02-B[a]P group. Moreover, the percentage of B[a]P eliminated as 3-OHB[a]P was equal in the 0.2-B[a]P and CTP groups, whereas it remained halved for tetrol-B[a]P in the CTP group. The percent elimination of HMW-PAH metabolites did not vary between weeks 1 and 10. Thus, dose, duration of exposure and chemical composition of the mixture have a major influence on PAH metabolism that goes beyond a simple additive effect. This work contributes to the reflection on determination of limit values and risk assessments in a context of poly-exposures.

Keywords Polycyclic aromatic hydrocarbons · Cocktail effect · B[a]P metabolism · Exposure biomarkers · Animal study

Introduction

The exposome concept refers to the set of all potential factors that can influence our health status and to which we are subjected from conception and throughout our lives. In addition to influences related to lifestyle and socioeconomic determinants, this concept emphasizes exposure to environmental pollutants and molecules produced within our body (i.e., those resulting from xenobiotic metabolism, which

may sometimes have a greater toxic potential than the initial molecule) (Miller and Jones 2014; Vineis et al. 2017; Wild 2012). Therefore, it is a major challenge to understand the production, potential interactions, and fate of metabolites produced in the body in response to exposure to environmental pollutants to develop relevant biomarkers of exposure and thus to assess the health impact of chronic exposure to a complex mixture of pollutants. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a good model for studying this issue, because they are a complex family of numerous molecules with different metabolic pathways and toxicity.

PAHs are a family of over 100 compounds made up of two or more fused aromatic rings that are produced by incomplete combustion of organic matter and coal or petroleum distillation. They are ubiquitous in our environment and can be found at very high levels in certain industrial sectors (e.g., metallurgy). PAHs are always emitted as complex mixtures whose composition varies greatly depending on the emission

✉ Christine Demeilliers
christine.demeilliers@univ-grenoble-alpes.fr

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC, 38000 Grenoble, France

sources (IARC 2010). Among these various congeners, only a few [high-molecular-weight (HMW) PAHs with more than four fused rings and including bay regions favoring the production of reactive metabolites] are classified as probable or possible carcinogens, and benzo[a]pyrene B[a]P is the only PAH to be classified as a certain carcinogen for humans (IARC 2010). However, PAHs require metabolic activation to exert their carcinogenic effects. Cytochrome P450 (CYP) 1A1 and, to a lesser extent, CYP1B1 are responsible for the activation of most carcinogenic PAHs to epoxide intermediates, which are spontaneously rearranged to form phenols and eliminated in urine or feces (detoxification pathway) or converted by epoxide hydrolase (EH) to more reactive diol-epoxides, which can lead to the formation of carcinogenic metabolites (carcinogenic pathway) (Supplementary figures, Fig. S1) (Shimada et al. 2003).

To assess health risk, urinary metabolites are used as biomarkers of human exposure. 1-Hydroxypyrene (1-OHP), which is the metabolite of pyrene (Pyr), has been widely used, especially since this metabolite is easy to quantify in urine (Leroy et al. 2010). However, this biomarker does not reflect carcinogenic PAH exposure, as Pyr itself is not carcinogenic, and the ratio of B[a]P/Pyr varies considerably (Gendre et al. 2002; Maitre et al. 2018). 3-Hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHB[a]P), which is the major urinary metabolite of B[a]P, has been previously proposed (Barbeau et al. 2014; Lafontaine et al. 2004), but this biomarker represents the detoxification pathway of B[a]P, and its relevance as a PAH exposure biomarker is currently being discussed (Valière et al. 2022). In contrast, B[a]P-7,8-dihydrodiol produced by EH can be oxidized by CYP1A and 1B1 to form B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), which is the ultimate carcinogenic metabolite of B[a]P responsible for DNA adduct formation (Hecht et al. 2010; Xue and Warshawsky 2005). The majority of this reactive metabolite is hydrolyzed, producing trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (tetrol-B[a]P), which seems to be the most relevant biomarker for assessing carcinogenic B[a]P exposure (Barbeau et al. 2018; Hilton et al. 2017; Zhong et al. 2011). Furthermore, human exposure is the result of not only B[a]P but also PAH mixtures of different compositions (Barbeau et al. 2015; Maitre et al. 2018). Since the bioactivation of various PAHs occurs through CYP1A1 and CYP1B1 (Shimada and Fujii-kuriyama 2004), a variety of interactions between the bioactivation pathways may take place (cocktail effect). This explains the significant importance of studying B[a]P metabolism, not only singularly but also when it is part of a complex realistic PAH mixture. To further characterize the patterns of metabolic pathways resulting from carcinogenic exposure to PAHs, urinary monohydroxylated metabolites (OH-PAHs), which are the most abundant metabolites of HMW-PAHs, have been recently analyzed (Grova et al. 2017; Woudneh et al. 2016), as well as dihydroxylated

metabolites (diol-PAHs), as they reflect the bioactivation HMW-PAH pathway inducing DNA adducts (Grimmer et al. 1997; Marques et al. 2021). Despite the importance of B[a]P and HMW-PAHs as carcinogenic compounds, to our knowledge, no animal study has compared the urinary excretion amounts of B[a]P metabolites when B[a]P is administered alone or in combination with other carcinogenic PAHs.

The objective of this work was therefore to study the impact of chronic exposure to a mixture of PAHs on the metabolism of B[a]P (cocktail effect) and, in particular, on the distribution between the OH-PAH metabolites of the detoxification pathway and those of the diol-PAH metabolites (or tetrol-B[a]P) reflecting the carcinogenicity pathway using a rat model exposed to a realistic mixture of PAHs.

The originality of this work was (1) to expose the animals for 10 weeks (chronic exposure) to a realistic mixture of PAHs extracted from industrial raw materials—coal tar pitch (CTP)—collected directly from metallurgical companies, (2) to use doses allowing us to obtain urinary levels equivalent to the levels measured in workers, and (3) to study the relevance of tetrol-B[a]P and diol-metabolites of HMW-PAHs as exposure biomarkers in the context of exposure to a complex mixture of carcinogenic PAHs.

Materials and methods

Preparation of the PAH mixture

The PAH mixture was extracted from an industrial raw material (CTP) and was adjusted to the required concentration of B[a]P in vegetable oil. The preparation of solutions was described elsewhere (Bourgart et al. 2019b), and the PAH profile extracted from the CTP is given in the supplementary data (Table S1). While Pyr accounted for 15.9%, HMW-PAHs were lower than 10%. At $1 \mu\text{mol.g}^{-1}$ B[a]P, the applied amounts of other PAHs were in the following descending order: Fluoranthene ($2.3 \mu\text{mol.g}^{-1}$) > Pyr ($1.7 \mu\text{mol.g}^{-1}$) > chrysene (Chr) ($1 \mu\text{mol.g}^{-1}$) > benzo[a]anthracene (B[a]A) ($0.9 \mu\text{mol.g}^{-1}$) = benzo[b]fluoranthene (B[b]F) ($0.9 \mu\text{mol.g}^{-1}$) > benzo[e]pyrene (B[e]P) ($0.7 \mu\text{mol.g}^{-1}$) > indeno[1,2,3-cd]pyrene (I[1,2,3-cd]P) ($0.6 \mu\text{mol.g}^{-1}$) > benzo[g,h,i]perylene (B[g,h,i]P) ($0.5 \mu\text{mol.g}^{-1}$) = benzo[k]fluoranthene (B[k]F) ($0.5 \mu\text{mol.g}^{-1}$) > benzo[j]fluoranthene (B[j]F) ($0.4 \mu\text{mol.g}^{-1}$).

Animal experimentation

Animal housing

The protocol was carried out in a “Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA)” UGA core facility (Grenoble, France), EU0197, Agreement C38-51610006, under

specific pathogen-free conditions, in a temperature-controlled environment with a 12-h light/dark cycle and ad libitum access to water and food (LASQC diet ROD-16R®, Grenobios, France).

Animal treatment

Six-week-old male Sprague–Dawley rats (Charles River, BP 0109, 69,592 L'Arbresle Cedex, France) with a body weight of 205–330 g were included in this study.

After 1 week of acclimation, the rats were randomly assigned to 4 groups of 7 rats. PAHs were administered by gastric intubation once daily for 5 consecutive days per week for 10 weeks. Two groups were exposed to B[a]P alone: the first group (0.02-B[a]P) at a dose of $0.02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($0.08 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and the second group (0.2-B[a]P) at a dose of $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($0.8 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). A third group (0.2-CTP) was exposed to the PAH mixture extracted from the CTP industrial product adjusted to $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ B[a]P. The last group (CG) was the control group, which received only vegetable oil ($4 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$).

The rats were weighed at the beginning of each week to adjust the amount of PAHs given to the animals. Food intake and water consumption were measured every week. The food and oil were tested to confirm that they were PAH-free down to a detection limit of $0.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of pellets and $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of fat (data not shown).

At the end of the experiment, the rats were euthanized by carbon dioxide inhalation. All organs were quickly harvested, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Urine sample collection and creatinine analysis

During the first and tenth weeks, the rats were individually housed in a metabolic cage for 72 h immediately after gavage. Urine was collected every 24 h, and creatinine was assayed.

Analysis of urinary PAH metabolites

1-OHP and 3-OHB[a]P analysis

Urinary 1-OHP and 3-OHB[a]P concentrations were determined as described by Jongeneelen et al. (1987) and Barbeau et al. (2011), respectively. After enzymatic hydrolysis, samples were analyzed using high-performance liquid chromatography equipped with a fluorescence detector (HPLC-Fluo). The laboratory met the German Society for

Occupational and Environmental Medicine external quality control system standards for 1-OHP. The limit of quantification (LQ) was $40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1-OHP and 3-OHB[a]P, respectively.

Tetrol-B[a]P analysis

Tetrol-B[a]P analysis was conducted as described previously (Barbeau et al. 2018). After enzymatic hydrolysis, purification concentration, and derivatization, analysis was performed using a gas chromatograph coupled with a triple quadrupole mass spectrometer operating with a negative chemical ionization source (GC–MSMS-NCI). The LQ of tetrol-B[a]P was $0.05 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

OH- and diol-metabolites of other HMW-PAHs' analysis

For HMW-PAHs, urinary OH metabolites (3-OHB[a]A, 6-OHChr, 3-OHChr, 8-OHB[k]F, 9-OHB[k]F, 10-OHB[b]F, 3-OHB[e]P) and diol-metabolites (B[a]A-8,9-diol, Chr-1,2-diol, B[k]F-8,9-diol, B[e]P-4,5-diol) were analyzed as previously described (Marques et al. 2021). After enzymatic hydrolysis, purification and concentration, followed by a two-stage derivatization, analysis was performed using GC–MS/MS operating in electron impact ionization. The LQ varied between $0.005 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (for 8-OHB[k]F) and $0.18 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (for B[e]P-4,5-diol and Chr-1,2-diol).

Calculation methods and statistical analysis

The percentages of PAHs recovered as OH-PAHs, diol-PAHs, or tetrol-B[a]P in urine were calculated by dividing the sum of the urinary amount of metabolites measured over 3 days multiplied by 100 by the sum of the amount of corresponding PAH administered over 3 days. The ratio of 3-OHB[a]P/tetrol-B[a]P was calculated by dividing the amount of 3-OHB[a]P by the amount of tetrol-B[a]P eliminated from the urine over 72 h.

Statistical analysis and calculations were carried out using SPSS Statistics 22.0 software (SPSS®, France). For the study of the interday variability of urinary metabolites during the first and tenth weeks, the Friedman test was used for each group. A comparison of creatinine quantity excreted in urine, urinary volumes, and kidney weights among the four groups was assessed using the Kruskal–Wallis test. For the study of the dose and cocktail effects, the differences in the percentages of B[a]P recovered in urine as 3-OHB[a]P and tetrol-B[a]P were tested using the Wilcoxon–Mann–Whitney test. Differences in weekly urinary excretion of PAH metabolites between the first and tenth weeks were tested using the Wilcoxon test for paired data for each group. For all tests, a *p* value below 0.05 was considered significant.

Results

Body and organ weights

There was no difference in body weight among the four groups over each study week. However, the mean of all body weights recorded at week 10 was significantly higher than that recorded at week 1, with a mean increase of 78% (Table S2). Moreover, no difference between the control and exposed groups was observed in the weight of all organs (data not shown), especially of the kidneys (Table S2). No deaths or major anomalies occurred during exposure to PAHs.

Influence of PAH exposure on urinary parameters

For the urinary volume, there was no difference between the 2 weeks regardless of group (Table S2). In addition, creatinine adjusted to body weight did not differ among the four groups regardless of the week. However, at week 10, the average creatinine level in the four groups was significantly higher (30%) than that at week 1 (Table S2).

Impact of the B[a]P dose on urinary elimination of B[a]P metabolites during the first week of exposure

During the first week, the percentages of B[a]P eliminated as 3-OHB[a]P and as tetrol-B[a]P were not different between the 0.02-B[a]P and 0.2-B[a]P groups. While the medians and the ranges of the percentage of 3-OHB[a]P were equal to 0.28% [0.18–0.40%] and 0.38% [0.25–0.53%] for the 0.02 and 0.2-B[a]P groups, respectively, (Fig. 1a), those of tetrol-B[a]P were equal to $0.07 \times 10^{-2}\%$ [$0.04 \times 10^{-2}\%$ – $0.10 \times 10^{-2}\%$] and $0.06 \times 10^{-2}\%$ [$0.04 \times 10^{-2}\%$ – $0.09 \times 10^{-2}\%$] (Fig. 1b). The ratios 3-OHB[a]P/tetrol-B[a]P were also in the same range [277–868] and [305–859] for the two groups (Fig. 1c).

Impact of the complex mixture of PAHs on the urinary elimination of B[a]P metabolites during the first week of exposure

The median of the B[a]P percentage eliminated as 3-OHB[a]P was approximately twice as low in the 0.2-CTP group compared to that in the 0.2-B[a]P group during the first week (0.2% [0.12–0.40%] and 0.38% [0.25–0.53%], respectively, $p=0.011$) (Fig. 1a). The same result was found for tetrol-B[a]P ($0.03 \times 10^{-2}\%$ [$0.02 \times 10^{-2}\%$ – $0.04 \times 10^{-2}\%$] vs. $0.06 \times 10^{-2}\%$ [$0.04 \times 10^{-2}\%$ – $0.09 \times 10^{-2}\%$]; $p=0.002$)

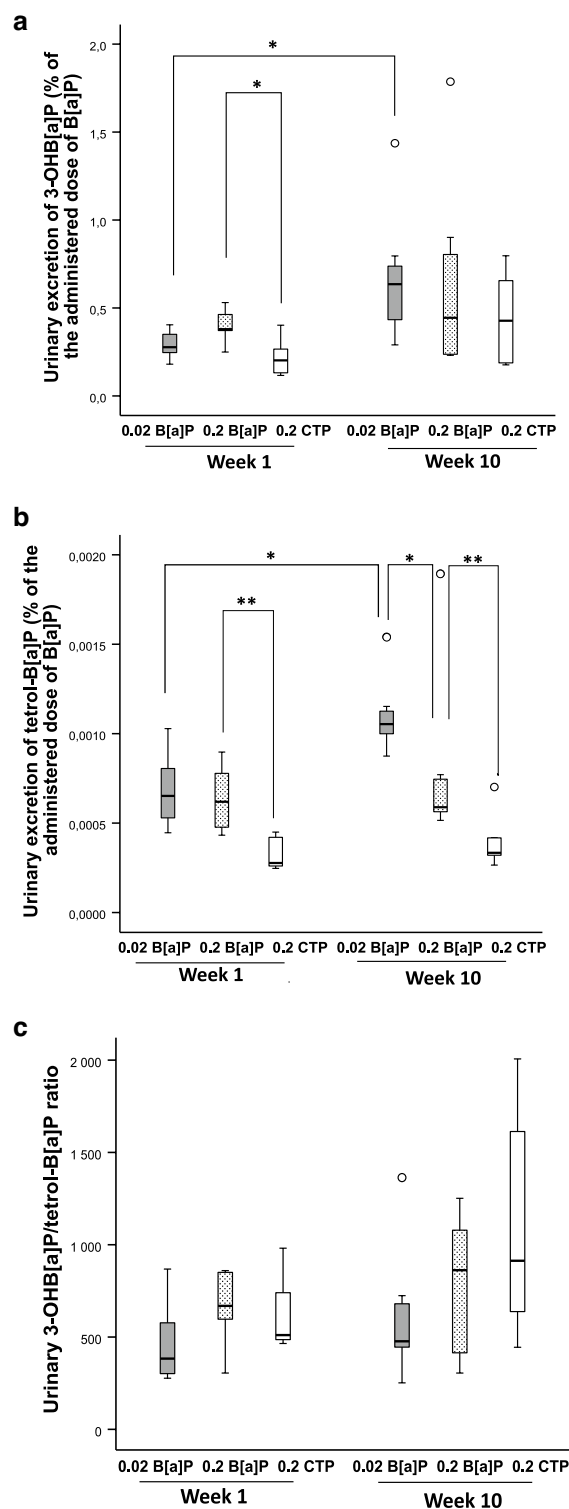


Fig. 1 Urinary elimination of 3-OHB[a]P (a), tetrol-B[a]P (b), and their ratio (c) in rats exposed to B[a]P alone or in the PAH mixture during the first and tenth weeks. Box plot for the urinary elimination of 3-OHB[a]P in rats exposed orally to B[a]P alone at 0.02 or 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹ or to the PAH mixture adjusted to 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹ of B[a]P (0.02 B[a]P, 0.2 B[a]P, 0.2 CTP, $n=7$ rats for each group), expressed as % of the administered dose. Horizontal lines represent from bottom to top: the minimum, 25th, 50th, and 75th percentiles and the maximum. ° indicates the extreme values. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(Fig. 1b), while the ratios 3-OHB[a]P/tetrol-B[a]P remained in the same range ([465–981] and [305–859]) (Fig. 1c).

Impact of exposure duration on urinary excretion of B[a]P metabolites

During the tenth week, the median of the B[a]P percentages eliminated as 3-OHB[a]P was again not different between the 0.02 and 0.2-B[a]P groups (0.64% [0.29–1.44%] and 0.44% [0.23–1.79%], respectively, $p=0.62$) (Fig. 1a), whereas the median percentages of B[a]P eliminated as tetrol-B[a]P were significantly lower by 45% for the 0.2-B[a]P group ($0.11 \times 10^{-2}\%$ [$0.09 \times 10^{-2}\%$ – $0.15 \times 10^{-2}\%$] vs. $0.06 \times 10^{-2}\%$ [$0.05 \times 10^{-2}\%$ – $0.19 \times 10^{-2}\%$], $p=0.026$) (Fig. 1b). The ratios 3-OHB[a]P/tetrol-B[a]P remained in the same range [251–1363] and [305–1251] for the two groups (Fig. 1c).

The decrease in the percentage of B[a]P eliminated as 3-OHB[a]P between the 0.2-B[a]P and the 0.2-CTP groups observed in week 1 was not found after 10 weeks (0.44% [0.23–1.79%] vs. 0.43% [0.18–0.80%]), (Fig. 1a). On the other hand, a significant twofold decrease was observed for tetrol-B[a]P ($0.06 \times 10^{-2}\%$ [$0.05 \times 10^{-2}\%$ – $0.19 \times 10^{-2}\%$] vs. $0.03 \times 10^{-2}\%$ [$0.03 \times 10^{-2}\%$ – $0.07 \times 10^{-2}\%$], respectively) in the 0.2-B[a]P and 0.2-CTP groups ($p=0.007$) (Fig. 1b). The ratios 3-OHB[a]P/tetrol-B[a]P remained in the same range [305–1251] and [444–2006] for the two groups (Fig. 1c).

Between weeks 1 and 10, the median percentages of B[a]P eliminated as 3-OHB[a]P and tetrol-B[a]P for the 0.02-B[a]P group were significantly increased by 54.6% ($p=0.018$) (Fig. 1a) and 36% ($p=0.028$) (Fig. 1b), respectively. This increase in both metabolites was found for all rats. In the 0.2-B[a]P and 0.2-CTP groups, the median percentages of the two metabolites were not different between weeks 1 and 10 (Fig. 1a, b, respectively). The 3-OHB[a]P/tetrol-B[a]P ratios of all exposed groups were also in the same range for the 2 weeks, although an increasing trend was found in the 0.2-CTP group ($p=0.063$) (Fig. 1c).

Impact of exposure duration on urinary excretion of OH-PAHs and diol-PAHs of HMW-PAHs (except B[a]P) in rats exposed to the complex mixture

During the first and tenth week of exposure, urinary concentrations of 3-OHB[a]A, 10-OHB[b]F, and 9-OHB[k]F of the 0.2-CTP groups were below the LQs.

As B[a]P metabolites, the median percentages of Pyr, B[a]A, chrysene, B[k]F and B[e]P eliminated as OH-PAH and diol-PAH metabolites were not significantly different between the first and the tenth weeks of exposure (Fig. 2). The median percentages of PAHs eliminated as OH-PAHs and diol-PAHs (during the first vs. the tenth weeks) were in the following ascending order: 6-OHChr (0.008% vs. 0.01%) = 3-OHChr (0.02% for the first and the

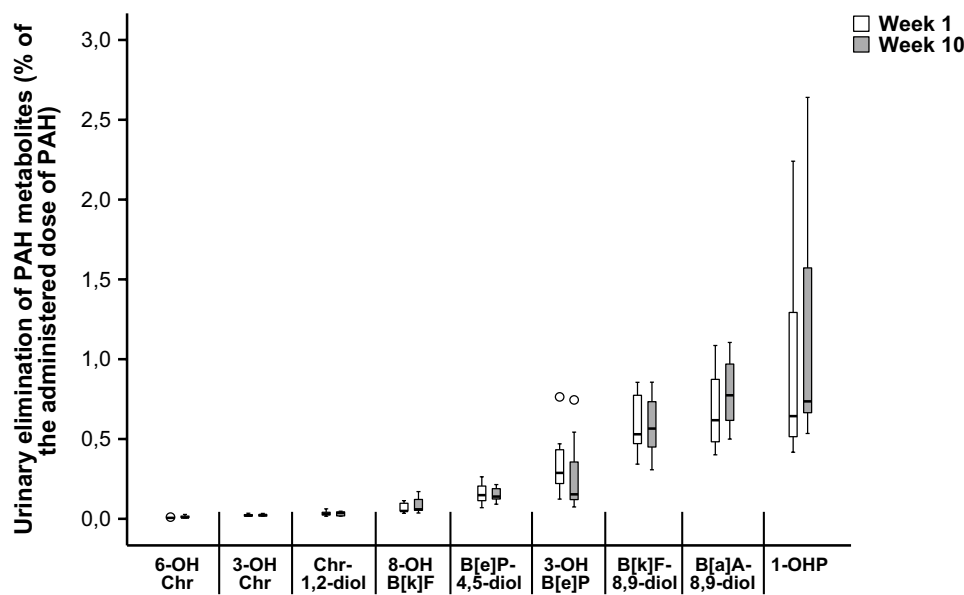


Fig. 2 Urinary elimination of PAH metabolites (6-hydroxychrysene (6-OHChr), 3-hydroxychrysene (3-OHChr), chrysene-1,2-diol (Chr-1,2-diol), 8-hydroxybenzo[k]fluoranthene (8-OHB[k]F), benzo[k]fluoranthene-8,9-diol (B[k]F-8,9-diol), 3-hydroxybenzo[e]pyrene (3-OHB[e]P), benzo[e]pyrene-4,5-diol (B[e]P-4,5-diol), benzo[a]anthracene-8,9-diol (B[a]A-8,9-diol), and 1-hydroxypyrene (1-OHP))

in rats exposed to the PAH mixture during the first (in white) and tenth (in gray) weeks, expressed as % of the administered dose ($n=7$ rats). Horizontal lines represent from bottom to top: the minimum, 25th, 50th, and 75th percentiles and the maximum. ° indicates the extreme values

tenth weeks) = Chr-1,2-diol (0.03% vs. 0.04%) < 8-OHB[k]F (0.05% vs. 0.06%) < B[e]P-4,5-diol (0.15% vs. 0.14%) = 3-OHB[e]P (0.29% vs. 0.15%) < B[k]F-8,9-diol (0.53% for the first and the tenth weeks) < B[a]A-8,9-diol (0.62% vs. 0.74%) = 1-OHP (0.64% vs. 0.74%).

Discussion

The question of the exposome is currently a major issue in toxicology, and this concept brings a certain number of challenges. In addition to the characterization of the environmental exposome, understanding the fate of mixtures of chemical substances in the body and molecules resulting from xenobiotic metabolism (toxicokinetics) is of extreme importance. In this context, our study focuses on understanding the metabolism of B[a]P when it is alone or included in a complex mixture of carcinogenic PAHs to understand the issue of cocktail effects in this original animal model study.

Thus, our study design and the exposure animal model were carefully chosen to be as representative as possible of human PAH exposure. Indeed, the doses used (0.02 and 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹) were based on the data published by Grova et al. (2017). After gavage of rats with a synthetic mixture of PAHs for 3 days a week for 90 days, the lowest dose at which urinary 3-OHB[a]P could be detected was 0.08 mg.kg⁻¹.d⁻¹. The quantity of 3-OHB[a]P excreted over 24 h was equal to 10 ng, which corresponded to a urinary concentration of 0.3 ng.mL⁻¹. The LQ of our analytical method was far above this level (Barbeau et al. 2011), and the lowest dose used in the present work was decreased to 0.02 mg.kg⁻¹.d⁻¹ to match the highest occupational exposure of the Exporisq-PAH database (Maitre et al. 2018). This exposure dose is well below those conventionally used in the literature, which are mostly between 0.3 and 10 mg.kg⁻¹.d⁻¹ (Bouchard and Viau 1995; Godschalk et al. 2000; Jongeneelen et al. 1984, 1985; Kang et al. 2007; Marie et al. 2010; Moreau and Bouchard 2015; Moreau et al. 2015), and can be as high as 100 mg.kg⁻¹ (Ramesh et al. 2001). The use of doses in the same range as those of human exposure is important to understand the different metabolic pathways of PAHs.

Furthermore, the originality of our study lies in the exposure to a PAH mixture that was not a synthetic mixture as previously used (Bouchard et al. 1998, 2002; Grova et al. 2017). It was extracted from an industrial product derived from CTP, a component of furnace electrodes consumed during metal production and leading to occupational carcinogenic PAH exposure (IARC 2010). Thus, this exposure mirrors a realistic PAH worker exposure as closely as possible. Moreover, to validate the relevance of the model, the lack of any significant presence of PAHs in animal feed or in the oil used to dissolve the mixture was checked. No alteration in body weight, organ mass, or urinary parameters

after treatment was encountered, which confirmed that this chronic low-level exposure to the B[a]P or CTP mixture did not affect kidney function.

After 1 week of exposure to B[a]P alone, the median percentages of B[a]P eliminated as 3-OHB[a]P (0.3–0.4%) and tetrol-B[a]P (0.0006–0.0007%) were not influenced by the dose. Regarding 3-OHB[a]P, the results are on the same order of magnitude as those of previous studies conducted with higher exposure levels. Indeed, the urinary excretion of 3-OHB[a]P after 3 days of exposure to B[a]P at 2.5 mg.kg⁻¹.d⁻¹ was 0.29% (Jongeneelen et al. 1984), while this percentage was equal to 0.4% after gavage with a B[a]P dose of 10 mg.kg⁻¹ (Godschalk et al. 2000). These results suggest that the activities of metabolic enzymes (CYP) involved in the production of 3-OHB[a]P are not saturated for an exposure B[a]P dose up to 10 mg.kg⁻¹. The present work is the first to report the urinary percentage of B[a]P eliminated as tetrol-B[a]P in an animal model. However, this metabolite derived from BPDE, the ultimate carcinogenic metabolite of B[a]P (Hecht et al. 2010), is considered the most relevant biomarker for assessing carcinogenic B[a]P exposure (Barbeau et al. 2018; Hilton et al. 2017; Zhong et al. 2011). The B[a]P conversion to tetrol-B[a]P requires three successive biochemical reactions involving different enzymes, such as CYP1A/1B1 (included also for the conversion in 3-OHB[a]P), EH to form BPDE, and a spontaneous hydrolysis from BPDE to tetrol-B[a]P. The tetrol-B[a]P levels in the present study were more than 500 lower than those of 3-OHB[a]P for both doses, while the urinary concentrations of these two metabolites were in the same range in the human population (Barbeau et al. 2018; Hilton et al. 2017; Zhong et al. 2011). These results can be explained by lower BPDE production in rats than in humans, which is consistent with the lower basal EH activity measured in the livers of rats compared with those of humans (Cornet et al. 1995; Pushparajah et al. 2008).

Another major point of interest was to compare urinary elimination of B[a]P metabolites according to the exposure time. After 10 weeks, the percentages recovered in urine as 3-OHB[a]P and tetrol-B[a]P were significantly increased by 54% and 36%, respectively, compared to exposure after 1 week in the 0.02-B[a]P group, while they were in the same range for the 0.2-B[a]P group. This result is consistent with those of a previous study involving in vitro models of human skin exposed to B[a]P alone (Bourgart et al. 2019a). While the level of 3-OHB[a]P in the medium after the 24- and 48-h exposure times was identical for all three applied doses, that of tetrol-B[a]P was lower when the dose of B[a]P increased. The rise in urinary metabolite elimination after 10 weeks at the lowest dose may be due to xenobiotic metabolizing enzyme (XME) induction or to an increase in B[a]P absorption with repeated exposure. However, the lack of an additional increase in urinary elimination of 3-OHB[a]P and

tetrol-B[a]P with the repetition of a ten times higher B[a]P dose suggested that maximal XME induction and saturation of XME was achieved. Interestingly, the percentage of B[a]P recovered in urine as tetrol-B[a]P with the repetition of the low dose was 1.8-fold higher than the level obtained with the repetition of the high dose. Thus, the repetition of exposure could be an important aggravating B[a]P factor of toxicity at low doses.

To approximate a “real-life” exposure, we studied the effect of a PAH mixture collected from metallurgy on B[a]P metabolism. After 1 week of exposure, the urinary elimination of 3-OHB[a]P and tetrol-B[a]P was halved when B[a]P was administered as part of a mixture (0.2-CTP) compared to B[a]P alone (0.2-B[a]P). These results are in agreement with a previous study involving *in vitro* models of human skin exposed to the same mixture (Bourgart et al. 2019b), where a decrease in tetrol-B[a]P production was found with the increasing mixture complexity. This decrease in urinary excretion of metabolites can be attributed to a decrease in gastrointestinal B[a]P absorption, as was reported for skin PAH penetration (Bourgart et al. 2019b; Dankovic et al. 1989). Another explanation may be the reduction in B[a]P metabolism. This reduction cannot be explained by XME inhibition, because the majority of environmental mixtures containing PAHs upregulate the expression of genes involved in XME (Sen et al. 2007). This decrease would be explained by saturation or competition for XME activity, since different PAHs of the mixture act through the same signaling pathway of the AhR receptor as B[a]P (Bourgart et al. 2019b; Dankovic et al. 1989; Shimada et al. 2003). However, we cannot exclude that urinary metabolite elimination may simply be delayed, because XME, having a greater diversity of PAHs to manage in the mixture, might take more time to produce HMW-PAH metabolites. This could lead to either an accumulation of PAHs in the organs or an increase in other PAH metabolic pathways, such as the o-quinone pathway or the cation radical pathway for B[a]P. In addition, the decrease in the urinary excretion of 3-OHB[a]P observed during the first week between exposure to B[a]P as part of the mixture compared to B[a]P alone disappeared after 10 weeks of exposure, probably due to XME induction or the increase in gastrointestinal PAH absorption, as previously discussed. However, potential XME induction by PAHs varies enormously, depending on the nature of the compound involved (Pushparajah et al. 2008). In contrast, the difference in urinary tetrol-B[a]P elimination between exposure to B[a]P alone or as part of the mixture remained true even after 10 weeks of exposure. This result suggests once again a specific regulation of the tetrol-B[a]P metabolic pathway, especially EH activity, that is different from that of 3-OHB[a]P. Thus, these results confirm that the complex PAH mixture partially inhibits the B[a]P bioactivation pathway (Bourgart et al. 2019b) and that there is neither an additive nor a synergistic effect on this pathway. Further studies are needed to clarify the mechanisms involved.

Regarding other HMW-PAHs, a reduction in urinary excretion of metabolites after exposure to the PAH mixture was also found for Chr in the present work. Indeed, the elimination percentages of 6-OHChr and 3-OHChr with 0.2-CTP (containing $0.17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Chr) were 0.008 and 0.02%, while they were 0.012 and 0.035% with exposure to Chr alone at $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Grimmer et al. 1988). While exposure to complex mixtures resulted in a decline in B[a]P metabolite excretion, time duration had no effect on the percentages of B[a]P recovered as 3-OHB[a]P and tetrol-B[a]P or on the percentages of other PAHs recovered as OH-PAH and diol-PAH metabolites. This is in agreement with the results of Grova et al. (2017), who found no difference in 3-OHB[a]P excretion between day 1 and 90 after B[a]P exposure at a dose of $0.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ included in a mixture of 16 PAHs. This invariance of the metabolite profile has already been published for the OH- and diol-PAHs determined in the urine of rats exposed five times to coal tar pitch as well as in the urine of coke oven workers collected over 4 consecutive exposure days (Grimmer et al. 1997). While B[a]A-8,9-diol is always the most eliminated metabolite and 3-OHChr and 6-OHChr are the least eliminated, the PAH metabolite profile differs between rats and humans. Indeed, for a given PAH, the levels of diol-PAHs resulting from the bioactivation pathway of PAHs (Cooper et al. 1980; Levin et al. 1978) were always higher than those of OH-PAHs in the urine of workers involved in electrode maintenance of aluminum electrolysis (Marques et al. 2021). In the present study, this was true for B[k]F and B[a]A but not for Chr and B[e]P. However, this profile exhibited significant interindividual variability regardless of study group. In our study, we found that even when the medians of the measured metabolite elimination percentages across all of our rats were significantly different, there was inter-rat variability that is worth noting, both in terms of direction and intensity of variation. However, the differences in variation observed for a given rat after 1 week of exposure were still maintained after 10 weeks of exposure. This large interindividual variability, already reported in both rat and worker studies (Grimmer et al. 1997), highlights the fact that monooxygenase capacity and EH activity differ among individuals, in animals as well as in humans. This is of great interest and should be an important parameter to be taken into account when determining toxicological reference values and in health risk assessments, whether for a single substance or for complex mixtures.

Conclusion

To understand the metabolic interactions and the metabolic fate of substances when they are included in a complex mixture (cocktail effect), we chose to work on PAHs, which are

a good study model because of the diversity of molecules involved and their different metabolic pathways and toxicity.

Thus, we have shown that in the case of repeated exposure to a complex mixture of carcinogenic PAHs, many factors, such as the dose, duration of exposure, and chemical composition of the mixture (type of molecules as well as their proportion), can have a major influence on the transformation of these molecules into metabolites of the detoxification or carcinogenicity pathways. Our results show that the metabolism and the expected effects following exposure to PAHs do not support a simple additive effect with mixture exposure. This is of major importance to understand and predict the health effects of chronic exposure to complex PAH mixtures and to set up a relevant biomonitoring protocol of populations exposed to mixtures that may vary in terms of dose and composition.

Furthermore, the difference in PAH metabolism between animals and humans underlines the difficulty of assessing health effects and establishing limit values for humans based on animal studies. Finally, the invariance of the individual metabolite profile over time and, conversely, the significant interindividual variability of this profile found in both rats and workers underline the need to set up a biomonitoring profile based on several biomarkers representing different metabolic pathways to identify the individuals most at risk.

To better understand the mechanisms involved in the observed effects, it would be interesting to deepen these toxicokinetic data and to study in particular the intestinal absorption of the compounds by the analysis of PAHs and their metabolites in the feces, the activity of the enzymes involved in the metabolic pathways, and the tissue distribution of the parent molecules and their metabolites.

In a broader way, this work brings major elements of understanding to the complex problem of cocktail effects. It thus contributes to the reflection on the determination of limit values and on the approaches of evaluation of the sanitary risks in a context of multiple exposures, which represents today, at the time of the development of exposomics, a challenge for environmental health.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03441-3>.

Acknowledgements We would like to thank the zootechnicians of the « Plateforme de Haute Technologie Animale » (PHTA) facility for animal housing and care, Sylvette Liaudy for her help in the bibliographic research and Franck Balducci for his help in statistical analysis.

Author contributions Conceived of designed study: CD and AM. Performed animal study: CD, MEH, and MM. Analyzed data: CD, MEH, AM, and RP. Wrote the paper: CD, MEH, AM, MM, and RP.

Funding This work was funded by the Translational Innovation in Medicine and Complexity (TIMC) CNRS 5525 laboratory and by the « Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation » (thesis grant of Maguy El Hajjar). 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.

Data availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

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

Ethics approval Animal housing and procedures were conducted in accordance with the recommendations from the Direction des Services Vétérinaires, Ministry of Agriculture of France, according to European Communities Council Directive 2010/63/EU and according to recommendations for health monitoring from the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Protocols involving animals were reviewed by the local ethics committee « Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale no.#12, Cometh-Grenoble » and approved by the Ministry of Research (APAFIS#16910-2018092816061560v2).

References

- 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>
- Barbeau D, Persoons R, Marques M, Hervé C, Laffitte-Rigaud G, Maitre A (2014) Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. *Ann Occup Hyg* 58(5):579–590. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meu004>
- Barbeau D, Lutier S, Bonnetterre V, Persoons R, Marques M, Herve C, Maitre A (2015) Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: relations between atmospheric mixtures, urinary metabolites and sampling times. *Int Arch Occup Environ Health* 88(8):1119–1129. <https://doi.org/10.1007/s00420-015-1042-1>
- Barbeau D, Lutier S, Choisinard L, Marques M, Persoons R, Maitre A (2018) Urinary trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydroxybenzo(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>
- Bouchard M, Viau C (1995) Benzo(a)pyrenediol epoxide hemoglobin adducts and 3-hydroxybenzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol* 69(8):540–546. <https://doi.org/10.1007/s002040050209>
- Bouchard M, Krishnan K, Viau C (1998) Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Arch Toxicol* 72(8):475–482. <https://doi.org/10.1007/s002040050531>
- Bouchard M, Thuot R, Carrier G, Viau C (2002) Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J Toxicol Environ Health A* 65(16):1195–1209. <https://doi.org/10.1080/152873902760125408>
- Bourgart E, Barbeau D, Marques M, von Koschimbahr A, Béal D, Persoons R, Leccia MT, Douki T, Maitre A (2019a) A realistic

- human skin model to study benzo[a]pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure. *Arch Toxicol* 93(1):81–93. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2329-2>
- Bourgart E, Persoons R, Marques M, Rivier A, Balducci F, von Koschembahr A, Beal D, Leccia MT, Douki T, Maitre A (2019b) Influence of exposure dose, complex mixture, and ultraviolet radiation on skin absorption and bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbons *ex vivo*. *Arch Toxicol* 93(8):2165–2184. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02504-8>
- Cooper CS, Ribeiro O, Hewer A, Walsh C, Pal K, Grover PL, Sims P (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. <https://doi.org/10.1093/carcin/1.3.233>
- Cornet M, Callaerts A, Jorritsma U, Bolt H, Vercruyssen A, Rogiers V (1995) Species-dependent differences in biotransformation pathways of 2-methylpropene (isobutene). *Chem Res Toxicol* 8(7):987–992. <https://doi.org/10.1021/tx00049a013>
- 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. *J Appl Toxicol* 9(4):239–244. <https://doi.org/10.1002/jat.2550090407>
- Gendre C, Lafontaine M, Morele Y, Payan JP, Simon P (2002) Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl Aromat Compd* 22(3–4):761–769. <https://doi.org/10.1080/10406630290103915>
- Godschalk RWL, Moonen EJC, Schilderman PA, Broekmans WM, Kleinjans JC, Van Schooten FJ (2000) Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 21(1):87–92. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.1.67>
- Grimmer G, Brune H, Dettbarn G, Heinrich U, Jacob J, Mohtashamipour E, Norpoth K, Pott F, Wenzel-Hartung R (1988) Urinary and faecal excretion of chrysene and chrysene metabolites by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Arch Toxicol* 62(6):401–405. <https://doi.org/10.1007/BF00288341>
- 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. *Int Arch Occup Environ Health* 69(4):231–239. <https://doi.org/10.1007/s004200050141>
- Grova N, Fayès F, Hardy EM, Appenzeller BMR (2017) New insights into urine-based assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure from a rat model: Identification of relevant metabolites and influence of elimination kinetics. *Environ Pollut* 228:484–495. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.060>
- 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>
- Hilton DC, Trinidad DA, Hubbard K, Li Z, Sjödin A (2017) Measurement of urinary benzo[a]pyrene tetrols and their relationship to other polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and cotinine in humans. *Chemosphere* 189:365–372. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.077>
- IARC (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 92. Lyon: International Agency for Research on Cancer. ISBN 978-92-832-1292-8
- Jongeneelen FJ, Leijdekkers CM, Henderson PT (1984) Urinary excretion of 3-hydroxy-benzo[a]pyrene after percutaneous penetration and oral absorption of benzo[a]pyrene in rats. *Cancer Lett* 25(2):195–201. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(84\)80045-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(84)80045-2)
- Jongeneelen FJ, Leijdekkers CM, Bos RP, Theuvs JL, Henderson PT (1985) Excretion of 3-hydroxybenzo(a)pyrene and mutagenicity in rat urine after exposure to benzo(a)pyrene. *J Appl Toxicol* 5(5):277–282. <https://doi.org/10.1002/jat.2550050503>
- Jongeneelen FJ, Anzion RB, Henderson PT (1987) Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J Chromatogr B* 413:227–232. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(87\)80230-x](https://doi.org/10.1016/0378-4347(87)80230-x)
- Kang HG, Jeong SH, Cho MH, Cho JH (2007) Changes of biomarkers with oral exposure to benzo(a)pyrene, phenanthrene and pyrene in rats. *J Vet Sci* 8(4):361–368. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.4.361>
- Lafontaine M, Gendre C, Delsaut P, Simon P (2004) Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limit value. *Polycycl Aromat Compd* 24(4–5):441–450. <https://doi.org/10.1080/10406630490471447>
- Leroyer A, Jeandel F, Maitre A, Howsam M, Deplanque D, Mazzuca M, Nisse C (2010) 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. *Sci Total Environ* 408(5):1166–1173. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.073>
- Levin W, Wood AW, Chang RL, Chang RL, Yagi H, Mah HD, Jerina DM, Conney AH (1978) Evidence for bay region activation of chrysene 1,2-dihydrodiol to an ultimate carcinogen. *Cancer Res* 38(6):1831–1834
- Maitre A, Petit P, Marques M, Hervé C, Montlevier S, Persoons R, Bicout DJ (2018) Exporisq-HAP database: 20 years of monitoring French occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures and identification of exposure determinants. *Int J Hyg Environ Health* 221(2):334–346. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.12.008>
- 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. *J Appl Toxicol* 30(5):402–410. <https://doi.org/10.1002/jat.1511>
- Marques M, Maitre A, Choïnard L, Demeilliers C, Persoons R (2021) Simultaneous analysis of PAH urinary mono- and dihydroxylated metabolites by GC-MS-MS following SPE and two-stage derivatization. *Anal Bioanal Chem* 413(27):6823–6835. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03638-4>
- Miller GW, Jones DP (2014) The nature of nurture: refining the definition of the exposome. *Toxicol Sci* 137(1):1–2. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft251>
- Moreau M, Bouchard M (2015) 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>
- Moreau M, Ayotte P, Bouchard M (2015) Kinetics of diol and hydroxybenzo[a]pyrene metabolites in relation to DNA adduct formation and gene expression in rats. *J Toxicol Environ Health A* 78(12):725–746. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1028119>
- Pushparajah DS, Umachandran M, Plant KE, Plant N, Ioannides C (2008) Differential response of human and rat epoxide hydrolase to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: studies using precision-cut tissue slices. *Mutat Res* 640(1–2):153–161. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.01.004>
- Ramesh A, Inyang F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, Nyanda AM (2001) Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(α)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp Toxicol Pathol* 53(4):275–290. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00192>
- Sen B, Mahadevan B, DeMarini DM (2007) Transcriptional responses to complex mixtures: a review. *Mutat Res* 636(1–3):144–177. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.002>

- Shimada T, Fujii-Kuriyama Y (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 95(1):1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x>
- Shimada T, Sugie A, Yamada T, Kawazoe H, Hashimoto M, Azuma E, Nakajima T, Inoue K, Oda Y (2003) Dose-response studies on the induction of liver cytochromes P4501A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons in arylhydrocarbon-responsive C57BL/6J mice. *Xenobiotica* 33(9):957–971. <https://doi.org/10.1080/0049825031000140896>
- Valière M, Petit P, Persoons R, Demeilliers C, Maître A (2022) Consistency between air and biological monitoring for assessing polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and cancer risk of workers. *Environ Res* 207:112268. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112268>
- Vineis P, Chadeau-Hyam M, Gmuender H, Gulliver J, Herceg Z, Kleinjans J, Kogevinas M, Kyrtopoulos S, Nieuwenhuijsen M, Phillips DH, Probst-Hensch N, Scalbert A, Vermeulen R, Wild CP, EXPOsOMICS Consortium (2017) The exposome in practice: Design of the EXPOsOMICS project. *Int J Hyg Environ Health* 220(2):142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.08.001>
- Wild CP (2012) The exposome: from concept to utility. *Int J Epidemiol* 41(1):24–32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>
- Woudneh MB, Benskin JP, Grace R, Hamilton MC, Magee BH, Hoeger GC, Forsberg ND, Cosgrove JR (2016) Quantitative determination of hydroxypolycyclic aromatic hydrocarbons as a biomarker of exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Chromatogr A* 1454:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.057>
- 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>
- 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>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Electronic supplementary material

Metabolism of benzo[a]pyrene after low-dose subchronic exposure to an industrial mixture of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in rats: A cocktail effect study

Archives of toxicology

Maguy El Hajjar¹, Anne Maître^{1,2}, Marie Marques^{1,2}, Renaud Persoons^{1,2}, Christine Demeilliers^{1,2}

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France.

² Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC, 38000 Grenoble, France.

Corresponding author:

*Christine Demeilliers

E-mail : christine.demeilliers@univ-grenoble-alpes.fr (CD)

Table S1 Analysis of the coal tar pitch PAH profile. IARC: International Agency for Research on Cancer, MW: molecular weight

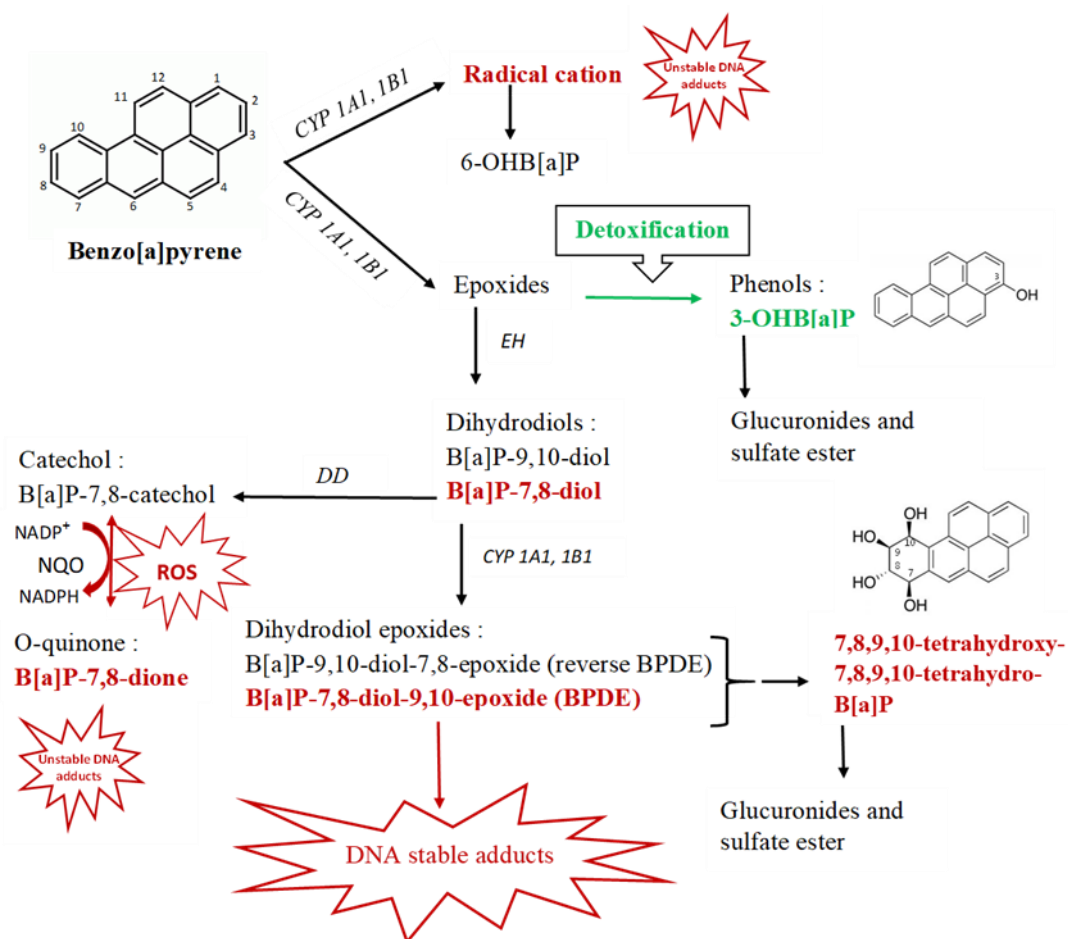
	IARC classification	MW (g. mol ⁻¹)	Concentration (μg. g ⁻¹)	Concentration (μmol. g ⁻¹)	Composition (% of total dosed PAHs)
Fluoranthene	3	202	4568	22.6	21.3
Pyrene	3	202	3409	16.9	15.9
Benzo[a]pyrene	1	252	2598	10.3	9.7
Chrysene	2B	228	2256	9.9	9.4
Benzo[a]anthracene	2B	228	2127	9.3	8.8
Benzo[b]fluoranthene	2B	252	2279	9.0	8.5
Benzo[e]pyrene	3	252	1770	7.0	6.6
Indenol [1,2,3-c, d] pyrene	2B	276	1642	5.9	5.6
Benzo[g,h,i.] perylene	3	276	1501	5.4	5.1
Benzo[k]fluoranthene	2B	252	1283	5.1	4.8
Benzo[j]fluoranthene	2B	252	899	3.6	3.4
Dibenzo[a,h]anthracene	2A	278	253	0.9	0.9

Table S2 Weight, urinary volumes and creatinine adjusted to the weight over the first and tenth weeks of exposure for the four groups (n=7 rats for each group). CG: control group, B[a]P: benzo[a]pyrene, CTP: coal tar pitch

		CG	0.02 B[a]P	0.2 B[a]P	0.2 CTP
Weight (g)	Week 1	263.1±33.8	264.0±33.4	262.1±38.6	265.7±38.0
	Week 10	466.1±35.2*	474.1±40.3*	458.3±54.7*	475.4±23.8*
Kidney weight (g)	Week 10	3.5 ± 0.3	3.6 ± 0.4	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.4
Creatinine (mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹)	Week 1	22.3±2.1	20.9±3.6	22.6±2.7	22.1±2.6
	Week 10	28.3±1.5*	28.3±2.2*	29.6±1.4*	28.4±1.6*
Urinary volume (mL.kg ⁻¹ .d ⁻¹)	Week 1	30.2 ± 9.3	26.9 ± 8.4	26.6 ± 7.1	30.4 ± 3.9
	Week 10	28.9 ± 5.2	28.5 ± 9.1	25.8 ± 9.3	27.2 ± 6.4

The values are expressed as the mean ± standard deviation (sd). *: Significantly different from the values obtained during the first week, $p < 0.05$

Fig. S1 Simplified metabolic schema for benzo[a]pyrene (according to Barbeau et al. 2018; Bouchard and Viau 1996). CYP: cytochrome P450, EH: epoxide hydrolase, ROS: reactive oxygen species, DD: dihydrodiol dehydrogenase, PS: prostaglandine synthase, NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NQO: NADPH quinone oxidoreductase



3 Principaux résultats

Impact de la dose de B[a]P sur l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P pendant la première semaine d'exposition :

Durant la 1^{ère} semaine d'exposition, l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P était identique entre les 2 groupes de B[a]P à 0,02 et 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹, respectivement 0,28 et 0,38 % de la dose administrée pour le 3-OHB[a]P et 0,0007 et 0,0006% de la dose administrée pour le tétraol-B[a]P. Le ratio 3-OHB[a]P/tétraol-B[a]P n'était pas significativement différent entre les 2 groupes (383 et 669). Ainsi avec les doses utilisées et après une seule semaine d'exposition, il n'y avait pas de saturation des enzymes de métabolisme du B[a]P.

Impact du mélange complexe de HAP sur l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P pendant la première semaine d'exposition :

Durant la 1^{ère} semaine d'exposition, l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P était diminuée de moitié avec le mélange versus le B[a]P seul : 0,38 *versus* 0,2 %, $p = 0.011$ pour le 3-OHB[a]P et 0,0006 *versus* 0,0003 %, $p = 0,002$ pour le tétraol-B[a]P. Le ratio 3-OHB[a]P/tétraol-B[a]P n'était pas significativement différent entre les 2 groupes (669 et 511). Ceci pouvait être expliqué par une diminution de l'absorption intestinale du B[a]P avec le mélange, et/ou une saturation ou une compétition enzymatique avec les autres HAP présents dans le mélange.

De plus, le ratio 3-OHB[a]P/tétraol-B[a]P observé chez le rat était beaucoup plus élevé que celui observé chez des travailleurs exposés aux HAP où le ratio variait entre 1 et 2 [Barbeau 2018]. Ceci pourrait être due à une différence d'activité enzymatique de l'EH entre l'homme et le rat comme démontré dans Cornet et al. (1995) et Pushparajah et al. (2008).

Impact de la dose de B[a]P sur l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P après 10 semaines d'exposition :

Après 10 semaines d'exposition, l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P restait identique entre les 2 doses de B[a]P. Cependant le pourcentage du B[a]P éliminé sous-forme de tétraol-B[a]P était 2 fois plus élevé avec la faible dose du B[a]P (0,0011 *versus* 0,0006 %) ce qui pourrait signifier un effet plus toxique avec l'exposition répétée de la plus faible dose car le tétraol-B[a]P provient de la voie de bio-activation du B[a]P.

Impact du mélange complexe de HAP sur l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P après 10 semaines d'exposition :

La diminution du pourcentage de B[a]P éliminé sous forme de 3-OHB[a]P entre le groupe 0,2-B[a]P (groupe recevant le B[a]P seul à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹) et le groupe 0,2-CTP (groupe recevant le mélange de HAP à base de CTP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P) observée à la 1^{ère} semaine n'a pas été retrouvée après 10 semaines (0,44 *versus* 0,43 %). Toutefois, le pourcentage de B[a]P éliminé sous forme de tétraol-B[a]P restait diminué d'un facteur 2 avec le mélange (0,0006 *versus* 0,0003 %).

Impact de la durée d'exposition sur l'excrétion urinaire des métabolites du B[a]P chez les rats exposés au B[a]P seul ou au mélange complexe :

La comparaison de l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P entre la 1^{ère} et la 10^{ème} semaine montrait une augmentation avec le groupe ayant reçu la faible dose du B[a]P uniquement (0,28 *versus* 0,64 % pour le 3-OHB[a]P, $p = 0,018$ et 0,0007 *versus* 0,001 %, $p = 0,028$ pour le tétraol-B[a]P). Ceci pouvait être dû à une augmentation de l'absorption intestinale du B[a]P après 10 semaines d'exposition et/ou à une induction enzymatique dans les enzymes métabolisant le B[a]P dans le groupe 0,02-B[a]P (groupe recevant le B[a]P seul à 0,02 mg.kg⁻¹.J⁻¹). Pour les groupes 0,2-B[a]P et 0,2-CTP, l'absence d'augmentation des 2 métabolites à la semaine 10 pourrait être due à une saturation des activités enzymatiques.

Impact de la durée d'exposition sur l'excrétion urinaire des métabolites monohydroxylés et des diols des HAP à haut poids moléculaire (excepté le B[a]P) chez les rats exposés au mélange complexe :

Comme pour les métabolites du B[a]P, l'élimination urinaire de Pyr, Chr, B[a]A, B[k]F et B[e]P éliminés sous forme de métabolites monohydroxylés et diols n'était pas significativement différente entre la 1^{ère} et la 10^{ème} semaine d'exposition. Les pourcentages médians de HAP éliminés sous forme de métabolites monohydroxylés et diols (au cours de la 1^{ère} et la 10^{ème} semaine) étaient dans l'ordre croissant suivant : 6-OHChr (0,008 % *versus* 0,01 %) = 3-OHChr (0,02 % pour la 1^{ère} et la 10^{ème} semaine) = Chr-1,2-diol (0,03 % *versus* 0,04 %) < 8-OHB[k]F (0,05 % *versus* 0,06 %) < B[e]P-4,5-diol (0,15 % *versus* 0,14 %) = 3-OHB[e]P (0,29 % *versus* 0,15 %) < B[k]F-8,9-diol (0,53 % pour la 1^{ère} et la 10^{ème} semaine) < B[a]A-8,9-diol (0,62 % *versus* 0,74 %) = 1-OHP (0,64 % *versus* 0,74 %).

De plus, cet ordre était différent de celui observé chez des travailleurs de maintenance d'électrode dans l'électrolyse de l'aluminium où l'élimination urinaire des diols était toujours

plus élevée que celle des métabolites monohydroxylés [Marques 2021]. Ceci pourrait être dûe à une différence d'activité enzymatique des enzymes de métabolisme des HAP entre l'homme et le rat.

4 Conclusion

Ce travail apporte des éléments majeurs de compréhension au problème complexe des effets cocktails. Il contribue ainsi à la réflexion sur la détermination des valeurs limites et sur les démarches d'évaluation des risques sanitaires dans un contexte d'expositions multiples, ce qui représente aujourd'hui, à l'heure du développement de l'exposome, un défi à relever.

Nous avons montré qu'en cas d'exposition répétée à un mélange complexe de HAP cancérigènes, de nombreux facteurs tels que la dose, la durée d'exposition et la composition chimique du mélange, pouvaient avoir une influence majeure sur la transformation de ces molécules en métabolites provenant des voies de détoxification ou de cancérogénicité. Nos résultats montrent que le métabolisme du B[a]P et les effets attendus suite à une exposition à un mélange complexe de HAP vont à l'encontre d'un simple effet additif. Ceci est d'une importance majeure pour comprendre et prédire les effets sur la santé d'une exposition chronique à des mélanges complexes de HAP qui peuvent varier en termes de dose et de composition.

En outre, la différence de métabolisme des HAP (ratio 3-OHB[a]P/tétraol-B[a]P, rapport entre les diols et les métabolites monohydroxylés des HAP de HPM) entre les animaux et les humains souligne la difficulté d'extrapoler les effets sur la santé et d'établir des valeurs limites pour l'homme sur la base d'études animales.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets observés après exposition aux mélanges d'HAP, il est intéressant d'approfondir ces données toxicocinétiques et d'étudier notamment l'absorption intestinale des HAP, la distribution tissulaire des molécules mères et de leurs métabolites mais aussi l'activité des enzymes impliquées dans les différentes voies métaboliques (notamment CYP et EH).

Dans la suite de ce travail, nous allons étudier l'absorption intestinale des HAP par l'analyse des HAP et de leurs métabolites dans les fèces, et la distribution tissulaire des HAP par l'analyse des composés parents dans le foie et les reins. Pour ce faire, nous allons mettre au point le dosage des HAP et de leurs métabolites dans les différentes matrices et dans les tissus.

Par contre, il ne nous sera pas possible par manque de temps d'étudier les modifications de l'activité des enzymes du métabolisme en lien avec l'exposition aux mélanges.

Chapitre II : Mise au point de l'analyse des HAP particulaires et de leurs métabolites dans le sang, les fèces et les organes

Afin de compléter notre étude de toxicocinétique par l'étude de l'influence du mélange sur l'absorption et la distribution du B[a]P et des autres HAP, nous avons mis au point des méthodes d'analyse des HAP et de leurs métabolites (1-OHP, 3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P) dans le sang, les fèces et les organes (foie et reins). Ces techniques seront également utilisées pour le 2^{ème} objectif de la thèse sur l'étude de différents facteurs pouvant influencer la toxicocinétique.

1 Mise au point de l'analyse des HAP et de leurs métabolites dans les fèces

Au niveau de l'analyse des HAP dans les fèces, le point critique était de déterminer la quantité nécessaire de tampon à ajouter aux matières fécales pour mettre en suspension les composés de façon homogène sans toutefois utiliser un volume trop important de tampon afin de ne pas perdre en sensibilité. Alors que dans la littérature [Marie 2010, van Schooten 1997], 100 mL de tampon étaient ajoutés à 5 ou 6,25 g de fèces, nous avons mis en solution 16,6 g de matières fécales dans 100 mL de tampon d'acétate (pH = 4,66). Cette solution a été agitée régulièrement pour obtenir une suspension homogène.

1.1 Analyse des HAP particulaires, du 3-OHB[a]P et du 1-OHP dans les fèces

La méthode d'extraction des HAP particulaires et du 3-OHB[a]P et du 1-OHP de la suspension que nous avons testée en premier était celle décrite par Marie et al. (2010) qui utilisait une double extraction liquide-liquide (LLE) avec 4 mL d'acétate d'éthyle (AE). Après évaporation à sec du solvant organique, le résidu était dissout dans 500 µL de méthanol (MeOH). Toutefois avec cette méthode, il était difficile de remettre en solution le résidu sec et les rendements d'extraction n'étaient pas satisfaisant puisque inférieurs à 50 %.

Afin d'améliorer les rendements, une étape d'extraction solide en phase dispersive (dSPE) a été ajoutée après la LLE pour éliminer toutes les impuretés lipidiques extraits par l'AE [Lankova 2016]. Avec cette étape supplémentaire, les rendements d'extraction des HAP étaient satisfaisants car ils étaient compris entre 83% pour le B[g,h,i]P et 93% pour le Flua et étaient pour les métabolites de 78% pour le 1-OHP et de 74 % pour le 3-OHB[a]P. L'amélioration des rendements d'extraction des HAP est illustrée par le chromatogramme de la Figure 12.

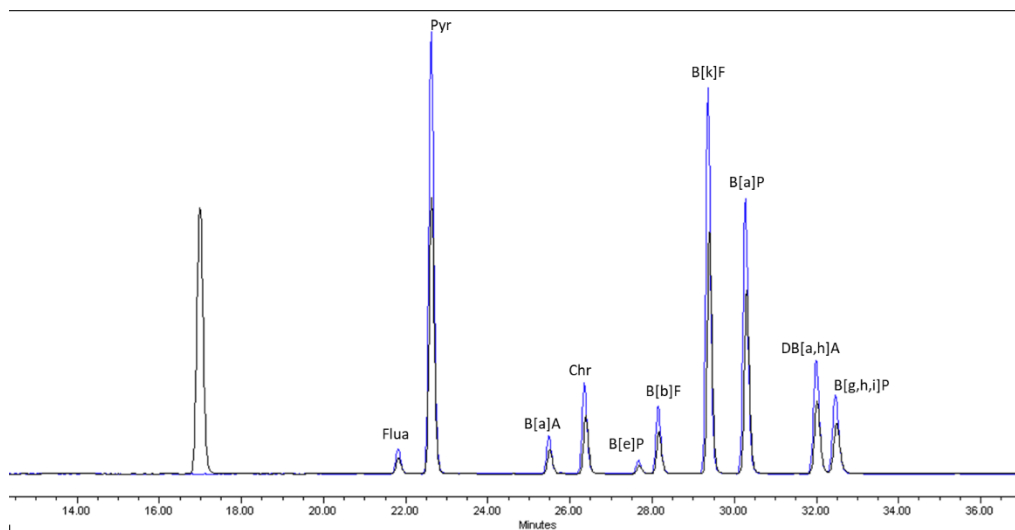


Figure 12 : Chromatogrammes de 1,5 mL de suspension fécale surchargée avec des HAP à 850 ng.g⁻¹ fèces extraite en LLE (en noir), ou extraite en LLE et dSPE (en bleu)

La méthode finale d'analyse des HAP, du 1-OHP et 3-OHB[a]P dans les fèces était la suivante: Un aliquot de 1,5 mL d'homogénat fécal a été dilué dans 4 mL de solution de tampon acétate (pH = 4,66) avant hydrolyse enzymatique avec 20 µL de β-glucuronidase-arylsulfatase. Après incubation pendant une nuit à 37°C, les échantillons ont été purifiés par double LLE avec 4 mL d'AE. Les extraits organiques (7 mL) ont été combinés et purifiés par une dSPE en utilisant des tubes Z-Sep (Supel QuE, Sigma-Aldrich).

Après évaporation à sec des surnageants d'extraction, les résidus étaient dilués dans 1 mL d'acétone/acétonitrile (ACN) (v/v). Les HAP, le 1-OHP et le 3-OHB[a]P ont été analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur un système Alliance Waters® 2695 équipé d'une colonne C18 de Waters® PAH (150 x 3 mm, 5µm) et d'un détecteur de fluorescence multi-longueur d'onde Waters® 2489 (HPLC-Fluo). Les LQ étaient comprises entre 4 et 20 pg.g⁻¹ de fèces pour les HAP et étaient de 0,5 et 5 pg.g⁻¹ de fèces pour le 1-OHP et le 3OHB[a]P.

1.2 Analyse du tétraol-B[a]P dans les fèces

L'analyse du tétraol-B[a]P a été réalisée comme décrit par Barbeau et al. (2018) avec quelques adaptations pour ajuster les volumes. 1,5 mL d'homogénat fécal a été dilué dans 5 mL de solution tampon acétate (pH = 4,66) et 8,5 mL d'eau Milli Q. Après hydrolyse enzymatique, concentration par purification sur cartouche d'extraction en phase solide (SPE) OASIS MAX (Waters) et dérivatisation par le N, O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA), l'analyse

a été réalisée à l'aide d'une chromatographie gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse à triple quadripôle 7000C équipé d'une source d'ionisation chimique négative (GC-MSMS-NCI). La LQ était de $5 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ de fèces.

2 Mise au point de l'analyse des HAP et de leurs métabolites dans le sang

2.1 Analyse des HAP dans le sang

Pour la mise au point de l'analyse des HAP particulières dans le sang, une LLE a été testée avec différents solvants : AE [Marie 2010, Moreau 2015b], et cyclohexane (CH) [Van Schooten 1997].

Le choix du solvant d'extraction est basé sur l'importance du bruit de fond obtenu avec chaque solvant. Ainsi, le CH est retenu comme solvant d'extraction pour les HAP car il présentait moins de pics parasites au niveau des temps de rétention des HAP d'intérêt (Figure 13).

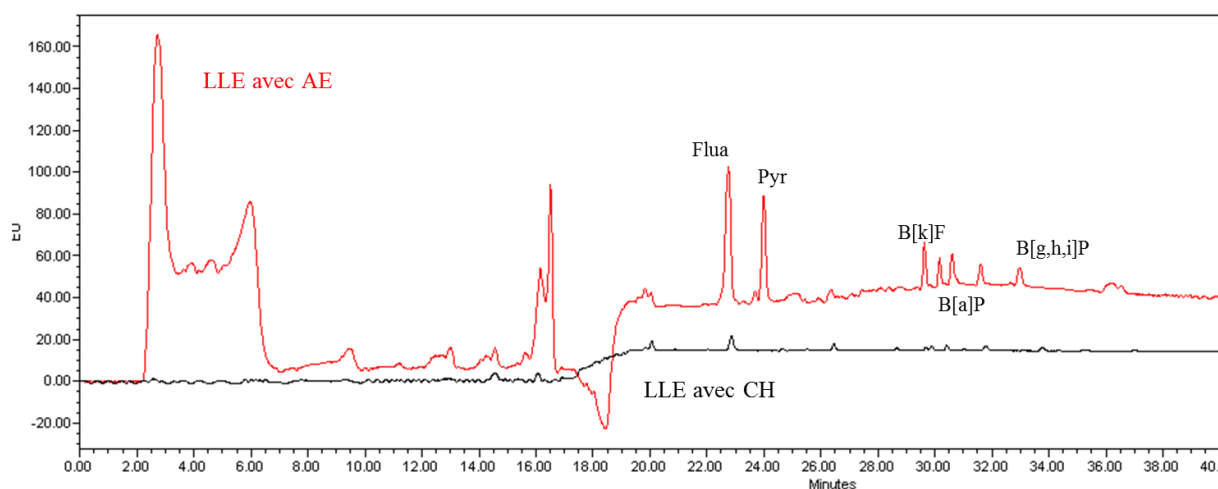


Figure 13: Chromatogrammes de 100 μl de sang témoin surchargé avec des HAP extraits par le cyclohexane (en noir) et l'acétate d'éthyle (en rouge)

La méthode finale d'analyse des HAP dans le sang était la suivante :

Un échantillon de $100 \mu\text{L}$ était dilué dans 2 mL de solution de tampon acétate ($\text{pH} = 4,66$) puis une double LLE avec 5 mL de CH était réalisée. Après évaporation à sec du solvant organique, le résidu était dissous dans $250 \mu\text{L}$ d'ACN. Les rendements d'extraction étaient compris entre 80 et 100 %.

L'analyse des HAP était réalisée à l'aide d'une HPLC-Fluo équipée d'une colonne C18 de Waters® PAH (250 x 3 mm, 5µm). La LQ variait entre 0,3 ng.mL⁻¹ (pour le B[a]P) et 1,6 ng.mL⁻¹ (pour le Pyr).

2.2 Analyse du 1-OHP et du 3-OHB[a]P dans le sang

Pour le dosage du 3-OHB[a]P, 2 méthodes d'extraction ont été testées : une LLE avec AE selon la méthode décrite par Moreau et Bouchard (2015b) et une LLE avec dichlorométhane et ACN suivie d'une dSPE selon la méthode décrite par Mülek et Högger (2015). Les rendements d'extraction étaient respectivement 68-74 % et 58-61 %. Ainsi, la méthode de Moreau et Bouchard a été retenue.

Six échantillons sanguins ont été analysés. Après extraction, chaque échantillon était injectés 2 fois en HPLC-Fluo. Le pic du 3-OHB[a]P n'a pas été détecté dans 25 % des injections (3 injections sur les 12 injections). Suite à ce problème, différentes hypothèses ont été testées :

- Problème lié aux choix de mauvaises longueurs d'onde pour détecter le 3-OHB[a]P dans la matrice sanguine
- Problème lié à la rétention de 3-OHB[a]P sur la colonne d'analyse HPLC
- Problème lié à la matrice sanguine : le sang contient des composés lipidiques qui peuvent être extraits par la LLE sur lesquels peut se fixer le 3-OHB[a]P.

Suite à ces différentes hypothèses, plusieurs essais ont été réalisés avec changement des longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour la détection du 3-OHB[a]P, changement du solvant de reprise du résidu sec (100 µL MeOH + 100 µL acétone) pour permettre une meilleure dissolution du résidu, changement du gradient du solvant d'élution, changement de colonne. La LQ obtenue était de 250 ng.L⁻¹ pour 3-OHB[a]P mais le rendement d'extraction était seulement de 48 %.

Au cours du développement de la méthode, différents problèmes sont apparus : importante variabilité de pic du 3-OHB[a]P pour un même échantillon sanguin extrait sur 2 jours différents (Figure 14), absence de détection du pic du 3-OHB[a]P dans certains points de la gamme.

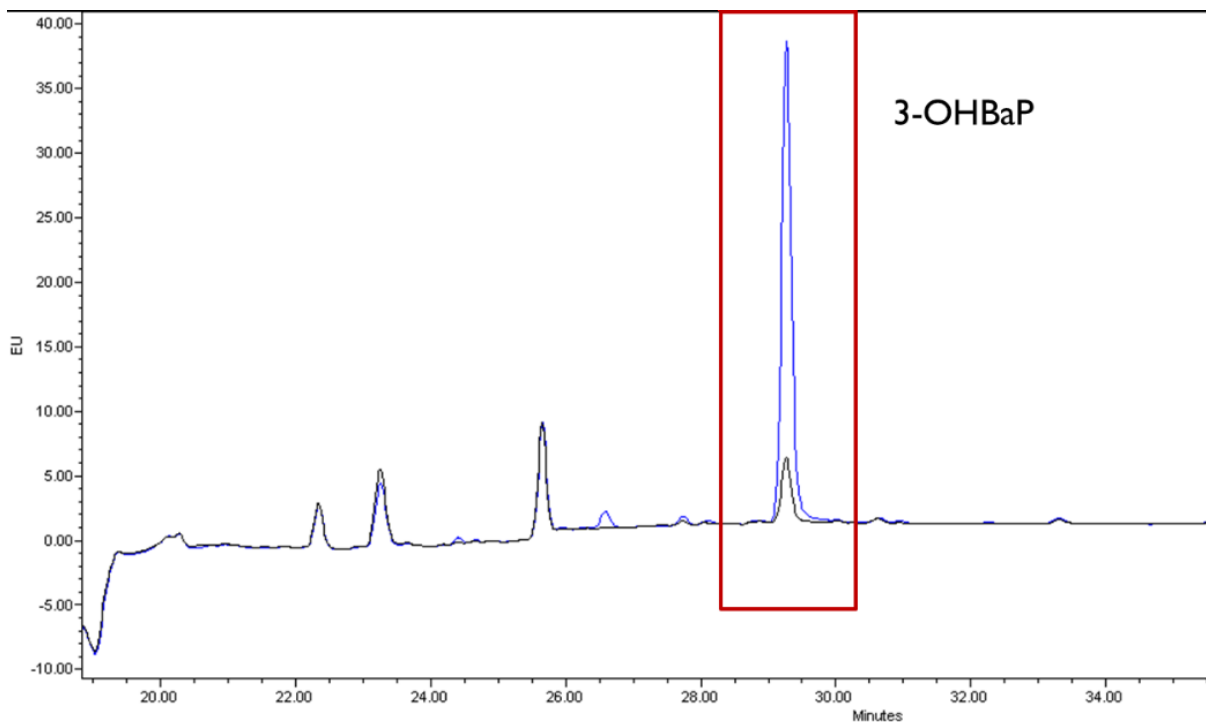


Figure 14 : Chromatogrammes d'un même échantillon sanguin extrait 2 fois par LLE avec l'acétate d'éthyl et repris dans 200 μ L ACN/acétone (v/v)

Suite à ces problèmes, une étude bibliographique a été menée pour essayer de mieux comprendre ces variations et de rechercher de nouvelles méthodes d'extraction du 3-OHB[a]P sanguin. Sugiraha et al. avaient montré que le 3-OHB[a]P se liait de façon covalente à l'hémoglobine ce qui rendait difficile son extraction par les solvants organiques et que la fraction libre du 3-OHB[a]P était oxydée en B[a]P-3,6-dione [Sugihara 2003]. Ceci explique que le 3-OHB[a]P libre dans le sang soit instable car il se lie aux protéines et molécules sanguines et subit des oxydations rendant ainsi le dosage du 3-OHB[a]P non répétable au niveau sanguin.

Le même problème était observé pour le 1-OHP.

Ainsi, l'analyse du 3-OHB[a]P et du 1-OHP dans le sang a malheureusement dû être abandonnée.

2.3 Analyse du tétraol-B[a]P dans le sang

L'analyse du tétraol-B[a]P a été réalisée comme décrit par Barbeau et al. (2018) avec quelques adaptations des volumes : 100 μ L de sang ont été dilués dans 5 mL de solution tampon acétate

(pH = 4,66) et 10 mL d'eau Milli Q. Après hydrolyse enzymatique, concentration par purification et dérivatisation au BSTFA, l'analyse a été réalisée à l'aide d'une GC-MSMS-NCI. La LQ était de 2 pg.mL⁻¹.

3 Mise au point de l'analyse des HAP dans les organes

La méthode d'analyse des HAP dans les organes (foie et reins) était identique à celle appliquée pour les fèces : 3 g de foie ou 1 rein entier étaient broyés avec 4 mL de tampon d'acétate (pH = 4,66). Un aliquot de 2 mL de la suspension obtenue était dilué dans 4 mL de solution de tampon acétate (pH = 4,66) puis purifié par double LLE avec 4 mL d'AE. Les extraits organiques (7 mL) étaient mélangés puis purifiés par dSPE en utilisant des tubes Z-Sep (Supel QuE, Sigma-Aldrich).

Les surnageants d'extraction étaient ensuite évaporés à sec puis dilués dans 1 mL d'acétone/ACN (v/v). Les HAP étaient analysés par HPLC sur un système Alliance Waters® 2695 équipé d'une colonne C18 de Waters® PAH (150 x 3 mm, 5µm) et d'un détecteur de fluorescence multi-longueur d'onde Waters® 2489 (HPLC-Fluo). Les rendements d'extraction dans le foie variaient entre 76 % pour le B[e]P à 90 % pour le Flua. Les rendements d'extraction dans les reins variaient entre 75 % pour le B[g,h,i]P à 93 % pour le Flua. Les LQ pour le foie et les reins étaient comprises entre 0,25 et 1 ng.g⁻¹.

4 Conclusion

Au total, nous avons mis au point les analyses suivantes (Figure 15) :

Dans les fèces :

- Analyse des HAP particuliers, du 1-OHP et du 3-OHB[a]P par HPLC-Fluo après extraction par double LLE suivie d'une dSPE. Les LQ étaient comprises entre 4 et 20 pg.g⁻¹ pour les HAP et étaient de 0,5 et 5 pg.g⁻¹ pour le 1-OHP et le 3OHB[a]P.
- Analyse du tétraol-B[a]P par GC-MSMS-NCI après extraction par SPE. La LQ était de 5 pg.g⁻¹ de fèces.

Dans le sang :

- Analyse des HAP particuliers par HPLC-Fluo après extraction par double LLE. Les LQ variaient entre 0,3 ng.mL⁻¹ pour le B[a]P et 1,6 ng.mL⁻¹ pour le Pyr.

- Analyse du tétraol-B[a]P par GC-MSMS-NCI après extraction par SPE. La LQ était de 2 pg.mL⁻¹.

- L'analyse du 3-OHB[a]P et du 1-OHP a été abandonnée du fait d'un manque de reproductibilité des analyses

Dans le foie et les reins :

- Analyse des HAP particulières par HPL-Fluo après extraction par double LLE suivie d'une dSPE. Les LQ étaient comprises entre 0,25 et 1 ng.g⁻¹.

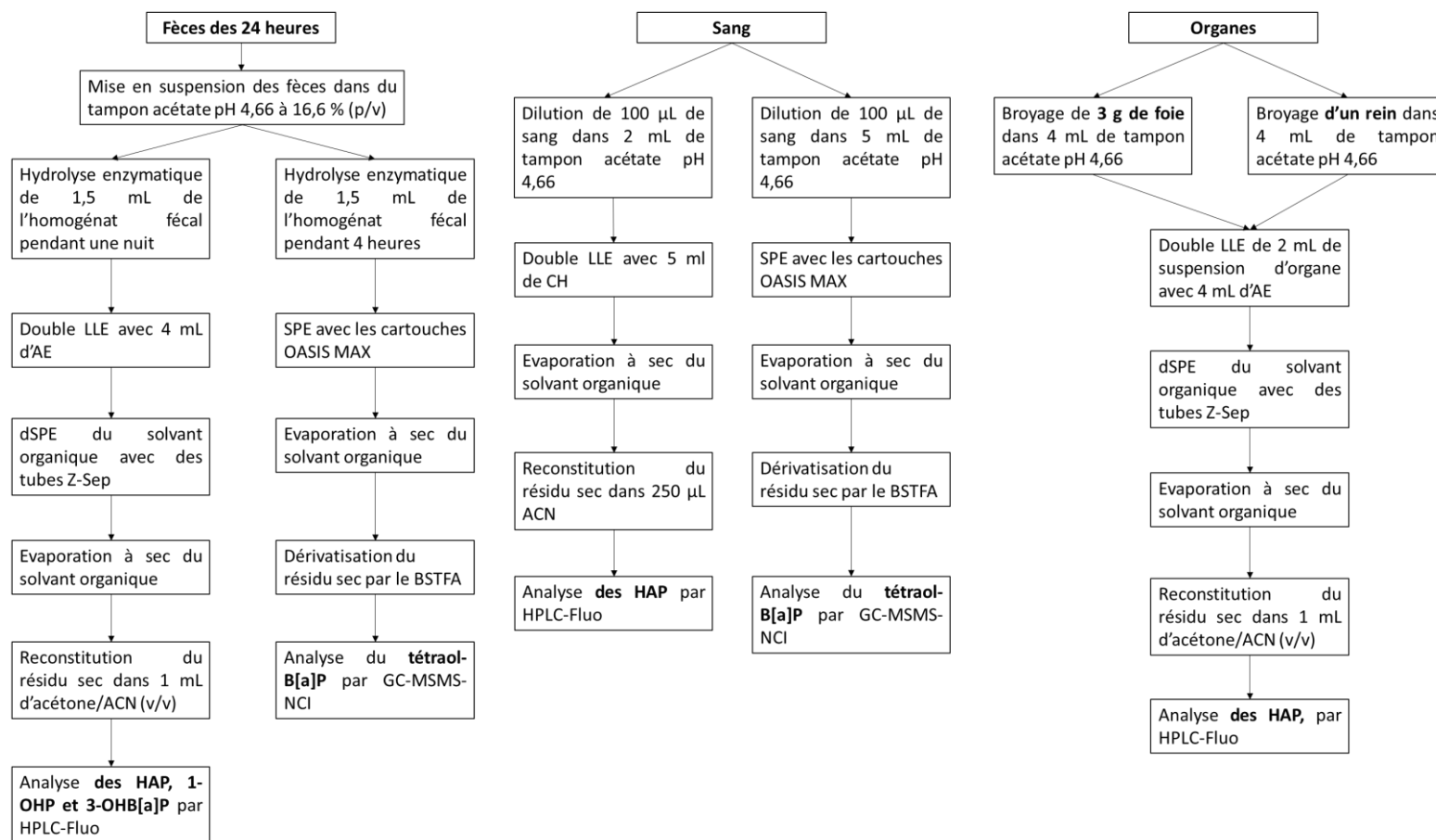


Figure 15 : Analyse des HAP et leurs métabolites dans les fèces, le sang et les organes.

ACN : acétonitrile, AE : acétate d'éthyle, BSTFA : *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide, CH : cyclohexane, dSPE : extraction en phase solide dispersive, GC-MSMS-NCI : chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse en ode tandem avec une source d'ionisation chimique négative, HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique, HPLC-Fluo : chromatographie liquide haute performance avec détection fluorescence, LLE : extraction liquide-liquide, SPE : extraction en phase solide, tétraol-B[a]P : tétraol-benzo[a]pyrène, 1-OHP : 1-hydroxypyrrène, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène.

Chapitre III : Analyse des HAP particulaires et leurs métabolites dans les fèces et les organes de rats exposés au B[a]P seul ou à un mélange de HAP

Comme nous l'avons montré précédemment (Partie II, Chapitre I), l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P (3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P) était diminuée de 50 % après une semaine d'exposition au B[a]P en mélange (0,2-CTP) par comparaison au B[a]P seul à la même dose (0,2-B[a]P) (Partie II, Chapitre I, Paragraphe 3). Ceci pourrait être expliqué par une diminution de l'absorption des HAP avec le mélange et/ou à une augmentation du métabolisme intestinal diminuant ainsi la quantité de B[a]P absorbée. De plus cette diminution de l'élimination urinaire des métabolites du B[a]P pourrait être due à une diminution du métabolisme hépatique avec le mélange suite à une saturation et/ou une compétition enzymatique entre les différents HAP du mélange. Toutefois après 10 semaines d'exposition, l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P était identique entre le mélange (0,2-CTP) et le B[a]P seul (0,2-B[a]P) alors que celle du tétraol-B[a]P restait diminuée avec le mélange. De plus, l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P était augmentée seulement avec le groupe du B[a]P à faible dose (0,02 B[a]P).

En complément de l'analyse des métabolites urinaires, le B[a]P et ses métabolites ont été analysés dans les fèces des groupes 0,2-B[a]P et 0,2-CTP afin de voir si l'exposition au mélange (0,2-CTP) avait une influence sur l'absorption et le métabolisme intestinal du B[a]P.

Les dosages sanguins du B[a]P et du tétraol-B[a]P n'ont pas pu être réalisés car nous ne disposions pas d'échantillon de sang. Enfin, les niveaux de B[a]P ont été dosés dans le foie et le rein. Tous les résultats étaient tous inférieurs aux LQ, soit $< 0,25 \text{ ng.g}^{-1}$ pour le foie et $< 1 \text{ ng.g}^{-1}$ pour le rein ce qui ne nous a pas permis d'étudier l'effet mélange.

1 Calcul de différents paramètres et analyses statistiques

La quantité de croquettes consommée par jour a été calculée en divisant la quantité de croquettes consommée pendant le séjour dans la cage métabolique (72 heures) par 3.

Le poids des fèces ajusté à la quantité de croquettes a été calculé en divisant la moyenne des valeurs des 3 jours du poids des fèces par la quantité des croquettes consommée par jour.

L'élimination fécale des HAP et de leurs métabolites a été calculée en pourcentage de la dose administrée du HAP parent. Elle a été calculée par l'équation suivante :

$$\frac{\text{Somme de la quantité de HAP ou du métabolite éliminé pendant 3 jours} * 100}{\text{Quantité du HAP administrée pendant 3 jours}}$$

L'étude de la variabilité entre les 2 groupes (0,2-B[a]P et 0,2-CTP) de la quantité de croquettes consommée par jour, du poids des fèces, de l'élimination fécale des HAP et de leurs métabolites à la 1^{ère} et 10^{ème} semaine a été réalisée par le test de Kruskal-Wallis.

L'étude de la variabilité entre la 1^{ère} et la 10^{ème} semaine de la quantité de croquettes consommée par jour, du poids des fèces, de l'élimination fécale des HAP et leurs métabolites a été réalisée par le test de Wilcoxon pour les données appariées.

Pour les tests statistiques, une valeur *p* inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

2 Effet du mélange sur la toxicocinétique du B[a]P

2.1 Effet du mélange sur l'alimentation de rats

Durant la 1^{ère} semaine, la quantité de croquettes consommées par jour ainsi que le poids des fèces éliminé par jour ajusté à la quantité de croquettes consommées étaient identiques entre les rats SD exposés au B[a]P seul (0,2-B[a]P) et ceux exposés au mélange contenant la même quantité de B[a]P (0,2-CTP) (Tableau 20).

Tableau 20 : Quantité de croquettes consommées par jour et poids des fèces éliminés par jour chez des rats SD exposés pendant 10 semaines au B[a]P à 0,2 mg.kg-1.J-1 (0,2 B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP ajusté à 0,2 mg.kg-1.J-1 B[a]P (0,2 CTP)

		0,2 B[a]P	0,2 CTP
Quantité de croquettes consommées par jour (g.J ⁻¹)	Semaine 1	31,3 ± 6,1	30,6 ± 3,1
	Semaine 10	20,7 ± 2,6*	20,2 ± 2,6*
Poids des fèces ajusté à la quantité de croquettes consommées (g.g ⁻¹)	Semaine 1	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,05
	Semaine 10	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,07

Les valeurs correspondent à la moyenne ± écart-type (n = 5 rats par groupe). * : *p* < 0,05 en comparaison avec la semaine 1.

2.2 Effet du mélange sur l'absorption intestinale du B[a]P

L'élimination fécale du B[a]P était 2 fois plus faible dans le groupe 0,2-CTP par rapport au groupe 0,2-B[a]P au cours de la première semaine (6,2 % versus 3,0 %; *p* = 0,01) (Figure 16).

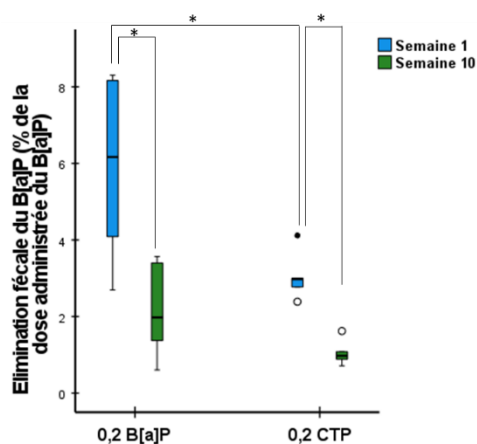


Figure 16 : Elimination fécale du B[a]P chez des rats SD exposés au B[a]P à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ (0,2 B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P (0,2 CTP) pendant 10 semaines
 Les valeurs correspondent au pourcentage de la dose administrée du B[a]P (n = 5 rats par groupe). Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25^{ème}, 50^{ème} et 75^{ème} percentiles, le maximum. Le sigle ° représente des valeurs extrêmes * : p < 0,05.

L'élimination fécale du B[a]P pendant la 1^{ère} semaine d'exposition (6,2 %) est du même ordre de grandeur que celle rapportée dans d'autres études portant sur l'exposition au B[a]P seul. En effet, après l'administration de 0,1 et 1 mg.kg⁻¹ de B[a]P à des rats Fischer F-344, 7,8 et 5,6 % de la dose ont été retrouvés dans les fèces [Hecht 1979]. Après exposition orale de rats SD à une dose plus élevée de 10 mg.kg⁻¹, 4 % du B[a]P ont été retrouvés dans les fèces [Moreau 2015b].

La réduction de l'élimination fécale du B[a]P quand celui-ci est administré en mélange ne peut pas s'expliquer par une augmentation de l'absorption du B[a]P car plusieurs études indiquent que l'absorption des HAP diminue lorsqu'ils sont en mélanges [Bartosek 1984, Ramesh 2001] et que ceci va à l'encontre de la diminution des niveaux de métabolites urinaires que nous avons mesurés avec le mélange. L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer la diminution de l'élimination fécale du B[a]P est l'augmentation du métabolisme intestinal du B[a]P avec le mélange. Pour étayer cette hypothèse, nous avons analysé les métabolites du B[a]P dans les fèces.

2.3 Effet du mélange sur le métabolisme intestinal du B[a]P

Alors que le pourcentage de B[a]P éliminé sous forme de tétraol-B[a]P après une semaine d'exposition était 50 % plus élevé avec le mélange par comparaison au B[a]P seul (0,0051 %

versus 0,0035 % ; $p = 0,032$), le pourcentage de B[a]P éliminé sous forme de 3-OHB[a]P était 50 % plus faible avec le mélange (6,3 % versus 9,6 % ; $p = 0,008$) (Figure 17).

