

Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-579



Acquisition de modèles pour l'étude de l'absorption percutanée des substances chimiques

Cellules de diffusion à flux continu

Claude Viau
Suzanne Leroux
Ross Thuot
Sophie Lim



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES

Mission *travaillent pour vous !*

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour.
De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement.
www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST.
Abonnement : 1-877-221-7046

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales
2008

ISBN : 978-2-89631-300-6 (version imprimée)

ISBN : 978-2-89631-301-3 (PDF)

ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
octobre 2008



Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches



RAPPORT R-579

Acquisition de modèles pour l'étude de l'absorption percutanée des substances chimiques Cellules de diffusion à flux continu

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Claude Viau, Suzanne Leroux,
Ross Thuot et Sophie Lim*

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



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSS

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

Sommaire

Dans les milieux de travail où des substances chimiques sont utilisées, celles-ci peuvent se retrouver dans l'air. Les employés peuvent donc y être exposés par le fait de la respiration. C'est d'ailleurs pour ça que le règlement sur la santé et la sécurité du travail donne des valeurs limites d'exposition dans l'air pour près de 700 substances chimiques. Mais il est aussi possible d'être exposé par le contact des substances avec la peau. Quand on veut savoir à quel point un travailleur peut absorber des substances dans son organisme de cette manière, on doit savoir trois choses principales :

- la grandeur de la surface de peau exposée à ces substances;
- la durée de contact de la substance avec la peau;
- la vitesse à laquelle la substance passe à travers la peau pour aller dans la circulation sanguine.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à ce troisième aspect. Il existe diverses méthodes pour mesurer la vitesse de passage des substances chimiques à travers la peau. L'une d'elles est basée sur l'utilisation de peau obtenue d'un animal ou d'un humain (dans le cadre d'une chirurgie esthétique par exemple). On place un fragment de peau dans une cellule. On fait baigner le côté habituellement intérieur à l'organisme dans une solution qui circule constamment à l'aide d'une pompe. On applique ensuite la substance à tester sur la face de la peau qui est habituellement en contact avec l'air. Il reste ensuite à recueillir le liquide qui circule pour connaître la vitesse de passage de la substance à travers le fragment de peau.

Nous avons implanté cette technique dans notre laboratoire. Pour ça, nous avons utilisé un appareil commercial prévu à cette fin et nous avons réalisé des tests avec de la peau prélevée chez des animaux. La peau de rats a été obtenue par contact avec la Division des animaleries de l'Université de Montréal. Nous avons utilisé des animaux qui avaient servi de groupe témoin dans des études sur le campus et qui devaient de toute façon être euthanasiés. Puisque certains rapports dans la littérature scientifique suggèrent que la peau de porc a des caractéristiques proches de celles de la peau humaine, nous avons également utilisé de la peau prélevée sur les oreilles de porc après leur abattage dans un abattoir industriel.

Nos résultats montrent :

- que nous sommes arrivés à maîtriser cette technique;
- qu'il y a en général beaucoup de variabilité dans les mesures, phénomène aussi observé ailleurs dans la littérature scientifique;
- qu'il y a peu de différences entre les peaux de rats et les peaux de porc;
- que la mesure des vitesses de passage à travers la peau est relativement facile pour les substances qui sont solubles dans l'eau;
- que la mesure des vitesses de passage à travers la peau des substances qui ne sont pas solubles dans l'eau pose des difficultés techniques;
- qu'on peut arriver à comparer les vitesses de passage à travers la peau de substances qui ne sont pas solubles dans l'eau en utilisant comme liquide qui circule dans les cellules une solution constituée à 50 % de méthanol.

Table des matières

Sommaire	i
Table des matières.....	ii
Introduction.....	1
Matériel et méthodes.....	3
Cellules à diffusion à flux continu	3
Principe	3
Assemblage du système	4
Échantillons de peau	5
Hydratation de la peau	5
Produits tests	6
Milieux récepteurs	6
Description des expériences.....	7
Résultats.....	10
Étanchéité du système.....	10
Mesure des flux transcutanés	10
Expérience 1 : Familiarisation avec le système – acide benzoïque	10
Expérience 2. Passage percutané de l'acide benzoïque sur 26 heures.....	11
Expérience 3. Comparaison de deux modes de dissection des peaux – acide benzoïque.....	12
Expérience 4. Premiers tests sur peau de porc – acide benzoïque	13
Expérience 5. Reproductibilité des mesures sur peaux congelées de porc– acide benzoïque	13
Expérience 6. Reproductibilité (bis) des mesures sur peaux congelées de porc – acide benzoïque	14
Expérience 7. Premier essai avec une substance lipophile – peau fraîche de rat, pyrène.....	14
Expérience 8. Répétition de l'essai avec une substance lipophile – peau fraîche de rat et peau congelée de porc, pyrène.....	15
Expérience 9. Essai d'un milieu éthanol à 50 % comme milieu récepteur d'une substance lipophile – peau congelée de rat, pyrène.....	16
Expérience 10. Ajout d'un surfactant pour améliorer la solubilité d'une substance lipophile dans le milieu récepteur – peau fraîche de rat, pyrène.....	16
Expérience 11. Changement de surfactant pour améliorer la solubilité d'une substance lipophile dans le milieu récepteur – peau congelée de rat, pyrène	17
Expérience 12. Effet de la dose appliquée sur les mesures de flux – peau fraîche de rat, pyrène.....	18
Expérience 13. Effet de l'hydratation de la peau avant application – peau fraîche de rat, pyrène.....	18
Expérience 14. Mesure du flux à l'aide du pyrène marqué au ^{14}C – peau fraîche de rat.....	19
Expérience 15. Mesure du flux à l'aide du pyrène marqué au ^{14}C – peau fraîche de porc...	19
Expérience 16. Mesure du flux à l'aide du pyrène marqué au ^{14}C – peau congelée de porc	20
Comparaison des flux transcutanés du pyrène selon les types de peau	21
Exploration de solutions de méthanol comme liquide récepteur	22
Expérience 17. Mesure des flux individuels de trois HAP en milieu récepteur méthanol à 50 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène.....	22

Expérience 18. Mesure des flux individuels de trois HAP en milieu récepteur méthanol à 30 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène.....	22
Expérience 19. Mesure des flux individuels de trois HAP en milieu récepteur méthanol à 70 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène.....	23
Expérience 20. Mesure des flux de trois HAP en mélange en milieu récepteur méthanol à 50 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène.....	24
Analyse comparative des profils de flux transcutanés de trois HAP en milieu récepteur contenant du méthanol	25
Discussion	27
Type de peau et mode de préparation	27
Composés hydrophiles	27
Composés lipophiles	27
Influence du milieu récepteur	28
Utilisation d'un milieu récepteur contenant du méthanol.....	29
Références.....	30

Figure 1. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau fraîche de rat; application de 100 µg (cellules 1 et 2), 500 µg (cellules 3 et 4) et 1000 µg (cellule 6). Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.	10
Figure 2. Relation entre la quantité d'acide benzoïque appliquée et la quantité récupérée sur la période de collecte de 18 heures	11
Figure 3. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau congelée de rat; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	12
Figure 4. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau fraîche ou congelée de rat; application de 500 µg. Peau fraîche de rat préparée sans tissu adipeux sous-cutané (cellules 1 et 2), peau fraîche de rat préparée normalement (cellules 3 et 4) et peau congelée de rat préparée normalement (cellules 5 et 6). Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	12
Figure 5. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau de porc; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite	13
Figure 6. Répétition des mesures de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau de porc; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	13
Figure 7. Nouvelle répétition des mesures de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau de porc; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	14
Figure 8. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite	15
Figure 9. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat (cellules 1, 2 et 3) et la peau congelée de porc (cellules 4 et 6); application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite	16

Figure 10. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau de rat en utilisant l'éthanol à 50 % comme milieu récepteur; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite	16
Figure 11. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite	17
Figure 12. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau congelée de rat; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite	17
Figure 13. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat; application de 43 (cellules 1 et 2), 214 (cellules 3 et 4) et 1070 (cellules 5 et 6) nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite. Sur le graphique de droite, l'ordonnée de gauche s'applique aux cellules 1 et 2 et l'ordonnée de droite aux cellules 3 à 6. .	18
Figure 14. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	19
Figure 15. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat bien hydratée; application de 214 nmol de pyrène froid et de 16 nmol de pyrène- ¹⁴ C. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	19
Figure 16. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de porc bien hydratée; application de 214 nmol de pyrène froid et de 16 nmol de pyrène- ¹⁴ C. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	20
Figure 17. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau congelée de porc bien hydratée; application de 214 nmol de pyrène froid et de 16 nmol de pyrène- ¹⁴ C. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	20
Figure 18. Comparaison des flux transcutanés de pyrène, exprimés en pourcentage de la dose de 214 nmol appliquée récupérée en 72 heures dans le liquide récepteur, selon les types de peau. Po Co = peau congelée de porc; Po Fr Hyd = peau fraîche de porc hydratée; Rat Co = peau congelée de rat; Rat Fr = peau fraîche de rat; Rat Fr Hyd = peau fraîche de rat hydratée. Les barres d'histogramme comportant des astérisques représentent des expériences menées avec du pyrène ¹⁴ C. Les milieux récepteurs contiennent du HHBSS, de l'albumine, de la gentamycine et du Brij 98 sauf celles qui sont désignées « Sans Brij 98 » où le Brij 98 a été omis.	21
Figure 19. Mesure de la pénétration de trois HAP à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Liquide récepteur à 50 % de méthanol. Cellules 1 et 2 → benzo(a)pyrène (lire sur l'échelle de droite sur les deux graphiques); cellules 3 et 4 → pyrène; cellules 5 et 6 → phénanthrène. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite	22
Figure 20. Mesure de la pénétration de trois HAP à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Liquide récepteur à 30 % de méthanol. Cellules 3 et 4 → pyrène; cellules 5 et 6 → phénanthrène. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite. Il n'y a pas de données pour le benzo(a)pyrène, non détectable dans ces conditions. Les données pour la cellule 5 doivent être lues sur l'ordonnée de droite dans le graphique de la récupération cumulative.	23
Figure 21. Mesure de la pénétration de trois HAP à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Liquide récepteur à 70 % de méthanol. Cellules 1 et 2 →	

benzo(a)pyrène; cellules 3 et 4 → pyrène; cellules 5 et 6 → phénanthrène. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.....	23
Figure 22. Mesure de la pénétration de trois HAP en mélange à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 71 nmol chacun de phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène. Liquide récepteur à 50 % de méthanol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite. Les graphiques du haut correspondent au phénanthrène, les intermédiaires au pyrène et ceux du bas au benzo(a)pyrène.....	24
Figure 23. Pourcentage de la quantité appliquée de phénanthrène (Phe), pyrène (Pyr) et benzo(a)pyrène (BaP) récupéré dans le liquide récepteur en fonction de la proportion de méthanol dans ce liquide suite à l'application de 214 nmol de HAP par cellule. Chaque courbe représente la moyenne de deux essais. La figure de gauche présente les résultats obtenus pour la période de 0 à 24 heures et celle de droite pour la période de 0 à 48 heures.....	25
Figure 24. Pourcentage de la quantité appliquée de phénanthrène (Phe), pyrène (Pyr) et benzo(a)pyrène (BaP) récupéré dans le liquide récepteur en fonction de la taille des HAP suite à l'application de 214 nmol de HAP par cellule. Chaque courbe représente la moyenne de deux essais. La figure de gauche présente les résultats obtenus ppour la période de 0 à 24 heures (la légende 30, 50, 70 désigne les pourcentages de méthanol dans le liquide récepteur) et celle de droite pour la période de 0 à 48 heures.	25
Figure 25. Profils comparatifs des flux transcutanés de trois HAP à travers de membranes de peau de rat congelée. Le liquide récepteur est constitué de méthanol à 50% dans l'eau. Pour fins de comparaison, les flux ont été normalisés par rapport au flux maximal (=100%). Seule la moyenne est présentée pour éviter l'encombrement du graphique avec les écarts types.	26

Introduction

La réglementation des expositions professionnelles passe notamment par l'établissement de normes d'exposition exprimées sous forme de concentrations maximales admissibles (valeurs d'exposition admissibles – VEA) prenant diverses dénominations. Tous les professionnels de la santé reconnaissent que cette approche ne tient compte que de l'absorption des substances chimiques par inhalation, négligeant ainsi les autres voies d'exposition comme l'exposition cutanée. Malgré le caractère impressionnant des propriétés barrières de la peau, plusieurs substances peuvent la pénétrer. Une des meilleures indications concernant la pénétration cutanée des xénobiotiques est le recours de plus en plus grand à cette voie pour l'absorption de substances pharmacologiques comme la nicotine ou certaines hormones (Patrick et Maibach 1994).

Par ailleurs, au fur et à mesure de l'évolution des connaissances scientifiques touchant la toxicité des substances chimiques, on révisé, généralement à la baisse, les VEA. Semblablement, l'amélioration du contrôle de l'exposition par voie pulmonaire (ventilation, port de masques efficaces) peut donner une signification nouvelle à la possible contribution de la voie cutanée (Viau et Truchon 2004). Dans certains cas, cela peut signifier que la contribution relative de la peau comme voie d'absorption peut devenir préoccupante (Benford *et al.* 1999; Lauwerys *et al.* 1980). On peut ajouter à ce contexte le fait que pour certaines substances faiblement volatiles l'exposition par voie pulmonaire puisse être modeste par rapport à l'exposition par voie cutanée.

Il est reconnu que pour des substances lipophiles, la peau, principalement la couche cornée, peut agir comme réservoir permettant le stockage de ces dernières pour des périodes allant de quelques heures à plusieurs jours (Poet 2000; Surber *et al.* 1999). Cette observation s'étend également à des substances autres que lipophiles (Bronaugh et Hood 1999). C'est notamment pour cette raison que certains auteurs suggèrent de définir l'absorption cutanée mesurée dans des expériences *in vitro* comme la somme de la quantité passée dans le liquide récepteur plus ce qui reste dans la peau après un lavage de surface à l'aide d'un savon ou d'un solvant (Bronaugh et Hood 1999). Les données de notre propre laboratoire vont aussi en ce sens. Dans un protocole réalisé chez des volontaires, une application de pyrène sur la peau pendant une période d'une heure suivie d'un lavage à l'eau tiède savonneuse a montré que l'excrétion urinaire de 1-hydroxypyrène, un métabolite du pyrène continuait à augmenter pendant plusieurs heures après le lavage du site d'application (Viau et Vyskocil 1995).

Il y a beaucoup de facteurs en jeu dans l'absorption cutanée et la mesure de la contribution de cette voie d'exposition en milieu de travail représente un défi énorme (OSHA 2002). La peau par exemple n'a pas la même épaisseur et n'a donc pas la même perméabilité ni sans doute la même capacité réservoir à différents sites anatomiques (Wester et Maibach 1999b). Par ailleurs, la composition d'un mélange (Rawlings *et al.* 1994; Riviere *et al.* 2001) et le véhicule dans lequel la substance est dissoute (Rawlings *et al.* 1994) peuvent influencer l'absorption de même que diverses approches de lavage de la peau peuvent présenter des différences importantes d'efficacité dans l'enlèvement de la substance (Wester et Maibach 1999a). Pour toutes ces raisons, il va de soi que lorsqu'une mesure validée d'exposition par surveillance biologique est applicable, celle-ci permet de s'affranchir de toute hypothèse plus ou moins valide sur les conditions d'absorption par la voie cutanée. Mais, d'une part, le nombre de substances pour lesquelles des biomarqueurs d'exposition ont été validés reste encore modeste et, d'autre part, il

reste pertinent d'étudier l'importance de la voie cutanée en tant que telle afin de guider les actions préventives.

Suite à la formation d'un réseau européen de chercheurs sur l'absorption percutanée, des membres du groupe ont notamment identifié certains besoins en recherche. Ces auteurs ont insisté sur la pénétration cutanée des substances chimiques et sur l'absorption systémique qui en résulte, établies par des méthodologies validées et des protocoles pertinents par rapport aux situations rencontrées en milieu de travail. Ils ont encore ajouté qu'initialement, ces données seraient sans doute obtenues par des approches *in vitro* (Benford *et al.* 1999).

Il apparaît donc que :

1. La peau est une voie d'exposition aux substances chimiques que le contexte nous impose de considérer avec encore plus d'acuité aujourd'hui.
2. L'expertise québécoise dans ce domaine est actuellement quasi inexistante malgré une reconnaissance de l'importance de ce domaine au niveau international.

Il y a un besoin de développement méthodologique et d'établissement de bases de données fiables dans le domaine de l'absorption percutanée des substances chimiques incluant l'étude de l'influence du véhicule, des mélanges et des méthodes de lavage

Objectifs de l'activité

Objectif général : Développer une expertise québécoise dans le domaine de l'absorption percutanée des substances chimiques du milieu de travail.

Objectifs spécifiques :

1. Implanter dans notre laboratoire la méthode d'évaluation du passage transcutané utilisant le modèle de mesure de flux transmembranaires utilisant des cellules à flux continu
2. Tester la fiabilité et notre maîtrise du modèle en l'utilisant pour mesurer l'absorption percutanée de substances peu volatiles rencontrées en industries (pyrène et benzo(a)pyrène) et deux substances utilisées comme référence par les spécialistes du domaine soit la caféine et l'acide benzoïque (Dick *et al.* 1997; Lotte *et al.* 1997).