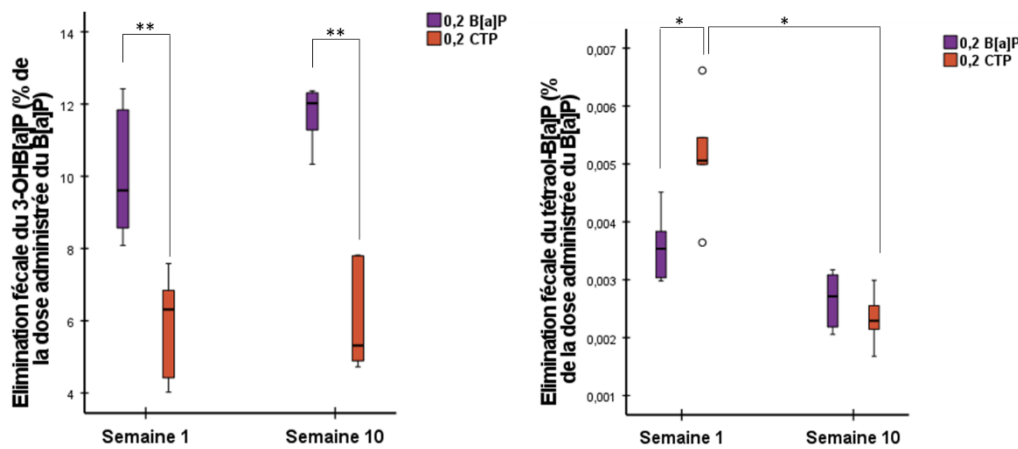


Figure 17 : Elimination fécale du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P chez des rats SD exposés au B[a]P à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ (0,2 B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P (0,2 CTP) pendant 10 semaines

Ces valeurs sont exprimées par le pourcentage de la dose administrée du B[a]P (n = 5 rats par groupe). Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25^{ème}, 50^{ème} et 75^{ème} percentiles, le maximum. Le sigle ° représente des valeurs extrêmes * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

Après exposition au B[a]P seul, les pourcentages de B[a]P éliminés dans les fèces que nous avons mesurés sous forme de métabolites sont du même ordre de grandeur que ceux rapportés dans la littérature. En effet, après une injection intraveineuse de rats SD de 10 mg.kg⁻¹ de B[a]P, 12,9 ± 1,0 % de la dose administrée a été retrouvé dans les fèces sous forme de 3-OHB[a]P [Marie 2010]. De plus, 7,6 % et 0,0023 % du B[a]P ont été retrouvés dans les fèces respectivement sous forme de 3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P après une exposition orale de rats SD à 10 mg.kg⁻¹ de B[a]P [Moreau 2015b]. Enfin, après exposition orale de rats Lewis à 0,03 mg.kg⁻¹ de B[a]P, 8,8 % de la dose de B[a]P étaient éliminés dans les fèces sous forme de 3-OHB[a]P [van Schooten 1997].

Après une semaine d'exposition, le pourcentage du 3-OHB[a]P mesuré dans les fèces était plus faible avec le mélange que le B[a]P seul, alors que celui du tétraol-B[a]P était plus élevé. Ces résultats sont différents de ceux observés au niveau urinaire chez les mêmes rats, où les pourcentages du 3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P étaient plus faibles après exposition au mélange qu'après exposition au B[a]P pur [El Hajjar 2023]. Cette différence pourrait être expliquée par une différence d'induction enzymatique avec le mélange entre l'intestin et le foie, et par une orientation du métabolisme vers la voie de bio-activation au niveau intestinal et une saturation

ou compétition enzymatique au niveau hépatique. En effet, l'expression des CYP varie entre l'intestin et le foie. Chez les rats, les CYP les plus exprimés dans l'intestin sont 1A1, 1B1 et 3A1 et, à un niveau moindre, 2C6 et 2C11. D'autres CYP (1A2, 2A1, 2B2, 2E1, 3A2 et 4A1) ne sont pas exprimés dans l'intestin alors qu'ils sont présents dans le foie du rat. Le CYP 1A1, principal CYP de métabolisme du B[a]P, n'est pas exprimé à l'état basal dans le foie du rat et nécessite une induction pour être exprimé [Zhang 1996]. Dans l'intestin, les CYP 1A1 et 1B1 sont les CYP les plus induits après une exposition aux HAP [Fang 2010, Roos 2002, Shimada 2003] et l'induction des CYP peut se produire pour des niveaux plus faibles de HAP que ceux requis pour induire leur expression dans le foie [Roos 2002].

De plus, il semblerait qu'il existe une prédominance de la voie des diol-époxydes dans le métabolisme intestinal du B[a]P. Chez l'humain, des études épidémiologiques ont indiqué qu'une consommation élevée de B[a]P par voie orale était associée à un risque accru d'adénomes colorectaux en lien avec une augmentation de la formation du BPDE dans le côlon [Martínez Góngora 2019, Sinha 2005]. Enfin, différentes études ont montré que la formation d'adduits à l'ADN dans l'épithélium du côlon passait par la voie des diol-époxydes [Alexandrov 1996, Autrup 1978].

2.4 Conclusion générale sur l'effet du mélange sur la toxicocinétique du B[a]P

Les analyses du B[a]P et de ses métabolites au niveau des fèces ont permis d'apporter des données sur l'absorption et le métabolisme intestinal du B[a]P et de compléter les données centrées sur les métabolites urinaires (partie 2, Chapitre I) après exposition à un mélange d'HAP (Figure 18).

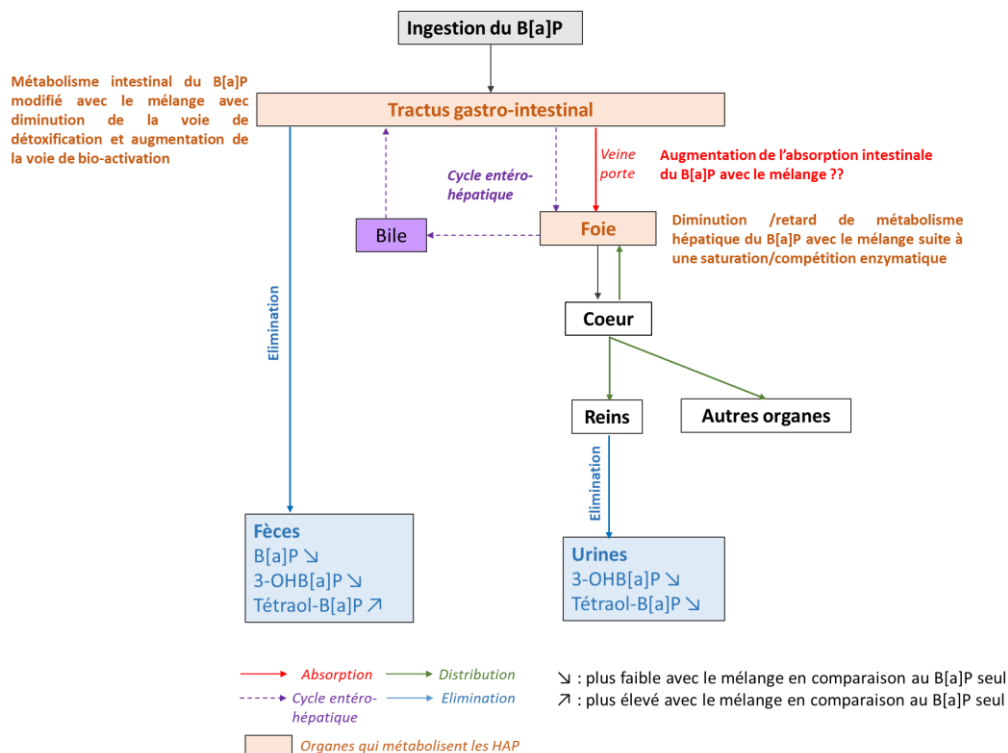


Figure 18 : Effet du mélange sur la toxicocinétique du benzo[a]pyrène

B[a]P : benzo[a]pyrène, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène.

L'exposition au mélange n'entraîne aucun effet sur l'alimentation (quantité de croquettes consommées par jour, poids des fèces ajusté à la quantité des croquettes) et l'hydratation des rats (volume et créatinine urinaires). Par contre, le mélange semble modifier le métabolisme intestinal du B[a]P avec une augmentation préférentielle de la voie de bio-activation du B[a]P générant ainsi une augmentation du tétraol-B[a]P au niveau des fèces. L'exposition au mélange pourrait également augmenter l'absorption intestinale du B[a]P expliquant la baisse du B[a]P fécal et il serait intéressant de doser le B[a]P au niveau sanguin pour confirmer cette hypothèse. Enfin, le mélange semble diminuer ou retarder le métabolisme hépatique du B[a]P du fait d'une saturation et/ou d'une compétition enzymatique expliquant la baisse des niveaux de métabolites urinaires.

3 Effet de l'exposition répétée sur la toxicocinétique des HAP

3.1 Effet de l'exposition répétée sur l'alimentation de rats

La quantité de croquettes consommées par jour ainsi que le poids des fèces éliminé par jour ajusté à la quantité de croquettes consommées étaient restés identiques entre les rats SD exposés au B[a]P seul (0,2-B[a]P) et ceux exposés au mélange contenant la même quantité de B[a]P (0,2-CTP) à la 10^{ème} semaine d'exposition (Tableau 20).

Après 10 semaines d'exposition, la quantité de croquettes consommées par jour diminuait de 34 % par rapport à la semaine 1, quel que soit le groupe alors que le poids des fèces éliminé par jour ajusté à la quantité de croquettes consommées restait identique (Tableau 20).

3.2 Effet de l'exposition répétée sur l'absorption intestinale des HAP

A la 10^{ème} semaine d'exposition, l'élimination fécale du B[a]P est devenue identique entre les 2 groupes (1,7 % *versus* 1,0 % ; $p = 0,485$) (Figure 16) alors qu'elle était 2 fois plus faible avec le mélange durant la 1^{ère} semaine.

Après 10 semaines d'exposition, les pourcentages de B[a]P éliminés dans les fèces étaient 57 et 68 % plus faibles que ceux de la semaine 1 pour les groupes 0,2-B[a]P et 0,2-CTP respectivement ($p = 0,043$) (Figure 16). Dans le groupe 0,2-CTP, les pourcentages des autres HAP (Flua, Chr, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[j]F, IP, B[g,h,i]P) éliminés dans les fèces étaient également diminués de 34 à 78 % ($p = 0,043$), à l'exception du Pyr et du DB[a,h]A, pour lesquels seule une tendance à la baisse a été observée ($p = 0,08$) (*résultats non montrés*).

La diminution de l'élimination fécale des HAP après une exposition répétée peut s'expliquer par une augmentation de l'absorption digestive des HAP et là encore, il aurait été intéressant d'analyser les HAP au niveau sanguin. Cette augmentation d'absorption pourrait être expliquée pour une part par la diminution de la consommation de croquettes après 10 semaines d'exposition entraînant une plus grande proportion de B[a]P libre au niveau intestinal. Un autre facteur pourrait être l'altération de l'intégrité de la barrière intestinale en lien avec une inflammation de la muqueuse iléale et colique après une exposition répétée. Celle-ci a été mise en évidence chez la souris après une exposition de 28 jours à 50 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P [Rivière 2016], avec une diminution de certaines souches de bactéries comme les Lactoacillaceae, Mucispirillum et Ruminococcaceae ou une augmentation d'autres souches comme les Desulfovibrionaceae. Ces dernières sont en effet connues pour être liées à des maladies inflammatoires, telles la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn [Rooks 2014, Vignaen 2013, Wang 2010]. L'exposition aux HAP modifie le microbiote intestinal [He 2019] qui, à son tour,

peut entraîner des changements dans l'absorption du B[a]P et dans son métabolisme. En effet, après un co-traitement de B[a]P et de Lactobacillus, l'élimination fécale du B[a]P augmente de 50 % par rapport à l'exposition au B[a]P seul [Liu 2021]. Toutefois, la relation entre microbiote, métabolisme et absorption des HAP est complexe et encore mal élucidée.

La diminution de l'élimination fécale des HAP après une exposition répétée peut également être expliquée par une augmentation du métabolisme intestinal des HAP ce qui explique que nous allons là encore analyser les métabolites du B[a]P dans les fèces.

3.3 Effet de l'exposition répétée sur le métabolisme intestinal des HAP

La diminution du 3-OHB[a]P observée durant la 1^{ère} semaine avec le mélange était retrouvée après 10 semaines (11,1% *versus* 6,1%; $p = 0,002$) (Figure 17) alors qu'il n'y avait plus de différence pour le tétraol-B[a]P entre les 2 groupes (0,0029% *versus* 0,0024%, $p = 0,589$) (Figure 17).

Après 10 semaines d'exposition, le pourcentage de B[a]P éliminé dans les fèces sous forme de 3-OHB[a]P était comparable à celui de la première semaine d'exposition, et ce pour les 2 groupes (0,2-B[a]P et 0,2-CTP) (Figure 17). Dans le groupe 0,2-CTP, le pourcentage de Pyr éliminé sous forme de 1-OHP était également comparable entre la 1^{ère} et la 10^{ème} semaine (7,44 % contre 6,38 % respectivement, $p = 0,500$) (*résultats non montrés*). Alors que ceci restait vrai pour le pourcentage éliminé sous forme de tétraol-B[a]P pour le groupe 0,2-B[a]P, ce pourcentage était diminué de 50 % dans le groupe 0,2-CTP ($p = 0,043$) (Figure 17).

Ainsi, après une exposition répétée, les pourcentages de HAP éliminés dans les fèces sous forme de métabolites ne sont pas augmentés ce qui n'est pas en faveur avec une augmentation du métabolisme intestinale des HAP mais plutôt avec une augmentation de l'absorption du B[a]P. Celle-ci pourrait expliquer la diminution du pourcentage de B[a]P éliminé dans les fèces sous forme de tétraol-B[a]P après exposition au mélange.

3.4 Conclusion générale sur l'effet de l'exposition répétée sur la toxicocinétique des HAP

L'exposition répétée aux HAP augmente l'absorption intestinale des HAP en lien avec une diminution de la quantité de croquettes consommées mais probablement aussi avec une inflammation de la muqueuse intestinale et/ou une modification de la composition du microbiote. Cette augmentation d'absorption de B[a]P pourrait expliquer la diminution du pourcentage de B[a]P éliminé dans les fèces sous forme de tétraol-B[a]P après exposition au mélange. **Le métabolisme hépatique pourrait être augmenté avec les faibles doses.** Cependant, avec les fortes doses et le mélange, le métabolisme hépatique n'est pas augmenté probablement suite à une saturation du système enzymatique dès la 1^{ère} semaine d'exposition (Figure 19).

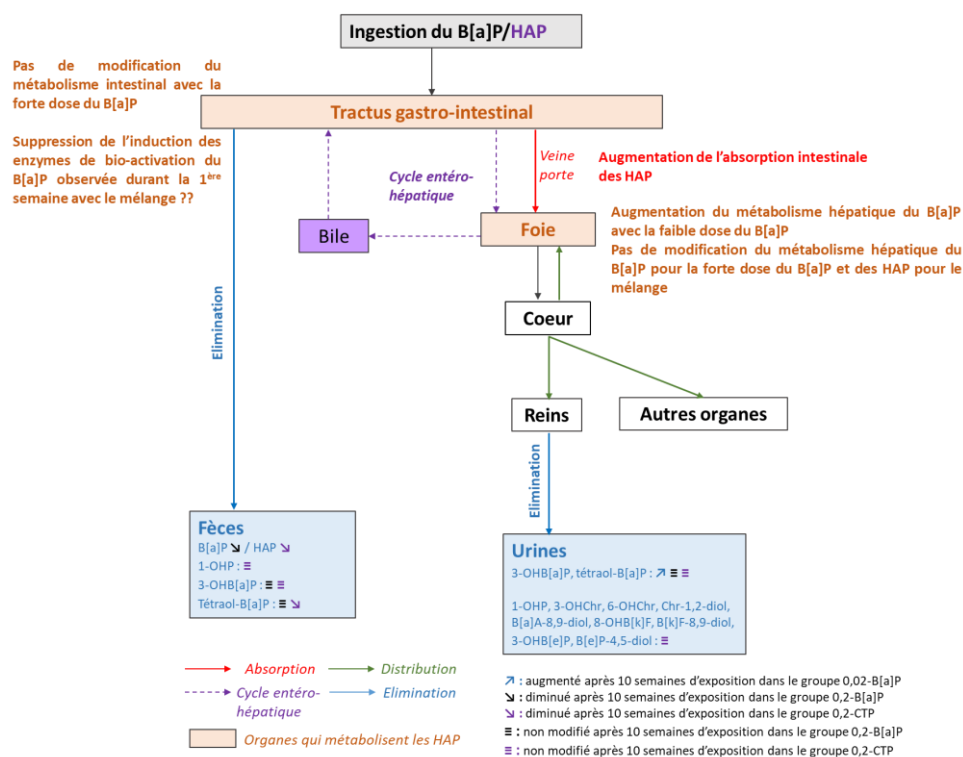


Figure 19 : Effet de l'exposition répétée sur la toxicocinétique des HAP

B[a]P : benzo[a]pyrène, HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, 1-OHP : 1-hydroxypyrene, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène, 3-OHB[e]P : 3-hydroxybenzo[e]pyrène, 3-OHChr : 3-hydroxychrysène, 6-OHChr : 6-hydroxychrysène, 8-OHB[k]F : 8-hydroxybenzo[k]fluoranthène. 0,02-B[a]P : groupe de rats recevant le B[a]P seul à 0,02 mg.kg⁻¹.J⁻¹, 0,2-B[a]P : groupe de rats recevant le B[a]P seul à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹, 0,2-CTP : groupe recevant le mélange de HAP à base de CTP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P

Pour approfondir nos résultats, il serait intéressant d'étudier :

- les autres voies de bio-activation du B[a]P (comme l'analyse du B[a]P-1,6-dione et le B[a]P-3,6-dione) et essayer de les comparer avec les autres métabolites du B[a]P analysés régulièrement comme le 3-OHB[a]P et le tétraol-B[a]P dans les mêmes matrices (comme dans les microsomes hépatiques)

- l'activité enzymatique des CYP et de l'EH dans le foie et les intestins à différents moments de l'exposition pour vérifier si l'induction enzymatique persiste tout au long de l'exposition ou si elle disparaît après une exposition répétée
- le microbiote intestinal et la vérification de l'effet du mélange sur celui-ci.

Ainsi, nos résultats montrent que la présence d'autres HAP a une influence sur la toxicocinétique des HAP avec des effets qui sont différents selon la durée d'exposition. Ceci est très important pour la compréhension des effets sanitaires liés à l'exposition chronique aux HAP éliminés dans l'environnement sous forme de mélange complexe dont la composition varie considérablement en fonction de l'origine de l'exposition. De plus, ces facteurs doivent être pris en considération lors de la détermination des VTR.

Chapitre IV : Impact du choix du modèle expérimental (modèle animal) dans les études de toxicologie : Influence des facteurs génétiques et environnementaux sur la toxicocinétique du B[a]P seul ou inclus dans un mélange complexe

1 Introduction et objectifs

En recherche, l'utilisation de modèles animaux est très fréquente. Selon le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche, en 2021, l'utilisation de modèles animaux a représenté 35 % des études de recherche fondamentale, 25 % des études en recherche appliquée et 31 % des études toxicologiques réglementaires [Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation 2023]. Selon cette même source, il apparaît que 1 893 897 animaux (61 % des souris, 9 % des rats, 9 % des lapins, 8 % des poissons, et 13 % autres espèces avec hamsters, cobayes, furets, poulets, cochons d'Inde, chats, chien, primates, ...) ont été utilisés en 2021 [Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation 2023]. La mise en place de ces protocoles est très contrôlée et doit répondre à différentes exigences pour obtenir l'accord des comités d'éthiques. En effet, toutes les expériences sur les modèles animaux doivent être conduites dans le respect du bien-être animal et selon la règle des 4R « Remplacer, Réduire, Raffiner, Responsabilité ».

La toxicologie est une branche des sciences biologiques qui étudie les effets néfastes des substances chimiques, physiques ou éventuellement microbiologiques sur la santé des êtres vivants. Malgré l'existence des modèles *ex vivo* (organes isolés par exemple), *in vitro* (modèles cellulaires, organes sur puce) ou *in silico* (modèle toxicocinétique à base physiologique (PBPK), modèle relation quantitative structure-activité (QSAR)) qui permettent de réaliser des screenings, d'étudier des mécanismes d'action toxiques, de prédire des dangers et ainsi de répondre partiellement aux problématiques de remplacement et de réduction, les modèles animaux offrent de nombreux avantages en toxicologie, en particulier les modèles rongeurs. Ainsi, les modèles animaux sont aujourd'hui encore indispensables malgré l'essor de ces méthodes alternatives pour évaluer les effets toxiques des produits chimiques sur l'être humain pour différentes raisons :

- ***Les interactions entre les organes et les tissus*** : Les modèles animaux fournissent une image plus complète de la circulation des substances dans l'organisme (toxicocinétique), des effets toxiques d'un produit chimique en examinant ses interactions entre différents organes et tissus, ainsi que les effets potentiels sur

l'ensemble de l'organisme. Les modèles *in vitro* ne permettent pas de reproduire cette complexité dans son intégralité et ne prennent souvent en compte qu'un seul type de cellule ou de tissu. De plus, les différents organes peuvent communiquer ensemble par l'intermédiaire des systèmes nerveux, circulatoires comme le sang et la lymphe qui peuvent permettre la circulation des protéines, des hormones, des cytokines, des vésicules extracellulaires, des microARN, des métabolites [Bayraktar 2017, Ramachandra 2012, Wang 2021]. La construction des modèles PBPK qui intègrent la toxicocinétique des substances s'appuient sur des résultats le plus souvent issus d'études animales.

- **La métabolisation des produits chimiques** : Les produits chimiques sont souvent métabolisés par l'organisme au niveau de plusieurs organes et tissus avant d'exercer leurs effets toxiques et /ou d'être éliminés. De même, une substance peut être métabolisée dans un organe et avoir une action toxique à distance de cet organe. Les modèles animaux permettant d'appréhender l'organisme dans son entière complexité.
- **Les réponses comportementales** : Les effets toxiques d'un produit chimique peuvent également se manifester par des réponses comportementales, telles que l'agressivité, la perte de coordination, la somnolence, la perte de la mémoire, ... Même si, l'interprétation des résultats des tests de comportement est très délicate les modèles animaux permettent d'appréhender cet aspect de la toxicologie.
- De plus, les modèles animaux sont nécessaires pour étudier **les effets à long terme** des substances chimiques sur la santé.

Cependant, outre le fait que l'utilisation des animaux à des fins de recherche et d'évaluation de risque présente des questionnements éthiques, il est important également de souligner la difficulté d'extrapoler des résultats obtenus sur des modèles rongeurs, à l'homme. Les différences anatomiques, physiologiques et biochimiques peuvent influencer la façon dont les substances chimiques sont absorbées, distribuées, métabolisées et excrétées par les animaux, ce qui peut limiter la pertinence de ces modèles pour prédire les effets chez l'homme et qui oblige lors de la détermination des VTR à prendre une marge de sécurité pour pallier à cette variabilité inter-espèce. De plus, les réponses aux substances chimiques peuvent varier en fonction de l'espèce animale, de l'âge, du sexe et de l'état de santé [Le magueresse-Battistoni 2020], d'où l'importance des lignes directrices internationales pour les tests sur les animaux en toxicologie et en recherche, qui ont été développées pour standardiser les tests d'évaluation des risques toxiques sur les modèles animaux. Ils existent plusieurs types de lignes directrices : les lignes

directrices internationales de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), celles de l'Union Européenne (UE), celles du « National Institutes of Health » (NIH) des États-Unis, et celles du Programme National de Toxicologie (NTP) des États-Unis. Ces lignes directrices fournissent des recommandations précises pour la réalisation des tests sur les animaux, afin de garantir leur reproductibilité et leur fiabilité. Ces lignes directrices diffèrent par leurs objectifs. Par exemple, celles du NTP visent les études concernant l'évaluation des risques toxicologiques des produits chimiques, et celles du NIH visent les études destinées à la recherche bio-médicale. Mais même avec ces lignes directrices, le choix du modèle rongeur reste parfois difficile et variable selon le contexte des études. Il est donc important de considérer tous ces aspects lors du choix d'un modèle pour évaluer les effets toxiques d'un produit chimique. Ainsi, un certain nombre de questions peuvent se poser lors de la réflexion sur la mise en place d'un modèle animal : Quelle est la souche la plus pertinente ? Quel sexe ? Quel âge ? Quel régime alimentaire ? Quelles expositions pour se rapprocher d'une exposition humaine (voie d'exposition, doses, durée, mélanges de substances) ? Quel niveau de standardisation pour diminuer la reproductibilité mais prendre en compte les variabilités inter-individus ? Combien d'animaux pour avoir une expérience significative ?

L'objectif de cette partie de mon travail de thèse a été d'étudier l'influence de certains de ces facteurs (génétiques et environnementaux) sur la toxicocinétique des HAP. Ces composés sont une famille de molécules ubiquitaires de l'environnement étudiée depuis de nombreuses années par notre laboratoire qui nous permette d'appréhender ces questions selon l'angle des expositions à des mélanges complexes qui constitue un réel enjeu en toxicologie aujourd'hui. De plus, notre laboratoire était partenaire d'un projet financé par l'ANSES intitulé « *Utilisation des microARNs circulants comme indicateurs d'exposition aux HAP seuls et en mélange (miR Expo)* » porté par Pr Lydie Sparfel de l'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (UMR_S 1085) qui nous a amené à nous poser un certain nombre de questions avant de finaliser le choix de notre protocole d'exposition de rongeurs aux HAP. Ce projet avait comme objectif la recherche de nouveaux biomarqueurs d'effet aux HAP en mélanges sur un modèle murin par différentes approches : les microARN en collaboration avec l'équipe de Pr Lydie Sparfel, la protéomique en collaboration avec la plateforme Prométhée avec le Pr Michel Sève et le Dr Sandrine Bourgoïn.

Les particularités, la toxicocinétique et les effets toxiques des HAP sont décrits dans la première partie de ma thèse (Partie I, Chapitres I et II) et ne seront pas repris dans ce chapitre.

Les facteurs que nous avons choisis d'étudier sont classés en 2 catégories :

Facteurs génétiques :

La variabilité inter-souche a été le premier facteur génétique étudié.

Une souche de rats fait référence aux rats de laboratoire ayant été reproduits dans l'isolement sur plusieurs générations. Une souche de rat est créée par reproduction pour produire des rats similaires entre eux pouvant donc être utilisés pour la recherche. Wistar, Fischer, et Sprague Dawley, et leurs certaines de divisions internes, sont des exemples de souches de rats.

Une souche non-consanguine est définie comme le résultat de moins de 20 générations d'accouplement entre frères et sœurs. Une souche consanguine est définie comme le résultat de plus de 20 générations d'accouplements entre frères et sœurs.

En effet, selon les guidelines OCDE sur la toxicocinétique n°417, le choix de l'espèce animale ainsi que le choix de la souche doit se faire selon la littérature en utilisant le modèle animal le plus utilisé avec la substance d'essai concernée [OCDE 2010]. Ainsi concernant les études de toxicocinétique des HAP, l'espèce animale la plus utilisée est le rat (*Rattus Norvegicus*) mais avec différentes souches : SD [Bouchard 1996, 1998a, 1998b, 2002, Cao 2005, Foth 1988, Kadry 1995, Kang 2007, Kim 2012, Laher 1984, 1987, Marie 2010, Moreau 2015a, 2015b, Rahman 1986, Ruzgyte 2006, Stavric 1994, Tzekova 2004, Wiersma 1983], W [Elovaara 2003, Grimmer 1988, 1997, Jacob 1989, Jongeneelen 1984, Kawamura 1988, Lipniak-Gawlik 1998, Ruzgyte 2006], Fischer F-344 [Hecht 1979, Ramesh 2001, Walker 2007], Long-Evans [Grova 2017], Lewis [Godschalk 2000]. Cependant, peu d'études ont comparé la toxicocinétique des HAP entre les différentes souches de rat. Ruzgyte et al. (2006) ont montré qu'après exposition au pyrène à différentes doses (0,01; 0,1; 1 et 10 mg.kg⁻¹) par voie intra-veineuse, l'élimination urinaire du 1-OHP était diminuée par 2 chez les W (0,3 – 0,4 %) en comparaison aux SD (0,6 – 0,8 %), sans étude de l'équipement enzymatique. ***Il nous est donc paru intéressant de comparer la toxicocinétique des HAP dans leur ensemble (et pas seulement le Pyr) sur les 2 souches de rats les plus utilisées dans la littérature : les SD et les W.***

La variabilité inter-individuelle : ce facteur est connu chez les humains qui présentent des différences variées (au niveau génétique, mode de vie, maladie sous-jacente, état nutritionnel, ...) ce qui les rend plus ou moins susceptibles à certaines substances ou à certaines maladies. Ainsi, ce facteur est pris en compte lors de la définition des VTR en appliquant un facteur d'incertitude maximal de 10 lorsqu'aucun élément d'information sur ce sujet n'est disponible [ANSES 2017, INERIS 2016]. Ainsi pour étudier cette variabilité inter-individuelle sur la toxicocinétique des différentes molécules, nous avons étudié les différences entre individus d'une même souche de rats non consanguins.

Une colonie non-consanguine (outbred) : produit des animaux homogènes, génétiquement indéfinis, sauf éventuellement pour certains caractères évidents, comme la couleur du pelage. L'effectif de la population doit être élevé, sans apport extérieur (colonie fermée). Le système d'accouplement inclut les reproducteurs dans une table de nombres au hasard. La sélection est donc minimale et les animaux présentent des caractères relativement stables dans le temps. Les modèles de rats non-consanguins sont génétiquement diversifiés. Comme l'homme présente une variabilité génétique, ces modèles sont utiles pour prédire comment les variations génétiques sont liées aux maladies.

Une colonie consanguine (inbred) : Les rats consanguins sont créés par l'accouplement d'au moins 20 générations de combinaisons frère/sœur ou parent/enfant, dans le but d'atteindre l'homozygotie. L'accouplement se poursuit jusqu'à ce que les descendants soient génétiquement identiques à leurs parents, uniformité phénotypique pour la plupart des caractères (couleurs du pelage, potentiel enzymatique), et que chaque organisme individuel puisse être traité comme un clone (ils sont similaires à 99,5 %).

Facteurs environnementaux :

Le jeûne : dans les guides pratiques de l'expérimentation animale, il n'y a pas d'indication sur une éventuelle mise à jeun des rats avant l'intervention expérimentale lors de l'étude de la toxicocinétique de produits chimiques [OECD 2010]. Or, dans les études intégrant des paramètres métaboliques, ou des approches -omiques (protéomique, métabolomique), la prise alimentaire à des moments différents et en quantité différente par les rats peut avoir une influence majeure sur les résultats, ce qui amène à proposer parfois une mise à jeun des rats

avant l'euthanasie. Dans ce contexte et dans le but de préparer un nouveau protocole d'exposition pour faire des analyses de protéomique, nous avons souhaité étudier l'influence du jeûne sur la toxicocinétique des HAP.

D'autre part, il est important de noter que cette étude de l'influence de ces différents facteurs sur la toxicocinétique d'une substance chimique a été réalisée à partir de différents protocoles expérimentaux dont certains ont été conçus avec d'autres objectifs. Les conditions expérimentales ne sont donc pas toujours idéales et peuvent présenter quelques faiblesses qui limitent certaines interprétations. Ces limites seront discutées dans la partie Discussion générale. Néanmoins, cette étude apporte des informations importantes sur certains paramètres à considérer lorsque l'on construit une étude de toxicologie.

2 Matériels et méthodes

2.1 Expérimentations animales

Tous ces protocoles impliquant des animaux ont été préalablement examinés par le comité d'éthique local " Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale no.#12, Cometh-Grenoble" et approuvés par le Ministère de la Recherche (APAFIS#16910-2018092816061560v2 et APAFIS#27189-2020091414284549 v6).

Les protocoles ont été réalisés au niveau de la Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA) à l'UGA (Grenoble, France), EU0197, Accord C38-51610006, dans des conditions spécifiques d'absence de pathogènes, dans un environnement à température contrôlée avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures et un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (LASQC diet ROD-16R®, Grenobios, France).

L'hébergement des animaux et les protocoles étaient effectués conformément aux recommandations de la Direction des Services Vétérinaires, Ministère de l'Agriculture de France, conformément à la Directive 2010/63/UE du Conseil des Communautés Européennes et aux recommandations de la Fédération des Associations Européennes de Science des Animaux de Laboratoire.

2.2 Protocoles animaux pour l'étude des effets génétiques et environnementaux sur la toxicocinétique du B[a]P

Trois protocoles ont été utilisés (Figure 20).

	Facteurs génétiques : Variabilité inter-espèce		
		Facteurs génétiques : Variabilité inter-individuelle	Facteurs environnementaux : Le jeûne
	PROTOCOLE 1	PROTOCOLE 2	PROTOCOLE 3
Souche de rats	Sprague Dawley (SD) âgés de 6 semaines	Wistar (W) âgés de 11 semaines	Wistar (W) âgés de 11 semaines
Groupes	<ul style="list-style-type: none"> B[a]P à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ (0,2 B[a]P) Mélange CTP de HAP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P (0,2 CTP) 	<ul style="list-style-type: none"> B[a]P à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ (0,2 B[a]P) Mélange CTP de HAP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P (0,2 CTP) 	<ul style="list-style-type: none"> B[a]P à 2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ (2 B[a]P)
Exposition	1 fois.J ⁻¹ , 5 fois.semaine ⁻¹ pendant 10 semaines	1 fois.J ⁻¹ pendant 4 jours	1 fois.J ⁻¹ pendant 4 jours
Cage métabolique	Passage des rats dans les cages métaboliques pendant 3 jours (du lundi matin au jeudi matin) Récupération des urines et des fèces à S1 et S10	Passage des rats dans les cages métaboliques pendant 3 jours (du lundi matin au jeudi matin) Récupération des urines et des fèces à S1	Passage des rats dans les cages métaboliques pendant 3 jours (du lundi matin au jeudi matin) Récupération des urines et des fèces à S1
Mis à jeun des rats	16 heures avant l'euthanasie	4 heures avant l'euthanasie (directement après le 4 ^{ème} gavage)	20 heures avant l'euthanasie (16 heures avant le dernier gavage)
Euthanasie des rats	24 heures après le dernier gavage	4 heures après le 4^{ème} gavage	4 heures après le 4^{ème} gavage
Analyses des HAP et leurs métabolites	Fèces : HAP, 1-OHP, 3-OHB[a]P, tétraol-B[a]P Urines : 1-OHP, 3-OHB[a]P, tétraol-B[a]P, métabolites monohydroxylés et diol des HAP	Fèces : HAP, 1-OHP, 3-OHB[a]P, tétraol-B[a]P Urines : 1-OHP, 3-OHB[a]P, tétraol-B[a]P, métabolites monohydroxylés et diol des HAP Sang : HAP, tétraol-B[a]P	Fèces : HAP, 3-OHB[a]P, tétraol-B[a]P Urines : 3-OHB[a]P, tétraol-B[a]P Sang : B[a]P, tétraol-B[a]P

Figure 20 : Protocoles animaux pour l'étude de l'effet des facteurs génétiques et environnementaux sur la toxicocinétique des HAP

Protocole 1 : Etude de l'effet mélange lors d'une exposition chronique

Le premier protocole était celui décrit dans El Hajjar et al. (2023). Brièvement, des rats SD de 6 semaines (n=7) étaient exposés à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P (0,2-B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP à base de CTP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P (0,2-CTP) durant 5 jours par semaine pendant 10 semaines. Au début de chaque semaine, les rats étaient pesés afin d'ajuster la quantité de HAP administrée aux poids des animaux. Durant la première et la dixième semaine, les rats ont été placés dans une cage métabolique individuelle pendant 72 heures (dont 24h d'acclimatation) pour récupérer les urines et les fèces. La consommation de nourriture et

la consommation d'eau ont été mesurées pendant les 3 premiers jours de la première, la cinquième et la dixième semaine. Après 10 semaines, les rats ont été euthanasiés par inhalation de dioxyde de carbone (CO₂). Les rats ont été mis à jeun 16 heures avant l'euthanasie.

Protocole 2 : Projet *miRExpo*

Le deuxième protocole a été conduit avec des rats W de 11 semaines (n=10) qui ont été exposés à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P (0,2-B[a]P) ou à un mélange industriel de HAP à base de CTP ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ (0,2-CTP) pendant 4 jours consécutifs. Au début de la semaine, les rats ont été pesés afin d'ajuster la quantité de HAP administrée aux animaux. Directement après le premier gavage, les rats ont été placés dans une cage métabolique individuelle pendant 72 heures (dont 24h d'acclimatation) pour récupérer les urines et les fèces. La consommation de nourriture et la consommation d'eau ont été mesurées pendant leur séjour dans la cage métabolique. Après le 4^{ème} et dernier gavage, les rats ont été mis à jeun pendant 4 heures pour être euthanasiés par inhalation de CO₂. Les organes et le sang ont été récupérés après euthanasie.

Protocole 3 : Etude préliminaire du projet *miRExpo*

Ce protocole a été conduit pour étudier l'effet du jeûne sur la toxicocinétique du B[a]P. Il faisait partie des études préliminaires ayant pour objectif de fixer les différents paramètres (comme la dose de B[a]P, le temps entre le dernier gavage et l'euthanasie des rats) du protocole animal destiné à la recherche de nouveaux biomarqueurs d'effet de l'exposition du B[a]P seul ou en mélange (projet *miRExpo*). Vu le nombre de paramètres à déterminer, il a fallu réaliser plusieurs études préliminaires. Compte tenu du R de réduire de la règle des 4R, chacune de ces études préliminaires n'a pu être réalisée qu'avec 3 rats par groupe.

Le protocole a été mené avec 3 rats W de 11 semaines. La dose de 2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ a été choisie car c'était la plus faible dose avec laquelle on pouvait doser le B[a]P et les autres HAP dans le sang.

Deux groupes de rats (n=3) étaient exposés à 2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P pendant 4 jours consécutifs. Au début de la semaine, les rats ont été pesés afin d'ajuster la quantité de HAP administrée aux animaux. Directement après le premier gavage, les rats ont été placés dans une cage métabolique individuelle pendant 72 heures (dont 24 h d'acclimatation) pour récupérer les urines et les fèces. La consommation de nourriture et la consommation d'eau ont été mesurées pendant leur séjour dans la cage métabolique. 4 heures après le 4^{ème} gavage, les rats ont été euthanasiés par inhalation de CO₂ et les organes et le sang ont été récupérés.

Dans un groupe, les rats ont eu accès à l'eau et à la nourriture jusqu'à l'euthanasie alors que dans le deuxième groupe, les rats ont été mis à jeun 16 heures avant l'euthanasie avec accès à l'eau.

2.3 Analyse des HAP et de leurs métabolites dans les fèces, le sang et les urines

Alors que les analyses des métabolites urinaires des HAP étaient déjà réalisées au laboratoire depuis de nombreuses années [Barbeau 2011, 2018, Marques 2021], les analyses des HAP et/ou de leurs métabolites (1-OHP, 3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P) dans le sang, les fèces et les organes (foie et reins) ont été développées durant ma thèse. Elles ont été présentées dans la Partie II, Chapitre II.

2.4 Calcul des différents paramètres

Le poids des fèces éliminés par jour, le volume urinaire éliminé par jour et la créatinine urinaire éliminée par jour ont été calculés par la moyenne des valeurs des 3 jours.

La quantité de croquettes consommée par jour et la quantité d'eau bue par jour ont été calculées en divisant la quantité de croquettes consommée ou la quantité d'eau bue pendant le séjour dans la cage métabolique (72 heures) par 3.

L'élimination fécale et urinaire des HAP et de leurs métabolites a été calculée en pourcentage de la dose administrée du HAP parent. Elle a été calculée par l'équation suivante :

$$\frac{\text{Somme de la quantité de HAP ou du métabolite éliminé pendant 3 jours} * 100}{\text{Quantité du HAP administrée pendant 3 jours}}$$

Pour le calcul de la quantité des HAP dans le sang en % de la dose administrée, la formule suivante a été appliquée :

$$\frac{\text{Concentration sanguine de HAP} * \text{Volume sanguin de rat} * 100}{\text{Quantité de HAP administrée par jour}}$$

Le volume sanguin de rat a été calculé selon le poids du rat avec une approximation de 6 mL de sang pour 100 g de poids corporel [Diehl 2001].

Pour l'étude de l'effet du jeûne, **le pourcentage de variation de l'élimination fécale** du B[a]P **entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour de gavage** a été calculée par l'équation suivante :

$$\frac{(\% \text{ de l'élimination fécale du B[a]P à J3} - \% \text{ de l'élimination fécale du B[a]P à J2}) * 100}{\% \text{ de l'élimination fécale du B[a]P à J2}}$$

Le pourcentage de variation de l'élimination fécale ou urinaire des métabolites du B[a]P entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour de gavage a été calculée par l'équation suivante :

$$\frac{(\% \text{ de l'élimination du métabolite à J3} - \% \text{ de l'élimination du métabolite à J2}) * 100}{\% \text{ de l'élimination du métabolite à J2}}$$

Pour l'étude de la variabilité inter-individuelle, **le coefficient de variation (CV)** a été calculé selon l'équation suivante :

$$\frac{\text{Ecart - type} * 100}{\text{Moyenne}}$$

2.5 Analyses statistiques

L'étude de la variabilité entre les 2 souches a été réalisée par le test de Kruskal-Wallis.

La variation inter-individuelle est considérée comme très faible avec un CV < 10 %, et faible avec un CV entre 10 et 20 % [Aronhime 2014].

Les corrélations entre les différents paramètres ont été faites par la corrélation de Spearman.

Pour les tests statistiques, une valeur *p* inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

2.6 Présentation des résultats

Pour la présentation de l'effet des différents facteurs sur la toxicocinétique des HAP, les résultats seront présentés de la façon suivante :

- Effet du facteur étudié sur les paramètres généraux qui peuvent influencer l'absorption intestinale : quantité des croquettes consommées, poids des fèces éliminés
- Effet du facteur étudié sur l'absorption intestinale : avec analyse des HAP dans les fèces
- Effet du facteur étudié sur le métabolisme intestinal : avec analyse des métabolites des HAP (1-OHP, 3-OHB[a]P, tétraol-B[a]P) dans les fèces.

- Effet du facteur étudié sur les paramètres généraux qui peuvent influencer l'élimination urinaire des métabolites : quantité d'eau bue, volume urinaire et créatinine urinaire
- Effet du facteur étudié sur le métabolisme hépatique des HAP et l'élimination urinaire de leurs métabolites : avec analyse des métabolites des HAP dans les urines.
- Effet du facteur étudié sur l'absorption intestinale et le métabolisme hépatique des HAP : avec analyse des HAP dans le sang prélevé dans l'aorte

La figure 21 montre le plan de présentation des résultats avec les différents facteurs étudiés.

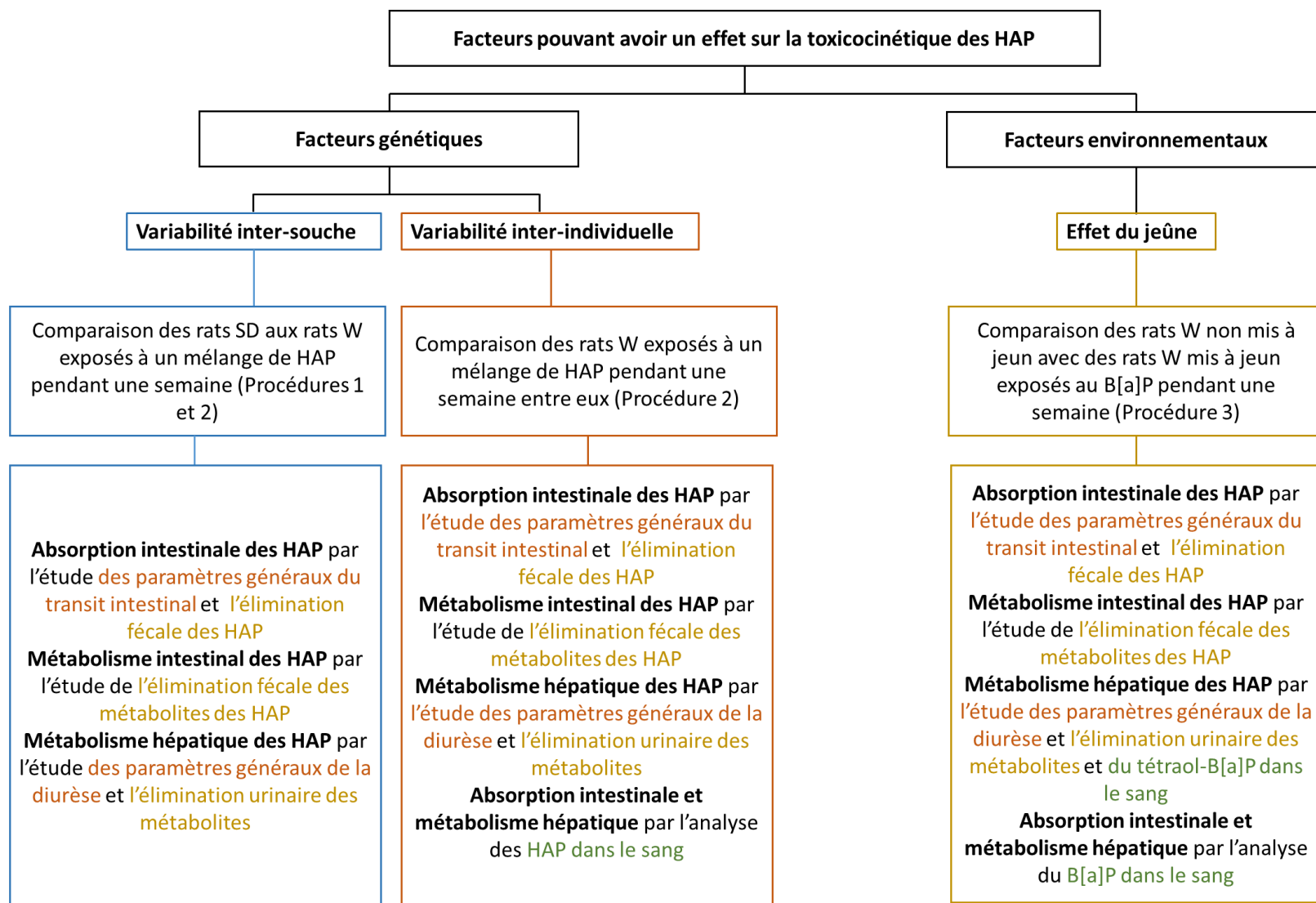


Figure 21 : Plan de présentation des résultats des facteurs pouvant avoir un effet sur la toxicocinétique des HAP

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, B[a]P : benzo[a]pyrène, SD : Sprague Dawley, W : Wistar.