Matériel et méthodes

Cellules à diffusion à flux continu

Principe

Le principe de mesure du flux *in vitro* à l'aide de cellules à diffusion à flux continu est présenté dans le schéma 1. Après dissection, la membrane est placée dans la cellule à diffusion selon les indications du schéma. La face qui baigne dans le liquide récepteur correspond à la face interne de la peau alors que la face qui est en contact avec l'air est celle qui est en contact avec l'air chez l'animal vivant. Le dépôt de substance testée se fait sur la face externe comme cela se produirait normalement dans une situation d'exposition *in vivo*. Le flux continu de liquide assure son renouvellement constant, ce qui permet de maintenir un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane qui se rapproche des conditions physiologiques – la circulation sanguine sous-cutanée joue normalement ce même rôle. La partie du flux continu qui émerge de la cellule est recueillie dans des éprouvettes disposées sur un collecteur de fractions. On choisit ensuite un intervalle de collecte (Δt – par exemple, toutes les 4 heures). Le liquide ainsi recueilli est par la suite analysé pour déterminer sa concentration (C) en produit test. Toutes les éprouvettes sont préalablement pesées. Elles sont de nouveau pesées après collecte pour déterminer par gravimétrie le volume recueilli (V). Le flux de substance test à travers la peau (F) est ensuite calculé selon l'équation 1.

$$F = \frac{C \times V}{\Delta t} \quad \text{Équation 1}$$

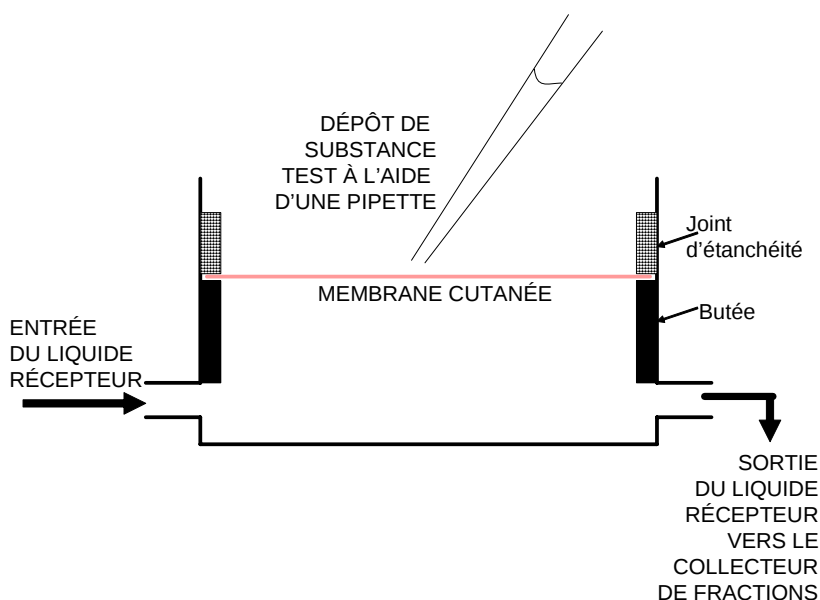


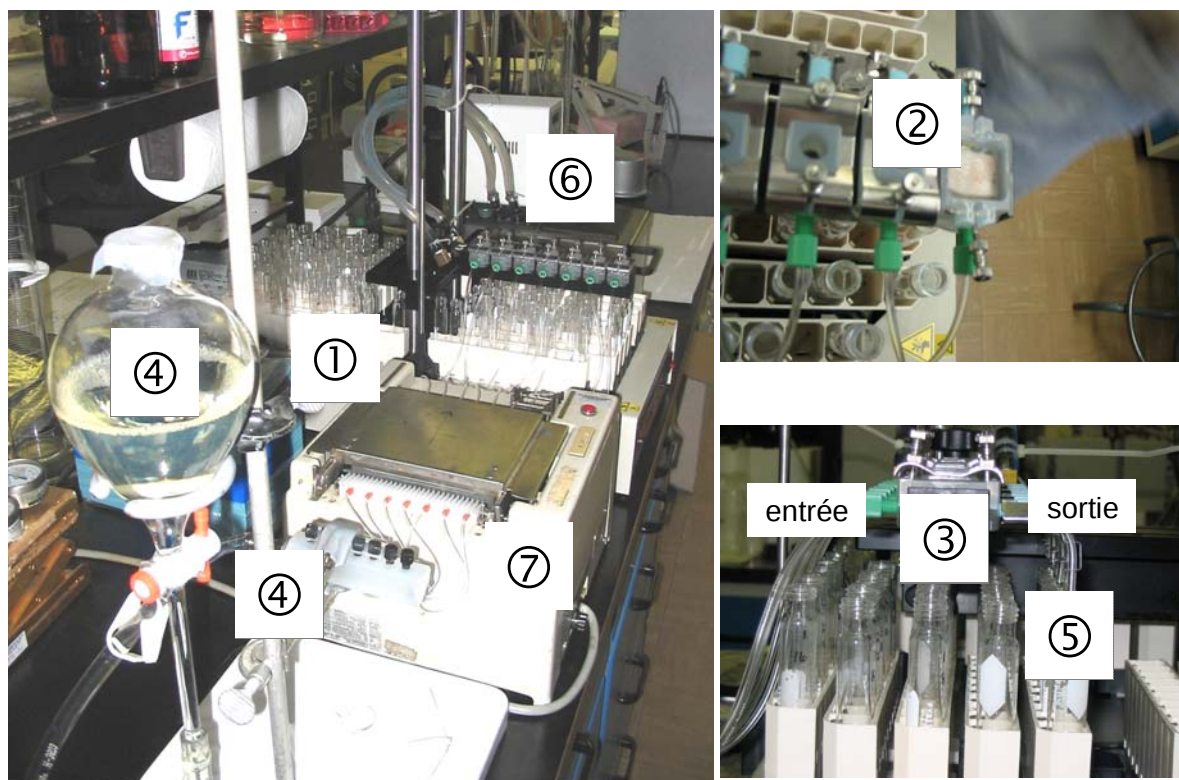
Schéma 1. Illustration du principe de mesure des flux transcutanés à l'aide de la cellule de diffusion à flux continu – la cellule schématisée ici correspond à l'élément #2 des photographies de la section suivante.

Assemblage du système

Les éléments du système de cellules à diffusion à flux continu sont :

1. Appareillage de mesure des flux de diffusion en cellules à flux continu (compagnie PermeaGear. Pennsylvanie)
2. Cellules à diffusion à flux continu de 9 mm; correspond à une surface de peau effective exposée aux divers produits tests de $0,636 \text{ cm}^2$
3. Chauffe-cellules et support
4. Réservoir et manifold
5. Collecteur de fractions et système de contrôle
6. Bain thermostatique à circulation d'eau
7. Pompe péristaltique; le fluide récepteur est pompé à travers la cellule à diffusion à un débit d'environ 1,5 ml/h

Les numéros apparaissant dans cette liste sont repris sur les photographies suivantes illustrant le système. À droite du repère numéro 2, on voit un échantillon de peau qui a été découpé et mis en place dans la cellule avant de terminer l'assemblage.



Photographie 1. Assemblage du système de diffusion à flux continu dans notre laboratoire. Les divers éléments repérés par des numéros sont décrits dans le texte.

Échantillons de peau

Il s'est avéré difficile de trouver un abattoir de porcs qui n'ébouillante pas complètement la carcasse après la mise à mort de l'animal. Or, pour obtenir un échantillon de peau utilisable dans le système *in vitro*, il est essentiel que le tissu cutané soit intact. Nous avons pu obtenir de tels échantillons d'un abattoir situé à une centaine de kilomètres de Montréal. Une technicienne du labo se rendait sur place le matin et revenait au laboratoire en fin de matinée avec les oreilles de porc d'un animal abattu quelques heures auparavant. Les oreilles étaient conservées dans une glacière pendant le transport vers le laboratoire. Après dissection de la peau pour la détacher du tissu sous-jacent, une partie était utilisée immédiatement dans le système de diffusion alors que le reste était congelé pour utilisation subséquente. Étant donné la lourdeur logistique de cette procédure, nous avons fait plusieurs essais sur la peau de rats. Nous obtenions accès aux animaux témoins (n'ayant subi aucun traitement pharmacologique) d'expériences menées à l'Université de Montréal, maximisant ainsi l'utilisation d'animaux d'expérience sans devoir en acheter nous-mêmes. La peau utilisée provenait soit de la zone dorsale ou de la zone ventrale des rongeurs. Cette zone était préalablement rasée 24 heures avant l'euthanasie et le prélèvement. Comme pour la peau d'oreille de porc, une partie était utilisée immédiatement après dissection et une autre était congelée pour utilisation future.