3 Résultats et discussion

3.1 Facteurs génétiques

Les résultats des facteurs génétiques (variabilités inter-souche et inter-individuelle) sur la toxicocinétique du B[a]P étaient similaires chez des rats exposés au B[a]P seul à $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ (0,2-B[a]P) à ceux des rats exposés au mélange (0,2-CTP). Aussi, pour faciliter la compréhension des résultats, seuls les résultats des variabilités inter-souche et inter-individuelle sur la toxicocinétique des HAP (y compris celles du B[a]P) chez les rats exposés au mélange de HAP ajusté à $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P (0,2-CTP) seront présentés.

3.1.1 Variabilité inter-souche (SD versus W) de la toxicocinétique des HAP

Pour répondre à cette question, nous avons comparé les rats SD du protocole 1 après une semaine d'exposition aux rats W du protocole 2. L'exposition était pour les 2 groupes de 1 semaine au mélange de HAP ajusté à $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P (0,2-CTP). Toutefois, l'âge des rats étaient différents : 6 semaines pour les SD dans le protocole 1 qui étudiait l'exposition répétée au mélange et 11 semaines pour les W dans le protocole 2 qui n'était conduit que sur une semaine.

3.1.1.1 Variabilité inter-souche sur les paramètres généraux influençant l'absorption intestinale

La quantité de croquettes consommées par jour ajustée au poids corporel était plus élevée chez les SD âgés de 6 semaines ($119 \text{ g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$) que chez les W âgés de 11 semaines ($55 \text{ g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$) ($p < 0,001$) (Figure 22).

Cette différence de consommation de croquettes entre les 2 souches pouvait être expliquée par la différence d'âge des 2 souches de rats. **En effet, la quantité de croquettes consommées par jour ajustée au poids corporel diminue avec l'âge chez les rats SD ($p = 0,018$) (Figure 22).**

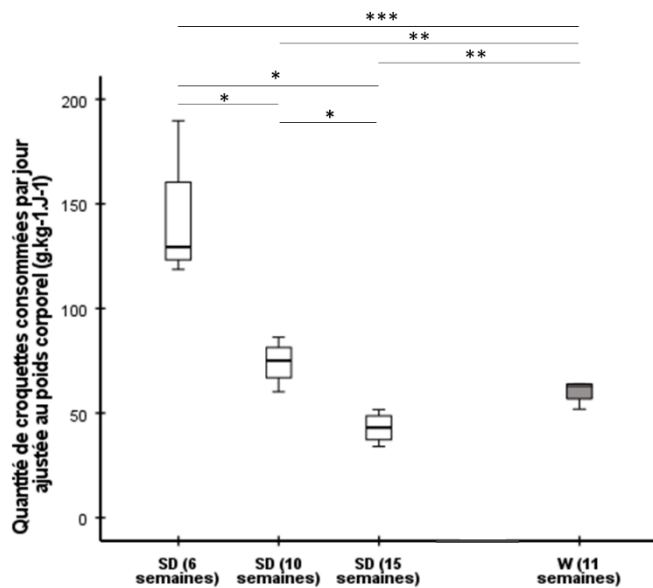


Figure 22 : Quantité de croquettes consommées par jour ajustée au poids corporel des rats chez les rats Sprague Dawley (SD) âgés de 6, 10 et 15 semaines (en blanc) et chez les rats Wistar (W) âgés de 11 semaines (en gris) exposés à un mélange de HAP

n=7 rats pour SD, et n = 10 rats pour W. Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25^{ème}, 50^{ème} et 75^{ème} percentiles, le maximum. Le sigle ° représente des valeurs extrêmes. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$; *** : $p < 0,001$.

A l'âge de 6 semaines, les rats SD étaient en pleine croissance et consommaient plus de croquettes qu'à l'âge de 10 semaines où la courbe de croissance commençait à se stabiliser et qu'à l'âge de 15 semaines où la courbe de croissance atteignait un plateau (Figure 23).

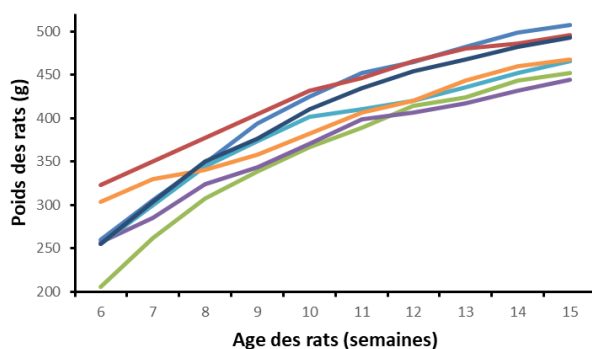


Figure 23 : Courbe de croissance des rats SD de l'âge de 6 semaines à l'âge de 15 semaines

Chaque droite correspond à la courbe de croissance d'un rat.

Toutefois à âge comparable, la quantité de croquettes consommées par jour ajustée au poids corporel reste plus élevée chez les SD que chez les W. En effet, elle était de $74 \text{ g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ chez les SD âgés 10 semaines et de $55 \text{ g.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ chez les W âgés de 11 semaines ($p = 0,001$) (Figure 22).

En plus de l'âge, la différence de consommation de croquettes entre les 2 souches pourrait être expliquée par des **conditions d'exposition différentes**. En effet, les rats SD âgés de 10 semaines avaient déjà eu 5 semaines d'exposition, étaient dans des cages normales et étaient probablement *moins stressés que les rats W* qui étaient à leur 1^{ère} semaine d'exposition et étaient dans des cages métaboliques, ce qui pourrait influencer leur consommation alimentaire. D'autre part, il a été constaté une **agressivité plus importante chez les W** par rapport aux SD pouvant être liée à une différence inter-souche et/ou aux conditions expérimentales. Ce constat a également été fait par d'autres utilisateurs de rongeurs dans notre animalerie mais également par des utilisateurs d'autres animaleries que nous avons contactées, ce qui va plutôt dans le sens **d'une différence de comportement due au fond génétique**. Enfin, différentes études ont montré que des différences de comportement pouvaient exister entre des rats de différentes souches [Drolet 2002, Rex 1996, 2004]. Rex et al. (2004) ont montré que la modification de différentes conditions environnementales (éclairage, isolement social, durée du test) n'avait pas d'effet sur le comportement des rats SD. A l'inverse, chez les rats W, le changement des conditions environnementales aboutissait à une augmentation de l'anxiété mesurée par la durée des contacts sociaux actifs, la fréquence des contacts sociaux actifs, le temps de latence avant le premier contact.

Le poids de fèces était significativement plus élevé de 50 % chez les SD âgés de 6 semaines par rapport aux W âgés de 11 semaines ($p < 0,001$, Figure 24a). Cette différence est probablement due à une plus grande quantité des croquettes consommées par les SD que par un transit ou un péristaltisme intestinal différent entre les 2 souches. En effet, cette différence n'était plus retrouvée après ajustement du poids des fèces par la quantité des croquettes consommées ($p = 1,000$; Figure 24b) après une semaine d'exposition (figure 24b), ou après 10 semaines d'exposition (*résultats non montrés*).

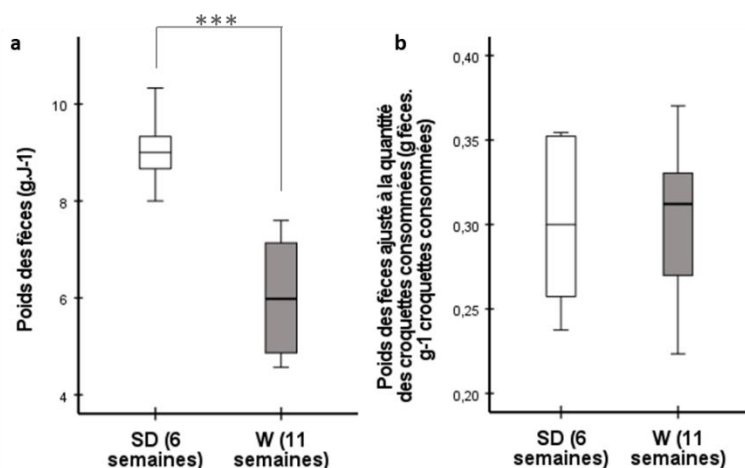


Figure 24 : Poids des fèces éliminés par jour (a) et ajusté à la quantité des croquettes consommées par jour (b) chez les rats Sprague Dawley (SD) âgés de 6 semaines (en blanc) et chez les rats Wistar (W) âgés de 11 semaines (en gris) après 1 semaine d'exposition à un mélange de HAP

n=5 rats pour SD, et n = 10 rats pour W. Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25^{ème}, 50^{ème} et 75^{ème} percentiles, le maximum. Le sigle ° représente des valeurs extrêmes. *** : $p < 0,001$.

3.1.1.2 Variabilité inter-souche de l'absorption intestinale des HAP parents

Le pourcentage des HAP totaux (somme des 12 HAP analysés) éliminés dans les fèces par rapport à la dose administrée était environ 2 fois plus élevé chez les SD (40,2 %) que chez les W (18,9 %) ($p < 0,001$) (Tableau 21). Alors que l'élimination fécale des HAP à FPM (Flua et Pyr) était identique entre les 2 souches ($p = 0,513$), celle des HAP à HPM était plus élevée chez les rats SD que chez les W ($p < 0,001$) à l'exception du B[e]P (Tableau 21).

Tableau 21: Elimination fécale des HAP parents exprimée en % de la dose administrée chez des rats Sprague Dawley (SD) (n = 5) et des rats Wistar (W) (n = 10), après exposition à un mélange de HAP

		Flua	Pyr	Chr	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[j]F	B[e]P	B[a]P	IP	B[g,h,i]P	DB[a,h]A	Somme des 12 HAP
	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	202,25	202,25	228,28	228,28	252,3	252,3	252,3	252,3	252,3	276,33	276,33	278,35	
SD	Med	3,2	1,5	2,3	2,7	2,8	3,0	7,9	3,0	3,0	4,8	4,5	7,9	40,2
	Moy	3,3	1,4	2,4	2,9	3,5	3,7	9,9	3,2	3,1	4,8	4,2	7,2	49,6
	ET	0,8	0,9	1,2	1,6	1,4	1,3	3,6	2,3	0,6	1,3	1,0	1,8	15,7
W	Med	3,9	1,4	1,1	0,8	1,0	1,0	2,1	1,0	0,7	0,9	2,3	1,2	18,9
	Moy	4,2	2,6	1,4	1,0	1,2	1,4	2,1	1,8	0,9	0,9	2,8	1,6	22,0
	ET	0,7	2,0	0,7	0,6	0,8	1,1	1,0	1,5	0,7	0,7	1,7	0,9	8,7
		0,513	0,513	0,055	0,008	0,003	0,005	<0,001	0,513	<0,001	<0,001	0,099	<0,001	<0,001

Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène, Med : médiane, Moy : moyenne, ET : écart-type.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

De plus, il apparaît que l'élimination fécale des HAP augmente avec le PM de la molécule chez les SD (Figure 25). Ceci est en accord avec la littérature qui montre que l'élimination fécale des HAP augmente avec leur PM chez différentes espèces animales comme les rats SD [Chang 1943, Rahman 1986], les hamsters [Mirvish 1981], les chèvres [Grova 2002] et les cochons [Laurent 2002]. Par contre, pour les W, l'élimination fécale des HAP n'était pas corrélée avec leur PM ($p = 0,502$) (Figure 25).

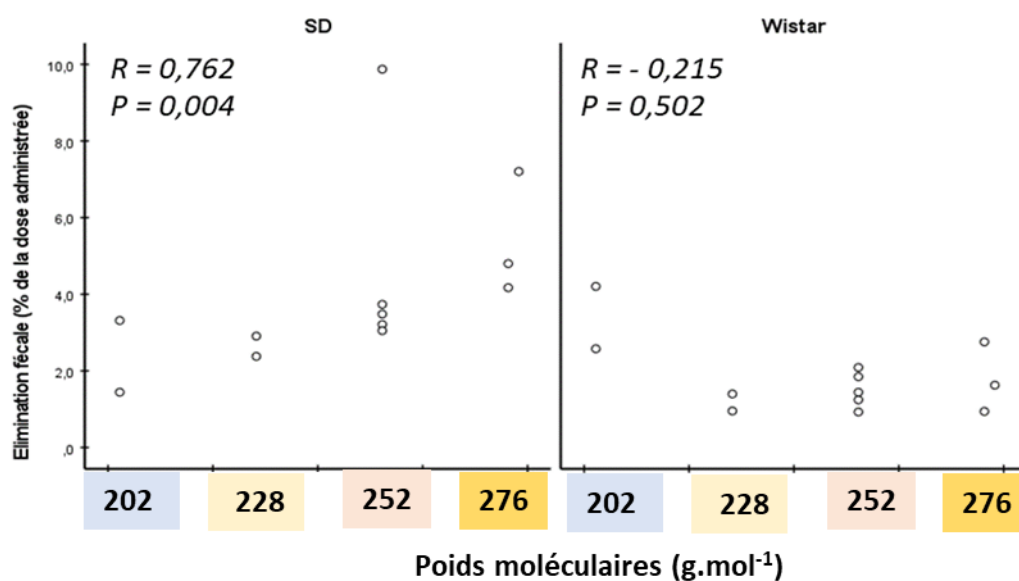


Figure 25 : Corrélation entre l'élimination fécale des HAP exprimée en % de la dose administrée et leur poids moléculaire chez des rats Sprague Dawley (SD) et des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP

n=5 rats pour SD, et n = 10 rats pour W.

De plus, le profil des pourcentages des HAP parents éliminés dans les fèces était différent entre les 2 souches de rats (Figure 26). Pour les SD, les composés majoritaires étaient le B[j]F et le DB[a,h]A et IP puis venaient par ordre décroissant : B[g,h,i]P > Flua \cong B[b]F \cong B[k]F \cong B[e]P \cong B[a]P > B[a]A \cong Chr > Pyr. Pour les W, le composé majoritaire était le Flua puis venaient par ordre décroissant : B[j]F \cong B[g,h,i]P > Pyr \cong Chr \cong B[e]P \cong DB[a,h]A > B[b]F \cong B[k]F > B[a]A \cong B[a]P \cong IP.

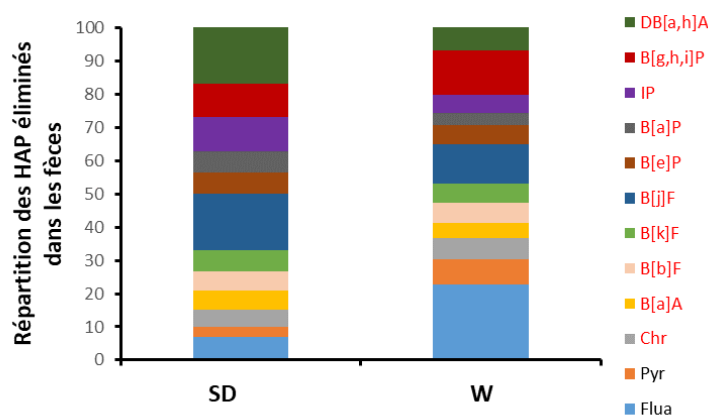


Figure 26 : Profil d'élimination fécale des HAP exprimée en % de la dose administrée chez des rats Sprague Dawley (SD) et des rats Wistar (W) exposés à un mélange de HAP

La répartition des HAP est faite à partir des valeurs médianes (n=5 rats pour SD, et n = 10 rats pour W). Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

La différence d'élimination fécale des HAP à HPM entre les 2 souches pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses :

Premièrement, l'élimination fécale des HAP plus élevée chez les SD pourrait être due à **une plus grande quantité de croquettes consommées**. En effet, les HAP à HPM vont s'adsorber sur les croquettes diminuant ainsi la quantité d'HAP libres capables de traverser la barrière intestinale. Ceci est en accord avec certaines études qui ont montré que l'élimination fécale des HAP augmentait lorsqu'ils étaient adsorbés sur une matrice solide par comparaison avec une forme libre dissoute dans une solution [Kawamura 1988, van Schooten 1997].

Deuxièmement, cette différence d'absorption des HAP à HPM pourrait être due à **une variabilité inter-souche de l'absorption intestinale des HAP à HPM**. Cette absorption plus faible chez les SD par rapport aux W avait déjà été mise en évidence pour d'autres molécules lipophiles, telles que la saikosponine [Fu 2019] ou le métoprolol [Oltra-noguera 2015] et avait été expliquée par des différences de mouvements des fluides intestinaux et du microbiote intestinal [Marques 2015] entre les 2 souches.

Enfin, cette différence pourrait être due à une **variabilité inter-souche du métabolisme intestinal des HAP à HPM** avec un métabolisme plus faible chez les SD par rapport au W. Pour vérifier cette hypothèse, les métabolites des HAP ont été analysés dans les fèces.

3.1.1.3 Variabilité inter-souche du métabolisme intestinal des HAP

Au niveau des métabolites, le pourcentage de Pyr éliminé dans les fèces sous forme de 1-OHP était identique entre les 2 souches ($p = 0,594$) (Figure 27a) ce qui va à l'encontre d'une différence inter-souche du métabolisme intestinal du Pyr.

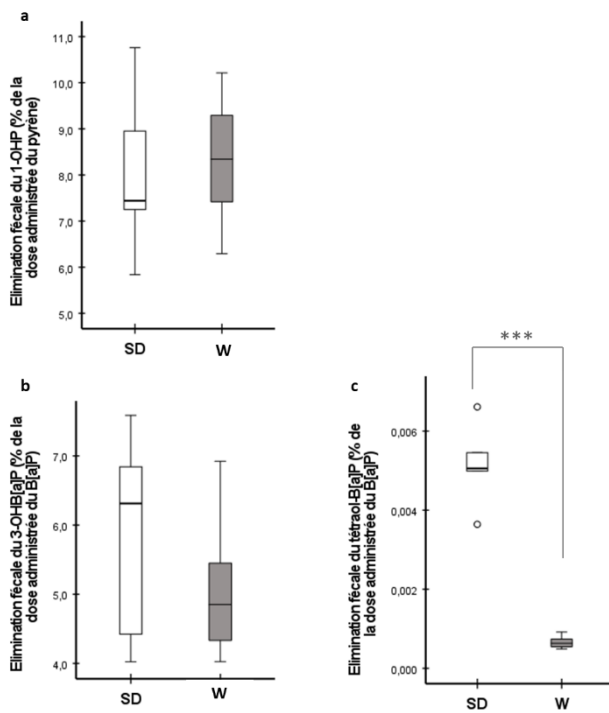


Figure 27 : Elimination fécale du 1-OHP (a), du 3-OHB[a]P (b) et du tétraol-B[a]P (c) chez les rats Sprague Dawley (SD) (en blanc) et chez les rats Wistar (W) (en gris) exposés à un mélange de HAP, exprimée en % de la dose administrée du Pyr et du B[a]P respectivement

$n=5$ rats pour SD, et $n = 10$ rats pour W. Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25ème, le 50ème, le 75ème percentiles et le maximum. Le sigle ° représente des valeurs extrêmes. *** : $p < 0,001$.

Il en est de même pour le pourcentage de B[a]P éliminé sous forme de 3-OHB[a]P ($p = 0,513$) (Figure 27b). Cependant, l'élimination fécale du tétraol-B[a]P était significativement plus élevée chez les SD en comparaison aux W ($p < 0,001$) (Figure 27c). Ces résultats sont les mêmes que l'on s'intéresse à la dose administrée ou à la dose absorbée (dose administrée – dose éliminée) (résultats non montrés).

Ces résultats tendent à montrer que, alors que la voie de détoxification est identique entre les 2 souches, la voie de bio-activation est plus importante chez les SD. Cette différence de métabolisme intestinal entre les 2 souches a déjà été rapportée dans la littérature avec notamment une différence d'activité enzymatique des CYP intestinaux impliqués dans le métabolisme intestinal des HAP. En effet, alors que l'activité du CYP1A1 a été décrit comme

plus faible chez les SD par rapport aux W, l'activité du CYP 3A2 était plus élevée [Bruyère 2009]. D'autres différences ont pu être mises en évidence au niveau de l'équipement enzymatique en CYP avec notamment une activité plus faible chez les SD pour les CYP 1A2 et 2C6 et une activité plus élevée pour le CYP 2D2 [Bruyère 2009]. Il serait intéressant de s'intéresser par la suite à une potentielle différence au niveau de l'activité des époxydes hydrolases car, à ma connaissance, cela n'a jamais été étudié dans la littérature.

3.1.1.4 Variabilité inter-souche sur les paramètres influençant l'élimination urinaire des métabolites des HAP

La quantité d'eau bue par jour était plus élevée chez les SD que chez les W ($p = 0,043$) (Figure 28a) mais celle-ci était comparable après ajustement à la quantité de croquettes consommées ($p = 0,330$) (Figure 28b). Donc, la consommation d'eau augmentait avec la quantité de croquettes consommées et la plus grande quantité d'eau bue par les SD que par les W pourrait s'expliquer par une plus grande quantité de croquettes consommées par les SD.

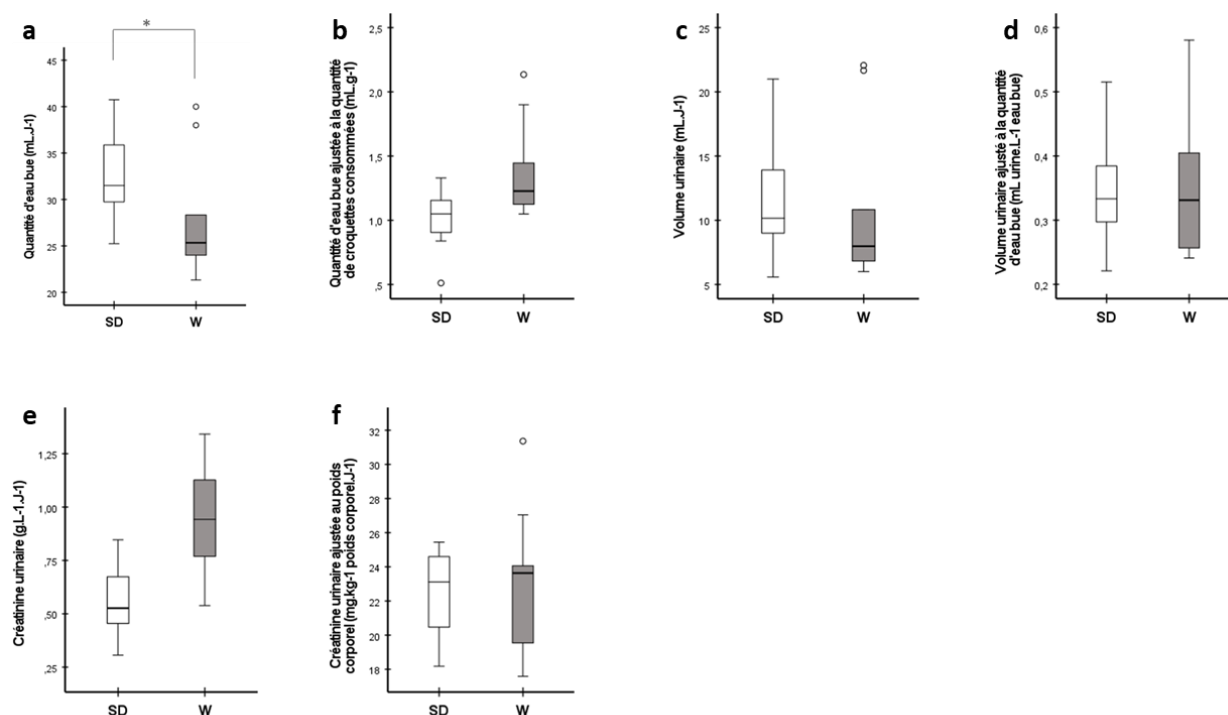


Figure 28 : Quantité d'eau bue, volume urinaire et créatinine urinaire chez les rats Sprague Dawley (SD) (en blanc) et chez les rats Wistar (W) (en gris) exposés à un mélange de HAP

$n=7$ rats pour SD, et $n = 10$ rats pour W. La figure a présente la quantité d'eau bue par jour, la figure b présente la quantité d'eau bue par jour ajustée à la quantité des croquettes consommées par jour, la figure c présente le volume urinaire éliminé par jour, la figure d présente le volume urinaire éliminé par jour ajusté à la quantité d'eau bue par jour, la figure e présente la concentration urinaire journalière de la créatinine, et la figure f présente

la concentration urinaire journalière de la créatinine ajustée au poids corporel du rat. Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25^{ème}, 50^{ème} et 75^{ème} percentiles, le maximum. Le sigle ° représente des valeurs extrêmes. * : $p < 0,05$.

Le volume urinaire éliminé par jour était identique entre les SD et les W, que celui-ci ait été ($p = 1,000$) ou non ajusté à la quantité d'eau bue ($p = 0,417$) (Figure 28b, 28c). De même, **la créatinine urinaire** était identique entre les SD et les W que celle-ci ait été ($p = 0,962$) ou non ajustée au poids corporel du rat ($p = 0,077$) (Figure 28e, 28f).

3.1.1.5 Variabilité inter-souche du métabolisme hépatique des HAP et de l'élimination urinaire de leurs métabolites

Les pourcentages de la plupart des métabolites urinaires des HAP étaient significativement plus élevés chez les rats SD que chez les W : ils étaient 2 fois plus élevés pour le 1-OHP ($p = 0,001$), le B[a]A-8,9-diol ($p < 0,001$), le 8-OHB[k]F ($p < 0,001$), le 3-OHB[a]P ($p < 0,001$) et le B[e]P-4,5-diol ($p = 0,007$); 3 fois plus pour le 3-OHChr ($p = 0,033$) et le Chr-1,2-diol ($p < 0,001$); 4 fois plus pour le 3-OHB[e]P ($p = 0,001$); et 5 fois plus pour le B[k]F-8,9-diol ($p < 0,001$) (Figure 29). Seul le pourcentage du 6-OHChr était à la limite de la significativité ($p = 0,070$) et celui du tétraol-B[a]P était identique entre les SD et les W ($p = 0,210$) (Figure 29).

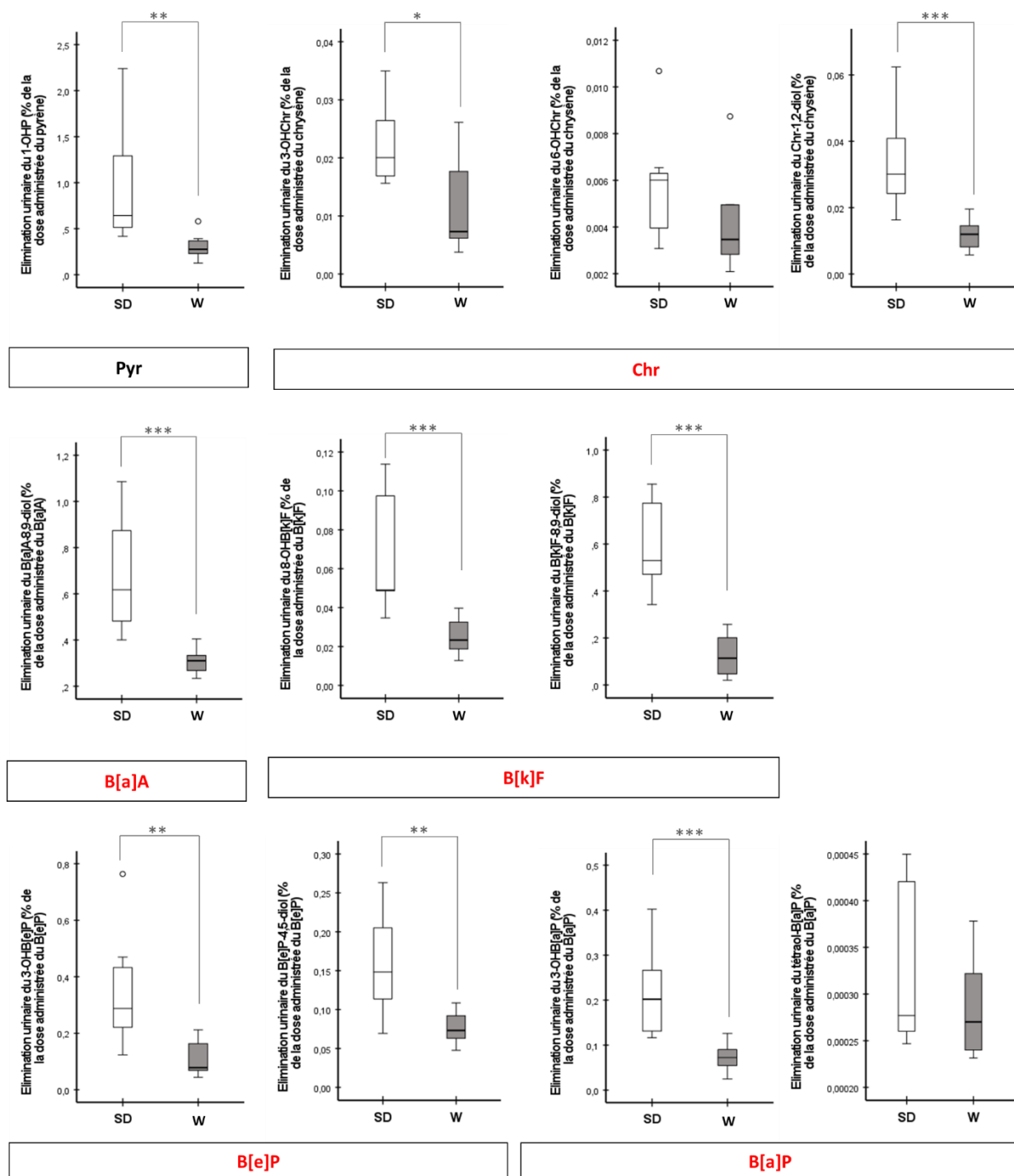


Figure 29 : Élimination urinaire des métabolites des HAP chez les rats Sprague Dawley (SD) (en blanc) et chez les rats Wistar (W) (en gris) exposés à un mélange de HAP, exprimée en % de la dose administrée $n = 7$ rats pour SD et $n = 10$ rats pour W. 1-OHP : 1-hydroxypyrene, 3-OHChr : 3-hydroxychrysène, 6-OHChr : 6-hydroxychrysène, Chr-1,2-diol : chrysène-1,2-dio, B[a]A-8,9-diol : benzo[a]anthracène-8,9-diol, 8-OHB[k]F : 8-hydroxybenzo[k]fluoranthène, 3-OHB[e]P : 3-hydroxybenzo[e]pyrène, B[e]P-4,5-diol : benzo[e]pyrène-4,5-diol, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène, tétraol-B[a]P : tétraol-benzo[a]pyrène. Les lignes horizontales représentent de bas en haut : le minimum, le 25ème, le 50ème, le 75ème percentiles et le maximum. ° est constitué des valeurs extrêmes. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$. Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Ruzgyte et al. (2006) qui a mis en évidence un pourcentage de 1-OHP urinaire 2 fois plus élevé chez les rats SD que chez les W après exposition intraveineuse au Pyr, voie d'exposition qui ne prend pas en compte les différences d'absorption intestinale du composé entre les 2 souches.

Cette **élimination urinaire des métabolites plus importante chez les SD que chez les W** pourrait être expliquée par plusieurs facteurs :

- **Une activité enzymatique des CYP hépatiques plus importante chez les SD** que chez les W. Ceci a déjà été rapporté dans la littérature avec une activité enzymatique plus élevée des CYP 1A1 et 1A2 de 30 % chez les SD que chez les W que ce soit à l'état basal ($180 \text{ pmol.mg}^{-1}\text{protéine.min}^{-1}$ versus $140 \text{ pmol.mg}^{-1}\text{protéine.min}^{-1}$ respectivement) [Nishiyama 2016] ou après induction par le B[a]P ($800 \text{ pmol.mg}^{-1}\text{protéine.min}^{-1}$ versus $400 \text{ pmol.mg}^{-1}\text{protéine.min}^{-1}$ respectivement) [Floeani 2012].
- Une **excrétion biliaire des métabolites plus faible chez les SD** en comparaison avec les W comme ceci a été rapporté pour le 1-OHP après exposition au Pyr [Ruzgyte 2006].
- **Un stockage des HAP et/ou de leurs métabolites plus important dans certains organes chez les W.** Bien que cette hypothèse ne puisse pas être totalement éliminée, la quantité d'HAP parents dans le foie et les reins des rats W restait comme pour les SD inférieure à la LQ ($0,05 \text{ ng.g}^{-1}$ pour le B[k]F et le B[a]P et 1 ng.g^{-1} pour le Flua, le Pyr, le B[e]P, l'IP et le B[g,h,i]P) (*résultats non montrés*).

A l'inverse, **l'absence de différence dans le pourcentage de B[a]P éliminé dans les urines sous forme de tétraol-B[a]P** entre les 2 souches pourrait s'expliquer par une saturation de la voie de bio-activation du B[a]P qui pouvait être liée à **une saturation de l'EH**. Ce résultat est cohérent avec ceux d'une étude précédente portant sur des modèles *in vitro* de peau humaine exposée au B[a]P seul pendant 24 et 48 heures [Bourgart 2019a]. Alors que le pourcentage du B[a]P éliminé sous forme de 3-OHB[a]P dans le milieu était identique quelle que soit la dose appliquée, celui du tétraol-B[a]P était plus faible lorsque la dose de B[a]P augmentait. Ce qui montre que les enzymes responsables de la formation du tétraol-B[a]P sont saturées pour des doses plus faibles que celles responsables de la formation du 3-OHB[a]P.

3.1.1.6 Conclusion de la variabilité inter-souche de la toxicocinétique des HAP

Une variabilité inter-souche entre les SD et les W a été observée au niveau de différentes étapes de la toxicocinétique des HAP (Figure 30).

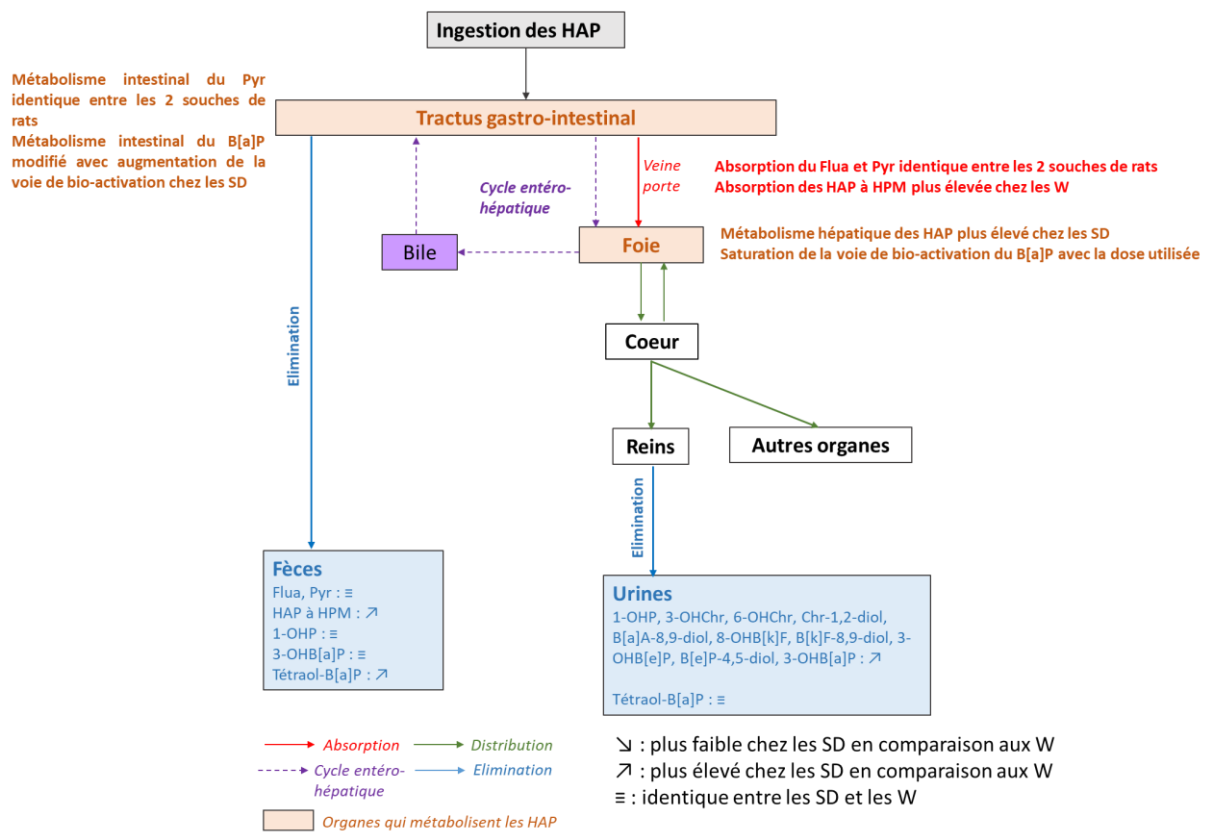


Figure 30 : Variabilité inter-souche entre les rats Sprague Dawley (SD) et les rats Wistar (W) pour la toxicocinétique des HAP

B[a]P : benzo[a]pyrène, HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, HPM : haut poids moléculaire, Pyr : pyrène, 1-OHP : 1-hydroxypyrene, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène, 3-OHB[e]P : 3-hydroxybenzo[e]pyrène 3-OHChr : 3-hydroxychrysène, 6-OHChr : 6-hydroxychrysène, 8-OHB[k]F : 8-hydroxybenzo[k]fluoranthène.

Alors que l'absorption des HAP de FPM était identique entre les 2 souches, celle des HAP à HPM était plus faible chez les SD que chez les W. De même, le métabolisme intestinal du Pyr était comparable entre les 2 souches alors que celui du B[a]P était différent, avec une orientation vers la voie de bio-activation plus importante chez les SD que chez les W. Ces différences pourraient être dues à une différence de consommation alimentaire (plus grande quantité de croquettes consommées par les SD sur lesquelles sont adsorbés les HAP à HPM) mais aussi une différence inter-souche de l'absorption et du métabolisme intestinal des HAP en lien avec des différences dans l'activité enzymatique des CYP intestinaux, les mouvements des fluides intestinaux et le microbiote intestinal.

De plus le métabolisme hépatique était plus élevé chez les SD en comparaison aux W pour tous les métabolites à l'exception du tétraol-B[a]P où la formation des métabolites était identique entre les 2 souches. Ceci pourrait être expliqué par une différence inter-souche des activités

enzymatiques des CYP hépatiques et/ou de l'excrétion biliaire des métabolites. Enfin, la voie de bio-activation du B[a]P serait moins impactée par la variabilité inter-souche suite à une saturation plus rapide des enzymes spécifiques de cette voie comme l'EH.

Ces résultats soulignent donc l'existence de **différences significatives dans la toxicocinétique et le métabolisme des HAP en fonction de la souche de rat et que donc, le choix de la souche est un paramètre important à prendre en compte dans les études de toxicologie.**

Pour mieux comprendre ces résultats des analyses supplémentaires seront intéressantes : étude de l'expression et de l'activité des enzymes (CYP 1A1, 1B1 et EH) au niveau hépatique et intestinal et étude de l'excrétion biliaire des métabolites.

3.1.2 Variabilité inter-individuelle

Pour répondre à cette question, nous avons comparé les 10 rats W (âgés de 11 semaines) du protocole 2 qui ont été exposés pendant 1 semaine au mélange de HAP ajusté à $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P (0,2-CTP).

3.1.2.1 Variabilité inter-individuelle sur les paramètres généraux influençant l'absorption intestinale

Le poids corporel, la quantité de croquettes consommées (ajustée ou non au poids corporel) et le poids des fèces (ajusté ou non à la quantité de croquettes consommées) étaient identiques entre les 10 rats, avec des CV < 20 (Tableau 22).

Tableau 22 : Paramètres de distribution du poids corporel, de la quantité des croquettes consommées et du poids des fèces chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP

	Poids du rat (g)	Quantité de croquettes consommées (g.J ⁻¹)	Quantité de croquettes consommées ajustée au poids corporel des rats (g croquette.kg ⁻¹ corporel.J ⁻¹)	Poids des fèces (g.J ⁻¹)	Poids des fèces ajusté à la quantité de croquettes consommées (g fèces.g ⁻¹ croquettes)
Médiane	371	20,8	54,9	6,0	0,3
Moyenne	369,9	20,6	55,4	6,1	0,3
ET	34,11	3,1	7,9	1,1	0,0
CV (%)	9	15	14	17	15

ET : écart-type, CV : coefficient de variation, n = 10 rats.

3.1.2.2 *Variabilité inter-individuelle de l'absorption intestinale des HAP*

La variabilité inter-individuelle du pourcentage des HAP totaux éliminés dans les fèces par rapport à la dose administrée était élevée avec un CV de 39 % (Tableau 23). Toutefois, il semblait exister 2 groupes de rats (Figure 31) :

- le premier (rats 1, 2, 3, 4, 6 et 9) où le pourcentage d'élimination fécale des HAP était faible avec une élimination fécale des HAP entre 10 et 20 % de la dose administrée.
- le deuxième (rats 5, 7, 8 et 10) où le pourcentage d'élimination fécale des HAP était plus élevée avec une élimination fécale des HAP entre 25 et 35 % de la dose administrée.

Tableau 23 : Paramètres de distribution de l'élimination fécale des HAP exprimée en % de la dose administrée chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

	Flua	Pyr	Chr	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[j]F	B[e]P	B[a]P	IP	B[g,h,i]P	DB[a,h]A	Somme des HAP HPM	Somme des HAP
PM (g.mol⁻¹)	202,2	202,2	228,28	228,28	252,3	252,3	252,3	252,3	252,3	276,33	276,33	278,33		
Médiane	3,93	1,36	1,09	0,79	1,03	1,01	2,06	0,99	0,67	0,92	2,33	1,19	12,8	18,9
Moyenne	4,21	2,58	1,40	0,96	1,25	1,44	2,09	1,85	0,93	0,94	2,76	1,63	15,2	22,0
ET	0,69	2,03	0,72	0,59	0,82	1,08	1,03	1,45	0,69	0,75	1,66	0,94	9,1	8,7
CV (%)	16	79	51	62	66	75	49	79	75	79	60	57	60	39

Les valeurs des médianes et des moyennes et des écart-types (ET) sont exprimées en % de la dose administrée du HAP (n = 10 rats). Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène, CV : coefficient de variation. Somme des HAP : c'est la somme des 12 HAP, Somme des HAP HPM : somme du Chr, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[e]P, B[a]P, IP, B[g,h,i]P et DB[a,h]A.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

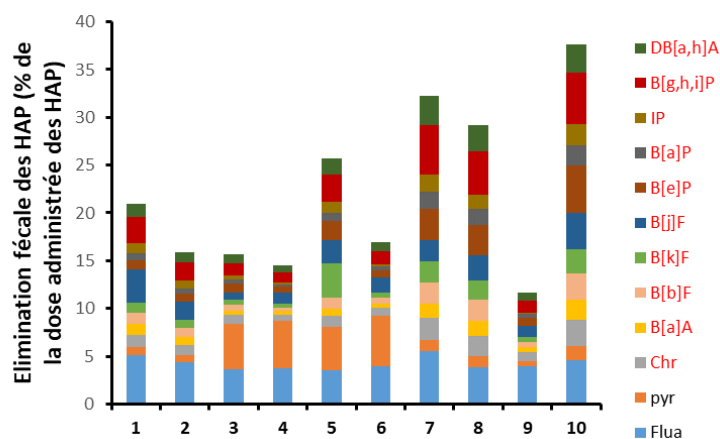


Figure 31 : Somme des pourcentages des HAP parents éliminés dans les fèces des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

n = 10 rats. Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

L'élimination dans les fèces des HAP parents pris individuellement était très variable entre les rats avec des CV élevés compris entre 49 et 79%, excepté le Flua qui présentait un CV de 16 % (Tableau 23). Cette variation était du même ordre que celle des HAP à HPM (60 %) (Tableau 23).

Par contre, le profil des pourcentages des HAP à HPM éliminés dans les fèces était comparable entre les rats (Figure 32). Les composés les plus éliminés étaient le B[g,h,i]P et le B[j]F puis venaient par ordre décroissant : DB[a,h]P \cong B[e]P \cong Chr > B[b]F \cong B[k]F > B[a]A \cong B[a]P \cong IP.

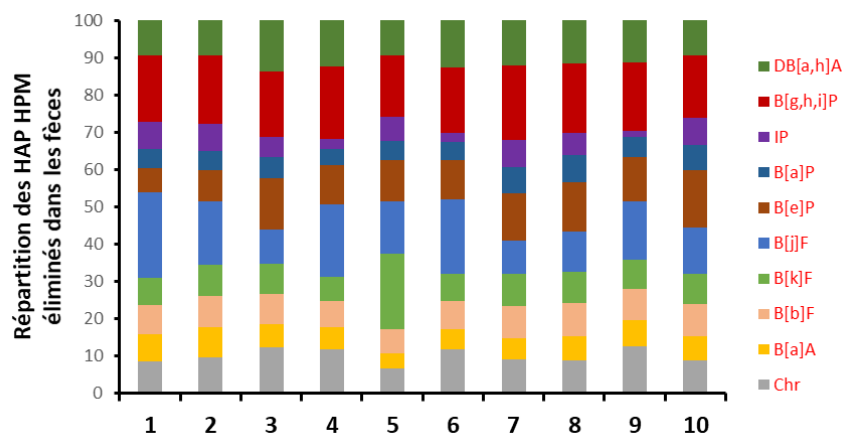


Figure 32 : Profil des pourcentages des HAP de haut poids moléculaire éliminés dans les fèces des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

$n = 10$ rats. Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène.

Enfin, l'étude des corrélations entre les pourcentages des HAP éliminés dans les fèces montrait que les **HAP de FPM (Flua et Pyr) n'étaient corrélés à aucun autre HAP, alors que les HAP de HPM étaient corrélés entre eux** (Figure 33).

Tous ces résultats montrent qu'il existe 3 mécanismes différents pour l'absorption des HAP : un pour le Flua qui est identique entre les rats, un pour le Pyr et un pour les 10 HAP à HPM. De plus, l'élimination fécale des HAP HPM se fait dans les mêmes proportions entre les différents rats.

Pyr	-0,47																			
Chr	0,60	-0,31																		
B[a]A	0,54	-0,49	0,94**																	
B[b]F	0,41	-0,31	0,94**	0,94**																
B[k]F	0,19	-0,13	0,84**	0,77**	0,92**															
B[j]F	0,45	-0,19	0,88**	0,82**	0,78**	0,77**														
B[e]P	0,26	-0,18	0,84**	0,86**	0,96**	0,88**	0,64*													
B[a]P	0,42	-0,20	0,95**	0,92**	0,99**	0,93**	0,81**	0,95**												
IP	0,39	-0,10	0,93**	0,88**	0,96**	0,92**	0,82**	0,93**	0,99**											
B[g,h,i]P	0,50	-0,26	0,99**	0,92**	0,95**	0,89**	0,86**	0,87**	0,96**	0,94**										
DB[a,h]A	0,44	-0,22	0,94**	0,89**	0,98**	0,92**	0,76*	0,94**	0,99**	0,98**	0,95**									
	Flua	Pyr	Chr	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[j]F	B[e]P	B[a]P	IP	B[g,h,i]P									

Figure 33 : Matrice de corrélation entre les pourcentages de la dose administrée des HAP éliminée dans les fèces des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

Les valeurs représentent le coefficient de corrélation entre le % de l'élimination fécale de 2 HAP pour 10 rats. Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène. * $<0,05$, ** $<0,01$.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

Nous avons recherché s'il existait des corrélations entre le pourcentage d'HAP éliminés et la quantité de croquettes consommées (ajustée ou non au poids du rat) et le poids des fèces (ajusté ou non à la quantité de croquettes consommées).

Ainsi, nous avons mis en évidence que :

- le pourcentage de Flua éliminé dans les fèces était plus élevé chez les rats qui avaient consommé une plus grande quantité de croquettes ($R = 0,72$; $p = 0,018$) (Annexe 1).

- le pourcentage de Pyr (qui était différent entre les rats, CV 79 %) était plus faible chez les rats qui avaient un poids des fèces plus élevé ($R = -0,661$; $p = 0,038$) (Annexe 1).

Cette différence de mécanisme d'absorption trouvés pour ces 2 HAP qui ont le même PM peut être expliquée par des caractéristiques différentes : le flua est un HAP non-alternatif avec une disposition angulaire des cycles et une solubilité dans l'eau de $260 \mu\text{g.L}^{-1}$ alors que le Pyr est un HAP alternatif avec une disposition en cluster des cycles et une solubilité plus faible dans l'eau de $135 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Pour les HAP de HPM, il n'y avait pas de corrélation entre le pourcentage des HAP éliminés dans les fèces et la quantité des croquettes consommées ou le poids des fèces (Annexe 1). Ceci suggère que **l'importante variabilité inter-individuelle de l'absorption des HAP de HPM** est due à d'autres facteurs tels que le pH intestinal, la quantité de fluides intestinaux, le mouvement des intestins, la surface de contact entre les croquettes et les HAP (si les croquettes étaient mieux rongées par certains rats), ... [Charman 1997, Martinez 2002]. D'après la littérature, l'absorption des HAP à HPM dépend fortement de **la présence des sels biliaires** [Rahman 1986] qui vont former des micelles autour des HAP pour leur permettre de traverser la couche d'eau stagnante et ainsi pénétrer dans l'entérocyte pour atteindre la circulation sanguine [Kelly 2004, Marcil 2004]. Ainsi, en fonction de l'importance de la sécrétion biliaire et/ou de la composition de la bile en sels biliaires, on peut distinguer 2 groupes de rats : le premier groupe de rats capables de former plus de micelles chez lesquels l'élimination fécale des HAP HPM seraient plus faibles et le deuxième où la formation de micelles serait moins importante et pour lesquels l'élimination fécale des HAP HPM serait plus élevée.

Le microbiote intestinal est un autre paramètre qui pourrait influencer l'absorption intestinale lorsque les HAP sont administrés par voie orale. En effet, le microbiote qui habite le tractus intestinal représente un site pour le métabolisme des xénobiotiques et peut également limiter l'absorption des xénobiotiques dans l'intestin grêle [Collins 2020]. Les HAP peuvent modifier la composition du microbiote [Li 2020, Zhang 2021] et, à son tour, la modification du microbiote intestinal peut entraîner des changements dans l'absorption du B[a]P et dans son métabolisme. Ainsi, l'hypothèse pourrait être que les interactions mutuelles entre les HAP et le microbiote intestinal seraient différentes entre les rats. Ainsi, le métabolisme des HAP serait différent ce qui aurait un effet sur leur absorption [Cavret 2005, Ebert 2005].

3.1.2.3 Variabilité inter-individuelle du métabolisme intestinal des HAP

La variabilité inter-individuelle du pourcentage du Pyr éliminé dans les fèces sous forme de 1-OHP (CV=16 %), du B[a]P éliminé sous forme de 3-OHB[a]P (CV=17 %) et de tétraol-B[a]P (CV = 18 %) était faible (< 20%) (Tableau 24) ce qui montre qu'au niveau intestinal, l'activité enzymatique est identique entre les rats.

Tableau 24 : Paramètres de distribution de l'élimination fécale du 1-hydroxypyrene (1-OHP), 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHB[a]P) et tétraol-B[a]P exprimée en % de la dose administrée du pyrene et du benzo[a]pyrene chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

	1-OHP	3-OHB[a]P	Tétraol-B[a]P
Médiane	8,5	4,9	0,0006
Moyenne	8,5	5,1	0,0007
ET	1,3	0,9	0,0001
CV (%)	16	17	18

ET : écart type, CV : coefficient de variation, n=10 rats.

Aucune corrélation n'a été trouvée entre le pourcentage des HAP éliminés sous forme des métabolites et la quantité de croquettes consommées (ajustée ou non au poids du rat) ou le poids des fèces (ajusté ou non à la quantité de croquettes consommées) (Annexe 2).

Enfin, les pourcentages du 1-OHP et du 3-OHB[a]P étaient corrélés entre eux ($R = 0,867$; $p = 0,001$) mais ne l'étaient pas avec leur HAP parent ou avec le tétraol-B[a]P (Annexe 2) ce qui suggère que la formation du 1-OHP et du 3-OHB[a]P dépend des mêmes facteurs, parmi lesquels on trouve les enzymes.

3.1.2.4 Variabilité inter-individuelle des paramètres influençant l'élimination urinaire des métabolites des HAP

La variabilité inter-individuelle pour la quantité d'eau bue (ajustée ou non à la quantité de croquettes consommées) était élevée (23% ou 26 % respectivement) (Tableau 25) ce qui montre que la quantité d'eau bue variait entre les rats indépendamment de la consommation des croquettes.

Tableau 25 : Paramètres de distribution de la quantité d'eau bue, du volume urinaire et de la créatinine urinaire chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

	Quantité d'eau bue (mL.J ⁻¹)	Quantité d'eau bue ajustée à la quantité de croquettes consommées ¹ (mL.g ⁻¹)	Volume urinaire (mL.J ⁻¹)	Volume urinaire ajusté à la quantité d'eau bue (mL urine.mL ⁻¹ eau)	Créatinine urinaire (g.L ⁻¹ .J ⁻¹)	Créatinine urinaire ajustée au poids corporel (g.kg ⁻¹ poids corporel)
Médiane	25,3	1,2	8,0	76	0,9	23,6
Moyenne	27,6	1,4	10,5	82,7	0,9	23,1
ET	6,4	0,4	6,2	19,18	0,3	4,1
CV (%)	23	26	59	23	30	18

ET : écart-type, CV : coefficient de variation, n=10 rats.

La variabilité inter-individuelle était aussi élevée pour le volume urinaire éliminé par jour (59 %) et pour la créatinine urinaire éliminé par jour (30 %) (Tableau 25). Cependant, après ajustement du volume urinaire à la quantité d'eau bue et de la créatinine urinaire au poids corporel, la variabilité inter-individuelle diminuait mais restait supérieure à 20 % pour le volume urinaire (CV 23 et 18 % respectivement) (Tableau 25). De plus, la concentration urinaire de la créatinine diminuait avec l'augmentation de la quantité d'eau bue et du volume urinaire (Annexe 3). Cela signifie que la variabilité inter-individuelle du volume urinaire et de la concentration urinaire de la créatinine pourrait être due à une différence du taux de la filtration rénale du sang suite à la différence de la quantité d'eau consommée.

3.1.2.5 Variabilité inter-individuelle du métabolisme hépatique des HAP et de l'élimination urinaire de leurs métabolites

La variabilité inter-individuelle du pourcentage de métabolites éliminés dans l'urine par rapport à la dose administrée était plus élevée pour les métabolites monohydroxylés (CV de 43% pour le 3-OHB[a]P à 73% pour le 3-OHChr) que pour les diols (CV de 18% pour le B[a]A-8,9-diol à 36% pour le B[k]F-8,9-diol) et le tétraol-B[a]P (CV = 19%) (Tableau 26).

Cette variabilité inter-individuelle dans l'élimination urinaire des différents métabolites a déjà été rapporté mais aucune explication n'a été avancée [Elovaara 2003, Grimmer 1997, Grova 2018, Ruzgyte 2006, Tzekova 2004].

Si l'on considère l'ensemble des métabolites (somme des 11 quantifiés), la variabilité était plus faible (26 %) par rapport à chaque métabolite tout seul (Tableau 26), ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'une question d'individus métabolisant mal/efficacement les HAP dans leur ensemble, mais qu'il est question de la capacité d'un individu à générer des métabolites spécifiques.

Tableau 26 : Paramètres de distribution de l'élimination urinaire des métabolites des HAP exprimée en % de la dose administrée chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP

	1-OHP	3-OHChr	6-OHChr	Chr-1,2diol	B[a]A- 8,9-diol	8-OHB[k]F	B[k]F-8,9- diol	3-OHB[e]P	B[e]P-4,5- diol	3-OHB[a]P	Tétraol- B[a]P	Somme des métabolites
Médiane	0,28	0,007	0,003	0,012	0,31	0,023	0,11	0,08	0,07	0,07	0,00027	1,00
Moyenne	0,30	0,011	0,004	0,012	0,31	0,025	0,13	0,10	0,08	0,07	0,00029	1,04
ET	0,13	0,008	0,002	0,004	0,05	0,019	0,05	0,06	0,02	0,03	0,00006	0,269
CV	44	73	48	36	18	65	36	55	25	43	19	26

Les valeurs des médianes et des moyennes et des écart-types (ET) sont exprimées en % de la dose administrée des HAP (n = 10 rats). CV : coefficient de variation.

Aucune corrélation n'était retrouvée entre les pourcentages des métabolites urinaires monohydroxylés et les diols ou tétraol d'un HAP parent, quelque soit l'HAP considéré : 3-OHChr et 6-OHChr *versus* Chr-1,2-diol, 8-OHB[k]F *versus* B[k]F-8,9-diol; 3-OHB[e]P *versus* B[e]P-4,5-diol; 3-OHB[a]P *versus* tétraol-B[a]P (Figure 34). Ceci confirme que la formation des métabolites monohydroxylés et celle des diols ou tétraol se fait par des voies métaboliques différentes et qu'un rat a la capacité à générer un métabolite spécifique d'un HAP. Par exemple, le rat 9 était celui qui a éliminé le plus de 3-OHB[a]P alors que pour le tétraol-B[a]P, c'était le rat 4 qui en a éliminé le plus.

3-OHChr	0,533									
6-OHChr	0,733*	0,745*								
Chr-1,2-diol	0,100	-0,236	-0,055							
B[a]A-8,9-diol	0,050	0,115	0,127	0,394						
8-OHB[k]F	0,783*	0,648*	0,564	-0,079	0,091					
B[k]F-8,9-diol	-0,300	-0,345	-0,588	0,430	0,564	-0,152				
3-OHB[e]P	0,617	0,442	0,345	0,297	0,418	0,855*	0,224			
B[e]P-4,5-diol	0,617	0,588	0,758*	0,345	0,648*	0,297	-0,067	0,358		
3-OHB[a]P	0,917**	0,550	0,733*	0,167	0,183	0,733*	-0,250	0,717*	0,683*	
Tétraol-B[a]P	0,714*	0,617	0,633	0,100	0,367	0,917**	-0,117	0,85**	0,567	0,619
	1-OHP	3-OH Chr	6-OH Chr	Chr-1,2-diol	B[a]A-8,9-diol	8-OH B[k]F	B[k]F-8,9-diol	3-OH B[e]P	B[e]P-4,5-diol	3-OH B[a]P

Figure 34 : Matrice de corrélation entre l'élimination urinaire des différents métabolites des HAP exprimée en % de la dose administrée des HAP chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

Les valeurs représentent le coefficient de corrélation entre le pourcentage des HAP éliminés sous forme des métabolites dans les urines pour 10 rats. 1-OHP : 1-hydroxypyrene, 3-OHChr : 3-hydroxychrysène, 6-OHChr : 6-hydroxychrysène, Chr-1,2-diol : chrysène-1,2-diol, B[a]A-8,9-diol : benzo[a]anthracène-8,9-diol, 8-OHB[k]F : 8-hydroxybenzo[k]fluoranthène, B[k]F-8,9-diol : benzo[k]fluoranthène-8,9-diol, 3-OHB[e]P : 3-hydroxybenzo[e]pyrène, B[e]P-4,5-diol : benzo[e]pyrène-4,5-diol, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène. * $<0,05$, ** $<0,01$.

Par contre, il existait des corrélations entre certains métabolites, notamment le 1-OHP avec le 3-OHB[a]P et le tétraol-B[a]P (Figure 32). Cette corrélation pourrait être expliquée par différentes hypothèses :

- Les métabolites qui sont corrélés entre eux sont formés par les mêmes enzymes. Ceci pourrait être vrai pour les métabolites monohydroxylés qui sont formés par les CYP comme le 1-OHP et le 3-OHB[a]P. Cependant, cette hypothèse ne pourrait pas être vraie pour le 1-OHP et le tétraol-B[a]P qui sont formés par des enzymes différentes surtout pour l'EH qui intervient uniquement dans la formation du tétraol-B[a]P.

- La corrélation entre les métabolites qui ne sont pas formés par les mêmes enzymes comme le 1-OHP et le tétraol-B[a]P pourrait être liée à une élimination urinaire identique entre ces métabolites.

La variabilité dans l'élimination urinaire des métabolites des HAP pourrait être due à différents facteurs :

- ***Une variabilité de l'absorption des HAP.*** Toutefois, aucune corrélation n'a été observée entre l'élimination urinaire des métabolites et l'élimination fécale du HAP parent (*résultats non montrés*) ce qui signifie, que l'absorption n'est pas le seul facteur qui génère la variabilité inter-individuelle de l'élimination urinaire des métabolites.
- ***Une différence de l'activité des enzymes hépatiques*** impliquées dans le métabolisme des HAP
- ***Une différence de la fonction rénale.*** En effet, Bouchard et Viau (1998b) ont montré que l'augmentation de la diurèse par l'ajout des électrolytes ou du sucre augmentait de 3 fois l'élimination urinaire du 1-OHP. Toutefois, le mécanisme d'élimination urinaire des HAP n'est pas totalement connu. Ainsi, pour le 3-OHB[a]P il existe un phénomène de rétention au niveau des reins qui peut être expliqué par un transfert du 3-OHB[a]P du sang vers les tubules rénaux par l'intermédiaire des transporteurs d'anions organiques présents sur les membranes basolatérales et apicales des tubules proximaux [Marie 2010, Van Aubel 2000, Wright 2004]. Ainsi, l'élimination de certains métabolites des HAP pourrait se faire par transport actif au niveau rénal et la variabilité inter-individuelle pourrait être due à une différence de l'expression ou de l'activité de ces transporteurs entre les rats. Ceci est en accord avec l'absence de corrélation entre l'élimination urinaire des métabolites et la créatinine urinaire (Annexe 4). Cependant, seule l'élimination du tétraol-B[a]P était corrélée avec la créatinine urinaire ($R = 0,733$, $p = 0,025$) (Annexe 4) ce qui suggère que l'élimination urinaire du tétraol-B[a]P se fait par filtration rénale comme la créatinine.

3.1.2.6 Variabilité inter-individuelle de l'absorption intestinale et du métabolisme hépatique des HAP par analyse des HAP sanguins

La variabilité inter-individuelle du pourcentage des HAP totaux mesurés dans le sang par rapport à la dose administrée était élevée (CV de 39%) (Tableau 27).

Tableau 27 : Paramètres de distribution des pourcentages sanguins de la dose administrée des HAP chez des rats Wistar exposés à un mélange de HAP

	Flua	Pyr	Chr	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[j]F	B[e]P	B[a]P	IP	B[g,h,i]P	Sommes des HAP à HPM	Somme des HAP
Médiane	0,13	0,17	0,07	0,02	0,02	0,02	0,09	0,36	0,03	0,02	0,45	1,09	1,34
Moyenne	0,14	0,19	0,08	0,02	0,03	0,03	0,10	0,43	0,04	0,03	0,47	1,23	1,55
ET	0,05	0,07	0,03	0,01	0,02	0,02	0,04	0,22	0,03	0,02	0,14	0,8	0,59
CV (%)	40	38	39	62	65	66	37	53	76	72	30	65	39

Les valeurs des médianes et des moyennes et des écart-types (ET) sont exprimées en concentration sanguine de HAP (ng.mL⁻¹) (n = 9 rats). Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène, Somme des HAP : c'est la somme des 12 HAP, Somme des HAP à HPM : somme du Chr, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[e]P, B[a]P, IP, B[g,h,i]P, CV : coefficient de variation.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

En effet, le rat 8 a un pourcentage de HAP totaux dans le sang qui est 2 fois plus élevé que celle des autres rats que l'on peut diviser en 2 groupes :

- le premier (rats 1, 2 et 6 et 8) qui a un pourcentage de HAP totaux supérieur à 1,5 % de la dose administrée
- le deuxième (rats 3, 4, 5, 7 et 9) qui a un pourcentage de HAP totaux inférieure à 1,5 % (Figure 35).

Ces 2 groupes sont toutefois différents des 2 groupes de rats classés selon l'élimination fécale des HAP.

De plus, aucune corrélation n'a été retrouvée entre le pourcentage de l'HAP parent mesuré dans le sang et celui éliminé dans les fèces (*résultats non montrés*).

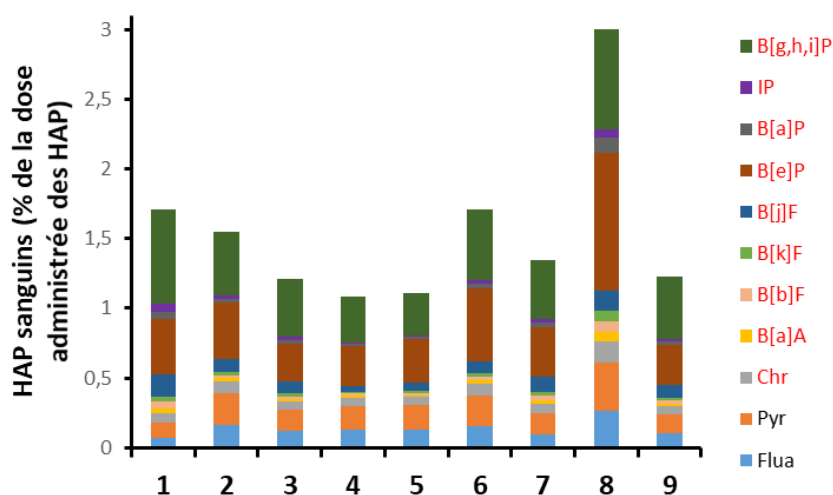


Figure 35 : Pourcentages de la dose administrée des HAP dans le sang des rats Wistar, 4 heures après l'exposition à un mélange de HAP

n = 9 rats. Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

Toutefois, la variabilité inter-individuelle du pourcentage de Flua et le Pyr mesurés dans le sang (CV de 40 et 38%) était plus faible pour celle des HAP à HPM (CV de 30 à 76%) (Tableaux 23, 27).

De plus, les HAP à HPM qui avaient les pourcentages les plus élevés dans le sang (B[g,h,i]P, B[e]P, B[j]F, Chr et B[k]F) avaient un CV plus faible par rapport à celui observé dans les fèces. Pour les autres HAP à HPM (B[a]A, B[b]F, B[a]P, IP), le CV sanguin était comparable à celui des fèces (Tableaux 23 et 27). Comme au niveau des fèces, les pourcentages des HAP à HPM étaient corrélées entre elles mais ne l'étaient pas à celles des HAP à FPM (Figure 36). Les

pourcentages des HAP de FPM (Flua et Pyr) étaient corrélées entre elles, ($R = 0,933$, $p < 0,001$) ce qui n'était pas vrai au niveau des fèces (Figure 36).

Pyr	0,93***										
Chr	0,51	0,64									
B[a]A	0,10	0,17	0,79*								
B[b]F	0,03	0,13	0,71*	0,97**							
B[k]F	0,03	0,13	0,71*	0,97**	1,00***						
B[j]F	-0,32	-0,23	0,41*	0,78*	0,82**	0,82**					
B[e]P	0,48	0,62	1,00**	0,80**	0,72*	0,72*	0,45				
B[a]P	0,00	0,13	0,76*	0,97**	0,97**	0,97**	0,87**	0,78*			
IP	0,26	0,29	0,78*	0,92**	0,93**	0,93**	0,71*	0,78*	0,88**		
B[g,h,i]P	0,25	0,18	0,71*	0,90**	0,82**	0,82**	0,68*	0,73*	0,82**	0,90**	
	Flua	Pyr	Chr	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[j]F	B[e]P	B[a]P	IP	

Figure 36 : Matrice de corrélation entre les pourcentages sanguins de la dose administrée des HAP chez des rats Wistar, 4 heures après l'exposition à un mélange de HAP

Les valeurs représentent le coefficient de corrélation entre les pourcentages sanguins des 2 HAP pour 9 rats. Flua : fluoranthène, Pyr : pyrène, Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$.

Les HAP en noir sont les HAP à faible poids moléculaire, les HAP en rouge sont les HAP à haut poids moléculaire.

Enfin, le profil des HAP à HPM mesurés dans le sang était identique entre les rats mais présentaient un ordre différent de celui des fèces : $B[g,hi]P \cong B[e]P < B[j]F > Chr > B[k]F \cong B[b]F \cong IP \cong B[a]P > B[a]A$ (Figure 37).

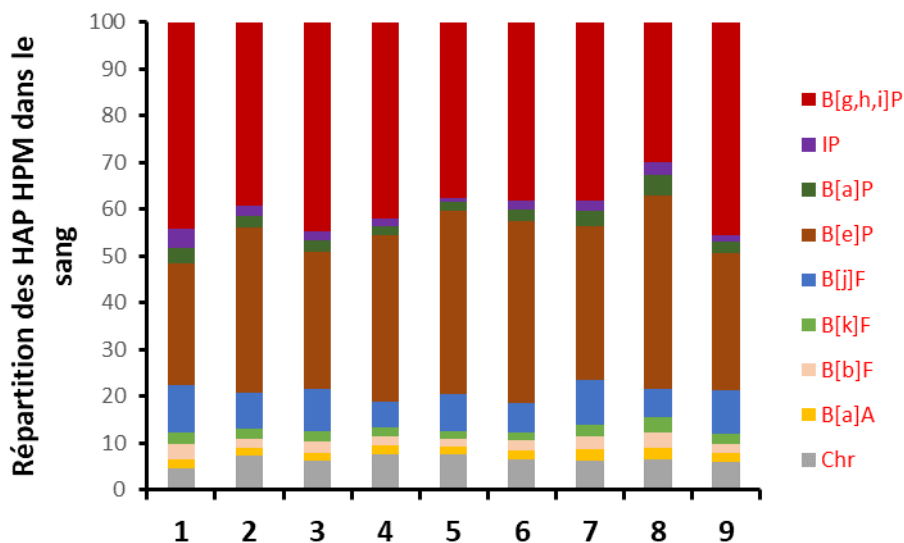


Figure 37 : Répartition des HAP à haut poids moléculaire dans le sang des rats Wistar, 4 heures après l'exposition à un mélange de HAP

$n = 10$ rats. Chr : chrysène, B[a]A : benzo[a]anthracène, B[b]F : benzo[b]fluoranthène, B[k]F : benzo[k]fluoranthène, B[j]F : benzo[j]fluoranthène, B[e]P : benzo[e]pyrène, B[a]P : benzo[a]pyrène, IP : indénol[1,2,3-cd]pyrène, B[g,h,i]P : benzo[g,h,i]pérylène, DB[a,h]A : dibenzo[a,h]anthracène

Le sang était prélevé dans l'aorte des rats 4 heures après le gavage ce qui correspond au pic sanguin des HAP à HPM, celui-ci étant situé entre 3 et 6 heures [Laurent 2002, Marie 2010, Moreau 2015b]. Ainsi, pour arriver au niveau de l'aorte, les HAP absorbés au niveau intestinal devaient passer avant dans le foie où ils pouvaient être métabolisés (effet du premier passage hépatique). Ceci signifie que le pourcentage sanguin des HAP mesuré sous forme inchangée correspondait à la quantité des HAP absorbés et qui n'avaient pas encore été métabolisés. Pour les HAP à FPM (Flua et Pyr), leur pic plasmatique est obtenu généralement 1 heure après l'exposition [Bartosek 1984] ce qui signifie qu'ils avaient déjà fait plusieurs passages dans le foie au moment du prélèvement de nos échantillons sanguins.

Tous ces résultats confirment que le pourcentage sanguin des HAP dépend de l'absorption et du métabolisme hépatique. De plus, comme pour l'absorption des HAP à HPM où le mécanisme d'absorption était identique entre les rats, la priorité de prise en charge des HAP par les enzymes hépatiques pour les HAP à HPM était identique entre les rats avec des HAP qui sont plus métabolisés que d'autres. Ainsi, les HAP à HPM qui subissent un métabolisme dès le 1^{er} passage hépatique sont : B[a]A, B[b]F, B[a]P, IP, et les autres HAP à HPM (B[g,h,i]P, B[e]P, B[j]F, Chr et B[k]F) sont les moins métabolisés.

3.1.2.7 Conclusion générale de la variabilité inter-individuelle de la toxicocinétique des HAP

La variabilité inter-individuelle de la toxicocinétique des HAP a été étudiée chez 10 rats W, de même âge et de poids similaires. Ils avaient une consommation de croquettes et un poids de fèces comparables. Cependant **le métabolisme et la toxicocinétique des HAP étaient différentes entre les rats** (Tableau 28).

Tableau 28 : Variabilité inter-individuelle entre les rats Wistar pour la toxicocinétique des HAP

Résultats	
Absorption	-Différence de l'absorption intestinale du Pyr et des HAP à HPM avec distinction de 2 groupes différents alors que l'absorption de Flua est comparable entre les rats
Distribution	Pourcentages sanguins des HAP variables entre les rats, avec une plus grande variabilité pour les HAP à HPM que pour le Flua et le Pyr

Métabolisme	-Métabolisme intestinal identique entre les rats -Métabolisme hépatique variable selon le rat
Elimination	-Elimination fécale du Flua, 1-OHP, 3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P comparable entre les rats -Elimination fécale du Pyr et des HAP à HPM variables selon le rat -Elimination urinaire des métabolites des HAP variable selon le rat surtout pour les métabolites monohydroxylés / diols et tétraol

L'absorption intestinale des HAP était très variable en fonction des rats ce qui pourrait être expliquée par une différence de sécrétion des sels biliaires et du microbiote intestinal. Par contre, le métabolisme intestinal des HAP était comparable entre les rats et il existait une corrélation entre la formation du 1-OHP et du 3-OHB[a]P du fait d'une transformation enzymatique passant tous les 2 par les CYP. A l'inverse, ces métabolites n'étaient pas corrélés au tétraol- B[a]P qui nécessite l'intervention de l'EH.

La variabilité inter-individuelle importante du volume urinaire et de la concentration urinaire de la créatinine pourrait être due à une différence du taux de la filtration rénale du sang suite à la différence de la quantité d'eau consommée par les rats. De plus, la variabilité inter-individuelle des métabolites urinaires des HAP montrait la capacité des rats à former des métabolites bien spécifiques. Cette variabilité inter-individuelle pourrait être expliquée par des différences de l'absorption des HAP, de l'activité enzymatique, mais aussi de la fonction rénale (filtration rénale des métabolites hydrophiles comme le tétraol-B[a]P et transport actif du 3-OHB[a]P par variabilité de l'activité ou de l'expression des transporteurs) entre les rats.

Ces résultats soulignent qu'il existe des différences significatives inter-individuelles dans la toxicocinétique et le métabolisme des HAP et apportent des données sur ces niveaux de variabilité en fonction des étapes de la toxicocinétique. Ces données sont importantes car les comités d'éthique demandent de justifier le choix des effectifs animaux en fonction de la variabilité des résultats attendus. A ma connaissance, ces données sur la variabilité des résultats attendus dans une étude de toxicocinétique n'étaient aujourd'hui pas disponibles dans la littérature.

3.2 Facteurs environnementaux

3.2.1 Effet du jeûne sur la toxicocinétique du B[a]P

Pour répondre à cette question, nous avons comparé 3 rats W mis à jeun 16 heures avant l'euthanasie à 3 autres rats W non mis à jeun, après exposition du lundi au jeudi au mélange de HAP ajusté à $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{J}^{-1}$ de B[a]P (0,2-CTP) (protocole 3).

Dans chacun des 2 groupes, nous avons comparé les paramètres mesurés au niveau fécal et urinaire de J3 par rapport à J2 afin que chaque rat soit son propre témoin (du fait de la grande variabilité inter-individuelle montrée dans le chapitre précédent). Au niveau sanguin, nous avons comparé les pourcentages des HAP et du tétraol-B[a]P par rapport à la dose administrée entre les 2 groupes.

3.2.1.1 Effet du jeûne sur les paramètres généraux influençant l'absorption intestinale

Alors que chez les 3 rats non mis à jeun, le poids des fèces augmentait de 20 % entre J2 et J3, la mise à jeun a eu un effet variable sur le poids des fèces entre les 3 rats (Figure 36) : diminution du poids de 50 % pour le rat 4, augmentation de 65% pour le rat 5 et pas de variation pour le rat 6 (Figure 38).

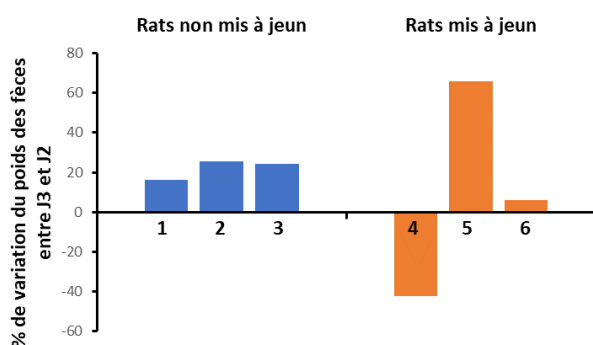


Figure 38 : Pourcentage de variation du poids des fèces entre le 2ème (J2) et le 3ème (J3) jour d'exposition au B[a]P

Les rats étaient exposés au B[a]P le 1^{er} (J1), le 2^{ème} (J2), le 3^{ème} (J3) et le 4^{ème} (J4) jour de la semaine. Les fèces de 24 heures étaient collectées pendant le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour. Les rats 4,5 et 6 étaient mis à jeun pendant 16 heures à la fin du 3^{ème} jour d'exposition jusqu'à l'euthanasie au 4^{ème} jour, alors que les rats 1,2 et 3 avaient accès à la nourriture ad libitum. L'accès à l'eau était ad libitum dans les deux groupes. Les rats étaient euthanasiés 4 heures après le 4^{ème} gavage le 4^{ème} jour (J4).

3.2.1.2 Effet du jeûne sur l'absorption intestinale du B[a]P

Le pourcentage d'élimination fécale du B[a]P augmentait de 5 à 70% entre J2 et J3 pour les rats non mis à jeun (Figure 39). Chez les rats mis à jeun, cette variabilité était encore plus grande

avec une diminution de 75 et 34 % pour les rats 4 et 6 mais une augmentation de 58 % pour le rat 5 (Figure 39).

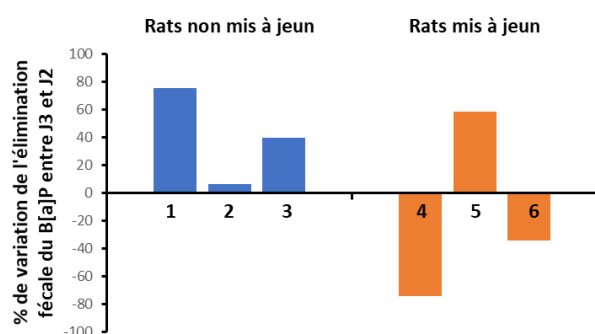


Figure 39 : Pourcentage de variation de l'élimination fécale du B[a]P entre le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour d'exposition au B[a]P

Les rats étaient exposés au B[a]P le 1^{er} (J1), le 2^{ème} (J2), le 3^{ème} (J3) et le 4^{ème} (J4) jour de la semaine. Les fèces de 24 heures étaient collectées pendant le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour. Les rats 4, 5 et 6 étaient mis à jeun pendant 16 heures à la fin du 3^{ème} jour d'exposition jusqu'à l'euthanasie au 4^{ème} jour, alors que les rats 1, 2 et 3 avaient accès à la nourriture ad libitum. L'accès à l'eau était ad libitum dans les deux groupes. Les rats étaient euthanasiés 4 heures après le 4^{ème} gavage le 4^{ème} jour (J4).

Cette variation de l'élimination fécale du B[a]P entre les 3 rats mis à jeun peut être expliquée par la variation du poids des fèces comme l'atteste la bonne corrélation entre ces 2 paramètres ($R = 1,00$; $p < 0,001$, résultats non montrés). Un autre paramètre à prendre en compte est la diminution de la sécrétion biliaire qui existe avec le jeûne et qui peut être variable entre les rats [Dumaswala 1994].

De plus, chez les rats non mis à jeun, la variation de l'absorption du B[a]P entre J2 et J3 pourrait être expliquée par une différence de consommation de croquettes entre ces 2 jours.

3.2.1.3 Effet du jeûne sur le métabolisme intestinal du B[a]P

Pour les 3 rats mis à jeun à J3, l'élimination fécale du 3-OHB[a]P diminuait de 27 à 64 % par rapport à J2 alors que chez les rats non mis à jeun elle augmentait de 38 à 137 % (Figure 40). Pour le tétraol-B[a]P, l'effet du jeûne était plus variable entre les 3 rats. Pour le rat 4, il n'y avait pas de modification du taux de tétraol-B[a]P entre J3 et J2 alors que pour les rats 5 et 6, celui-ci était augmenté de 300 et 17% respectivement (Figure 40). Pour les rats non mis à jeun, le pourcentage du tétraol-B[a]P était augmenté de façon comparable pour les 3 rats (Figure 40).

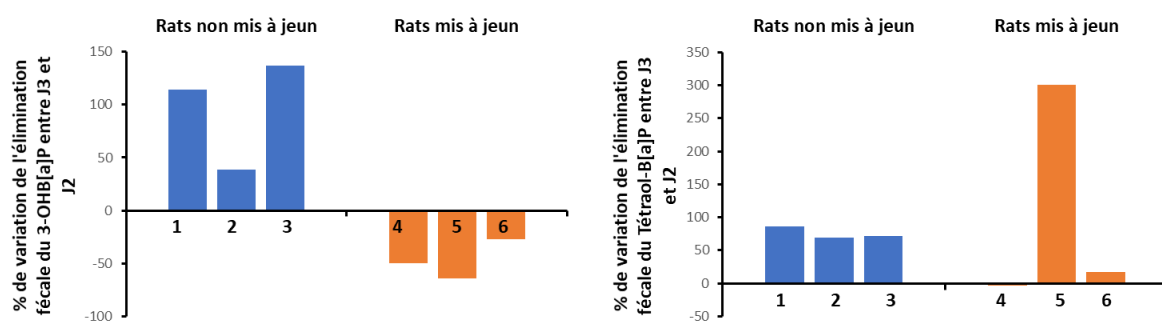


Figure 40 : Pourcentage de variation de l'élimination fécale du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P entre le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour d'exposition au B[a]P

Les rats étaient exposés au B[a]P le 1^{er} (J1), le 2^{ème} (J2), le 3^{ème} (J3) et le 4^{ème} (J4) jour de la semaine. Les fèces de 24 heures étaient collectées pendant le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour. Les rats 4,5 et 6 étaient mis à jeun pendant 16 heures à la fin du 3^{ème} jour d'exposition jusqu'à l'euthanasie au 4^{ème} jour, alors que les rats 1,2 et 3 avaient accès à la nourriture ad libitum. L'accès à l'eau était ad libitum dans les deux groupes. Les rats étaient euthanasiés 4 heures après le 4^{ème} gavage le 4^{ème} jour (J4).

La diminution de l'élimination fécale du 3-OHB[a]P avec le jeûne ne peut pas être expliquée par l'augmentation de l'absorption du B[a]P, car chez le rat 5, bien que l'élimination fécale du B[a]P était augmentée, le % du B[a]P éliminé sous forme de 3-OHB[a]P était diminué.

Une autre hypothèse serait une diminution du métabolisme du B[a]P ou plutôt une modification des voies métaboliques du B[a]P avec l'augmentation de la voie de bio-activation ce qui est en accord avec l'augmentation de l'élimination fécale du tétraol-B[a]P.

3.2.1.4 Effet du jeûne sur les paramètres influençant l'élimination urinaire des métabolites

Avec le jeûne, le volume urinaire augmentait de 220, 100 et 60 % chez les rats 4, 5 et 6 respectivement (Figure 41). Alors que la quantité de créatinine éliminée par jour augmentait de 86, 29 et 23 %, la concentration urinaire de la créatinine diminuait de 41, 35 et 22 %. Chez les rats non mis à jeun, les variations de ces 3 paramètres entre J2 et J3 étaient très faibles : diminution du volume urinaire de 12 %, augmentation de la concentration urinaire de créatine de 15 %, diminution de la quantité de créatinine urinaire de 17 % (Figure 41).

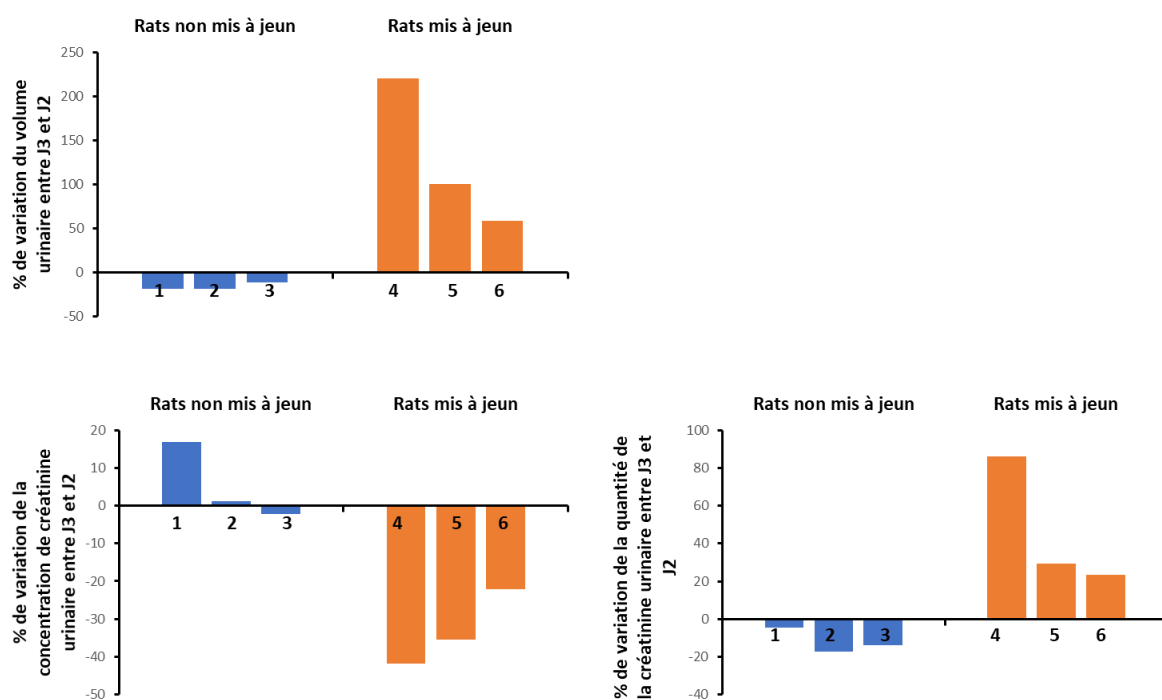


Figure 41 : Pourcentage de variation du volume urinaire, de la concentration urinaire de la créatinine et de la quantité urinaire de créatinine entre le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour d'exposition au B[a]P

Les rats étaient exposés au B[a]P le 1^{er} (J1), le 2^{ème} (J2), le 3^{ème} (J3) et le 4^{ème} (J4) jour de la semaine. Les urines de 24 heures étaient collectées pendant le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour. Les rats 4,5 et 6 étaient mis à jeun pendant 16 heures à la fin du 3^{ème} jour d'exposition jusqu'à l'euthanasie au 4^{ème} jour, alors que les rats 1,2 et 3 avaient accès à la nourriture ad libitum. L'accès à l'eau était ad libitum dans les deux groupes. Les rats étaient euthanasiés 4 heures après le 4^{ème} gavage le 4^{ème} jour (J4).

Avec le jeûne, la consommation d'eau des 3 jours a augmenté de 45 % par rapport à celle des rats non mis à jeun (*résultats non montrés*), ce qui explique l'augmentation du volume urinaire et de la quantité de créatinine éliminée du fait d'une filtration rénale plus importante. La diminution de la concentration urinaire de créatinine s'explique quant à elle par la dilution des urines due à l'augmentation du volume urinaire ($R = -1,00; p < 0,001$).

3.2.1.5 Effet du jeûne sur le métabolisme hépatique du B[a]P et l'élimination urinaire de ses métabolites

Le jeûne diminuait l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P entre J3 et J2, de 70 %, 74 % et 40 % chez les rats 4, 5 et 6 respectivement, alors qu'il augmentait l'élimination urinaire du tétraol-B[a]P de 24 %, 23 % et 29 % (Figure 42). Chez les rats non mis à jeun, l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P variait de -40% à 60% et celle du tétraol de -35% à -10% (Figure 42).

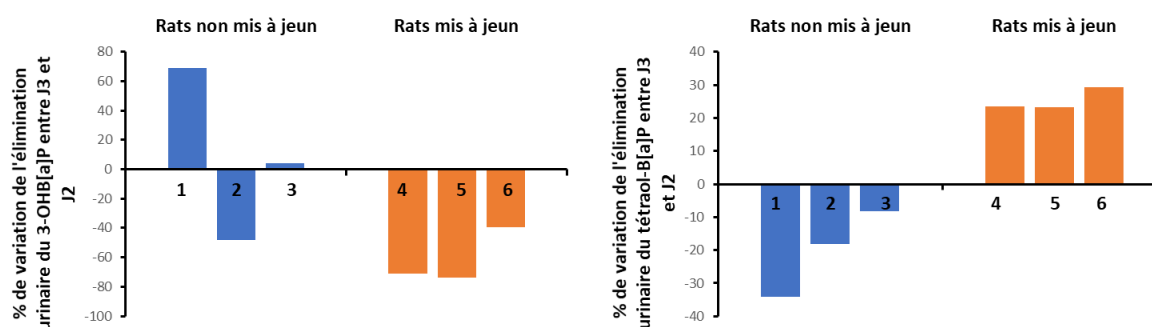


Figure 42 : Pourcentage de variation de l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P entre le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour d'exposition au B[a]P

Les rats étaient exposés au B[a]P le 1^{er} (J1), le 2^{ème} (J2), le 3^{ème} (J3) et le 4^{ème} (J4) jour de la semaine. Les urines de 24 heures étaient collectées pendant le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour. Les rats 4,5 et 6 étaient mis à jeun pendant 16 heures à la fin du 3^{ème} jour d'exposition jusqu'à l'euthanasie au 4^{ème} jour, alors que les rats 1,2 et 3 avaient accès à la nourriture ad libitum. L'accès à l'eau était ad libitum dans les deux groupes. Les rats étaient euthanasiés 4 heures après le 4^{ème} gavage le 4^{ème} jour (J4).

La diminution de l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P pourrait être due à une diminution du métabolisme hépatique du B[a]P et/ou une modification des voies métaboliques du B[a]P avec diminution de la voie de détoxification et augmentation de la voie de bio-activation. Ceci est en accord avec la littérature où différentes études ont montré que le jeûne modifiait l'activité des CYP ce qui diminuait le métabolisme du B[a]P et modifiait le rapport des métabolites provenant des différentes voies. Ainsi chez les rats SD, le jeûne augmentait l'expression et l'activité des CYP 1A1 et 1A2 dans la muqueuse nasale [Longo 2000], et chez les truites, il générait une diminution du métabolisme du B[a]P avec une augmentation de la formation des phénols par rapport aux diols [Kennedy 2008]. Toutefois, chez des rats Fisher, le jeûne n'entraînait pas de modification de l'expression des CYP 1A1 et 1A2 dans les microsomes hépatiques [Qu 1998] ce qui souligne que les variations des CYP dues au jeûne sont variables selon l'espèce ou le modèle (animal ou cellulaire) utilisé.

L'augmentation de l'élimination urinaire du tétraol-B[a]P ne peut pas être expliquée par une augmentation de la formation du tétraol-B[a]P au niveau hépatique car le pourcentage de la dose administrée trouvé sous forme de tétraol-B[a]P dans le sang était identique entre les rats mis à jeun et les rats non mis à jeun (Figure 43).