Il y a donc eu quatre types de peaux utilisées dans les expériences :

- Peau d'oreille de porc fraîche
- Peau d'oreille de porc congelée
- Peau de rat fraîche
- Peau de rats congelée

Lors de la préparation des échantillons de peau, on en mesurait l'épaisseur avant de les mettre en place dans la cellule. Pour ce faire, nous avons utilisé une jauge d'épaisseur de la compagnie Mitutoyo.

Hydratation de la peau

À un moment des essais, nous avons cru que l'état d'hydratation de la peau pouvait peut-être être déterminant sur la perméabilité membranaire. Aussi avons-nous mis à l'essai le protocole d'hydratation de la peau suivant. Les peaux entières fraîches ou congelées étaient hydratées enveloppées dans du papier buvard imbibé d'une solution saline isotonique 3 heures avant d'être découpées et mises en cellule. Après avoir inséré les peaux dans les cellules, on laissait circuler le fluide récepteur une heure afin de permettre un état d'équilibre de la surface cutanée interne et l'assèchement de la surface externe, la couche cornée.

Produits tests

Nous avons utilisé des produits divers qui nous ont servi à des démonstrations spécifiques comme indiqué au tableau suivant.

Tableau 1. Liste des produits tests utilisés dans les essais

Produit	Utilité
Bleu de Coomassie	Le bleu de Coomassie est une substance de masse moléculaire très élevée et elle ne peut traverser les membranes biologiques. Nous l'avons utilisé pour nous assurer de l'étanchéité de notre système lorsque nous mettons en place les membranes cutanées dans les cellules à diffusion; il est important que la substance mesurée dans le fluide récepteur provienne de la diffusion transcutanée et non pas de simples fuites au pourtour de la membrane.
Acide benzoïque	L'acide benzoïque est un produit test standard utilisé comme produit de référence dans les laboratoires qui étudient la pénétration percutanée (Hotchkiss <i>et al.</i> 1992; Reifenrath <i>et al.</i> 1994). La masse moléculaire de l'acide benzoïque est de 122. Nous nous sommes limités à cette substance hydrosoluble et avons donc écarté la caféine des essais.
Pyrène (froid et marqué au ^{14}C)	Le pyrène est une substance lipophile type; on sait qu'elle peut pénétrer à travers la peau <i>in vivo</i> autant chez l'animal de laboratoire que chez l'humain. La version marquée au ^{14}C nous a permis de vérifier le bilan de masse après une expérience à savoir : ce qui reste sur les parois de la cellule et les autres parties de celle-ci, ce qui reste dans la membrane elle-même, ce qui est recueilli dans le liquide récepteur. La version « froide » (non radioactive) a servi à la mesure des flux en situation normale et à la comparaison des flux avec d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). La masse moléculaire du pyrène, un HAP à quatre cycles benzéniques, est de 202.
Phénanthrène	Un HAP à trois cycles benzéniques de faible masse moléculaire. La masse moléculaire du phénanthrène est de 178.
Benzo(a)pyrène	Un HAP à cinq cycles benzéniques de masse moléculaire élevée. Cette molécule est la représentante la plus typique des HAP cancérigènes. La masse moléculaire du benzo(a)pyrène est de 252.

Milieux récepteurs

In vivo, pour qu'une substance puisse traverser une membrane comme la peau, il faut d'abord que ses caractéristiques physicochimiques lui permettent de passer à travers la couche cornée et les autres structures épidermiques jusqu'à ce qu'elle soit prise en charge par la circulation sanguine. Cela suppose donc également une certaine solubilité dans le sang. Ce dernier est composé à la fois d'eau, de protéines et de lipides. *In vitro*, il faut donc que la substance testée puisse se solubiliser dans le milieu récepteur.

Pour les substances présentant une bonne hydrosolubilité comme l'acide benzoïque, un milieu récepteur constitué d'une simple solution tampon aqueuse à laquelle on ajoute un bactériostatique peut suffire. La situation est plus complexe avec les substances liposolubles puisqu'il est difficile de reproduire *in vitro* la capacité de dissolution du sang vis-à-vis de telles substances. Typiquement, on ajoute de l'albumine bovine à une concentration d'environ 40 g/l. Certains auteurs suggèrent également l'ajout d'agents tensioactifs comme le Brij 98 (Challapalli et Stinchcomb 2002). Les différents milieux récepteurs utilisés dans le cadre de ce projet sont présentés dans un tableau de la section Résultats.

Description des expériences

Ce projet est essentiellement de nature méthodologique et vise l'implantation de la technologie de mesure des flux transcutanés *in vitro* à l'aide du système de cellules à flux continu. Aussi, il ne s'agit pas d'un projet basé sur une hypothèse de recherche. Le tableau suivant présente la liste des expériences principales effectuées et l'objectif spécifique visé par chaque expérience.

Tableau 2. Liste des expériences réalisées dans le cadre de l'activité

#	Peau/ Épaisseur ¹	Produit/ Quantité ²	Fluide Récepteur ³	Collectes Nombre X intervalle (h)	Objectif spécifique
1	Rat Fr/ 0,96 mm ± 0,10	ABz / 100; 500; 1000	PBS	18 X 1	Familiarisation avec le système et vérification de l'existence d'une relation entre le flux transcutané observé et la quantité de produit appliquée; choix de la meilleure dose à appliquer dans les essais subséquents
2	Rat Co/ 0,92 mm ± 0,17	ABz / 500	PBS	13 X 2	Allongement de l'intervalle de chaque collecte et prolongement de la durée totale de collecte
3	Rat Fr & Co/ 0,74 mm ± 0,17	ABz / 500	PBS / NaN ₃	13 X 2	Comparaison de deux modes de dissection de peau fraîche : la première peau fraîche a été disséquée jusqu'à retirer le plus complètement possible le gras sous-cutané, la seconde peau fraîche a été préparée sans cette précaution particulière comme la peau congelée. Ajout d'azoture de sodium pour contrer la prolifération bactérienne puisque de mauvaises odeurs provenant des échantillons de peau dans les cellules avaient été perçues au terme de l'expérience précédente.
4	Porc Co/ 1,66 mm ± 0,30	ABz / 500	PBS / NaN ₃	14 X 3	Premiers tests sur la peau de porc; comparaison entre les échantillons de peau prélevés sur les faces interne et externe de l'oreille
5	Porc Co/ 1,38 mm ± 0,20	ABz / 500	PBS / NaN ₃	13 X 3	Test de reproductibilité des mesures toutes effectuées sur la partie arrière de l'oreille
6	Porc Co/ 1,30 mm ± 0,16	ABz / 500	PBS / NaN ₃	16 X 3	Idem
7	Rat Fr/ 0,79 mm ± 0,04	Pyr / 214	HHBSS / Alb / Gen	12 X 6	Premier essai avec une substance lipophile; le liquide récepteur est un milieu standard pour la préservation de la viabilité cellulaire; vérification du bilan de masse approximatif au terme de l'expérience
8	Rat Fr / Porc Co/ R : 0,73 mm ± 0,08 P : 1,11 mm ± 0,07	Pyr / 214	HHBSS / Alb / Gen	12 X 6	Compte tenu des flux transcutanés apparemment faibles observés dans l'expérience 7, on répète et on ajoute une comparaison avec la peau de porc
9	Rat Co/ 0,85 mm ± 0,06	Pyr / 214	EtOH:H ₂ O 50:50	16 X 6	Compte tenu de la confirmation des faibles flux, on a inclus un essai avec un solvant dans lequel le pyrène est davantage soluble
10	Rat Fr/ 0,78 mm ± 0,20	Pyr / 214	HHBSS / Alb / Gen / Brj 96	7 X 6	Certains auteurs suggérant l'ajout d'un surfactant pour favoriser la solubilité des composés lipophiles dans le liquide récepteur, nous ajoutons le Brij 96
11	Rat Co/ 0,78 mm ± 0,18	Pyr / 214	HHBSS / Alb / Gen / Brj 98	11 X 6	Même type d'essai, mais on a ici changé le surfactant du Brij 96 au Brij 98
12	Rat Fr 0,90 mm ± 0,05	Pyr / 43; 214; 1070	HHBSS / Alb / Gen / Brj 98	12 X 6	Même type d'essai avec le Brij 98, mais en testant diverses quantités de pyrène déposées sur la peau

#	Peau/ Épaisseur ¹	Produit/ Quantité ²	Fluide Récepteur ³	Collectes Nombre X intervalle (h)	Objectif spécifique
13	Rat Fr/ 0,90 mm ± 0,06	Pyr / 214	HHBSS / Alb / Gen / Brj 98	12 X 6	Toujours le même type d'essai, mais avec une étape minutieuse d'hydratation de la peau avant son placement dans la cellule (Hikima et Maibach 2006)
14	Rat Fr/ 0,96 mm ± 0,04	Pyr / 214 ¹⁴ C-Pyr / 16	HHBSS / Alb / Gen / Brj 98	12 X 4	Puisque l'analyse du liquide récepteur par chromatographie ne mesure que le pyrène inchangé et que l'analyse peut toujours être sujette à des interférences, nous vérifions si l'éventuel total « pyrène plus métabolites » mesuré par la radioactivité totale donnera des résultats différents des mesures effectuées par chromatographie; maintien de l'étape d'hydratation
15	Porc Fr/ 1,38 mm ± 0,12	Pyr / 214 ¹⁴ C-Pyr / 16	HHBSS / Alb / Gen / Brj 98	12 X 4	Comme précédemment, mais sur la peau de porc fraîche hydratée
16	Porc Co/ 1,37 mm ± 0,06	Pyr / 214 ¹⁴ C-Pyr / 16	HHBSS / Alb / Gen / Brj 98	12 X 4	Comme précédemment, mais sur peau de porc congelée
17	Rat Co/ 0,57 mm ± 0,06	Phe /Pyr / BaP 214 chacun	MeOH:H ₂ O 50:50	8 X 6	Tests sur les flux relatifs de 3 HAP en utilisant une solution de méthanol à 50% comme fluide récepteur; application de chaque HAP en duplicata dans des cellules différentes
18	Rat Co/ 0,56 mm ± 0,04	Phe /Pyr / BaP 214 chacun	MeOH:H ₂ O 30:70	8 X 6	Tests sur les flux relatifs de 3 HAP en utilisant une solution de méthanol à 30% comme fluide récepteur; application de chaque HAP en duplicata dans des cellules différentes
19	Rat Co/ 0,52 mm ± 0,06	Phe /Pyr / BaP 214 chacun	MeOH:H ₂ O 70:30	8 X 6	Tests sur les flux relatifs de 3 HAP en utilisant une solution de méthanol à 70% comme fluide récepteur; application de chaque HAP en duplicata dans des cellules différentes
20	Rat Co/ 0,48 mm ± 0,04	Mélange de Phe /Pyr / BaP 71 chacun	MeOH:H ₂ O 50:50	16 X 6	Tests sur les flux relatifs de 3 HAP en utilisant une solution de méthanol à 50% comme fluide récepteur; application dans 6 cellules des trois HAP en mélange

¹ Rat Fr = peau de rat fraîche; Rat Co = peau de rat congelée; Porc Fr = peau d'oreille de porc fraîche; Porc Co = peau d'oreille de porc congelée; épaisseur en millimètres (moyenne ± 1 écart type de l'expérience)

² ABz = acide benzoïque; Pyr = pyène; ¹⁴C-Pyr = pyrène marqué au carbone-14; Phe = phénanthrène; BaP = benzo(a)pyrène; Quantité totale de produit test appliquée (en µg pour ABz et en nmol pour les HAP, dissous dans 20 µl d'acétone) sur la surface standard de 0,636 cm² exposée à l'air une fois la cellule assemblée

³ PBS = tampon phosphate salin 0,01 M, pH 7,2; NaN₃ = azoture de sodium 1 mg/ml; HHBSS = Hepes-Buffered Hanks' Balanced Salt Solution (solution saline équilibrée de Hanks tamponnée à l'HEPES [acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique]); Alb = albumine bovine sérique 4%; Gen = gentamycine 50 mg/l; EtOH = éthanol; MeOH = méthanol; Brj 96, Brj 98 = Brij 96 ou Brij 98 (surfactant) 5g/l

Résultats

Il faut réitérer ici que ce rapport décrit l'implantation d'une technologie de mesure des flux transcutanés en cellules à diffusion à flux continu. Il ne s'agit pas d'un travail basé sur une hypothèse de recherche. Aussi nous a-t-il semblé important de présenter, étape par étape, le cheminement de cette implantation. Dans une étude classique, on filtre les résultats à présenter en illustrant seulement les plus « typiques », ceux qui permettent de défendre l'hypothèse avancée. Ici, les résultats, ce sont essentiellement les mesures des flux transcutanés et leur reproductibilité dans les diverses conditions testées. Aussi le lecteur pardonnera-t-il la présentation quelque peu répétitive des résultats des diverses expériences qui retracent la démarche suivie dans l'acquisition du modèle.

Étanchéité du système

Le test avec le bleu de Coomassie nous a permis de confirmer que l'installation d'échantillons de peau dans les cellules à diffusion permet l'obtention d'un système étanche. En effet, aucune trace de ce colorant appliqué à la surface de la peau n'a été détectée dans le liquide récepteur. Par ailleurs, ce test a également permis de confirmer, à l'examen visuel, que l'étalement des 20 μ l de solution permet d'obtenir une dispersion uniforme sur la surface externe de la peau.

Mesure des flux transcutanés

Dans les pages qui suivent, nous présentons en rafale les résultats graphiques des diverses expériences décrites dans le tableau 2. Nous y ajoutons de brefs commentaires pour faire ressortir les principales déductions que nous en tirons.

Expérience 1 : Familiarisation avec le système – acide benzoïque

La figure 1 montre la variation du flux transcutané (peau fraîche de rat) avec le temps et la quantité cumulée d'acide benzoïque recueillie au cours de la période, exprimée en pourcentage de la dose appliquée. En moyenne, on observe un flux transcutané très faible pendant les 3-4 premières heures suivi d'une augmentation qui culmine autour de 6 heures et qui pour la plupart des cellules se maintient plus ou moins à ce niveau maximal jusqu'à 18 heures.

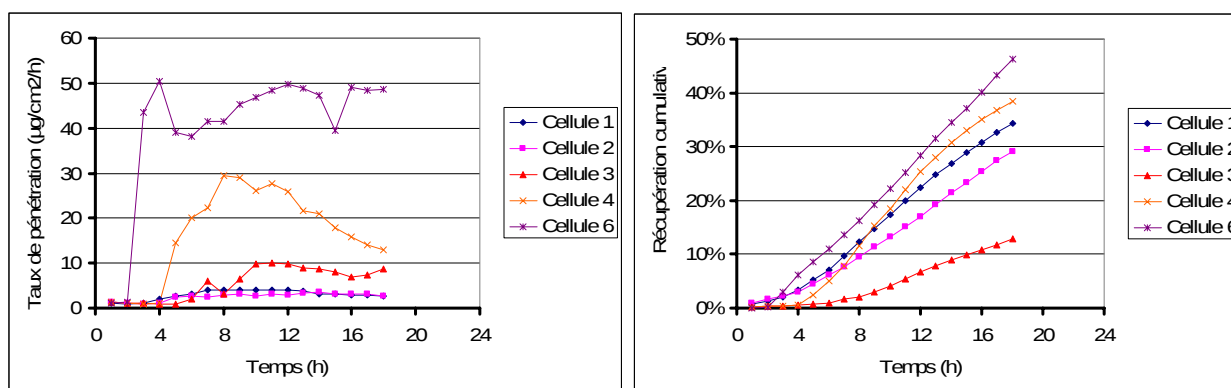


Figure 1. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau fraîche de rat; application de 100 μ g (cellules 1 et 2), 500 μ g (cellules 3 et 4) et 1000 μ g (cellule 6). Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite.

On remarque à la figure 2 qu'il existe une relation linéaire entre la quantité d'acide benzoïque appliqué sur la peau et la quantité récupérée au cours de la période de collecte de 18 heures. Toutefois, la relation ne passe pas par zéro, le duplicata à 500 µg d'acide benzoïque appliqué ne montre pas une très bonne reproductibilité et il manque les données d'une cellule à 1000 µg appliqué (problème technique). Le pourcentage moyen d'acide benzoïque récupéré dans les fractions est de 32 ± 12 % pour l'ensemble des observations ou de 37 ± 7 % si l'on exclut le point qui paraît aberrant sur le graphique à 500 µg d'acide benzoïque appliqué.