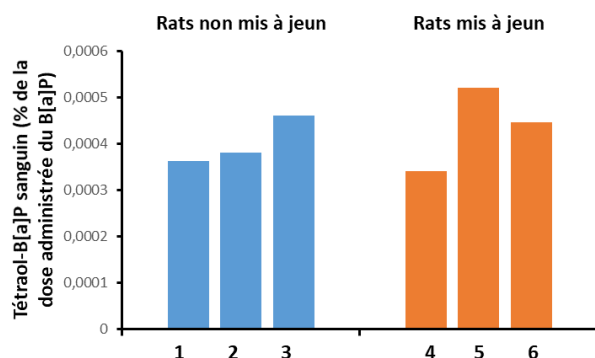


Figure 43 : Tétrao-B[a]P sanguin exprimé en pourcentage de la dose administrée du B[a]P dans le sang des rats Wistar 4 heures après l'exposition au B[a]P

Les rats étaient exposés au B[a]P le 1^{er} (J1), le 2^{ème} (J2), le 3^{ème} (J3) et le 4^{ème} (J4) jour de la semaine. Les urines de 24 heures étaient collectées pendant le 2^{ème} (J2) et le 3^{ème} (J3) jour. Les rats 4,5 et 6 étaient mis à jeun pendant 16 heures à la fin du 3^{ème} jour d'exposition jusqu'à l'euthanasie au 4^{ème} jour, alors que les rats 1,2 et 3 avaient accès à la nourriture ad libitum. L'accès à l'eau était ad libitum dans les deux groupes. Les rats étaient euthanasiés 4 heures après le 4^{ème} gavage le 4^{ème} jour (J4).

Cette augmentation pourrait être plutôt due à l'augmentation de l'élimination urinaire du tétraol-B[a]P du fait de l'augmentation de la filtration rénale d'autant que l'augmentation de l'élimination urinaire du tétraol-B[a]P est comparable à celle du volume urinaire ($R = 0,812$; $p = 0,042$) mais opposée à celle de la concentration de la créatinine ($R = -0,829$; $p = 0,042$).

3.2.1.6 Effet du jeûne sur l'absorption et le métabolisme hépatique du B[a]P

Les pourcentages sanguins du B[a]P chez les rats mis à jeun étaient plus élevés que ceux des rats non mis à jeun avec là encore une plus grande variabilité entre les rats (Figure 44). Cette augmentation du pourcentage sanguin du B[a]P avec le jeûne pourrait être due soit à une absorption plus élevée du B[a]P soit à une diminution du métabolisme hépatique du B[a]P. En effet, en l'absence de croquettes dans l'intestin, le B[a]P ne pourrait pas s'adsorber sur les aliments et resterait sous forme libre, forme qui est plus facilement absorbée [Kawamura 1988, van Schooten 1997].

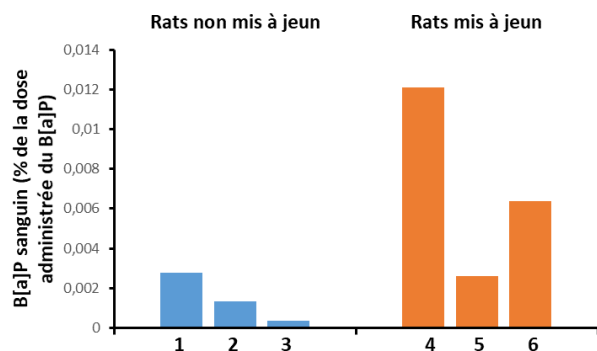


Figure 44 : B[a]P sanguin exprimé en pourcentage de la dose administrée du B[a]P dans le sang des rats Wistar 4 heures après l'exposition au B[a]P

Les rats étaient exposés au B[a]P le 1^{er} (J1), le 2^{ème} (J2), le 3^{ème} (J3) et le 4^{ème} (J4) jour de la semaine. Les rats 4,5 et 6 étaient mis à jeun pendant 16 heures à la fin du 3^{ème} jour d'exposition jusqu'à l'euthanasie au 4^{ème} jour, alors que les rats 1,2 et 3 avaient accès à la nourriture ad libitum. L'accès à l'eau était ad libitum dans les deux groupes. Les rats étaient euthanasiés 4 heures après le 4^{ème} gavage le 4^{ème} jour (J4).

3.2.1.7 Conclusion générale sur l'effet du jeûne sur la toxicocinétique du B[a]P

Les effets du jeûne étaient observés sur la toxicocinétique et le métabolisme du B[a]P (Figure 45).

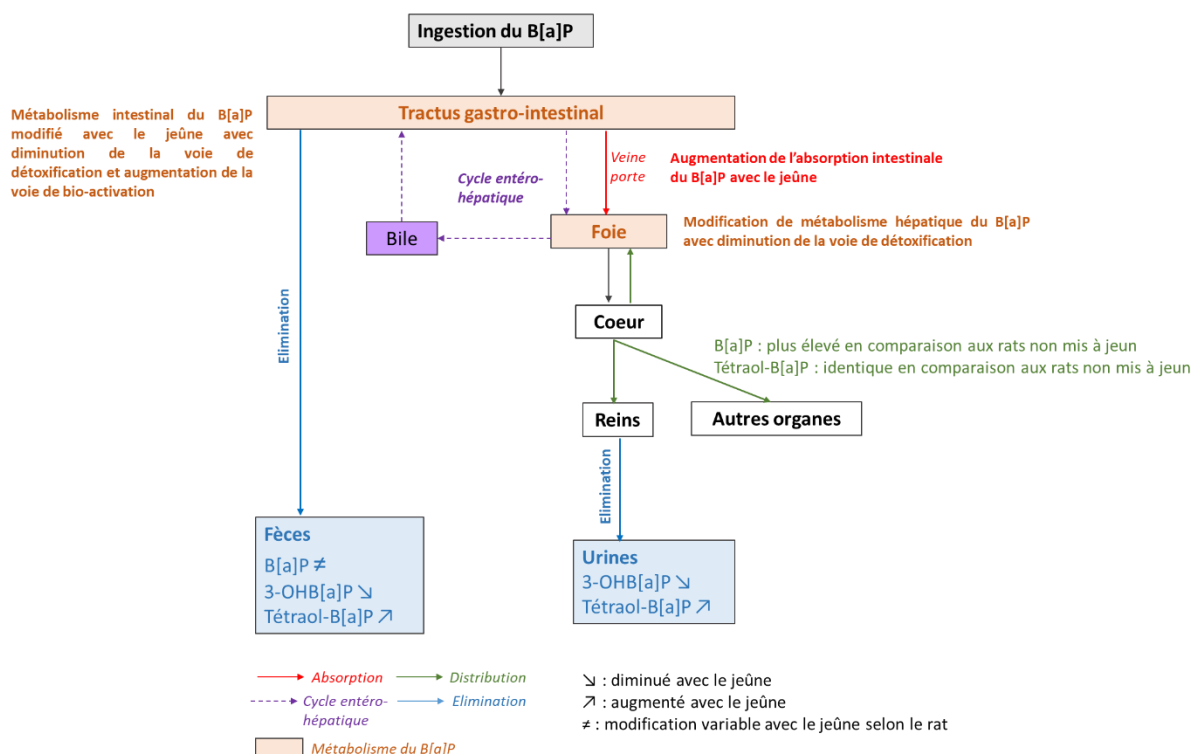


Figure 45 : Effet du jeûne sur la toxicocinétique du benzo[a]pyrène

B[a]P : benzo[a]pyrène, 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène.

Au niveau de l'intestin, le jeûne a un effet très variable sur l'élimination fécale du B[a]P des rats pouvant être expliqué par une différence de transit intestinal et/ou une différence de sécrétion biliaire. De plus, le jeûne augmenterait la quantité de B[a]P libre au niveau intestinal car non adsorbé sur les croquettes ce qui favoriserait son absorption intestinale expliquant ainsi un pourcentage sanguin de B[a]P plus élevée. Enfin, le métabolisme intestinal de B[a]P serait modifié entraînant une diminution de la voie de détoxification et une augmentation de la voie de bio-activation.

Au niveau rénal, le jeûne induit une augmentation de la filtration rénale de la créatinine et du tétraol-B[a]P en lien avec l'augmentation de la consommation d'eau des animaux. La diminution de l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P pourrait être expliquée par une diminution du métabolisme hépatique du B[a]P et/ou une modification des voies métaboliques du B[a]P avec diminution de la voie de détoxification et augmentation de la voie de bio-activation.

Ces résultats soulignent que le jeûne a un effet sur la toxicocinétique et le métabolisme des HAP et pour certains paramètres (comme pour l'absorption et le métabolisme intestinal), il peut augmenter la variabilité de réponse selon le rat. Ceci qui doit être pris en compte lors des études de toxicocinétique si les rats étaient mis à jeun pour autres raisons (comme analyse de la glycémie dans le sang).

4 Conclusion générale sur l'impact des facteurs génétiques et environnementaux sur la toxicocinétique des HAP

Toutes ces études ont rapporté de nouvelles informations sur la toxicocinétique et le métabolisme des HAP permettant de mieux comprendre la variabilité des résultats rapportés dans la littérature.

Ainsi, le choix de la souche de rat, la variabilité inter-individuelle et le jeûne sont des facteurs qui ont une influence sur la toxicocinétique des HAP. De plus, l'effet de ces facteurs sur le métabolisme qui est une étape cruciale dans la bio-activation des HAP, était variable selon le lieu de métabolisation. Par exemple, le métabolisme hépatique était plus élevé pour tous les HAP chez les SD que chez les W, alors qu'au niveau intestinal, le métabolisme du Pyr était identique entre les 2 souches et le métabolisme du B[a]P modifié avec une augmentation de la voie de bio-activation du B[a]P chez les SD.

De plus, différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'effet de ces différents facteurs sur la toxicocinétique des HAP. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier chez les 2 souches l'expression et l'activité enzymatique des CYP et EH au niveau hépatique et intestinal, d'étudier le microbiote intestinal, et d'analyser les adduits à l'ADN (dans les cellules sanguines périphériques par exemple) pour montrer l'effet génotoxique des HAP à HPM autres que le B[a]P qui présentaient un métabolisme plus élevé chez les SD.

De plus, une question se pose sur le choix de la souche de rats : est-ce qu'il faut choisir une souche inbred pour diminuer la variabilité inter-individuelle et réduire le nombre de rats nécessaire pour une étude ? ou faut-il choisir une souche outbread pour mimer la variabilité génétique de la population humaine et dans ce cas augmenter le nombre de rats ?

Enfin, le jeûne ne doit être appliqué que si des analyses supplémentaires nécessitant le jeûne sont prévues.

Partie III : Discussion générale et perspectives

Le concept d'exposome fait référence à l'ensemble des facteurs qui peuvent influencer notre état de santé et auxquels nous sommes soumis dès la conception et tout au long de notre vie. Outre les influences liées au mode de vie et aux déterminants socio-économiques, ce concept met l'accent sur l'exposition aux polluants environnementaux et aux molécules produites dans notre organisme (notamment celles issues du métabolisme des xénobiotiques, qui peuvent parfois avoir un potentiel toxique plus important que la molécule initiale) [Miller 2014, Vineis 2017, Wild 2012]. Il s'agit donc d'un défi majeur que de comprendre la production, les interactions potentielles et le devenir des métabolites produits dans l'organisme en réponse à l'exposition aux polluants environnementaux afin de développer des biomarqueurs d'exposition pertinents pour évaluer l'impact sur la santé d'une exposition chronique à un mélange complexe de polluants.

L'effet mélange ou l'effet « cocktail » constitue donc un enjeu majeur de santé publique. En effet, l'effet cocktail peut entraîner un effet additif des effets individuels de chacune des substances présentes dans le mélange, un effet synergique où l'effet observé avec le mélange est supérieur à la somme des effets individuels, ou encore un effet antagoniste ou compétitif où l'effet observé avec le mélange est inférieur à la somme des effets individuels. Actuellement, du fait d'un manque de données, l'effet additif est l'effet qui est le plus souvent utilisé lors des études d'évaluation de risques.

Les HAP sont un bon modèle pour étudier la complexité de l'effet mélange car ils constituent une famille de molécules ubiquitaire de l'environnement qui sont toujours présentes sous forme de mélanges dont la composition est très variable selon la source d'émission. Les HAP sont divisés en 2 groupes : les HAP gazeux à FPM, prépondérants dans l'environnement mais peu toxiques, et les HAP particuliers à HPM, connus pour leur cancérogénicité. Bien que le B[a]P soit le seul composé classé cancérogène certain, d'autres HAP à HPM sont potentiellement cancérogènes selon la classification du CIRC [IARC 2010]. Pour acquérir leur cancérogénicité, les HAP doivent être métabolisés. Leur métabolisme est complexe et constitué de plusieurs voies de bio-activation, notamment la voie des diol-époxydes qui va donner naissance aux adduits à l'ADN précurseurs des effets génotoxiques.

Des études *in vitro* sur l'apparition des adduits à l'ADN après exposition au B[a]P ont montré que la présence d'autres HAP pouvait avoir un effet synergique ou antagoniste selon le mélange ou le modèle cellulaire utilisé [Libalova 2014, Staal 2008, Tarantini 2011]. Ces résultats étaient en général liés à la modification du métabolisme du B[a]P en présence d'autres HAP.

Cependant, à notre connaissance, très peu d'études se sont intéressées à l'effet du mélange sur la toxicocinétique des HAP à HPM dont le B[a]P. Bouchard et al. (2002) ont montré que la présence d'autres HAP dans un mélange synthétique n'avait pas d'effet sur l'élimination urinaire du 1-OHP, métabolite du Pyr, HAP à FPM. Grova et al. (2017) ont étudié l'élimination urinaire des métabolites monohydroxylés après exposition de rats à un mélange synthétique de HAP à HPM mais les résultats trouvés n'ont pas été comparés à ceux après exposition à un seul HAP.

La biosurveillance de l'exposition professionnelle aux HAP se fait surtout par l'analyse dans les urines des biomarqueurs d'exposition qui sont des métabolites des HAP dont les plus utilisés sont le 1-OHP et le 3-OHB[a]P [INRS 2018]. L'analyse du 1-OHP urinaire se fait depuis de nombreuses années en routine pour la biosurveillance des travailleurs exposés aux HAP, car la méthode d'analyse est facile et spécifique [Jongeneelen 1985]. De plus, le Pyr est un des HAP le plus étudié en littérature puisqu'en général il est un des composés majeurs des mélanges d'HAP mais c'est un HAP non cancérigène et sa proportion par rapport aux autres HAP cancérigènes est très variable en fonction du secteur d'activité. Ainsi l'utilisation du 1-OHP comme biomarqueur d'exposition nécessite la connaissance du ratio Pyr/B[a]P ou Pyr/HAP cancérigènes [INRS 2018].

Par la suite, le dosage du 3-OHB[a]P, métabolite monohydroxylé du B[a]P, a été développé pour représenter les HAP cancérigènes [Barbeau 2011, Jongeneelen 1984]. Cependant, le dosage de ce métabolite nécessite une méthode très sensible et représente la voie de détoxification du B[a]P. Le dosage d'un autre métabolite du B[a]P, le tétraol-B[a]P, provenant de la voie de bio-activation du B[a]P a été récemment développé par notre équipe [Barbeau 2018]. Toutefois, ces 2 métabolites proviennent seulement du B[a]P ce qui pose un problème pour l'estimation du risque des mélanges dont la composition varie selon la source d'émission. Ainsi, notre équipe a développé l'analyse urinaire des métabolites d'autres HAP à HPM (B[a]A-8,9-diol, 3-OHB[a]A, Chr-1,2-diol, 3-OHChr, 6-OHChr, B[k]F-8,9-diol, 8-OHB[k]F, 9-OHB[k]F, 10-OHB[k]F, B[e]P-4,5-diol, 3-OHB[e]P) qui sont classés en 2B par le CIRC (comme le B[a]A, le Chr, le B[k]F). Ces métabolites sont des biomarqueurs d'exposition des autres HAP particuliers présents dans les mélanges [Marques 2021], mais leur analyse nécessite des méthodes très sensibles du fait de leurs faibles concentrations. Actuellement, par manque de données, il n'existe pas de valeurs réglementaires à ne pas dépasser pour ces biomarqueurs afin de limiter les risques sanitaires des populations exposées.

La plupart des études expérimentales qui ont étudié la toxicocinétique et le métabolisme des HAP se sont intéressées à des HAP individuels et ont très souvent utilisé des doses élevées d'exposition (entre 0,3 et 10 mg.kg⁻¹). Le plus étudié était le Pyr car son métabolite urinaire (1-OHP) était facile à analyser et le B[a]P car c'est le seul HAP classé comme cancérigène certain pour l'homme par le CIRC. Cependant, la connaissance de la toxicocinétique des HAP en mélanges doit prendre en compte tous les HAP présents dans le mélange et en particulier ceux classés comme cancérigènes probables ou possibles pour l'homme car ils peuvent jouer un rôle important dans la cancérogenèse des HAP qui sont toujours présents sous forme de mélanges.

L'objectif principal de ce travail a donc été d'étudier l'effet des HAP en mélange, principalement des HAP à HPM, sur la toxicocinétique et plus spécifiquement sur le métabolisme du B[a]P en utilisant des conditions d'exposition les plus réalistes possibles : faible dose d'exposition, exposition à un mélange industriel dérivant du brai de houille, exposition chronique pendant 10 semaines. Le modèle murin était des rats SD qui était la souche la plus utilisée dans la littérature. Pour étudier l'effet cocktail, nous avons comparé les paramètres de toxicocinétique mesurés chez des rats SD après exposition au B[a]P seul avec ceux des rats SD exposés au mélange industriel de HAP ajusté à la même dose de B[a]P.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à **l'effet du mélange** et de **l'exposition chronique** sur le **métabolisme hépatique et l'élimination urinaire** du B[a]P et des autres HAP présents dans le mélange par l'analyse des métabolites urinaires du B[a]P (3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P) et du Pyr (1-OHP) et des autres HAP à HPM (B[a]A-8,9-diol, 3-OHB[a]A, Chr-1,2-diol, 3-OHChr, 6-OHChr, B[k]F-8,9-diol, 8-OHB[k]F, 9-OHB[k]F, 10-OHB[k]F, B[e]P-4,5-diol et 3-OHB[e]P) [El Hajjar 2023]. *Dans un second temps*, nous avons étudié **l'effet du mélange** et de **l'exposition chronique** sur **l'absorption et le métabolisme intestinal** du B[a]P et des autres HAP à HPM, par l'analyse des HAP parents et de certains métabolites (1-OHP, 3-OHB[a]P et tétraol-B[a]P) dans les fèces et les organes.

Pour répondre à cette question, des mises au point de l'analyse des HAP et de leurs métabolites ont été faites dans différentes matrices biologiques (fèces, sang) et dans le foie et les reins. Au niveau des fèces et des organes, les HAP parents ont été extraits par double LLE suivie d'une dSPE et analysés par HPLC-Fluo. La même méthode a été appliquée pour l'analyse du 1-OHP et du 3-OHB[a]P dans les fèces. Au niveau sanguin, les HAP parents ont été extraits par double LLE et analysés par HPLC-Fluo. Enfin, le tétraol-B[a]P a été analysé dans les fèces et le sang

par GC-MSMS-NCI après extraction par SPE. L'analyse du 1-OHP et du 3-OHB[a]P dans le sang n'a pas pu être réalisée car ces métabolites sont instables dans le sang. Ils peuvent être oxydés en diones ou bien se lier à des protéines plasmatiques comme l'hémoglobine et l'albumine [Sugihara 2003].

L'originalité de notre travail est que nos rats ont été exposés non pas à un mélange synthétique mais à un mélange réel prélevé dans une entreprise de métallurgie. Ce mélange a été extrait d'un produit industriel à base de brai de goudron de houille entrant dans la composition des électrodes de four consommées lors de la production de métaux. La composition en HAP a été déterminée [Bourgart 2019b] et l'exposition a été réalisée avec le mélange ajusté à la dose de B[a]P appliquée en monoexposition. En effet, la plupart des études *in vivo* publiées dans la littérature [Bouchard 1998a, 2002, Grova 2017] ont utilisé des mélanges synthétiques de HAP. Cependant, quelques études *in vitro* ont utilisé des mélanges réels (comme les extraits organiques des particules de diesel, les mélanges à base de brai de houille) et ont montré que d'autres polluants (comme les métaux) présents dans le mélange pouvaient avoir un effet inhibiteur sur l'activité des enzymes de métabolisme des HAP (CYP 1A1, 1B1) et par la suite entraîner une diminution du métabolisme des HAP [Benedetti 2007, Bourgart 2019b, Vakharia 2001, von Koschembahr 2020].

Un élément important de ce travail était de choisir une dose assez faible pour éviter la saturation des systèmes enzymatiques. En effet, dans une étude *in vitro* sur des modèles de peau humaine en culture, notre équipe avait montré que lorsque la dose d'exposition de B[a]P augmentait de 0,88 à 22,11 nmol.cm⁻², le pourcentage de tétraol-B[a]P formé dans le milieu diminuait alors que celui du 3-OHB[a]P restait identique ce qui montrait qu'avec une dose élevée les systèmes enzymatiques de la voie de bioactivation et notamment l'EH était saturée [Bourgart 2019a]. Dans notre étude, l'absorption intestinale, le métabolisme intestinal et hépatique étaient identiques pour les doses 0,02 et 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ ce qui montre que les doses utilisées ne saturaient pas les systèmes enzymatiques après une semaine d'exposition.

Nous avons montré que **le métabolisme hépatique du B[a]P était diminué avec le mélange par rapport au B[a]P seul**, que ce soit au niveau de la voie de détoxification ou de la voie de bio-activation. Cette diminution de production de métabolites pourrait être expliquée par une saturation et/ou une compétition enzymatique entre les différents HAP présents dans le mélange

et/ou par une diminution de l'absorption du B[a]P avec le mélange [Bartosek 1984, Bourgart 2019b, Shimada 2003].

La bio-activation du B[a]P, du Chr et du B[e]P était plus faible chez le rat en comparaison à l'homme alors que celle du B[a]A et du B[k]F était identique entre les 2 espèces. Le ratio 3-OHB[a]P / tétraol-B[a]P urinaire était 500 fois plus élevé que celui observé chez des travailleurs exposés aux HAP où il est de l'ordre de 1 [Barbeau 2018]. **Ceci montre que la voie de détoxification est plus importante chez le rat que chez l'homme** ce qui est en accord avec la littérature. En effet, il a été montré que l'activité de l'EH, enzyme qui intervient uniquement dans la voie de bioactivation pour catalyser l'hydroxylation d'époxydes en époxydes diols et entraîner la formation du tétraol-B[a]P, était plus faible dans les microsomes hépatiques de rat que dans les microsomes hépatiques humains [Cornet 1995, Pushparajah 2008].

De plus, les niveaux urinaires des diols du Chr (Chr-1,2-diol) et du B[e]P (B[e]P-4,5-diol) qui résultent de la voie de bio-activation [Cooper 1980, Levin 1978] étaient identiques à ceux des métabolites monohydroxylés (3-OHChr et 6-OHChr, 3-OHB[e]P) qui résultent de la voie de détoxification, alors que chez des travailleurs exposés au même mélange pendant l'entretien des électrodes des fours de métallurgie, les niveaux des diols étaient toujours plus élevés que ceux des métabolites monohydroxylés [Marques 2021]. Cependant, les niveaux urinaires du B[a]A-8,9-diol et du B[k]F-8,9-diol étaient plus élevés que les métabolites monohydroxylés (3-OHB[a]A, 8-OHB[k]F) chez le rat comme chez les travailleurs [Marques 2021].

L'absorption intestinale pourrait être augmentée avec le mélange puisque nous avons montré que l'élimination fécale du B[a]P était plus faible. Ceci pourrait être expliqué par une saturation de certaines familles des transporteurs ABC qui peuvent être impliquées dans l'excrétion des HAP des entérocytes vers la lumière intestinale [Buesen 2002, 2003, Hessel 2013]. Cependant, ces résultats vont à l'encontre d'autres études de la littérature qui ont montré que l'absorption des HAP est diminuée avec les mélanges [Bartosek 1984]. Cette équipe a montré que l'absorption du B[a]A et du triphénylène diminuait respectivement de 8 et 5 % lorsqu'ils étaient en mélange binaire en comparaison à leur administration seule.

D'autre part, il apparaît dans nos résultats que **le métabolisme intestinal était modifié avec une augmentation de la voie de bio-activation** ce qui pourrait expliquer la diminution de l'élimination fécale du B[a]P avec le mélange. La variation du métabolisme intestinal avec le mélange pourrait être expliquée par la présence dans le mélange d'autres HAP que le B[a]P (Chr, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[j]F, IP, B[g,h,i]P, DB[a,h]A) qui sont de forts inducteurs des CYP

impliqués dans la voie de détoxification (CYP 1A1) et la voie de bio-activation (CYP 1B1) des HAP et de l'EH [Cavret 2005, Ebert 2005, Gao 2022, Genies 2016, Pushparajah 2008].

De plus, la **différence de l'impact de l'effet mélange sur le métabolisme intestinal et hépatique** du B[a]P pourrait être expliqué par la quantité des HAP présents dans chaque organe. Ainsi, après exposition orale aux HAP, la quantité des HAP présents dans l'intestin est probablement supérieure à celle dans le foie ce qui explique qu'à faibles doses, et après une courte exposition, l'induction enzymatique ne soit visible qu'au niveau intestinal et surtout pour les enzymes responsables de la bio-activation du B[a]P (CYP 1B1 et EH) [Diggs 2013, Hodek 2013, Li 2020, Shi 2010]. Dans notre étude, le mélange a pu induire une induction intestinale des enzymes du métabolisme du B[a]P et plus spécifiquement ceux responsables de la bio-activation du B[a]P sans entraîner une induction enzymatique au niveau hépatique. Ainsi après exposition au mélange, il a pu y avoir une saturation et/ou une compétition enzymatique au niveau hépatique entraînant ainsi une diminution du métabolisme du B[a]P ce qui explique la diminution de l'élimination urinaire de ses métabolites que nous avons trouvée.

Un autre paramètre qui peut influencer la toxicocinétique du B[a]P est **la durée d'exposition**. Pour étudier ce facteur, les rats SD ont été exposés pendant 10 semaines au B[a]P (0,02 et 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹) et au mélange (ajusté à 0,02 et 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P).

Après 10 semaines d'exposition, **l'absorption intestinale du B[a]P et d'autres HAP est augmentée** comme le montre la diminution de l'élimination fécale du B[a]P et des autres HAP. Ceci pourrait être expliqué par l'apparition d'une inflammation au niveau intestinal qui altérerait la perméabilité de la barrière intestinale, comme démontré chez la souris Ribière et al. (2016). Une autre hypothèse serait la modification de la composition du microbiote intestinal suite à l'exposition répétée aux HAP [He 2019].

Le métabolisme intestinal n'était pas modifié après 10 semaines d'exposition à la plus forte dose de B[a]P seul (0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹) ce qui suggère qu'il n'y a pas eu d'induction enzymatique. Toutefois avec le mélange, la formation du tétraol-B[a]P était diminuée ce qui pourrait être dû à un retour du taux des enzymes intestinaux aux valeurs basales avant l'induction observée à la 1^{ère} semaine d'exposition. En effet, après une exposition répétée aux HAP, l'induction enzymatique pourrait disparaître après une durée d'exposition de 30 jours [Shi 2010].

Le métabolisme hépatique était augmenté avec uniquement la faible dose du B[a]P suite à l'augmentation de l'absorption du B[a]P. Pour la forte dose (0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P) et le mélange, l'absence d'augmentation du métabolisme hépatique après 10 semaines d'exposition

pourrait être dûe à une saturation des activités enzymatiques au niveau hépatique comme trouvée dès la 1^{ère} semaine d'exposition.

En conclusion, en cas d'exposition répétée à un mélange complexe de HAP cancérigènes, de nombreux facteurs tels que la dose et la durée d'exposition ont une influence majeure sur leurs différentes voies de métabolisation tant au niveau des voies de détoxification que de bioactivation.

Ce protocole a rapporté de nouveaux éléments pour la compréhension de la toxicocinétique des HAP et plus spécifiquement de leur métabolisme et le choix du biomarqueur pertinent pour l'évaluation du risque sanitaire dans un contexte d'exposition répétée à des mélanges :

- Au niveau hépatique, la voie de bio-activation, représentée par le tétraol-B[a]P, présente une saturation plus rapide avec la dose, le mélange et l'exposition répétée que la voie de détoxification qui est représentée par le 3-OHB[a]P. Ainsi, le tétraol-B[a]P serait un biomarqueur d'exposition plus pertinent que le 3-OHB[a]P pour évaluer le risque cancérigène des populations. Enfin, le métabolisme et les effets attendus suite à une exposition à un mélange complexe de HAP vont à l'encontre d'un simple effet additif.
- Parmi les métabolites des HAP à HPM, le B[a]A-8,9-diol et le B[k]F-8,9-diol semblent être de bons candidats comme biomarqueurs d'exposition aux mélanges d'HAP car les profils d'élimination entre les diols et les métabolites monohydroxylés du B[a]A et du B[k]F mesurés chez les rats sont comparables à ceux observés chez l'homme.
- La balance entre la voie de bio-activation et de détoxification du B[a]P et de certains HAP à HPM (Chr et B[e]P) est différente entre l'homme et le rat, ce qui nécessite une attention toute particulière lors de l'extrapolation des résultats du rat chez l'homme. Ainsi le facteur d'incertitude de 10 appliqué lors de cette extrapolation du rat à l'homme peut paraître faible au vu du ratio 3-OHB[a]P/tétraol-B[a]P qui est 500 fois plus élevé chez le rat par rapport à l'homme.
- La fixation des ERU suite à l'apparition des cancers digestifs doit aussi prendre en compte l'exposition aigue au mélange de HAP car la bio-activation du B[a]P au niveau intestinal est plus élevée avec le mélange surtout à la première semaine d'exposition .

Dans une seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à **l'étude d'autres facteurs qui pouvaient avoir une influence sur la toxicocinétique des HAP mais qui étaient en lien**

non pas avec l'exposition mais avec le protocole animal utilisé. En effet, la revue bibliographique des études animales concernant la toxicocinétique des HAP suite à une monoexposition (Partie I, Chapitre II) ou à une polyexposition aux HAP (Partie I, Chapitre III) montre la diversité des protocoles expérimentaux utilisés. Ces études diffèrent entre elles par plusieurs paramètres : l'espèce animale (souris ou rat), la souche animale, la dose utilisée, la voie d'exposition (gavage, intra-veineuse, intra-péritonéale, intra-trachéale, cutanée), la durée de mise à jeun avant l'exposition, La variabilité des résultats concernant la toxicocinétique des HAP peut être expliquée par ces différents paramètres, avec en tout premier lieu la voie d'exposition. Par exemple, après une administration de Pyr (0,3 et 0,05 mg.kg⁻¹) à des rats SD, le pourcentage de Pyr retrouvé dans les urines sous forme de 1-OHP est de 0,65 % après administration par voie intra-veineuse [Bouchard 1998a] alors qu'il est de 0,92 % après gavage [Bouchard 2002]. De même, après une administration de 10 mg.kg⁻¹ de B[a]P, le pourcentage de B[a]P retrouvé dans les urines sous forme de 3-OHB[a]P est de 0,21 % après administration par voie intra-veineuse [Marie 2010] alors qu'il est de 0,35 % par gavage [Jongeneelen 1984]. La souche animale utilisée semble également être un important facteur de variabilité. Ainsi après exposition par gavage à un mélange synthétique de HAP, le pourcentage de Pyr retrouvé dans les urines sous forme de 1-OHP est de 1,14 % de la dose administrée chez des rats SD [Bouchard 2002] alors qu'il est seulement de 0,6 % chez des rats Lewis [Grova 2017]. Cependant, les résultats des études animales servent à la fixation de VTR pour l'homme. L'extrapolation des résultats chez l'homme implique l'application de différents facteurs d'incertitude (de valeur allant jusqu'à 10) qui sont fixés selon l'étude retenue : facteur d'incertitude pour la variabilité inter-individuelle, facteur d'incertitude pour l'extrapolation inter-espèces, facteur d'incertitude pour la durée de l'étude, facteur d'incertitude pour l'utilisation d'un LOAEL. La valeur de ces VTR peut varier selon l'agence sanitaire en fonction de l'étude animale choisie et des facteurs d'incertitude appliqués (Tableau 18).

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la variabilité inter-souche (facteur génétique) car du fait d'un problème de production, Charles River (fournisseur auprès duquel on achète les rats) a arrêté pendant un certain temps de produire des rats SD et les a remplacés par des rats W. Dans les directives OCDE sur les études de toxicocinétique n°417, il n'y a pas d'obligation de choix d'une souche spécifique de rat mais il est recommandé de choisir la souche la plus utilisée dans la littérature. Ainsi, sur les 53 articles publiés sur la toxicocinétique des HAP et plus spécifiquement du Pyr et du B[a]P, 58 % des études de toxicocinétique des

HAP étaient faites avec les rats SD, 26 % avec les rats W et 16 % avec les autres souches (Fischer-344, Long-Evans, Lewis).

Dans notre travail, nous avons donc comparé la toxicocinétique des HAP après une semaine d'exposition de rats SD et W à un mélange industriel de HAP. *L'absorption intestinale* des HAP de FPM (Flua et Pyr) qui se fait par diffusion passive [Ifegwu 2015, Ramesh 2004] était identique entre les 2 souches de rats. Par contre, l'absorption intestinale des HAP à HPM qui nécessite la présence de sels biliaires pour former des micelles amphipathiques et permettre leur passage dans les entérocytes [Bartosek 1984, Rahman 1986] était plus faible chez les SD que chez les W. La différence d'absorption des HAP à HPM entre les 2 souches pouvait être due à une plus faible sécrétion biliaire par les rats SD car plusieurs publications ont montré une différence dans la sécrétion biliaire et/ou dans les mouvements des fluides intestinaux et/ou dans la composition du microbiote intestinal entre ces 2 souches de rats [Fu 2019, Klaassen 1969, Marques 2015, Oltra-noguera 2015, Uchida 1978]. Cette différence d'absorption intestinale pouvait également être expliquée par la consommation plus élevée de croquettes par les SD que par les W car l'adsorption des HAP à HPM sur ces croquettes favorise leur élimination dans les fèces [Kawamura 1988]. Cette différence de prise alimentaire était liée à la différence d'âge des rats. En effet, les rats SD étaient plus jeunes (âgés de 6 semaines) et encore en phase de croissance alors que les rats W (âgés de 11 semaines) étaient déjà à l'âge adulte. La différence d'âge des rats était due au fait que nous avons voulu limiter le nombre de rats sacrifiés et utiliser des rats qui étaient inclus dans différents protocoles. Les rats SD étaient inclus dans un protocole d'étude en lien avec une exposition chronique ce qui nécessitait de prendre des rats jeunes en début d'étude alors que les rats W étaient inclus dans un protocole d'étude de l'apparition de microvésicules et de modifications des microARN qui durait seulement une semaine.

De même, *le métabolisme intestinal* du Pyr était comparable entre les 2 souches alors que celui du B[a]P était différent, avec une orientation vers la voie de bio-activation plus importante chez les SD que chez les W. Ceci pourrait être dû à une différence inter-souche des activités enzymatiques des CYP intestinaux impliqués dans la voie de bio-activation (CYP 1B1) et/ou du microbiote intestinal qui joue un rôle important dans le métabolisme intestinal des HAP et dans leur absorption [Bruyère 2009]. Ainsi, le risque du développement du cancer au niveau intestinal pourrait être plus élevé chez les rats SD car le tétraol-B[a]P provient principalement de l'hydrolyse du BPDE, métabolite cancérigène ultime du B[a]P [Hecht 2010].

Le métabolisme hépatique des HAP et l'élimination urinaire de leurs métabolites étaient plus élevés chez les SD que chez les W car tous les métabolites urinaires monohydroxylés et diols

des HAP de FPM et HPM étaient plus élevés chez les SD, à l'exception du tétraol-B[a]P qui avait des concentrations comparables entre les 2 souches. Ceci pourrait être expliqué par une différence des activités enzymatiques des CYP hépatiques et/ou à une différence de l'excrétion biliaire des métabolites [Floreani 2012, Nishiyama 2016, Ruzgyte 2006]. En effet, l'activité enzymatique des CYP 1A1 et 1A2 est plus élevée de 30 % chez les SD par rapport au W que ce soit à l'état basal [Nishiyama 2016] ou après induction par le B[a]P [Floreani 2012].

Au total, cette étude montre qu'il y a différents facteurs qui nécessitent une attention supplémentaire lors du choix et de l'évaluation de la qualité des études sur la toxicocinétique des HAP :

- L'âge des rats : il est important de privilégier des rats adultes ou en tout cas des rats ayant atteint la phase de stabilisation de la croissance avec une consommation régulière de croquettes (sauf si l'on s'intéresse à une population spécifique telle que les enfants)
- La souche de rat : ainsi, le choix du protocole rongeur pour la fixation des VTR basées sur l'effet des HAP sur la formation des cancers du tractus digestif nécessite une certaine attention. Ainsi, cette problématique de l'influence du choix de la souche rajoute un niveau d'incertitude qu'il est important de considérer soit lors du choix du modèle animal utilisé dans la recherche des NOAEL/LOAEL, soit lors de l'extrapolation des résultats obtenus lors de la réflexion sur la fixation de VTR.

Nous avons également étudié la **variabilité inter-individuelle** qui intervient dans la détermination du nombre de sujets exposés par groupe pour mettre en évidence une différence. Ce calcul est très important notamment car le R de réduire de la règle des 4 R nous oblige à réduire au maximum le nombre de rats utilisés tout en ayant toujours un résultat significatif. En effet, le nombre nécessaire de rats par groupe augmente avec l'augmentation de la variabilité inter-individuelle. Par exemple, si on fait le calcul du nombre de rat nécessaire (via le logiciel BiostaTGV) pour mettre en évidence une diminution de 50 % de l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P, celui-ci est égal à 8 si le CV est de 43 % alors qu'il est égal à 4 si le CV est de 20%. La variabilité inter-individuelle du métabolisme des HAP en lien notamment avec le polymorphisme génétique est importante chez l'homme car certains polymorphismes génétiques pourraient avoir un effet sur la probabilité d'apparition des cancers après exposition aux HAP [Ford 2000, Wenzlaff 2005].

La variabilité inter-individuelle a été étudiée chez les rats W car le nombre de rats (n = 10 rats) était plus élevé que celui des SD et car on disposait d'échantillons sanguins. Les rats W étaient

de la lignée Han qui est une lignée outbreed génétiquement diversifiés ce qui rappelle le polymorphisme génétique chez l'homme. Pour une même souche de rat, il existe en effet des lignées différentes. Pour les W (actuellement produits chez Charles River), on trouve les lignées Han (outbred) mais aussi les lignées Kyoto et WU (inbred) qui sont issus de différents types d'accouplement avec des fonds génétiques identiques.

Chez des rats W adultes (11 semaines) qui avaient un poids, une consommation de croquettes et un poids de fèces comparables, nous avons montré que *l'absorption intestinale des HAP était très variable* (CV entre 49 et 79 % pour les différents HAP), exceptée celle du Flua (CV de 16 %). Il semblait exister 2 groupes de rats : un pour lequel l'absorption des HAP était supérieure à 80% de la dose administrée, et un autre où l'absorption était plus faible. Ceci pourrait être expliqué par une différence de sécrétion des sels biliaires ou une différence du microbiote intestinal [Liu 2021, Rahman 1986].

Le métabolisme intestinal était comparable entre les rats (CV < 20%) du fait d'une activité enzymatique identique. De plus, la formation du 3-OHB[a]P variait parallèlement à celle du 1-OHP montrant ainsi que leur formation dépendait des mêmes enzymes.

Le métabolisme hépatique et l'élimination urinaire des métabolites était variable entre les rats avec la capacité de chaque rat à former des métabolites bien spécifiques. La variabilité de la formation des diols ou du tétraol B[a]P était plus élevée que celle des métabolites monohydroxylés (19-36 % *versus* 43-73%). Cette différence pourrait être expliquée par le fait que la formation des diols et du tétraol est plus complexe que celle des métabolites monohydroxylés et qu'elle nécessite l'intervention d'autres enzymes comme l'EH qui est plus rapidement saturable que les CYP impliqués dans la formation des métabolites monohydroxylés [Shimada 2006, Xue 2005]. De plus, pour un HAP donné, il n'y avait pas de relation entre la quantité des métabolites formés par différentes voies de métabolisation ce qui signifiait que chez un rat une voie pouvait être privilégiée par rapport à une autre. Cette variabilité au niveau des métabolites éliminés par voie urinaire peut être expliquée par la variabilité de l'absorption des HAP, de l'activité enzymatique, de l'activité ou de l'expression des transporteurs responsables de l'élimination urinaire de certains métabolites comme le 3-OHB[a]P ou de la filtration rénale des métabolites hydrophiles comme le tétraol-B[a]P suite à un taux de filtration rénale variable entre les rats du fait d'une consommation d'eau différente.

Toutefois dans notre travail, des corrélations ont été trouvées entre l'élimination urinaire de certains métabolites ce qui pourrait être expliqué par un métabolisme commun de certains HAP ou par des mécanismes d'élimination identique de certains métabolites. Par exemple,

l'élimination urinaire du 1-OHP augmentait parallèlement à celle du 3-OHB[a]P et du tétraol-B[a]P ce qui est comparable aux résultats observés chez l'homme, où une corrélation entre l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P et du 1-OHP a été trouvée chez des sujets fumeurs ($R = 0,636, p < 0,05$) [Barbeau 2011] et chez des travailleurs exposés aux HAP (dans la cokerie, production des électrodes de graphite) ($R = 0,618 - 0,867, p < 0,01$) [Fôrster 2008]. Toutefois, cette corrélation n'est pas retrouvée quand les travailleurs ont des activités professionnelles différentes car dans ce cas la composition des mélanges et les voies d'exposition sont différentes [Barbeau 2015]. Ceci montre que la variabilité inter-individuelle de l'élimination urinaire des métabolites ne dépend pas uniquement de la variabilité inter-individuelle du métabolisme des HAP. En effet, les voies d'absorption des HAP et la composition des mélanges en HAP peuvent avoir un effet sur la toxicocinétique des HAP [Lafontaine 2002, Payan 2009]. Ainsi, ces 3 métabolites peuvent être de bons biomarqueurs d'exposition pour les HAP de notre mélange mais pas pour tous les mélanges.

Cette étude montre la variabilité inter-individuelle sur la toxicocinétique des HAP avec des rats outbred. Ainsi, la question qui se pose :

- Faut-il travailler avec des modèles rongeurs *inbred* avec un fond génétique identique pour réduire la variabilité inter-individuelle et par la suite répondre au R de réduction de la règle des 4R ?
- Ou plutôt faut-il travailler avec des modèles rongeurs *outbred* ayant un fond génétique variable pour mimer la variabilité inter-individuelle de la population générale, et dans ce cas augmenter le nombre de rats nécessaire pour trouver une différence significative selon le facteur étudié ? Cette option nous paraît être la plus raisonnable.

Le dernier facteur que nous avons étudié est **le jeûne** car de nombreuses données d'expérimentations animales sont collectées après mis à jeun des animaux. La mise à jeun des rats durant les études de toxicocinétique n'est pas très claire. Par exemple, dans l'OECD n°417 sur la toxicocinétique, il n'y a aucun renseignement sur la mise des rats à jeun ou pas avant l'exposition au xénobiotique étudié. Dans les études faites avec les HAP, certains auteurs ont choisi de mettre à jeun les rats avant exposition aux HAP 24 [Lipiniak-Gawlik 1998]; 16 [Ramesh 2001]; 12 [Foth 1988, Kadry 1995]; 6 [Kawamura 1988, Ruzgyte 2006] ou 2 heures [Marie 2010, Moreau 2015b], ou 24 heures après exposition [Elovaara 2003, Tzekova 2004], alors que d'autres ont laissé aux rats l'accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture [Bouchard 2002,

Godschalk 2000, Grimmer 1988, Grova 2017, Jacob 1989, Jongeneelen 1984, Kang 2007, Wiersma 1983] avec une collecte des urines de 24 heures après l'exposition.

Nous avons conduit cette étude seulement avec 6 rats (3 mis à jeun et 3 non mis à jeun) car elle constituait une des études préliminaires pour la construction du protocole rongeurs pour le projet *miRExpo* où il fallait décider de la dose de B[a]P à utiliser, du délai entre le dernier gavage et l'euthanasie des rats, et de la durée de la mise à jeun des rats avant l'euthanasie. Nous avons montré qu'il existait avec le jeûne :

- ***une augmentation de l'absorption intestinale du B[a]P*** en lien avec la présence du B[a]P au niveau intestinal sous forme libre, non adsorbée sur les croquettes, capable de mieux traverser la barrière intestinale. Cependant, l'augmentation de l'absorption du B[a]P était très variable selon le rat en rapport avec la variabilité inter-individuelle vue précédemment.

- ***une modification du métabolisme intestinal*** avec une augmentation de la voie de bio-activation du B[a]P ce qui suggère que le jeûne augmente le risque cancérigène au niveau intestinal vu que le tétraol-B[a]P représente la voie de bio-activation du B[a]P [Hecht 2010].

- ***une modification du métabolisme hépatique*** avec diminution de la voie de détoxification et/ou réorientation vers la voie de bio-activation du B[a]P en lien avec une modification de l'activité des enzymes. Il semble que le jeûne ait un effet très variable sur l'activité enzymatique des CYP en fonction de l'espèce et de la souche étudiée. Alors que le jeûne augmente l'expression et l'activité des CYP 1A chez les rats SD et chez l'homme [Longo 2000, Zarezadeh 2021], il n'entraîne aucune modification chez les rats Fisher F-344 [Qu 1998], et les diminue chez la souris [de Vries 2016]. Enfin chez la truite, il générerait une diminution de 58 % du métabolisme du B[a]P [Kennedy 2008].

En conclusion ces résultats montrent que :

- La réponse inter-individuelle des rats au jeûne est très variable ce qui augmente la variabilité inter-individuelle sur la toxicocinétique des HAP. Ceci va à l'encontre de la littérature qui considère que la mise à jeun des rats est un facteur important pour diminuer la variabilité des réponses des animaux à une substance donnée et pour accentuer l'effet de la substance administrée afin de répondre au R de la réduction [Curfs 2010].
- Si l'on veut extrapoler les résultats des expérimentations animales à l'homme, il est plus intéressant de ne pas mettre les animaux à jeun pour être dans des conditions d'exposition les plus réalistes possibles par rapport à l'exposition humaine

Conclusion et perspectives :

La toxicocinétique des HAP est très complexe et de nombreux facteurs peuvent intervenir sur l'absorption et le métabolisme des HAP dans les modèles animaux. Cependant, ces expérimentations animales sont très importantes à conduire car par manque de données épidémiologiques, ces études sont utilisées pour fixer des VTR [INERIS 2020].

Ainsi, nous avons montré qu'en cas d'exposition répétée à un mélange complexe de HAP cancérigènes, de nombreux facteurs, tels que la dose, la durée de l'exposition et la présence d'autres HAP, peuvent avoir une influence majeure sur la toxicocinétique de ces molécules. Nos résultats montrent que le métabolisme et les effets attendus suite à l'exposition aux HAP sont variables selon l'organe étudié et ne permettent pas de conclure à un simple effet additif en cas d'exposition à un mélange. De plus, avec une exposition répétée, la bio-activation du B[a]P est inversement proportionnelle à la dose.

De plus, l'extrapolation des résultats obtenus à partir de modèles animaux à l'homme est un processus complexe qui nécessite une approche intégrée et une compréhension approfondie des mécanismes biologiques sous-jacents à la toxicité. Ainsi, pour extrapoler les résultats de l'expérimentation animale à l'homme différents facteurs d'incertitudes sont appliqués systématiquement : facteur d'incertitude pour la variabilité inter-individuelle, facteur d'incertitude pour l'extrapolation inter-espèces, facteur d'incertitude pour la durée de l'étude, facteur d'incertitude pour l'utilisation d'un LOAEL. Ainsi, selon nos résultats, une question qui se pose : Est-ce qu'il faut augmenter la valeur maximale de ces facteurs à plus que 10 ? De plus, d'autres facteurs supplémentaires nécessitent plus d'attention lors du choix du modèle animal comme l'âge de rat, la souche de rat, l'accès des rats à la nourriture, la dose et le mélange utilisé, afin de choisir un modèle avec une exposition la plus réaliste possible.

Plusieurs perspectives de recherche s'ouvrent suite à ce travail :

- L'étude de l'expression et/ou l'activité enzymatique des CYP (1A1, 1A2 et 1B1) et de surtout de l'EH qui sont les enzymes responsables de voie des diol-époxydes :

Le métabolisme des HAP et leur bio-activation est un point crucial dans la cancérogénicité des HAP. Ainsi, pour mieux comprendre les variations du métabolisme intestinal et hépatique observés en fonction des différents facteurs étudiés, il serait intéressant d'étudier la variation de l'activité de ces enzymes.

- L'étude de l'effet du mélange sur l'absorption des différents HAP à FPM et HPM dans des modèles *in vitro* avec des cellules Caco-2 en présence et en absence des inhibiteurs des ABC pour mieux comprendre l'effet du mélange sur l'absorption des HAP.
- Des études supplémentaires de recherche des adduits à l'ADN dans certains organes comme la vessie ou dans des cellules cibles comme les cellules sanguines périphériques: Dans la comparaison des 2 souches de rats (SD et W), la formation du tétraol-B[a]P était identique entre les 2 souches ce qui tend à montrer que la formation des adduits à l'ADN en lien avec la voie du BPDE devrait être identique entre les 2 souches. Cependant, la formation des diols des autres HAP qui sont classés comme cancérigènes probables ou possibles était plus élevée chez les SD. Vu que ces diols proviennent de la voie de bio-activation des HAP, il serait intéressant de vérifier si la bio-activation des autres HAP pourrait aussi avoir un effet sur l'apparition des adduits à l'ADN même si la bio-activation du B[a]P était identique entre les 2 souches.
- Des études supplémentaires de la variabilité inter-souches avec d'autres souches de rats (Long-Evans, Lewis, Fischer) pourraient être intéressantes en cas où il serait obligatoire de fixer une souche spécifique pour la toxicocinétique des HAP ou autres substances.
- L'étude des autres voies de bio-activation du B[a]P :
De futures études devront évaluer l'influence des facteurs étudiés sur d'autres voies métaboliques, telle que la voie de l'o-quinone ou du radical cation avec analyse d'autres métabolites comme le B[a]P-3,6-dione, le B[a]P-1,6-dione dans le sang ou dans les microsomes hépatiques. Surtout que nos résultats montrent 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.
- Le microbiote intestinal :
Une autre perspective qui pourrait être intéressante pour la compréhension des effets des facteurs étudiés sur la toxicocinétique des HAP, et notamment sur l'absorption et le métabolisme intestinal, est le microbiote intestinal. Actuellement, des informations limitées sont connues sur l'effet du microbiote intestinal sur l'absorption des HAP. Ainsi, il est connu que l'exposition répétée aux HAP individuels modifie la composition du microbiote avec la dominance des bactéries connues pour l'apparition des maladies inflammatoires de l'intestin. De plus, l'administration de certains genres bactériens

comme les *Lactobacillus* diminue l'absorption des HAP. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires pour étudier la modification de la composition du microbiote dans un contexte de multi-expositions aux HAP et pour la compréhension de la relation entre le microbiote intestinal et l'absorption et le métabolisme intestinal et hépatique des HAP.

Références bibliographiques

Abiko Y, Puga A, Kumagai Y. Covalent binding of quinones activates the Ah receptor in Hepa1c1c7 cells. *J Toxicol Sci.* 2015; 40(6): 873-86.

Abiko Y, Lin FY, Lee H, Puga A, Kumagai Y. Quinone-mediated induction of cytochrome P450 1A1 in HepG2 cells through increased interaction of aryl hydrocarbon receptor with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *J Toxicol Sci.* 2016; 41(6): 775-81.

Achten C, Andersson JT. Overview of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC). *Polycycl Aromat Compd.* 2015; 35: 177–186.

Agarwal P, Anand M, Chakraborty P, Singh L, Masih J, Taneja A. Placental levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their association with birth weight of infants. *Drug Chem Toxicol.* 2022; 45(2): 868-77.

Agrawal PK, Shrivastava R, Verma J. Bioremediation Approaches for Degradation and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: Bharagava RN, Chowdhari P editors. *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management.* Singapore: Springer; 2019. pp. 99–119.

Airparif. La réglementation en France. La réglementation française précise les modalités de mise en oeuvre des directives européennes, voire complète ces dernières. Paris: Airparif; 2021.

Akash S, Sivaprakash B, Rajamohan N, Selvankumar T. Biotransformation as a tool for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted environment - review on toxicity and treatment technologies. *Environ Pollut.* 2023; 318: 120923.

Alexandrie AK, Warholm M, Carstensen U, Axmon A, Hagmar L, Levin JO, et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis.* 2000; 21(4): 669-76.

Alexandrov K, Rojas M, Kadlubar FF, Lang NP, Bartsch H. Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis.* 1996; 17(9): 2081-3.

Alhamdow A, Lindh C, Albin M, Gustavsson P, Tinnerberg H, Broberg K. Early markers of cardiovascular disease are associated with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 9426.

Alhamdow A, Tinnerberg H, Lindh C, Albin M, Broberg K. Cancer-related proteins in serum are altered in workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons: a cross-sectional study. *Carcinogenesis.* 2019; 40(6): 771-781.

ANSES. Etude de l'alimentation totale française² (EAT 2). Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques. Avis de l'ANSES. Rapport d'expertise. Tome 2. Maisons-Alfort: ANSES; 2011: 1-405.

ANSES. Étude de l'alimentation totale infantile. Composés organiques. Rapport d'expertise collective. Edition scientifique. Tome 2. Partie 3. Maisons-Alfort: ANSES; 2016: 1-378.

ANSES. Valeurs toxicologiques de référence (VTR). Guide d'élaboration de VTR. Rapport d'expertise collective. Edition scientifique. Troisième édition. Maisons-Alfort: ANSES; 2017: 1-186.

ANSES. VTR construites et choisies par l'Anses-Base de données. Fiche technique. Maisons-Alfort: ANSES; 2023.

Archibong AE, Inyang F, Ramesh A, Greenwood M, Nayyar T, Kopsombut P, et al. Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats exposed by inhalation to benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol.* 2002; 16(6): 801-8.

Arlt VM, Stiborova M, Henderson CJ, Thiemann M, Frei E, Aimova D, et al. Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis*. 2008; 29(3): 656-65.

Arlt VM, Kraus AM, Godschalk RW, Riffo-Vasquez Y, Mrizova I, Roufousse CA, et al. Pulmonary Inflammation Impacts on CYP1A1-Mediated Respiratory Tract DNA Damage Induced by the Carcinogenic Air Pollutant Benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci*. 2015; 146(2): 213-25.

Aronhime S, Calcagno C, Jajamovich GH, Dyvorne HA, Robson P, Dieterich D, et al. DCE-MRI of the liver: effect of linear and nonlinear conversions on hepatic perfusion quantification and reproducibility. *J Magn Reson Imaging*. 2014; 40(1): 90-8.

ATSDR. Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta (USA): ATSDR; 1995: 1-487 .

Autrup H, Harris CC, Trump BF, Jeffrey AM. Metabolism of benzo(a)pyrene and identification of the major benzo(a)pyrene-DNA adducts in cultured human colon. *Cancer Res*. 1978; 38(11 Pt 1): 3689-96.

Banasiewicz M, Nelson G, Swank A, Grubor N, Ross J, Nesnow S, et al. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts formed at low adduction level in mice lung tissue. *Anal Biochem*. 2004; 334(2): 390-400.

Barbeau D, Maitre A, Marques M. Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *Analyst*. 2011; 136(6): 1183-91.

Barbeau D, Persoons R, Marques M, Herve C, Laffitte-Rigaud G, Maitre A. Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. *Ann Occup Hyg*. 2014; 58(5): 579-90.

Barbeau D, Lutier S, Bonnetterre V, Persoons R, Marques M, Herve C, et al. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: relations between atmospheric mixtures, urinary metabolites and sampling times. *Int Arch Occup Environ Health*. 2015; 88(8): 1119-29.

Barbeau D, Lutier S, Choisnard L, Marques M, Persoons R, Maitre A. 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*. 2018; 112: 147-55.

Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett*. 2007; 581(19): 3608-15.

Bartolome M, Ramos JJ, Cutanda F, Huetos O, Esteban M, Ruiz-Moraga M, et al. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites levels in a representative sample of the Spanish adult population: The BIOAMBIENT.ES project. *Chemosphere*. 2015; 135: 436-46.

Bartosek I, Guitani A, Modica R, Fiume M, Urso R. Comparative kinetics of oral benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats: study with hydrocarbon mixtures. *Toxicol Lett*. 1984; 23(3): 333-9.

Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol Oncol*. 2017; 11(12): 1673-86.

- Becker L, Glavin DP, Bada JL.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Antarctic Martian meteorites, carbonaceous chondrites, and polar ice. *Geochim Cosmochim Acta.* 1997; 61(2): 475-81.
- Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH.** The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008; 18(3): 207-50.
- Benedetti M, Martuccio G, Fattorini D, Canapa A, Barucca M, Nigro M, et al.** Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquat Toxicol.* 2007; 85(3): 167-75.
- Bentsen-Farmen RK.** Short Communication: The effect of CYP1A1 induction on the formation of benzo a pyrene adducts in liver and lung DNA and plasma albumin in rats exposed to benzo a pyrene: adduct quantitation by immunoassay and an HPLC method. *Biomarkers.* 1999; 4(1): 37-47.
- Bevan DR, Ruggio DM.** Bioavailability in vivo of benzo[a]pyrene adsorbed to diesel particulate. *Toxicol Ind Health.* 1991; 7(3): 125-39.
- Binkova B, Giguere Y, Rossner P, Jr., Dostal M, Sram RJ.** The effect of dibenzo[a,1]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat Res.* 2000; 471(1-2): 57-70.
- Binkova B, Sram RJ.** The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat Res.* 2004; 547(1-2): 109-21.
- Binkova B, Topinka J, Sram RJ, Sevastyanova O, Novakova Z, Schmuczerova J, et al.** In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part I: acellular assay. *Mutat Res.* 2007; 620(1-2): 114-22.
- Bock KW.** Aryl hydrocarbon receptor (AHR): From selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions. *Biochem Pharmacol.* 2019; 168: 65-70.
- 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.
- Borek-Dohalska L, Klusonova Z, Holecova J, Martinkova M, Barta F, Dracinska H, et al.** Exposure of rats to exogenous endocrine disruptors 17alpha-ethinylestradiol and benzo(a)pyrene and an estrogenic hormone estradiol induces expression of cytochromes P450 involved in their metabolism. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016; 37 Suppl 1: 84-94.
- Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C.** Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol.* 2007; 18(3): 431-46.
- Bouchard M, Viau C.** Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxy-benzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol.* 1995; 69(8): 540-6.
- Bouchard M, Viau C.** Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 139(2): 301-9.

Bouchard M, Krishnan K, Viau C. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of binary and ternary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat. *Arch Toxicol.* 1998a; 72(8): 475-82.

Bouchard M, Viau C. Urinary and biliary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology.* 1998b; 127(1-3): 69-84.

Bouchard M, Thuot R, Carrier G, Viau C. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in rats subchronically exposed to pyrene or polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *J Toxicol Environ Health A.* 2002; 65(16): 1195-209.

Bouchard M, Normandin L, Gagnon F, Viau C, Dumas P, Gaudreau E, et al. Repeated measures of validated and novel biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in individuals living near an aluminum plant in Quebec, Canada. *J Toxicol Environ Health A.* 2009; 72(23): 1534-49.

Bourgart E, Barbeau D, Marques M, von Koschimbahr A, Beal 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. *Arch Toxicol.* 2019a; 93(1): 81-93.

Bourgart E, Persoons R, Marques M, Rivier A, Balducci F, von Koschimbahr A, et al. Influence of exposure dose, complex mixture, and ultraviolet radiation on skin absorption and bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbons ex vivo. *Arch Toxicol.* 2019b; 93(8): 2165-84.

Brandt HC, Watson WP. Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann Occup Hyg.* 2003; 47(5): 349-78.

Bruyere A, Decleves X, Bouzom F, Proust L, Martinet M, Walther B, et al. Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains. *Xenobiotica.* 2009; 39(1): 22-32.

Buchet JP, Ferreira M, Jr., Burrion JB, Leroy T, Kirsch-Volders M, Van Hummelen P, et al. Tumor markers in serum, polyamines and modified nucleosides in urine, and cytogenetic aberrations in lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am J Ind Med.* 1995; 27(4): 523-43.

Buesen R, Mock M, Seidel A, Jacob J, Lampen A. Interaction between metabolism and transport of benzo[a]pyrene and its metabolites in enterocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 183(3): 168-78.

Buesen R, Mock M, Nau H, Seidel A, Jacob J, Lampen A. Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo[a]pyrene metabolites. *Chem Biol Interact.* 2003; 142(3): 201-21.

Burchiel SW, Lauer FT, McDonald JD, Reed MD. Systemic immunotoxicity in AJ mice following 6-month whole body inhalation exposure to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 196(3): 337-45.

Burchiel SW, Lauer FT, Factor-Litvak P, Liu X, Santella RM, Islam T, et al. An increase in circulating B cells and B cell activation markers in peripheral blood is associated with cigarette smoking in a male cohort in Bangladesh. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019; 384: 114783.

Burczynski ME, Lin HK, Penning TM. 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 Res.* 1999; 59(3): 607-14.

Burczynski ME, Penning TM. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* 2000; 60(4): 908-15.

Buters JT, Sakai S, Richter T, Pineau T, Alexander DL, Savas U, et al. Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(5): 1977-82.

Buters JT, Mahadevan B, Quintanilla-Martinez L, Gonzalez FJ, Greim H, Baird WM, et al. Cytochrome P450 1B1 determines susceptibility to dibenzo[a,l]pyrene-induced tumor formation. *Chem Res Toxicol.* 2002; 15(9): 1127-35.

Campo L, Rossella F, Pavanello S, Mielzynska D, Siwinska E, Kapka L, et al. Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers. *Toxicol Lett.* 2010; 192(1): 72-8.

Campo L, Fustinoni S, Bertazzi P. Quantification of carcinogenic 4- to 6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by solid-phase microextraction gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 401(2): 625-34.

Cao D, Yoon CH, Shin BS, Kim CH, Park ES, Yoo SD. Effects of aloe, aloesin, or propolis on the pharmacokinetics of benzo[a]pyrene and 3-OH-benzo[a]pyrene in rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68(23-24): 2227-38.

Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, et al. Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(7): 538-45.

Cavaliere EL, Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol Ther.* 1992; 55(2): 183-99.

Cavallari JM, Osborn LV, Snawder JE, Kriech AJ, Olsen LD, Herrick RF, et al. Predictors of airborne exposures to polycyclic aromatic compounds and total organic matter among hot-mix asphalt paving workers and influence of work conditions and practices. *Ann Occup Hyg.* 2012; 56(2): 138-47.

Cavret S, Laurent C, Feidt C, Laurent F, Rychen G. Intestinal absorption of ¹⁴C from ¹⁴C-phenanthrene, ¹⁴C-benzo[a]pyrene and ¹⁴C-tetrachlorodibenzo-para-dioxin: approaches with the Caco-2 cell line and with portal absorption measurements in growing pigs. *Reprod Nutr Dev.* 2003; 43(2): 145-54.

Cavret S, Feidt C. Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. *Environ Res.* 2005; 98(1): 22-32.

Chahin A, Peiffer J, Olry JC, Crepeaux G, Schroeder H, Rychen G, et al. EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues of rats orally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Chem Toxicol.* 2013; 56: 371-80

Chang LH. The fecal excretion of polycyclic hydrocarbons following their administration to the rat. *Journal of biological Chemistry.* 1943; 151(1): 93-9.

Charman WN, Porter CJ, Mithani S, Dressman JB. Physiochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *J Pharm Sci.* 1997; 86(3): 269-82.

Chen L, Devanesan PD, Higginbotham S, Ariese F, Jankowiak R, Small GJ, et al. Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: their significance in tumor initiation. *Chem Res Toxicol.* 1996; 9(5): 897-903.

Chen MR, Tsai PJ, Wang YF. 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. *Environ Int.* 2008; 34(7): 971-5.

Chen C, Tang Y, Jiang X, Qi Y, Cheng S, Qiu C, et al. Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Toxicol Sci.* 2012; 125(1): 248-61.

Chen Y, Shen G, Su S, Shen H, Huang Y, Li T, et al. Contamination and distribution of parent, nitrated, and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014; 21(19): 11521-30.

Cherng SH, Lin P, Yang JL, Hsu SL, Lee H. Benzo[g,h,i]perylene synergistically transactivates benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 170(1): 63-8.

Cherng SH, Hsu SL, Yang JL, Yu CT, Lee H. Suppressive effect of 1-nitropyrene on benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 protein expression in HepG2 cells. *Toxicol Lett.* 2006; 161(3): 236-43.

Chipman JK, Millburn P, Brooks TM. Mutagenicity and in vivo disposition of biliary metabolites of benzo(a)pyrene. *Toxicol Lett.* 1983; 17(3-4): 233-40.

Choi H, Jedrychowski W, Spengler J, Camann DE, Whyatt RM, Rauh V, et al. International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(11): 1744-50.

Ciecierska M, Obiedzinski MW. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bakery chain. *Food Chem.* 2013; 141(1): 1-9.

CITEPA. Gaz à effet de serre et polluants atmosphériques. Bilan des émissions en France de 1990 à 2021. Format Secten. Edition juillet 2021. Paris: CITEPA; 2022: 1-496.

Cohen GM, Bracken WM, Iyer RP, Berry DL, Selkirk JK, Slaga TJ. Anticarcinogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene tumor initiation and its relationship to DNA binding. *Cancer Res.* 1979; 39(10): 4027-33.

Collins SL, Patterson AD. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 2020; 10(1): 19-32.

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.

Cornet M, Callaerts A, Vercruyssen A, Rogiers V. In vitro biotransformation of 2-methylpropene (isobutene) in rat lung tissue in comparison with liver tissue. *Arch Toxicol.* 1995; 70(1): 64-7.

Courter LA, Musafia-Jeknic T, Fischer K, Bildfell R, Giovanini J, Pereira C, et al. Urban dust particulate matter alters PAH-induced carcinogenesis by inhibition of CYP1A1 and CYP1B1. *Toxicol Sci.* 2007a; 95(1): 63-73.

Courter LA, Pereira C, Baird WM. Diesel exhaust influences carcinogenic PAH-induced genotoxicity and gene expression in human breast epithelial cells in culture. *Mutat Res.* 2007b; 625(1-2): 72-82.

Courter LA, Luch A, Musafia-Jeknic T, Arlt VM, Fischer K, Bildfell R, et al. The influence of diesel exhaust on polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage, gene expression, and tumor initiation in Sencar mice in vivo. *Cancer Lett.* 2008; 265(1): 135-47.

Crawford JO, Dixon K, Miller BG, Cherrie JW. A review of the effectiveness of respirators in reducing exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons for coke oven workers. *Ann Occup Hyg.* 2014 Oct;58(8):943-54.

Crebelli R, Carta P, Andreoli C, Aru G, Dobrowolny G, Rossi S, et al. Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. *Mutat Res.* 2002; 516(1-2): 63-70.

Crowell SR, Hanson-Drury S, Williams DE, Corley RA. In vitro metabolism of benzo[a]pyrene and dibenzo[def,p]chrysene in rodent and human hepatic microsomes. *Toxicol Lett.* 2014; 228(1): 48-55.

Curfs Jo H A J, Chwalibog A, Savenije B S, Ritskes-Hoitinga. Nutrient Requirements, Experimental Design, and Feeding Schedules in Animal Experimentation. Chapter 11. In: Hau J, Schapiro SJ editors. *Handbook of Laboratory Animal Science. Volume I.* 3rd edition. Boca Raton: CRC Press; 2010. pp. 308-337.

Davila DR, Romero DL, Burchiel SW. Human T cells are highly sensitive to suppression of mitogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and this effect is differentially reversed by alpha-naphthoflavone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 139(2): 333-41.

De Jong WH, Kroese ED, Vos JG, Van Loveren H. Detection of immunotoxicity of benzo[a]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol Sci.* 1999; 50(2): 214-20.

Deng Q, Dai X, Guo H, Huang S, Kuang D, Feng J, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons-associated microRNAs and their interactions with the environment: influences on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in coke oven workers. *Environ Sci Technol.* 2014; 48(7): 4120-8.

Devanesan PD, RamaKrishna NV, Todorovic R, Rogan EG, Cavalieri EL, Jeong H, et al. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5(2): 302-9.

Devanesan PD, Higginbotham S, Ariese F, Jankowiak R, Suh M, Small GJ, et al. Depurinating and stable benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in isolated rat liver nuclei. *Chem Res Toxicol.* 1996; 9(7): 1113-6.

de Vries EM, Lammers LA, Achterbergh R, Klumpen HJ, Mathot RA, Boelen A, et al. Fasting-Induced Changes in Hepatic P450 Mediated Drug Metabolism Are Largely Independent of the Constitutive Androstane Receptor CAR. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159552.

Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001; 21(1): 15-23.

Diggs DL, Myers JN, Banks LD, Niaz MS, Hood DB, Roberts LJ, 2nd, et al. Influence of dietary fat type on benzo(a)pyrene [B(a)P] biotransformation in a B(a)P-induced mouse model of colon cancer. *J Nutr Biochem.* 2013; 24(12): 2051-63.

Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 149-73.

Ding YS, Trommel JS, Yan XJ, Ashley D, Watson CH. Determination of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from domestic cigarettes. *Environ Sci Technol.* 2005; 39(2): 471-8.

Drolet G, Proulx K, Pearson D, Rochford J, Deschepper CF. Comparisons of behavioral and neurochemical characteristics between WKY, WKHA, and Wistar rat strains. *Neuropsychopharmacology.* 2002; 27(3): 400-9.

Dumaswala R, Berkowitz D, Setchell KD, Heubi JE. Effect of fasting on the enterohepatic circulation of bile acids in rats. *Am J Physiol.* 1994; 267(5 Pt 1): G836-42.

Ebert B, Seidel A, Lampen A. Induction of phase-1 metabolizing enzymes by oltipraz, flavone and indole-3-carbinol enhance the formation and transport of benzo[a]pyrene sulfate conjugates in intestinal Caco-2 cells. *Toxicol Lett.* 2005; 158(2): 140-51.

EC (European Commission). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. Brussels: EC; 2002: 1-84.

Eca GF, Albergaria-Barbosa ACR, de Souza MM, Costa PG, Leite AS, Fillmann G, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and shellfish from Todos os Santos bay, Brazil. *Mar Pollut Bull.* 2021; 173(Pt A): 112944.

EFSA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal.* 2008; 6(8): 724.

Ekunwe SIN, Hunter RD, Hwang H-M. Ultraviolet radiation increases the toxicity of pyrene, 1-aminopyrene and 1-hydroxypyrene to human keratinocytes. *Int J Environ Res Public Health.* 2005; 2(1): 58-62.

El Hajjar M, Maître A, Marques M, Persoons R, Demeilliers C. Metabolism of benzo[a]pyrene after low-dose subchronic exposure to an industrial mixture of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in rats: a cocktail effect study. *Arch Toxicol.* 2023; 97(3): 865-874.

Elovaara E, Vaananen V, Mikkola J. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with beta-naphthoflavone induction in the rat. *Arch Toxicol.* 2003; 77(4): 183-93.

Endo K, Uno S, Seki T, Ariga T, Kusumi Y, Mitsumata M, et al. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor transactivation and DNA adduct formation by CYP1 isoform-selective metabolic deactivation of benzo[a]pyrene. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 230(2): 135-43.

Ewa B, Danuta MS. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J Appl Genet.* 2017; 58(3): 321-30.

Fang AH, Smith WA, Vouros P, Gupta RC. Identification and characterization of a novel benzo[a]pyrene-derived DNA adduct. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 281(2): 383-9.

Fang C, Zhang QY. The role of small-intestinal P450 enzymes in protection against systemic exposure of orally administered benzo[a]pyrene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 334(1): 156-63.

Flesher JW, Myers SR, Stansbury KH. The site of substitution of the methyl group in the bioalkylation of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis.* 1990; 11(3): 493-6.

Floreani M, Gabbia D, Barbierato M, S DEM, Palatini P. Differential inducing effect of benzo[a]pyrene on gene expression and enzyme activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2 in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27(6): 640-52.

Flowers-Geary L, Harvey RG, Penning TM. Identification of benzo[a]pyrene-7,8-dione as an authentic metabolite of (+/-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in isolated rat hepatocytes. *Carcinogenesis.* 1995; 16(11): 2707-15.

Ford JG, Li Y, O'Sullivan MM, Demopoulos R, Garte S, Taioli E, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans. *Carcinogenesis.* 2000; 21(11): 1971-5.

Forster K, Preuss R, Rosbach B, Bruning T, Angerer J, Simon P. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occup Environ Med.* 2008; 65(4): 224-9.

Foth H, Kahl R, Kahl GF. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1988; 26(1): 45-51.

Fretland AJ, Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Interact.* 2000; 129(1-2): 41-59.

Fu R, Liu J, Xue Y, Zhang Z, Song R. Effects of Animal Strain, Dose, and Cotreatment with Saikosaponin b(2) on the Pharmacokinetics of Saikosaponin a in Rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2019; 44(6): 827-36.

Gao M, Zheng A, Chen L, Dang F, Liu X, Gao J. Benzo(a)pyrene affects proliferation with reference to metabolic genes and ROS/HIF-1 α /HO-1 signaling in A549 and MCF-7 cancer cells. *Drug Chem Toxicol.* 2022; 45(2): 741-9.

Gate L, Langlais C, Micillino JC, Nunge H, Bottin MC, Wrobel R, et al. Bitumen fume-induced gene expression profile in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 215(1): 83-92.

Gendre C, Lafontaine M, Morele Y, Payan JP, Simon P. Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl Aromat Compd* 2002; 22(3-4): 761-769.

Genies C, Maitre A, Lefebvre E, Jullien A, Chopard-Lallier M, Douki T. The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs. *PLoS One.* 2013; 8(11): e78356.

Genies C, Jullien A, Lefebvre E, Revol M, Maitre A, Douki T. Inhibition of the formation of benzo[a]pyrene adducts to DNA in A549 lung cells exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol In Vitro.* 2016; 35: 1-10.

- Gershkovich P, Hoffman A.** Uptake of lipophilic drugs by plasma derived isolated chylomicrons: linear correlation with intestinal lymphatic bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2005; 26(5): 394-404.
- Ginsberg GL, Atherholt TB.** DNA adduct formation in mouse tissues in relation to serum levels of benzo(a)pyrene-diol-epoxide after injection of benzo(a)pyrene or the diol-epoxide. *Cancer Res.* 1990; 50(4): 1189-94.
- Gladen BC, Zadorozhnaja TD, Chislovska N, Hryhorczuk DO, Kennicutt MC, 2nd, Little RE.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. *Hum Exp Toxicol.* 2000; 19(11): 597-603.
- Godschalk RW, Moonen EJ, Schilderman PA, Broekmans WM, Kleinjans JC, Van Schooten FJ.** Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis.* 2000; 21(1): 87-92.
- Goudarzi G, Idani E, Alavi N, Salmanzadeh S, Babaei AA, Geravandi, S, et al.** Association of polycyclic aromatic hydrocarbons of the outdoor air in Ahvaz, southwest Iran during warm-cold season. *Toxin Rev.* 2017; 36: 282–289.
- Gourronc FA, Markan KR, Kulhankova K, Zhu Z, Sheehy R, Quelle DE, et al.** Pdgfra-Cre mediated knockout of the aryl hydrocarbon receptor protects mice from high-fat diet induced obesity and hepatic steatosis. *PLoS One.* 2020; 15(7): e0236741.
- Gower JD, Sayer JW, Wills ED.** The effect of dietary lipids and antioxidants on the activity of epoxide hydratase in the rat liver and intestine. *Biochem Pharmacol.* 1986; 35(12): 1965-9.
- Grimmer G, Brune H, Dettbarn G, Heinrich U, Jacob J, Mohtashamipur E, et al.** Urinary and faecal excretion of chrysene and chrysene metabolites by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Arch Toxicol.* 1988; 62(6): 401-5.
- Grimmer G, Jacob J, Dettbarn G, Naujack KW.** Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 1997; 69(4): 231-9.
- Grova N, Feidt C, Laurent C, Rychen G.** Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of aromatic hydrocarbons. *Int Dairy J.* 2002; 12(12): 1025-31.
- Grova N, Fays 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. *Environ Pollut.* 2017; 228: 484-95.
- Grova N, Hardy EM, Fays F, Duca RC, Appenzeller BMR.** Hair analysis for the biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: comparison with urinary metabolites and DNA adducts in a rat model. *Arch Toxicol.* 2018; 92(10): 3061-75.
- Harper N, Steinberg M, Safe S.** Immunotoxicity of a reconstituted polynuclear aromatic hydrocarbon mixture in B6C3F1 mice. *Toxicology.* 1996; 109(1): 31-8.
- Harrigan JA, McGarrigle BP, Sutter TR, Olson JR.** Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20(4): 426-38.
- Harris DL, Hood DB, Ramesh A.** Vehicle-dependent disposition kinetics of fluoranthene in Fisher-344 rats. *Int J Environ Res Public Health.* 2008; 5(1): 41-8.

Harris KL, Banks LD, Mantey JA, Huderson AC, Ramesh A. Bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance to toxicity and carcinogenesis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013; 9(11): 1465-80.

Hauser-Davis RA, Lopes RM, Zioli RL. Inhibition of mullet (*M. liza*) brain acetylcholinesterase activity by in vitro polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Mar Pollut Bull.* 2019; 140: 30-4.

He S, Li X, Li C, Deng H, Shao Y, Yuan L. Isoorientin attenuates benzo[a]pyrene-induced colonic injury and gut microbiota disorders in mice. *Food Res Int.* 2019; 126: 108599.

Hecht SS, Grabowski W, Groth K. Analysis of faeces for benzo[a]pyrene after consumption of charcoal-broiled beef by rats and humans. *Food Cosmet Toxicol.* 1979; 17(3): 223-7.

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. *Chem Res Toxicol.* 2010; 23(5): 900-8.

Hernandez F, Portoles T, Pitarch E, Lopez FJ. Searching for anthropogenic contaminants in human breast adipose tissues using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2009; 44(1): 1-11.

Hessel S, John A, Seidel A, Lampen A. Multidrug resistance-associated proteins are involved in the transport of the glutathione conjugates of the ultimate carcinogen of benzo[a]pyrene in human Caco-2 cells. *Arch Toxicol.* 2013; 87(2): 269-80.

Hockley SL, Arlt VM, Brewer D, Te Poele R, Workman P, Giddings I, et al. AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem Res Toxicol.* 2007; 20(12): 1797-810.

Hodek P, Koblihova J, Kizek R, Frei E, Arlt VM, Stiborova M. The relationship between DNA adduct formation by benzo[a]pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 36(3): 989-96.

Holder GM, Yagi H, Jerina DM, Levin W, Lu AY, Conney AH. Metabolism of benzo[a]pyrene. Effect of substrate concentration and 3-methylcholanthrene pretreatment on hepatic metabolism by microsomes from rats and mice. *Arch Biochem Biophys.* 1975; 170(2): 557-66.

Hopf NB, Carreon T, Talaska G. Biological markers of carcinogenic exposure in the aluminum smelter industry--a systematic review. *J Occup Environ Hyg.* 2009; 6(9): 562-81.

Hopf NB, Kirkeleit J, Kramer SL, Moen B, Succop P, Genter MB, et al. Urinary 1-hydroxypyrene levels in offshore workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 2010; 83(1): 55-9.

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). *Toxicol Lett.* 2018; 287: 122-30.

Howsam M, Jones KC. Sources of PAH in the Environment. In: Neilson AH editor. *The Handbook of Environmental chemistry. Vol 3 Part I. PAHs and related Compounds.* Springer; 1998. pp. 137-169.

Hu Y, Li G, Xue X, Zhou Z, Li X, Fu J, et al. PAH-DNA adducts in a Chinese population: relationship to PAH exposure, smoking and polymorphisms of metabolic and DNA repair genes. *Biomarkers.* 2008; 13(1): 27-40.

Huang X, Xu X, Dai Y, Cheng Z, Zheng X, Huo X. Association of prenatal exposure to PAHs with anti-Mullerian hormone (AMH) levels and birth outcomes of newborns. *Sci Total Environ.* 2020; 723: 138009.

Hubbard TD, Murray IA, Perdew GH. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metab Dispos.* 2015; 43(10): 1522-35.

Hussain K, Hoque RR, Balachandran S, Medhi S, Idris MG, Rahman M, et al. Monitoring and Risk Analysis of PAHs in the Environment. In: Hussain C editor. *Handbook of Environmental Materials Management.* Berlin: Springer; 2018. pp. 1-35.

IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 92. Lyon: IARC; 2010: 1-853.

Ifegwu OC, Anyakora C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part I. Exposure. *Adv Clin Chem.* 2015; 72: 277-304.

INERIS. Choix de valeurs toxicologiques de références (VTR). Méthodologie appliquée par l'INERIS. Impact des activités humaines sur la santé. Première édition. DRC-16-156196-11306A. Verneuil-en-Halatte: INERIS; 2016: 1-68.

INERIS. Choix de valeur toxicologique de références. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). DRC-20-180728-00256A. Verneuil-en-Halatte: INERIS; 2020: 1-34.

Ingram AJ, Lee R, Phillips JC. Factors affecting the bioavailability of benzo[a]pyrene from oils in mouse skin: oil viscosity, grooming, activity and its prevention. *J Appl Toxicol.* 1995; 15(3): 175-82.

INRS. Cartographie des expositions aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par secteur d'activité : focus sur la surveillance biologique des expositions professionnelles. Paris: INRS; 2018: 1-23.

Inyang F, Ramesh A, Kopsombut P, Niaz MS, Hood DB, Nyanda AM, et al. Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol.* 2003; 17(5): 527-37.

Jackson DP, Joshi AD, Elferink CJ. Ah Receptor Pathway Intricacies; Signaling Through Diverse Protein Partners and DNA-Motifs. *Toxicol Res (Camb).* 2015; 4(5): 1143-58.

Jacob J, Brune H, Gettbarn G, Grimmer D, Heinrich U, Mohtashamipur E, et al. Urinary and faecal excretion of pyrene and hydroxypyrene by rats after oral, intraperitoneal, intratracheal or intrapulmonary application. *Cancer Lett.* 1989; 46(1): 15-20.

Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, Greenwald P, Chorost S, Tucci C, et al. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N Engl J Med.* 1990; 323(10): 632-6.

Jarvis IW, Dreij K, Mattsson A, Jernstrom B, Stenius U. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology.* 2014; 321: 27-39.

Ji G, Gu A, Zhou Y, Shi X, Xia Y, Long Y, et al. Interactions between exposure to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA repair gene polymorphisms on bulky DNA adducts in human sperm. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13145.

- Jin X, Hua Q, Liu Y, Wu Z, Xu D, Ren Q, et al.** Organ and tissue-specific distribution of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ApoE-KO mouse. *Environ Pollut.* 2021; 286: 117219.
- Jones JM, Anderson JW.** Relative potencies of PAHs and PCBs based on the response of human cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1999; 7(1): 19-26.
- Jongeneelen FJ, Leijdekkers CM, Henderson PT.** Urinary excretion of 3-hydroxybenzo[a]pyrene after percutaneous penetration and oral absorption of benzo[a]pyrene in rats. *Cancer Lett.* 1984; 25(2): 195-201.
- Jongeneelen FJ, Anzion RB, Leijdekkers CM, Bos RP, Henderson PT.** 1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int Arch Occup Environ Health.* 1985; 57(1): 47-55.
- Jongeneelen FJ.** A guidance value of 1-hydroxypyrene in urine in view of acceptable occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Lett.* 2014; 231(2): 239-48.
- Kadry AM, Skowronski GA, Turkall RM, Abdel-Rahman MS.** Comparison between oral and dermal bioavailability of soil-adsorbed phenanthrene in female rats. *Toxicol Lett.* 1995; 78(2): 153-63.
- Kang HG, Jeong SH, Cho MH, Cho JH.** Changes of biomarkers with oral exposure to benzo(a)pyrene, phenanthrene and pyrene in rats. *J Vet Sci.* 2007; 8(4): 361-8.
- Kap-Soon N, Do-Youn L, Hak CJ, Joo WA, Lee E, Chan-Wha K.** Protein biomarkers in the plasma of workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Proteomics.* 2004; 4(11): 3505-13.
- Kapuci M, Ulker Z, Gurkan S, Alpsoy L.** Determination of cytotoxic and genotoxic effects of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol on human lymphocyte culture. *Toxicol Ind Health.* 2014; 30(1): 82-9.
- Kawabata TT, White KL Jr.** Effects of naphthalene and naphthalene metabolites on the in vitro humoral immune response. *J Toxicol Environ Health.* 1990; 30(1): 53-67.
- Kawamura Y, Kamata E, Ogawa Y, Kaneko T, Uchiyama S, Saito Y.** The effect of various foods on the intestinal absorption of benzo-a-pyrene in rats. *J Food Hyg Soc Jpn.* 1988; 29(1): 21-5.
- Kelly BC, Gobas FA, McLachlan MS.** Intestinal absorption and biomagnification of organic contaminants in fish, wildlife, and humans. *Environ Toxicol Chem.* 2004; 23(10): 2324-36.
- Kennedy CJ, Tierney KB.** Energy intake affects the biotransformation rate, scope for induction, and metabolite profile of benzo[a]pyrene in rainbow trout. *Aquat Toxicol.* 2008; 90(3): 172-81.
- Keshava C, Divi RL, Whipkey DL, Frye BL, McCanlies E, Kuo M, et al.** Induction of CYP1A1 and CYP1B1 and formation of carcinogen-DNA adducts in normal human mammary epithelial cells treated with benzo[a]pyrene. *Cancer Lett.* 2005; 221(2): 213-24.
- Khalil A, Villard PH, Dao MA, Burcelin R, Champion S, Fouchier F, et al.** Polycyclic aromatic hydrocarbons potentiate high-fat diet effects on intestinal inflammation. *Toxicol Lett.* 2010; 196(3): 161-7.
- Kim MK, Oh S, Lee JH, Im H, Ryu YM, Oh E, et al.** Evaluation of biological monitoring markers using genomic and proteomic analysis for automobile emission inspectors and waste

incinerating workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxins. *Exp Mol Med*. 2004; 36(5): 396-410.

Kim J, Koo SI, Noh SK. Green tea extract markedly lowers the lymphatic absorption and increases the biliary secretion of ¹⁴C-benzo[a]pyrene in rats. *J Nutr Biochem*. 2012; 23(8): 1007-11.

Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJ. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*. 2013; 60: 71-80.

Klaassen CE, Roberts RJ, Plaa GL. Maximal biliary excretion of bilirubin and sulfobromophthalein during various rates of infusion in rats of different weights and strains. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1969; 15(1): 143-51.

Klotz K, Schindler BK, Angerer J. 1,2-Dihydroxynaphthalene as biomarker for a naphthalene exposure in humans. *Int J Hyg Environ Health*. 2011; 214(2): 110-4.

Kogevinas M, Mannetje A, Cordier S, Ranft U, Gonzalez CA, Vineis P, et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control*. 2003; 14(10): 907-14.

Konczak M, Godlewska P, Wisniewska M, Oleszczuk P. Chemical properties of soil determine the persistence and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge- or sewage sludge/biomass-derived biochar-amended soils. *Environ Pollut*. 2023; 319: 120909.

Koutros S, Cross AJ, Sandler DP, Hoppin JA, Ma X, Zheng T, et al. Meat and meat mutagens and risk of prostate cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(1): 80-7.

Kroese ED, Muller JJA, Mohn GR, Dortant PM, Wester PW. Tumorigenic effects in Wistar rats orally administered benzo[a]pyrene for two years (gavage studies). Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Report 658603010. Bilthoven (NL): National Institute of Public Health and the Environment, RIVM; 1999: 1-139.

Kumar S, Chang RL, Wood AW, Xie JG, Huang MT, Cui XX, et al. Tumorigenicity of racemic and optically pure bay region diol epoxides and other derivatives of the nitrogen heterocycle dibenz[a,h]acridine on mouse skin. *Carcinogenesis*. 2001; 22(6): 951-5.

Lafontaine M, Gendre C, Morele Y, Laffitte-Rigaud G. Excretion of urinary 1-hydroxypyrene in relation to the penetration routes of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycycl Aromat Compd*. 2002; 22(3-4): 579-588.

Lafontaine M, Gendre C, Desaut P, Simon P. Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limit value. *Polycycl Aromat Compd*. 2004; 24(4-5): 441-50.

Laher JM, Rigler MW, Vetter RD, Barrowman JA, Patton JS. Similar bioavailability and lymphatic transport of benzo(a)pyrene when administered to rats in different amounts of dietary fat. *J Lipid Res*. 1984; 25(12): 1337-42.

Laher JM, Barrowman JA. Role of the lymphatic system in the transport of absorbed 7,12-dimethylbenzanthracene in the rat. *Lipids*. 1987; 22(3): 152-5.

Lankova D, Urbancova K, Sram RJ, Hajslova J, Pulkrabova J. A novel strategy for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon monohydroxylated metabolites in urine

using ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408(10): 2515-25.

Laupeze B, Amiot L, Sparfel L, Le Ferrec E, Fauchet R, Fardel O. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168(6): 2652-8.

Laurent C, Feidt C, Grova N, Mpassi D, Lichtfouse E, Laurent F, et al. Portal absorption of ¹⁴C after ingestion of spiked milk with ¹⁴C-phenanthrene, ¹⁴C-benzo[a]pyrene or ¹⁴C-TCDD in growing pigs. *Chemosphere.* 2002; 48(8): 843-8.

Le Magueresse-Battistoni B. Adipose Tissue and Endocrine-Disrupting Chemicals: Does Sex Matter? *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(24): 9403.

Le Marchand L, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, et al. Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res.* 1998; 58(21): 4858-63.

Levin W, Wood AW, Chang RL, Yagi H, Mah HD, Jerina DM, et al. Evidence for bay region activation of chrysene 1,2-dihydrodiol to an ultimate carcinogen. *Cancer Res.* 1978; 38(6): 1831-4.

Li Z, Sandau CD, Romanoff LC, Caudill SP, Sjodin A, Needham LL, et al. Concentration and profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population. *Environ Res.* 2008; 107(3): 320-31.

Li Q, Lauer FT, Liu KJ, Hudson LG, Burchiel SW. Low-dose synergistic immunosuppression of T-dependent antibody responses by polycyclic aromatic hydrocarbons and arsenic in C57BL/6J murine spleen cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 245(3): 344-51.

Li X, Feng Y, Deng H, Zhang W, Kuang D, Deng Q, et al. The dose-response decrease in heart rate variability: any association with the metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in coke oven workers? *PLoS One.* 2012; 7(9): e44562.

Li G, Xiong H, Saeed K, Ma R, Xing Y, Bi Y, et al. Comparative toxicity analysis of corannulene and benzo[a]pyrene in mice. *Toxicol Lett.* 2020; 331: 130-42.

Libalova H, Krckova S, Uhlirva K, Milcova A, Schmuczerova 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. *Toxicol Lett.* 2014; 225(3): 350-7.

Lipniak-Gawlik M. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the elimination kinetics of pyrene and the urinary excretion profile of 1-hydroxypyrene in the rat. *J Toxicol Environ Health A.* 1998; 55(7): 503-16.