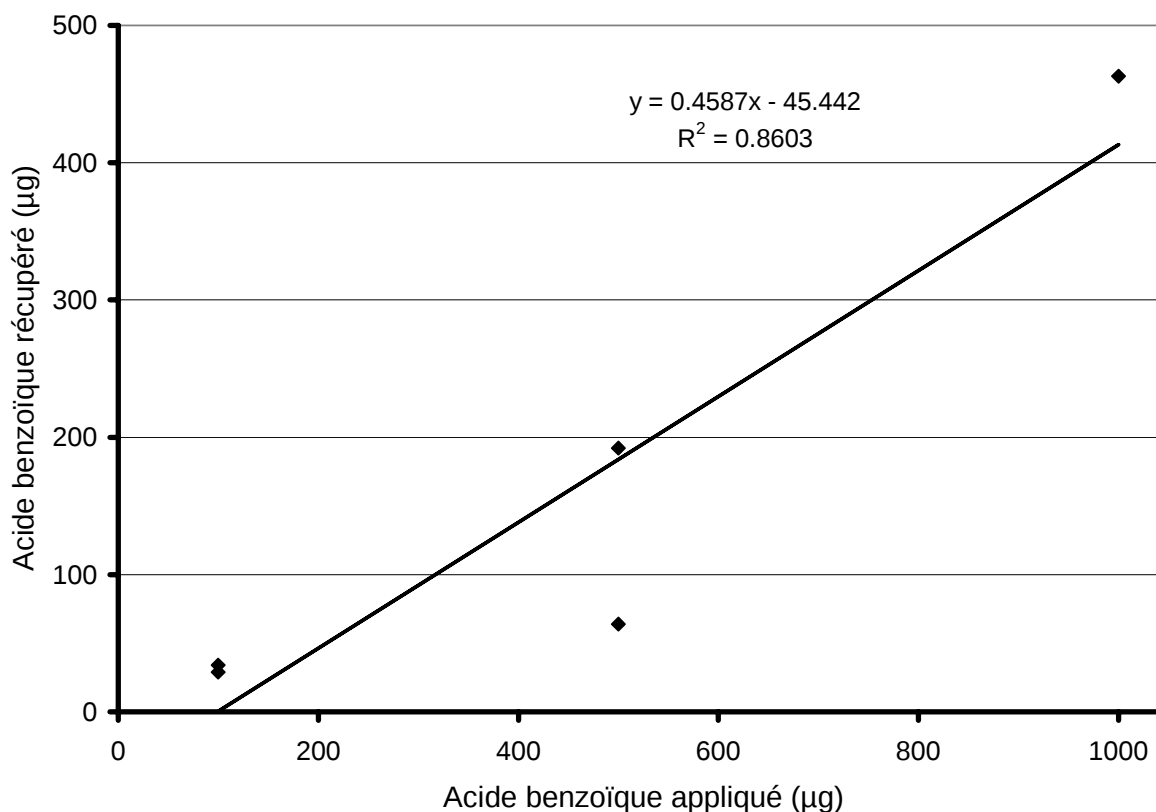


Figure 2. Relation entre la quantité d'acide benzoïque appliquée et la quantité récupérée sur la période de collecte de 18 heures

Expérience 2. Passage percutané de l'acide benzoïque sur 26 heures

La figure 3 montre les flux d'acide benzoïque observés sur une période totale de collecte de 26 heures. L'application cutanée sur de la peau congelée de rat ne s'est fait qu'à une seule dose de 500 µg. On remarque une assez grande dispersion des flux mesurés par période de collecte. Celle-ci va presque du simple au double au point maximal observé à $t = 6$ h. Toutefois, la dispersion sur la quantité cumulée au cours des 26 heures d'observation est beaucoup moindre. Elle correspond à (moyenne $\pm$ écart type) 74 ± 8 % pour l'ensemble des 4 cellules utilisées dans cette expérience.

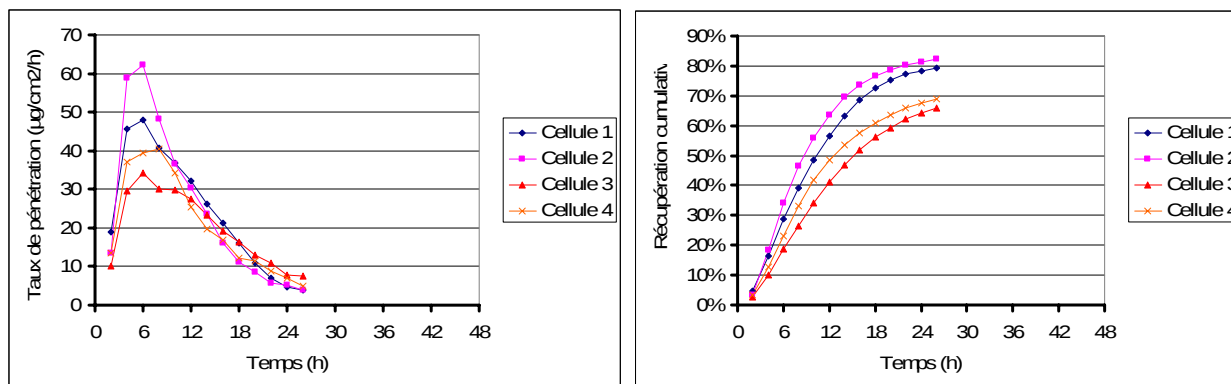


Figure 3. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau congelée de rat; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 3. Comparaison de deux modes de dissection des peaux – acide benzoïque

Deux échantillons de peau fraîche de rat ont été disséqués en retirant soigneusement toute trace de tissu adipeux sous-cutané. Deux autres ont été préparés également avec soin, mais sans cette précaution particulière. Enfin, deux échantillons proviennent d'une peau congelée de rat. Par ailleurs, ayant noté une mauvaise odeur au terme de l'expérience précédente, de l'azoture de sodium a été ajouté au liquide récepteur comme bactériostatique. La figure 4 fait voir une assez grande dispersion des résultats des flux par période de collecte des fractions. La dispersion est également importante pour les quantités recueillies cumulées. Les pourcentages cumulés moyens pour chaque condition expérimentale sont : 62 %, 48 % et 76 % pour les échantillons de peau fraîche sans tissu adipeux, fraîche normalement apprêtée et congelée normalement apprêtée. Ces résultats suggèrent une perméabilité un peu plus grande lorsque « tout » le tissu adipeux sous-cutané est retiré et également plus grande pour les peaux congelées. Toutefois, les mesures n'ayant été effectuées qu'en duplicata, elles ne permettent pas de faire d'analyse statistique et de tirer des conclusions.

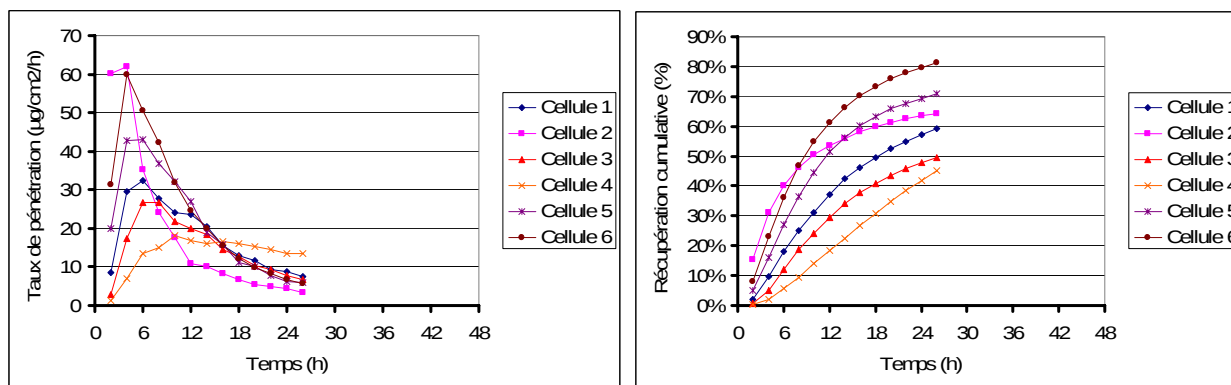


Figure 4. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau fraîche ou congelée de rat; application de 500 µg. Peau fraîche de rat préparée sans tissu adipeux sous-cutané (cellules 1 et 2), peau fraîche de rat préparée normalement (cellules 3 et 4) et peau congelée de rat préparée normalement (cellules 5 et 6). Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 4. Premiers tests sur peau de porc – acide benzoïque

Ces premiers essais sur peaux congelées de porc mettent en évidence des similarités avec les peaux de rat puisque le flux maximal est observé à $t = 6$ h après l'application. De plus, lorsque calculé sur 27 heures afin de comparer aux résultats obtenus sur peaux congelées de rat, les pourcentages cumulés d'acide benzoïque recueillis sont de 73 ± 5 % comparativement aux 76% obtenus dans le duplicata de l'expérience 3. L'écart entre les échantillons individuels est également moindre atteignant 40% pour le point à $t = 6$ heures comme le montre la figure 5.