Liu J, He H, Xu M, Wang T, Dziugan P, Zhao H, et al. Detoxification of Oral Exposure to Benzo(a)pyrene by *Lactobacillus plantarum* CICC 23121 in Mice. *Mol Nutr Food Res.* 2021; 65(12): e2001149.

Longo V, Ingelman-Sundberg M, Amato G, Salvetti A, Gervasi PG. Effect of starvation and chlormethiazole on cytochrome P450s of rat nasal mucosa. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59(11): 1425-32.

Lou W, Zhang MD, Chen Q, Bai TY, Hu YX, Gao F, et al. Molecular mechanism of benzo [a] pyrene regulating lipid metabolism via aryl hydrocarbon receptor. *Lipids Health Dis.* 2022; 21(1): 13.

Lu D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Quantitation of benzo[a]pyrene metabolic profiles in human bronchoalveolar (H358) cells by stable isotope dilution liquid chromatography-

atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24(11): 1905-14.

Lu L, Ni R. Association between polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and hypertension among the U.S. adults in the NHANES 2003-2016: A cross-sectional study. *Environ Res*. 2023; 217: 114907.

Luckert C, Ehlers A, Buhrke T, Seidel A, Lampen A, Hessel S. Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. *Toxicol Lett*. 2013; 222(2): 180-8.

Luo K, Hochalter JB, Carmella SG, Hecht SS. Quantitation of phenanthrene dihydrodiols in the urine of smokers and non-smokers by gas chromatography-negative ion chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020; 1141: 122023.

Luo XJ, Huang LQ, Guan KL, Qi XM, Zeng YH, Mai BX. Bioamplification and Biomagnification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Halogenated Organic Pollutants in Moths from an Electronic Waste Recycling Site. *Environ Toxicol Chem*. 2022; 41(10): 2395-403.

Machala M, Vondracek J, Blaha L, Ciganek M, Neca JV. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res*. 2001; 497(1-2): 49-62.

Mahadevan B, Marston CP, Luch A, Dashwood WM, Brooks E, Pereira C, et al. Competitive inhibition of carcinogen-activating CYP1A1 and CYP1B1 enzymes by a standardized complex mixture of PAH extracted from coal tar. *Int J Cancer*. 2007; 120(6): 1161-8.

Maitre A, Petit P, Marques M, Herve C, Montlevier S, Persoons R, et al. Exporisq-HAP database: 20 years of monitoring French occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures and identification of exposure determinants. *Int J Hyg Environ Health*. 2018; 221(2): 334-46.

Mallah MA, Changxing L, Mallah MA, Noreen S, Liu Y, Saeed M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overreview. *Chemosphere*. 2022; 296: 133948.

Marcil V, Peretti N, Delvin E, Levy E. Les processus digestifs et absorptifs des lipides alimentaires. *Gastroenterol Clin Biol*. 2004; 28(12): 1257-66.

Marie C, Maitre A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, Guiraud P, et al. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol*. 2008; 28(5): 579-90.

Marie C, Ravanat JL, Badouard C, Marques M, Balducci F, Maitre A. Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. *Environ Mol Mutagen*. 2009; 50(2): 88-95.

Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, Viau C, Maitre A. A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. *J Appl Toxicol*. 2010; 30(5): 402-10.

Marie-Desvergne C, Maitre A, Bouchard M, Ravanat JL, Viau C. Evaluation of DNA adducts, DNA and RNA oxidative lesions, and 3-hydroxybenzo(a)pyrene as biomarkers of DNA damage in lung following intravenous injection of the parent compound in rats. *Chem Res Toxicol.* 2010; 23(7): 1207-14.

Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte.* 2015; 5(1): 11-21.

Marques M, Maitre A, Choisnard L, Demeilliers C, Persoons R. Simultaneous analysis of PAH urinary mono- and dihydroxylated metabolites by GC-MS-MS following SPE and two-stage derivatization. *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413(27): 6823-35.

Marston CP, Pereira C, Ferguson J, Fischer K, Hedstrom O, Dashwood WM, et al. 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.* 2001; 22(7): 1077-86.

Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42(6): 620-43.

Martínez Góngora V, Matthes KL, Castaño PR, Linseisen J, Rohrmann S. Dietary Heterocyclic Amine Intake and Colorectal Adenoma Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019; 28(1): 99-109.

McClellan MD, Rinehart RD, Sapkota A, Cavallari JM, Herrick RF. Dermal exposure and urinary 1-hydroxypyrene among asphalt roofing workers. *J Occup Environ Hyg.* 2007; 4 Suppl 1: 118-26.

Meeker JD, Barr DB, Serdar B, Rappaport SM, Hauser R. Utility of urinary 1-naphthol and 2-naphthol levels to assess environmental carbaryl and naphthalene exposure in an epidemiology study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2007; 17(4): 314-20.

Miller GW, Jones DP. The nature of nurture: refining the definition of the exposome. *Toxicol Sci.* 2014; 137(1): 1-2.

Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Utilisation d'animaux à des fins scientifiques dans les établissements français-Enquête statistique 2021-2023. Paris: Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation; 2023: 1-13.

Mirvish SS, Ghadirian P, Wallcave L, Raha C, Bronczyk S, Sams JP. Effect of diet on fecal excretion and gastrointestinal tract distribution of unmetabolized benzo(a)pyrene and 3-methylcholanthrene when these compounds are administered orally to hamsters. *Cancer Res.* 1981; 41(6): 2289-93.

Molliere M, Foth H, Kahl R, Kahl GF. Comparison of benzo(a)pyrene metabolism in isolated perfused rat lung and liver. *Arch Toxicol.* 1987; 60(4): 270-7.

Moody RP, Joncas J, Richardson M, Chu I. Contaminated soils (I): In vitro dermal absorption of benzo[a]pyrene in human skin. *J Toxicol Environ Health A.* 2007; 70(21): 1858-65.

Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci.* 2015; 145(1): 5-15.

- Moreau M, Ayotte P, Bouchard M.** Kinetics of Diol and Hydroxybenzo[a]pyrene Metabolites in Relation to DNA Adduct Formation and Gene Expression in Rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2015a; 78(12): 725-46.
- Moreau M, Bouchard M.** Comparison of the kinetics of various biomarkers of benzo[a]pyrene exposure following different routes of entry in rats. *J Appl Toxicol*. 2015b; 35(7): 781-90.
- Moriguchi T, Motohashi H, Hosoya T, Nakajima O, Takahashi S, Ohsako S, et al.** Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(10): 5652-7.
- Mülek M, Högger P.** Highly sensitive analysis of polyphenols and their metabolites in human blood cells using dispersive SPE extraction and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407(7): 1885-99.
- Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD.** Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:297-316.
- Murray IA, Patterson AD, Perdew GH.** Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(12): 801-14.
- Neal J, Rigdon RH.** Gastric tumors in mice fed benzo(a)pyrene: a quantitative study. *Tex Rep Biol Med*. 1967; 25(4): 553-7.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ.** Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem*. 2004; 279(23): 23847-50.
- Nesnow S, Ross J, Nelson G, Holden K, Erexson G, Kligerman A, et al.** Quantitative and temporal relationships between DNA adduct formation in target and surrogate tissues: implications for biomonitoring. *Environ Health Perspect*. 1993; 101 Suppl 3(Suppl 3): 37-42.
- Neuschafer-Rube F, Schraplau A, Schewe B, Lieske S, Krutzfeldt JM, Ringel S, et al.** Arylhydrocarbon receptor-dependent mIndy (Slc13a5) induction as possible contributor to benzo[a]pyrene-induced lipid accumulation in hepatocytes. *Toxicology*. 2015; 337: 1-9.
- Nishiyama Y, Nakayama SM, Watanabe KP, Kawai YK, Ohno M, Ikenaka Y, et al.** Strain differences in cytochrome P450 mRNA and protein expression, and enzymatic activity among Sprague Dawley, Wistar, Brown Norway and Dark Agouti rats. *J Vet Med Sci*. 2016; 78(4): 675-80.
- NTP.** Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (cas no. 91-20-3) in B6C3F1 mice (inhalation studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 1992; 410: 1-172.
- NTP.** Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (cas no. 91-20-3) in F344/N rats (inhalation studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 2000; (500): 1-173.
- Obach RS, Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky LS.** Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome p450s. *Drug Metab Dispos*. 2001; 29(3): 347-52.
- OCDE.** Essai n°417: Toxicocinétique. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Section 4. Paris: OCDE; 2010: 1-22.
- Okuda H, Nojima H, Miwa K, Watanabe N, Watabe T.** Selective covalent binding of the active sulfate ester of the carcinogen 5-(hydroxymethyl)chrysene to the adenine residue of calf thymus DNA. *Chem Res Toxicol*. 1989; 2(1): 15-22.

Olasehinde TA, Olaniran AO. Neurotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Systematic Mapping and Review of Neuropathological Mechanisms. *Toxics*. 2022; 10(8): 417.

Oltra-Noguera D, Mangas-Sanjuan V, Gonzalez-Alvarez I, Colon-Useche S, Gonzalez-Alvarez M, Bermejo M. Drug gastrointestinal absorption in rat: Strain and gender differences. *Eur J Pharm Sci*. 2015; 78: 198-203.

Palackal NT, Lee SH, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *J Biol Chem*. 2002; 277(27): 24799-808.

Palazzi P, Mezzache S, Bourokba N, Hardy EM, Schritz A, Bastien P, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in women living in the Chinese cities of BaoDing and Dalian revealed by hair analysis. *Environ Int*. 2018; 121(Pt 2): 1341-54.

Park HG, Ha NY, Kim DH, Kim JH, Lee CK, Kim K, et al. Relationship between residence characteristics and polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in housewives: second Korean National Environmental Health Survey (2012-2014). *Ann Occup Environ Med*. 2018; 30: 23.

Pastor-Belda M, Campillo N, Arroyo-Manzanares N, Torres C, Perez-Carceles MD, Hernandez-Cordoba M, et al. Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Forensic Assessment Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2019; 32(8): 1680-8.

Payan JP, Lafontaine M, Simon P, Marquet F, Champmartin-Gendre C, Beydon D, et al. 3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene. *Arch Toxicol*. 2009; 83(9): 873-83.

Penning TM. Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol*. 2014; 27(11): 1901-17.

Perera FP, Wheelock K, Wang Y, Tang D, Margolis AE, Badia G, et al. Combined effects of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and material hardship on child ADHD behavior problems. *Environ Res*. 2018; 160: 506-13.

Peters S, Talaska G, Jönsson BA, Kromhout H, Vermeulen R. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, urinary mutagenicity, and DNA adducts in rubber manufacturing workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(6): 1452-9.

Pieterse B, Felzel E, Winter R, van der Burg B, Brouwer A. PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures. *Environ Sci Technol*. 2013; 47(20): 11651-9.

Pinel-Marie ML, Louarn L, Desmots S, Fardel O, Sparfel L. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the IgA receptor Fc α RI by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in human macrophages. *Toxicology*. 2011; 290(1): 89-95.

Podechard N, Lecureur V, Le Ferrec E, Guenon I, Sparfel L, Gilot D, et al. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett*. 2008; 177(2): 130-7.

Polachova A, Gramblicka T, Parizek O, Sram RJ, Stupak M, Hajslova J, et al. Estimation of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) based on the dietary and outdoor atmospheric monitoring in the Czech Republic. *Environ Res*. 2020; 182: 108977.

Poursafa P, Moosazadeh M, Abedini E, Hajizadeh Y, Mansourian M, Pourzamani H, et al. A Systematic Review on the Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Cardiometabolic Impairment. *Int J Prev Med.* 2017; 8: 19.

Pushparajah DS, Umachandran M, Plant KE, Plant N, Ioannides C. Differential response of human and rat epoxide hydrolase to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: studies using precision-cut tissue slices. *Mutat Res.* 2008; 640(1-2): 153-61.

Pushparajah DS, Ioannides C. Antagonistic and synergistic interactions during the binding of binary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons to the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol In Vitro.* 2018; 50: 54-61.

Qu SX, Stacey NH. Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis.* 1996; 17(1): 53-9.

Qu W, Rippe RA, Ma J, Scarborough P, Biagini C, Fiedorek FT, et al. Nutritional status modulates rat liver cytochrome P450 arachidonic acid metabolism. *Mol Pharmacol.* 1998; 54(3): 504-13.

Ragin AD, Crawford KE, Etheredge AA, Grainger J, Patterson DG Jr. A gas chromatography-isotope dilution high-resolution mass spectrometry method for quantification of isomeric benzo[a]pyrene diol epoxide hemoglobin adducts in humans. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(9): 728-36.

Rahman A, Barrowman JA, Rahimtula A. The influence of bile on the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from the rat intestine. *Can J Physiol Pharmacol.* 1986; 64(9): 1214-8.

Raineri R, Hillesund T, Ernst MK, Cavanaugh DM, Poiley JA. Metabolic activation, detoxification and transformation studies with benzo[a]pyrene using rat and hamster organ cells in vitro. *J Appl Toxicol.* 1983; 3(4): 196-202.

Ramachandran S, Palanisamy V. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012; 3(2): 286-93.

Ramesh A, Inyang F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, Nyanda AM. Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp Toxicol Pathol.* 2001; 53(4): 275-90.

Ramesh A, Walker SA, Hood DB, Guillen MD, Schneider K, Weyand EH. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Toxicol.* 2004; 23(5): 301-33.

Ravindra K, Sokhi R, Vangrieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment.* 2008;42(13):2895-921.

Reddy KP, Reddy PS. Testicular and epididymal toxicity induced by benzo(a)pyrene, alcohol, and their combination in Wistar rats. *Toxicol Res (Camb).* 2016; 5(2): 420-33.

Reed L, Mrizova I, Barta F, Indra R, Moserova M, Kopka K, et al. Cytochrome b (5) impacts on cytochrome P450-mediated metabolism of benzo[a]pyrene and its DNA adduct formation: studies in hepatic cytochrome b (5) /P450 reductase null (HBRN) mice. *Arch Toxicol.* 2018; 92(4): 1625-38.

Rehwagen M, Muller A, Massolo L, Herbarth O, Ronco A. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Sci Total Environ.* 2005; 348(1-3): 199-210.

Rex A, Sondern U, Voigt JP, Franck S, Fink H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(1): 107-11.

Rex A, Voigt JP, Gustedt C, Beckett S, Fink H. Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology (Berl).* 2004; 177(1-2): 23-34.

Riaz F, Pan F, Wei P. Aryl hydrocarbon receptor: The master regulator of immune responses in allergic diseases. *Front Immunol.* 2022; 13: 1057555.

Ribiere C, Peyret P, Parisot N, Darcha C, Dechelotte PJ, Barnich N, et al. Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Sci Rep.* 2016; 6: 31027.

Rice JE, Defloria MC, Sensenhauser C, Lavoie EJ. The influence of fluoranthene on the metabolism and DNA binding of benzo[a]pyrene in vivo in mouse skin. *Chem Biol Interact.* 1988; 68(1-2): 127-36.

Rogan EG, Hakam A, Cavalieri EL. Structure elucidation of a 6-methylbenzo[a]pyrene-DNA adduct formed by horseradish peroxidase in vitro and mouse skin in vivo. *Chem Biol Interact.* 1983; 47(1): 111-22.

Rooks MG, Veiga P, Wardwell-Scott LH, Tickle T, Segata N, Michaud M, et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *ISME J.* 2014; 8(7): 1403-17.

Roos PH. Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Toxicol.* 2002; 76(2): 75-82.

Rosankis E, Léonard M. Les expositions aux produits chimiques cancérogènes en 2017. Résultats de l'enquête SUMER. *Références en santé au travail.* 2022; (172): 43-51

Rota M, Bosetti C, Boccia S, Boffetta P, La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: an updated systematic review and a meta-analysis to 2014. *Arch Toxicol.* 2014; 88(8): 1479-90.

Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(3): 184-97.

Ruzgyte A, Bouchard M, Viau C. Comparison of the urinary excretion time courses of pyrene-1,6-dione, pyrene-1,8-dione and 1-hydroxypyrene in rats intravenously exposed to pyrene. *Biomarkers.* 2006; 11(5): 417-27.

Santé.fr. Les facteurs de risque du cancer du poumon. Consulté le 04 avril 2023. [En ligne]. Mis à jour le 2 août 2023. Disponible : <https://www.sante.fr/les-facteurs-de-risque-du-cancer-du-poumon>.

Saunders CR, Das SK, Ramesh A, Shockley DC, Mukherjee S. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol.* 2006; 26(5): 427-38.

Sayed TS, Maayah ZH, Zeidan HA, Agouni A, Korashy HM. Insight into the physiological and pathological roles of the aryl hydrocarbon receptor pathway in glucose homeostasis, insulin resistance, and diabetes development. *Cell Mol Biol Lett.* 2022; 27(1): 103.

Schabath MB, Spitz MR, Zhang X, Delclos GL, Wu X. Genetic variants of myeloperoxidase and lung cancer risk. *Carcinogenesis*. 2000; 21(6): 1163-6.

Schneider K, Roller M, Kalberlah F, Schuhmacher-Wolz U. Cancer risk assessment for oral exposure to PAH mixtures. *J Appl Toxicol*. 2002; 22(1): 73-83.

Selkirk JK, Croy RG, Wiebel FJ, Gelboin HV. Differences in benzo(a)pyrene metabolism between rodent liver microsomes and embryonic cells. *Cancer Res*. 1976; 36(12): 4476-9.

Shah UK, Seager AL, Fowler P, Doak SH, Johnson GE, Scott SJ, et al. A comparison of the genotoxicity of benzo[a]pyrene in four cell lines with differing metabolic capacity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016; 808: 8-19.

Shi Z, Dragin N, Galvez-Peralta M, Jorge-Nebert LF, Miller ML, Wang B, et al. Organ-specific roles of CYP1A1 during detoxication of dietary benzo[a]pyrene. *Mol Pharmacol*. 2010; 78(1): 46-57.

Shiizaki K, Kawanishi M, Yagi T. Modulation of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. *Genes Environ*. 2017; 39: 14.

Shimada T, Yamazaki H, Foroozesh M, Hopkins NE, Alworth WL, Guengerich FP. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem Res Toxicol*. 1998; 11(9): 1048-56.

Shimada T, Inoue K, Suzuki Y, Kawai T, Azuma E, Nakajima T, et al. Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*. 2002; 23(7): 1199-207.

Shimada T, Sugie A, Shindo M, Nakajima T, Azuma E, Hashimoto M, et al. Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 187(1): 1-10.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006; 21(4): 257-76.

Shimada T, Murayama N, Okada K, Funae Y, Yamazaki H, Guengerich FP. Different mechanisms for inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic inhibitors. *Chem Res Toxicol*. 2007; 20(3): 489-96.

Singh R, Kaur B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, et al. Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans. *Mutat Res*. 2007; 620(1-2): 71-82.

Singh A, Kamal R, Ahamed I, Wagh M, Bihari V, Sathian B, et al. PAH exposure-associated lung cancer: an updated meta-analysis. *Occup Med (Lond)*. 2018; 68(4): 255-61.

Sinha R, Kulldorff M, Gunter MJ, Strickland P, Rothman N. Dietary benzo[a]pyrene intake and risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(8): 2030-4.

Smith CJ, Walcott CJ, Huang W, Maggio V, Grainger J, Patterson DG, Jr. 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. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002; 778(1-2): 157-64.

Smith TL, Merry ST, Harris DL, Joe Ford J, Ike J, Archibong AE, et al. Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a)pyrene, an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor. *Toxicol In Vitro*. 2007; 21(4): 753-8.

Smith JN, Gaither KA, Pande P. Competitive Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): An Assessment Using In Vitro Metabolism and Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(14): 8266.

Smithgall TE, Harvey RG, Penning TM. Regio- and stereospecificity of homogeneous 3 alpha-hydroxysteroid-dihydrodiol dehydrogenase for trans-dihydrodiol metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem*. 1986; 261(14): 6184-91.

Smithgall TE, Harvey RG, Penning TM. Oxidation of the trans-3,4-dihydrodiol metabolites of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and other benz(a)anthracene derivatives by 3 alpha-hydroxysteroid-dihydrodiol dehydrogenase: effects of methyl substitution on velocity and stereochemical course of trans-dihydrodiol oxidation. *Cancer Res*. 1988; 48(5): 1227-32.

Sparfel L, Van Grevenynghe J, Le Vee M, Aninat C, Fardel O. Potent inhibition of carcinogen-bioactivating cytochrome P450 1B1 by the p53 inhibitor pifithrin alpha. *Carcinogenesis*. 2006; 27(3): 656-63.

Sparfel L, Pinel-Marie ML, Boize M, Koscielny S, Desmots S, Pery A, et al. Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol Sci*. 2010; 114(2): 247-59.

Staal YC, Hebels DG, van Herwijnen MH, Gottschalk RW, van Schooten FJ, van Delft JH. Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis*. 2007a; 28(12): 2632-40.

Staal YC, van Herwijnen MH, Pushparajah DS, Umachandran M, Ioannides C, van Schooten FJ, et al. Modulation of gene expression and DNA-adduct formation in precision-cut liver slices exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons of different carcinogenic potency. *Mutagenesis*. 2007b; 22(1): 55-62.

Staal YC, Pushparajah DS, van Herwijnen MH, Gottschalk RW, Maas LM, Ioannides C, et al. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures: effects on gene expression and DNA adduct formation in precision-cut rat liver slices. *Mutagenesis*. 2008; 23(6): 491-9.

Stansbury KH, Fleisher JW, Gupta RC. Mechanism of aralkyl-DNA adduct formation from benzo[a]pyrene in vivo. *Chem Res Toxicol*. 1994; 7(2): 254-9.

Stavric B, Klassen R. Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. *Food Chem Toxicol*. 1994; 32(8): 727-34.

Stejskalova L, Dvorak Z, Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Curr Drug Metab*. 2011; 12(2): 198-212.

Stern RS, Zierler S, Parrish JA. Skin carcinoma in patients with psoriasis treated with topical tar and artificial ultraviolet radiation. *Lancet*. 1980; 1(8171): 732-5.

Stiborova M, Moserova M, Mrizova I, Dracinska H, Martinek V, Indra R, et al. Induced expression of microsomal cytochrome b(5) determined at mRNA and protein levels in rats exposed to ellipticine, benzo[a]pyrene, and 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Monatsh Chem*. 2016; 147(5): 897-904.

Stowers SJ, Anderson MW. Formation and persistence of benzo(a)pyrene metabolite-DNA adducts. *Environ Health Perspect.* 1985; 62: 31-9.

Sugihara N, James MO. Binding of 3-hydroxybenzo[a]pyrene to bovine hemoglobin and albumin. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17(4): 239-47.

Sulc M, Indra R, Moserova M, Schmeiser HH, Frei E, Arlt VM, et al. The impact of individual cytochrome P450 enzymes on oxidative metabolism of benzo[a]pyrene in human livers. *Environ Mol Mutagen.* 2016; 57(3): 229-35.

Sun K, Song Y, He F, Jing M, Tang J, Liu R. A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics. *Sci Total Environ.* 2021; 773: 145403.

Suter MA, Aagaard KM, Coarfa C, Robertson M, Zhou G, Jackson BP, et al. Association between elevated placental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-DNA adducts from Superfund sites in Harris County, and increased risk of preterm birth (PTB). *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 516(2): 344-9.

Taioli E, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Garte S, et al. Biomarkers of exposure to carcinogenic PAHs and their relationship with environmental factors. *Mutat Res.* 2007; 620(1-2): 16-21.

Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Rajhi A, Douki T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology.* 2011; 279(1-3): 36-44.

Tomaz S, Shahpoury P, Jaffrezo JL, Lammel G, Perraudin E, Villenave E, et al. One-year study of polycyclic aromatic compounds at an urban site in Grenoble (France): Seasonal variations, gas/particle partitioning and cancer risk estimation. *Sci Total Environ.* 2016; 565: 1071-83.

Torsekar R, Gautam MM. Topical Therapies in Psoriasis. *Indian Dermatol Online J.* 2017; 8(4): 235-45.

Tuominen R, Baranczewski P, Warholm M, Hagmar L, Möller L, Rannug A. Susceptibility factors and DNA adducts in peripheral blood mononuclear cells of aluminium smelter workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Toxicol.* 2002; 76(3): 178-86.

Tzekova A, Thuot R, Viau C. Correlation between biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and electrophilic tissue burden in a rat model. *Arch Toxicol.* 2004; 78(6): 351-61.

Uchida K, Nomura Y, Kadowaki M, Takase H, Takano K, Takeuchi N. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J Lipid Res.* 1978; 19(5): 544-52.

Uno S, Dalton TP, Shertzer HG, Genter MB, Warshawsky D, Talaska G, et al. Benzo[a]pyrene-induced toxicity: paradoxical protection in Cyp1a1(-/-) knockout mice having increased hepatic BaP-DNA adduct levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(5): 1049-56.

Uno S, Dalton TP, Derkenne S, Curran CP, Miller ML, Shertzer HG, et al. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol Pharmacol.* 2004; 65(5): 1225-37.

Uno S, Dalton TP, Dragin N, Curran CP, Derkenne S, Miller ML, et al. Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol Pharmacol.* 2006; 69(4): 1103-14.

Unwin J, Cocker J, Scobbie E, Chambers H. An Assessment of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the UK. *The Annals of occupational hygiene.* 2006; 50(4): 395-403.

Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(7): 999-1006.

Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel F. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279(2): 216-32.

van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol.* 2003; 170(5): 2374-81.

van Schooten FJ, Moonen EJ, van der Wal L, Levels P, Kleinjans JC. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces, and urine of rats orally exposed to PAH contaminated soils. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1997; 33(3): 317-22.

Vetter RD, Carey MC, Patton JS. Coassimilation of dietary fat and benzo(a)pyrene in the small intestine: an absorption model using the killifish. *J Lipid Res.* 1985;26(4):428-34.

Stavric B, Klassen R. Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32(8): 727-34.

Viau C, Carrier G, Vyskocil A, Dodd C. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *Sci Total Environ.* 1995; 163(1-3): 179-86.

Viau MB. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers.* 1999; 4(3): 159-87.

Vigsnaes LK, van den Abbeele P, Sulek K, Frandsen HL, Steenholdt C, Brynskov J, et al. Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus. *Sci Rep.* 2013; 3: 1110.

Vineis P, Airoidi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H, et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ.* 2005; 330(7486): 277.

Vineis P, Chadeau-Hyam M, Gmuender H, Gulliver J, Herceg Z, Kleinjans J, et al. The exposome in practice: Design of the EXPOsOMICS project. *Int J Hyg Environ Health.* 2017; 220(2PtA): 142-51.

Vondracek J, Pencikova K, Neca J, Ciganek M, Grycova A, Dvorak Z, et al. Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human cell-based reporter gene assay. *Environ Pollut.* 2017; 220(Pt A): 307-16.

von Koschimbahr A, Youssef A, Béal D, Bourgart E, Rivier A, Marques M, et al. Metabolism and genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human skin explants: mixture effects and modulation by sunlight. *Arch Toxicol.* 2020; 94(2): 495-507.

Wada T, Sunaga H, Miyata K, Shirasaki H, Uchiyama Y, Shimba S. Aryl Hydrocarbon Receptor Plays Protective Roles against High Fat Diet (HFD)-induced Hepatic Steatosis and the Subsequent Lipotoxicity via Direct Transcriptional Regulation of Socs3 Gene Expression. *J Biol Chem.* 2016; 291(13): 7004-16.

Walker SA, Whitten LB, Seals GB, Lee WE, Archibong AE, Ramesh A. Inter-species comparison of liver and small intestinal microsomal metabolism of fluoranthene. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44(3): 380-7.

Walker SA, Addai AB, Mathis M, Ramesh A. Effect of dietary fat on metabolism and DNA adduct formation after acute oral exposure of F-344 rats to fluoranthene. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(4): 236-49.

Wang H, Chen W, Zheng H, Guo L, Liang H, Yang X, et al. Association between plasma BPDE-Alb adduct concentrations and DNA damage of peripheral blood lymphocytes among coke oven workers. *Occup Environ Med.* 2007a; 64(11): 753-8.

Wang S, Sheng Y, Feng M, Leszczynski J, Wang L, Tachikawa H, et al. 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.* 2007b; 22(3): 318-27.

Wang Y, Devkota S, Musch MW, Jabri B, Nagler C, Antonopoulos DA, et al. Regional mucosa-associated microbiota determine physiological expression of TLR2 and TLR4 in murine colon. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13607.

Wang J, Chen S, Tian M, Zheng X, Gonzales L, Ohura T, et al. Inhalation cancer risk associated with exposure to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in an electronic waste and urban area in South China. *Environ Sci Technol.* 2012; 46(17): 9745-52.

Wang F, Yang L, Zhang B, Liu G, Wang C, Zhang Y, et al. Neurobehavioral performance of PAH exposure in male coal miners in Shanxi, China: a cross-sectional study. *Int Arch Occup Environ Health.* 2020; 93(6): 707-14.

Wang F, So KF, Xiao J, Wang H. Organ-organ communication: The liver's perspective. *Theranostics.* 2021; 11(7): 3317-30.

Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, Santer SK, Schwartz DR, et al. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis.* 2005; 26(12): 2207-12.

Weyand EH, Bevan DR. Benzo(a)pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer Res.* 1986; 46(11): 5655-61.

Weyand EH, Bevan DR. Species differences in disposition of benzo[a]pyrene. *Drug Metab Dispos.* 1987; 15(4): 442-8.

Wiersma DA, Roth RA. Total body clearance of circulating benzo(a)pyrene in conscious rats: effect of pretreatment with 3-methylcholanthrene and the role of liver and lung. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983; 226(3): 661-7.

Wild CP. The exposome: from concept to utility. *Int J Epidemiol.* 2012; 41(1): 24-32.

Williams JA, Martin FL, Muir GH, Hewer A, Grover PL, Phillips DH. Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue. *Carcinogenesis*. 2000; 21(9): 1683-9.

Williams JA. Single nucleotide polymorphisms, metabolic activation and environmental carcinogenesis: why molecular epidemiologists should think about enzyme expression. *Carcinogenesis*. 2001; 22(2): 209-14.

Wright SH, Dantzler WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev*. 2004; 84(3): 987-1049.

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. *Toxicol Ind Health*. 2015; 31(10): 898-910.

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 Commun Mass Spectrom*. 2004; 18(19): 2299-308.

Xu CX, Wang C, Zhang ZM, Jaeger CD, Krager SL, Bottum KM, et al. Aryl hydrocarbon receptor deficiency protects mice from diet-induced adiposity and metabolic disorders through increased energy expenditure. *Int J Obes (Lond)*. 2015; 39(8): 1300-9.

Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 206(1): 73-93.

Yamamoto Y, Ishizaki A, Kataoka H. Biomonitoring method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in hair by online in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015; 1000: 187-91.

Yamano Y, Hara K, Ichiba M, Hanaoka T, Pan G, Nakadate T. Urinary 1-hydroxypyrene as a comprehensive carcinogenic biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a cross-sectional study of coke oven workers in China. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014; 87(7): 705-13.

Ye X, Pan W, Li C, Ma X, Yin S, Zhou J, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and risk for premature ovarian failure and reproductive hormones imbalance. *J Environ Sci (China)*. 2020; 91: 1-9.

Yebra-Pimentel I, Fernandez-Gonzalez R, Martinez-Carballo E, Simal-Gandara J. A Critical Review about the Health Risk Assessment of PAHs and Their Metabolites in Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015; 55(10): 1383-405.

Yu H, Xia Q, Yan J, Herreno-Saenz D, Wu YS, Tang IW, et al. Photoirradiation of polycyclic aromatic hydrocarbons with UVA light - a pathway leading to the generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and dna damage. *Int J Environ Res Public Health*. 2006; 3(4): 348-54.

Zarezadeh M, Saedisomeolia A, Shekarabi M, Khorshidi M, Emami MR, Muller DJ. The effect of obesity, macronutrients, fasting and nutritional status on drug-metabolizing cytochrome P450s: a systematic review of current evidence on human studies. *Eur J Nutr*. 2021; 60(6): 2905-21.

Zhang QY, Wikoff J, Dunbar D, Kaminsky L. Characterization of rat small intestinal cytochrome P450 composition and inducibility. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24(3): 322-8.

Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27(7): 804-9.

Zhang W, Sun Z, Zhang Q, Sun Z, Su Y, Song J, et al. Preliminary evidence for an influence of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on the composition of the gut microbiota and neurodevelopment in three-year-old healthy children. *BMC Pediatr.* 2021; 21(1): 86.

Zhong Y, Carmella SG, Hochalter JB, Balbo S, Hecht SS. 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.* 2011; 24(1): 73-80.

Valorisation de thèse

Article scientifique

El Hajjar M, Maître A, Marques M, Persoons R, Demeilliers C. Metabolism of benzo[a]pyrene after low-dose subchronic exposure to an industrial mixture of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in rats: a cocktail effect study. Arch Toxicol. 2023; 97(3): 865-874.

Communications orales

Maguy El Hajjar, Anne Maitre, Christine Demeilliers. Etude des modifications toxicocinétiques et métaboliques induites par les Hydrocarbures aromatiques polycycliques en mélanges, sur un modèle murin et chez des travailleurs. Journée des doctorants TIMC, 25 mai 2021, Grenoble

Maguy El Hajjar, Anne Maitre, Marie Marques, Renaud Persoons, Christine Demeilliers
Etude des métabolites urinaires du benzo[a]pyrène chez le rat après une exposition subchronique au benzo[a]pyrène seul ou inclus dans un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. Journée scientifique webinaire dédiée aux jeunes toxicologues, 31 mars 2022, Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire (STCM). Livre des résumés, 39 pages, page 15

Communications affichées

Maguy El Hajjar, Anne Maitre, Marie Marques, Renaud Persoons, Christine Demeilliers
Urinary and fecal elimination of benzo(a)pyrene metabolites in rats after subchronic exposure to benzo(a)pyrene alone or included in a complex industrial mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons. 20ème Journée de l'EDISCE, 2 juin 2022, Faculté de Médecine et Pharmacie de Grenoble, La Tronche (Isère). Livre des résumés, 88 pages, page 39

Maguy El Hajjar, Anne Maitre, Marie Marques, Renaud Persoons, Christine Demeilliers
Etude de l'élimination des métabolites du benzo[a]pyrène chez le rat après une exposition subchronique au benzo[a]pyrène seul ou inclus dans un mélange industriel complexe d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. RF09-Journée de la Recherche médicale 2022, 30 juin 2022, Faculté de Médecine de Grenoble, La Tronche (Isère). Livre des résumés, 62 pages, page 48

Annexes

Annexe 1 : Matrice de corrélation entre l'élimination fécale des différents HAP exprimée en % de la dose administrée du HAP et le poids corporel du rat, la quantité des croquettes consommées par jour (ajustée ou non au poids corporel), et le poids des fèces éliminés par jour (ajusté ou non à la quantité des croquettes chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP

	Flua	Pyr	Chr	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[j]F	B[e]P	B[a]P	IP	B[g,h,i]P	DB[a,h]A
Poids corporel du rat	0,33	-0,25	-0,05	0,03	-0,14	-0,35	-0,14	-0,21	-0,16	-0,18	-0,07	-0,21
Quantité de croquettes consommées .J-1	0,72*	-0,33	0,13	0,12	0,04	-0,09	-0,05	-0,02	0,07	0,06	0,04	0,12
Quantité de croquettes consommées ajustée au poids corporel du rat	0,54	-0,39	-0,13	-0,08	-0,20	-0,31	-0,24	-0,26	-0,19	-0,20	-0,22	-0,12
Poids des fèces.J-1	0,59	-0,66*	0,02	0,14	0,01	-0,22	-0,14	-0,08	-0,05	-0,07	-0,07	0,03
Poids des fèces ajusté à la quantité des croquettes consommées	-0,19	-0,38	-0,02	-0,01	0,09	0,18	-0,03	0,07	-0,01	-0,04	0,02	0,07

Les valeurs représentent le coefficient de corrélation entre les différentes variables. * : $p < 0,05$.
 Les HAP à faible poids moléculaire en noir, et les HAP à haut poids moléculaire en rouge.

Annexe 2 : Matrice de corrélation entre l'élimination fécale du 1-OHP et du 3-OHB[a]P exprimée en % de la dose administrée du HAP et le poids corporel du rat, la quantité des croquettes consommées par jour (ajustée ou non au poids corporel), le poids des fèces éliminés par jour (ajusté ou non à la quantité des croquettes) et le HAP parent chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP

	1-OHP	3-OHB[a]P	Tétraol-B[a]P
Poids corporel du rat (g)	0,212	0,200	0,188
Quantité des croquettes consommées (g.J-1)	0,432	0,602	-0,377
Quantité de croquettes consommées ajustée au poids corporel du rat (g.kg-1.J-1)	0,479	0,564	-0,539
Poids des fèces (g.J-1)	0,503	0,515	-0,370
Poids des fèces ajusté à la quantité des croquettes consommées (g fèces.g-1 croquettes)	0,030	0,018	0,200
Pyr	0,115		
B[a]P		-0,224	-0,091

Les valeurs représentent le coefficient de corrélation entre les différentes variables.

Annexe 3 : Matrice de corrélation entre les paramètres généraux qui régulent la diurèse chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP

Quantité d'eau bue ajustée à la quantité de croquettes consommées (mL.g-1)	0,742*				
Volume urinaire (mL.J-1)	0,470	0,389			
Volume urinaire ajusté à la quantité d'eau bue (mL urine.mL-1 eau)	0,267	0,236	0,936*		
Créatinine urinaire (g.L-1.J-1)	-0,705*	-0,733*	-0,778*	-0,648*	
Créatinine urinaire ajustée au poids corporel (g.kg-1 poids corporel)	0,304	-0,042	0,711*	0,806**	-0,333
	Quantité d'eau bue (mL.J-1)	Quantité d'eau bue ajustée à la quantité de croquettes consommées (mL.g-1)	Volume urinaire (mL.J-1)	Volume urinaire ajusté à la quantité d'eau bue (mL urine.mL-1 eau)	Créatinine urinaire (g.L-1.J-1)

Les valeurs représentent le coefficient de corrélation entre les différentes variables. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$.

Annexe 4 : Matrice de corrélation entre l'élimination urinaire des différents métabolites exprimée en % de la dose administrée du HAP et la quantité d'eau bue par jour, le volume urinaire et la créatinine urinaire chez des rats Wistar exposés à un mélange industriel de HAP

	1-OHP	3-OHChr	6-OHChr	Chr-1,2- diol	B[a]A-8,9- diol	8-OHB[k]F	B[k]F-8,9- diol	3-OHB[e]P	B[e]P-4,5- diol	3-OHB[a]P	Tétraol- B[a]P
Quantité d'eau bue.J⁻¹	-0,117	-0,334	-0,158	0,608	0,006	-0,529	0,182	-0,255	0,109	0,083	-0,633
Volume urinaire.J⁻¹	0,326	0,389	0,571	-0,122	-0,097	-0,146	-0,511	-0,274	0,486	0,502	-0,285
Créatinine urinaire.J⁻¹	0,100	0,139	-0,018	0,067	0,406	0,612	0,321	0,661	0,042	-0,050	0,733*

*Les valeurs représentent le coefficient de corrélation entre les différentes variables. * : p<0,05.*

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants environnementaux produits en mélanges complexes dont la composition varie selon la source d'émission. Les HAP à haut poids moléculaires (HPM) sont classés comme cancérigènes probables ou possibles pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et le benzo[a]pyrène (B[a]P) est le seul HAP classé comme cancérigène certain. Pour exercer leur effet cancérigène, les HAP doivent être métabolisés. La biosurveillance de l'exposition aux HAP qui est très importante pour estimer les risques sanitaires des populations se fait par l'analyse des métabolites urinaires des HAP. Cependant, par manque de données épidémiologiques, il n'existe pas des valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour ces polluants. D'où l'importance des modèles animaux pour fixer ces VTR. Ainsi la question qui se pose : Comment choisir le bon protocole animal pour étudier **la toxicocinétique des HAP en mélange**? Est-ce que les facteurs génétiques et environnementaux peuvent impacter les résultats de ces études?

Pour répondre à ces questions et pouvoir extrapoler nos résultats à l'homme, 2 protocoles animaux ont été réalisés avec des expositions réalistes (faibles doses, mélange réel, exposition courte ou répétée). Le premier consistait à exposer par gavage des rats Sprague Dawley (SD) à de faibles doses (0,02 et 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹) de B[a]P seul ou inclus dans un mélange industriel de HAP (ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P) 5 fois.semaine⁻¹ pendant 10 semaines. Le deuxième consistait à exposer par gavage des rats Wistar (W) au B[a]P seul (0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹) ou inclus dans un mélange industriel de HAP (ajusté à 0,2 mg.kg⁻¹.J⁻¹ de B[a]P) pendant 4 jours. En plus du dosage des métabolites urinaires du B[a]P et des HAP à HPM, nous avons mis au point l'analyse des HAP et/ou de leurs métabolites dans le sang, les fèces et les organes (foie et reins) par HPLC-Fluo et GC-MSMS-NCI après différents types d'extraction selon les matrices et les composés. Aucune différence dans la toxicocinétique du B[a]P n'a été trouvée avec **les deux doses utilisées**.

L'effet mélange ou l'effet cocktail était : augmentation de l'absorption du B[a]P, modification du métabolisme intestinal avec augmentation de la voie de bio-activation, diminution du métabolisme hépatique suite à une saturation/compétition enzymatique.

L'effet de l'exposition répétée pendant 10 semaines était : augmentation de l'absorption des HAP après exposition au B[a]P et au mélange de HAP sans modification du métabolisme intestinal, augmentation du métabolisme hépatique uniquement après exposition au B[a]P seul à faible dose (0,02 mg.kg⁻¹.J⁻¹).

La variabilité inter-souche entre les SD et les W a montré que l'absorption et le métabolisme intestinal du fluoranthène et du pyrène étaient identiques entre les 2 souches. Cependant, l'absorption des HAP à HPM était plus faible chez les SD avec un métabolisme intestinal du B[a]P orienté vers la voie de bio-activation. Le métabolisme hépatique était plus élevé chez les SD.

Une grande **variabilité inter-individuelle** était observée entre les rats W exposés au mélange de HAP au niveau de l'absorption intestinale des HAP à HPM et de leur métabolisme hépatique. Il existait des profils différents de formation des métabolites au niveau hépatique alors que le métabolisme intestinal était comparable entre les rats.

Le jeûne augmentait l'absorption du B[a]P mais le métabolisme intestinal et hépatique étaient diminués et/ou modifiés avec une augmentation de la voie de bio-activation.

Ce travail contribue à la réflexion sur le choix du modèle animal et des conditions d'exposition pour la détermination des VTR et l'évaluation des risques des populations dans un contexte de poly-expositions qui est beaucoup plus complexe qu'un simple effet additif.

Mots clés : Hydrocarbures aromatiques polycycliques, B[a]P, toxicocinétique, effet mélange, exposition chronique, variabilité inter-souche, variabilité inter-individuelle, jeûne.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants produced in complex mixtures whose composition varies depending on the source of emission. High molecular weight (HMW) PAHs are classified as probable or possible human carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC) and benzo[a]pyrene (B[a]P) is the only PAH classified as a definite carcinogen. To exert their carcinogenic effect, PAHs must be metabolized. Biomonitoring of PAH exposure, which is very important for estimating health risks in populations, is done by analyzing urinary PAH metabolites. However, due to a lack of epidemiological data, there are no toxicological reference values (TRV) for these pollutants. Hence the importance of animal models to establish these TRVs. Thus the question arises: How to choose the right animal protocol to study the **toxicokinetics of PAH in mixtures**? Can genetic and environmental factors impact the results of these studies?

To answer these questions and to be able to extrapolate our results to humans, two animal protocols were carried out with realistic exposures (low doses, real mixture, short or repeated exposure). The first protocol consisted in exposing Sprague Dawley (SD) rats by gavage to low doses (0.02 and 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹) of B[a]P alone or included in an industrial mixture of PAHs (adjusted to 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹ of B[a]P) 5 times.week⁻¹ during 10 weeks. The second protocol consisted in exposing Wistar (W) rats by gavage to B[a]P alone (0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹) or included in an industrial mixture of PAHs (adjusted to 0.2 mg.kg⁻¹.d⁻¹ B[a]P) for 4 days. In addition to the determination of urinary metabolites of B[a]P and HMW PAHs, we developed the analysis of PAHs and/or their metabolites in blood, feces and organs (liver and kidneys) by HPLC-Fluo and GC-MSMS-NCI after different types of extraction depending on the matrices and compounds.

No difference in the toxicokinetics of B[a]P was found with **the two doses used**.

The mixture or cocktail effect was: increased absorption of B[a]P, altered intestinal metabolism with increased bioactivation pathway, decreased hepatic metabolism due to enzyme saturation/competition.

The effect of repeated exposure for 10 weeks was: increased PAH absorption after exposure to B[a]P and PAH mixture without change in intestinal metabolism, increased hepatic metabolism only after exposure to B[a]P alone at low dose (0.02 mg.kg⁻¹.d⁻¹).

The inter-strain variability between SD and W showed that the absorption and intestinal metabolism of fluoranthene and pyrene were identical between the 2 strains. However, absorption of HMW PAHs was lower in SD with intestinal metabolism of B[a]P directed toward the bioactivation pathway. Hepatic metabolism was higher in SD.

A large **inter-individual variability** was observed between W rats exposed to the PAH mixture in the intestinal absorption of HMW PAHs and their hepatic metabolism. There were different patterns of metabolite formation at the liver, whereas intestinal metabolism was comparable between rats.

Fasting increased the absorption of B[a]P but intestinal and hepatic metabolism were decreased and/or modified with an increase in the bioactivation pathway.

This work contributes to the reflection on the choice of the animal model and the exposure conditions for the determination of TRVs and the risk assessment of populations in a context of poly-exposures which is much more complex than a simple additive effect.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons, B[a]P, toxicokinetics, mixture effect, chronic exposure, inter-strain variability, inter-individual variability, fasting.