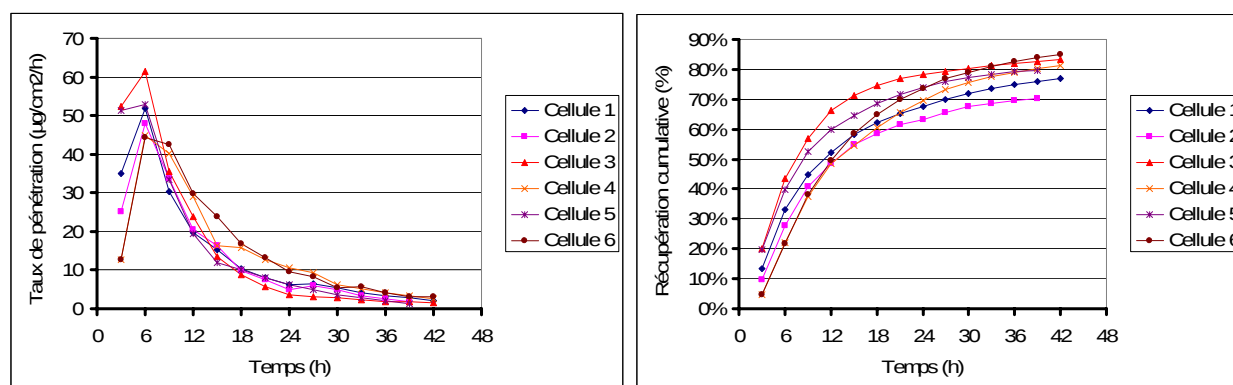


Figure 5. Mesure de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau congelée de porc; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 5. Reproductibilité des mesures sur peaux congelées de porc – acide benzoïque

L'expérience 4 a été répétée un mois plus tard afin de vérifier la reproductibilité des mesures. Comme l'illustre clairement la figure 6, les mesures apparaissent beaucoup plus erratiques ici. Il n'y a plus de maximum clairement identifiable et il y a une grande variabilité entre les cellules dans les flux mesurés par période de trois heures. Cette variabilité est beaucoup moindre pour la récupération cumulée d'acide benzoïque qui est de 59 ± 16 % pour l'ensemble des 6 cellules ou 65 ± 5 % si l'on omet un point aberrant.

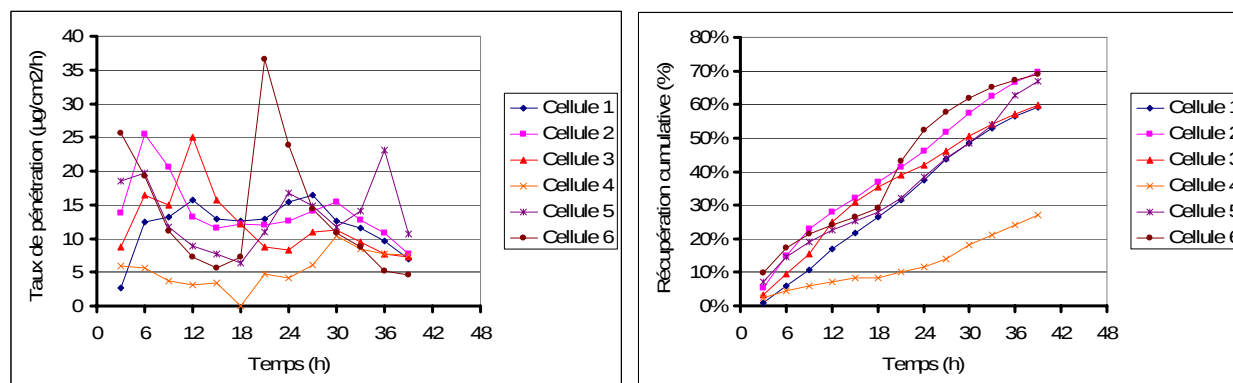


Figure 6. Répétition des mesures de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau congelée de porc; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 6. Reproductibilité (bis) des mesures sur peaux congelées de porc – acide benzoïque

Devant les résultats très variables de l'expérience précédente, le test de reproductibilité a été repris. La figure 7 montre que les résultats ne sont pas meilleurs ici. La variabilité entre les cellules est toujours aussi grande. Les quantités recueillies sur l'ensemble de la période de collecte de 48 heures correspondent à une moyenne de 69 ± 16 % de la dose appliquée ou 75 ± 6 % en omettant un point aberrant. Il convient de préciser ici que c'est toujours la même peau de porc congelée qui a été utilisée pour les expériences 4, 5 et 6. La durée de congélation pour ces expériences a été de 3, 32 et 39 jours respectivement avant l'utilisation des échantillons de peau. Il n'y a pas eu de cycle de congélation/décongélation puisque la peau avait été congelée en portions séparées.

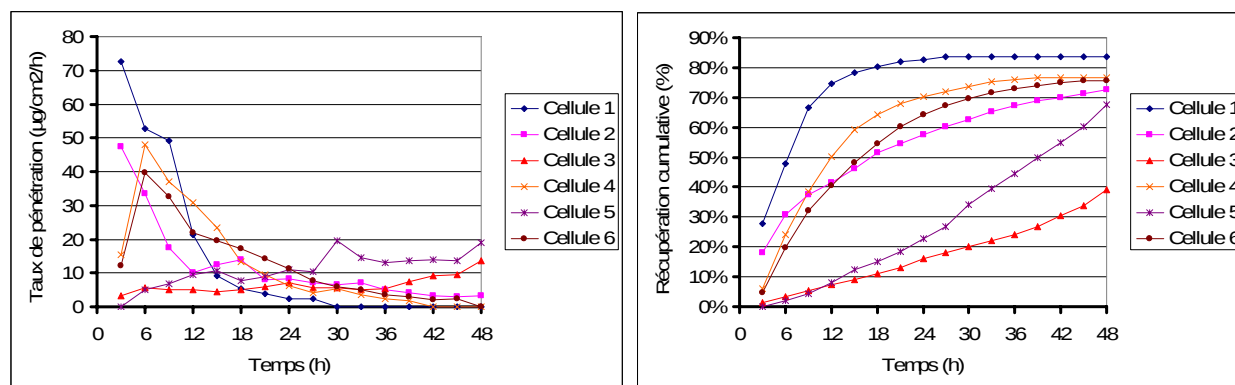


Figure 7. Nouvelle répétition des mesures de la pénétration de l'acide benzoïque à travers la peau congelée de porc; application de 500 µg. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Le tableau 3 résume les quantités cumulées d'acide benzoïque recueillies dans le liquide récepteur pour les trois expériences menées sur les peaux de porc. Pour faciliter la comparaison, nous avons utilisé les cumulatifs observés sur une période de référence commune de 39 heures. Ce tableau met en évidence que si seuls les cumulatifs de 39 heures sont rapportés, les données semblent très proches les unes des autres.

Tableau 3. Pourcentage de la dose d'acide benzoïque recueillie dans trois essais séparés (expériences 4, 5 et 6) réalisés en utilisant de la peau de porc congelée.

Expérience	Durée de congélation (jours)	Pourcentage de la dose recueillie
4	3	79 ± 5
5	32	59 ± 16
5, sans un point aberrant		65 ± 5
6	39	63 ± 21
6, sans un point aberrant		71 ± 13

Expérience 7. Premier essai avec une substance lipophile – peau fraîche de rat, pyrène

Le premier essai avec une substance lipophile a été réalisé avec de la peau fraîche de rat en utilisant le pyrène comme substance test. Le milieu récepteur était une solution tamponnée à pH 7,4 de HHBSS (« Hepes-Buffered Hanks' Balanced Salt Solution », une solution saline

équilibrée de Hanks tamponnée à l'HEPES [acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique]). La solution contenait également 4% d'albumine bovine et 50 mg/l de gentamycine.

Comme le montre la figure 8, les flux transcutanés observés sont très faibles et il y a une variabilité considérable entre les trois cellules utilisées dans cette expérience. Cette variabilité est observée autant en exprimant les résultats en flux qu'en les présentant en excrétion cumulative. Dans ce dernier cas et pour chaque cellule, les quantités cumulées dans les fractions pour toute la période de collecte de 72 heures correspondent à 0,18 %, 0,35 % et 0,05 % de la dose appliquée de 214 nmol par cellule.

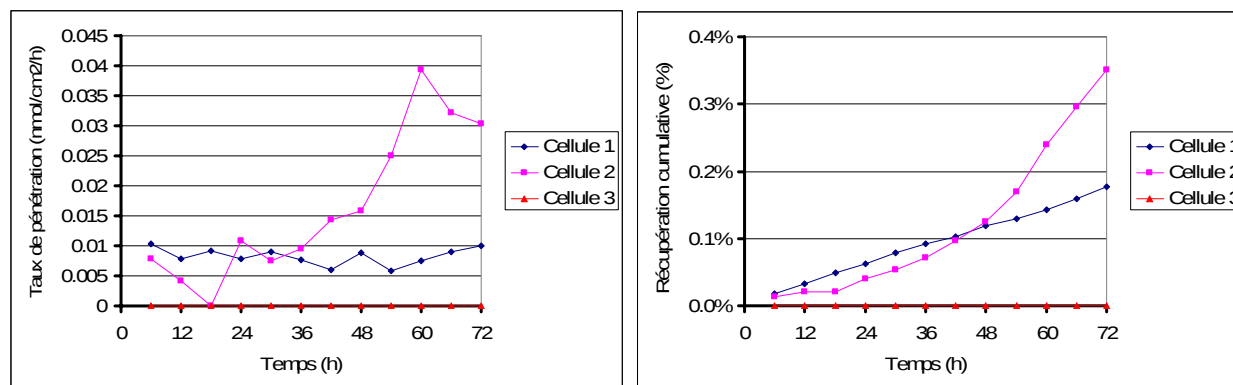


Figure 8. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 8. Répétition de l'essai avec une substance lipophile – peau fraîche de rat et peau congelée de porc, pyrène

Devant les résultats préliminaires très variables obtenus lors de l'essai initial avec le pyrène, l'essai a été répété en mode comparatif entre la peau de rat fraîche et la peau de porc. Le même milieu récepteur est utilisé. La figure 9 montre que les trois cellules contenant la peau de rat fraîche donnent des résultats assez semblables avec des cumulatifs recueillis de $0,11 \pm 0,04$ % pendant les 72 heures de collecte. Pour la peau de porc congelée, nous avons dû éliminer une cellule (#5) parce que l'analyse a révélé une contamination. Pour les deux autres, le cumulatif des 72 heures donne une moyenne de 0,71 %, plus de 6 fois la valeur observée pour la peau fraîche de rats. Notons aussi que cette moyenne de 0,71 % a été calculée à partir de deux valeurs éloignées de 1,06 % et 0,37 %.

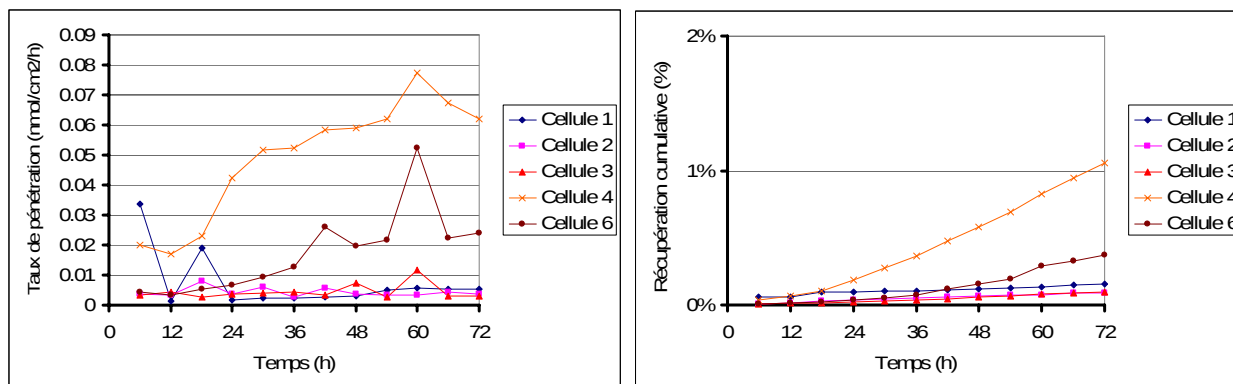


Figure 9. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat (cellules 1, 2 et 3) et la peau congelée de porc (cellules 4 et 6); application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 9. Essai d'un milieu éthanol à 50 % comme milieu récepteur d'une substance lipophile – peau congelée de rat, pyrène

Compte tenu des faibles taux de transport observés précédemment et pour nous assurer que le passage transcutané du pyrène à travers les échantillons de peau de notre système *in vitro* était possible, le milieu récepteur précédent (HHBSS, albumine, gentamycine et Brij) a été remplacé par une solution d'éthanol à 50 %. La figure 10 montre que le flux maximal est atteint vers 24-30 h avec une différence entre les cellules qui va du simple au double pour ce flux maximal. Par contre, les pourcentages cumulatifs de la quantité de pyrène recueillie dans le fluide récepteur varient peu avec une moyenne ($\pm$ écart type) de 47 ± 7 %.

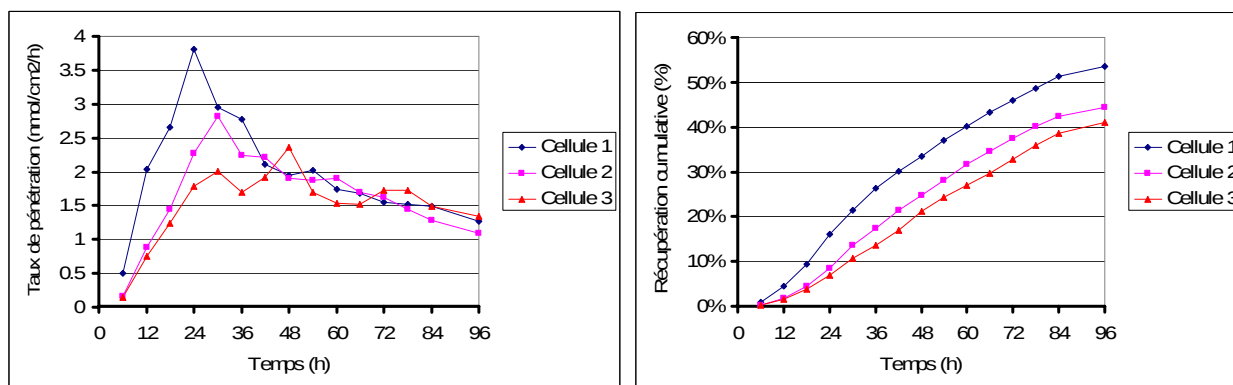


Figure 10. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau de rat en utilisant l'éthanol à 50 % comme milieu récepteur; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 10. Ajout d'un surfactant pour améliorer la solubilité d'une substance lipophile dans le milieu récepteur – peau fraîche de rat, pyrène

La figure 11 montre l'effet de l'ajout du Brij 96 comme surfactant dans le milieu récepteur en vue d'améliorer la solubilité du pyrène dans le liquide récepteur. La membrane est une peau fraîche de rat. On constate que les flux par période de collecte sont aussi faibles que sans la

présence du Brij 96. La quantité cumulative moyenne de pyrène recueilli dans le liquide récepteur est de $0,08 \pm 0,05$ % sur la période 0-42 heures.

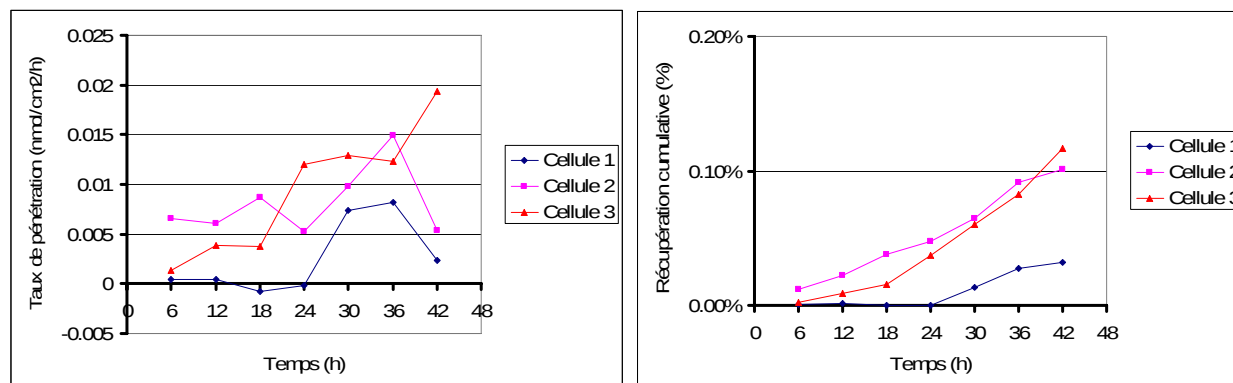


Figure 11. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 11. Changement de surfactant pour améliorer la solubilité d'une substance lipophile dans le milieu récepteur – peau congelée de rat, pyrène

Ici, le même contexte expérimental que celui de l'expérience a été repris, mais on a changé le Brij 96 pour du Brij 98. Ce même surfactant a été ajouté dans les expériences de 12 à 16 inclusivement. On constate à l'examen de la figure 12, comme c'était le cas pour plusieurs des expériences précédentes, que deux cellules sur trois donnent des résultats semblables alors que la troisième se détache des autres. Pour les deux cellules semblables, le flux maximal est atteint dès la première collecte et se maintient à un niveau presque constant pendant toute la période de collecte. La troisième cellule montre aussi un flux relativement constant au début, quoiqu'environ 5 fois inférieur aux deux autres cellules. Par contre, à la fin de la période de collecte, le flux transcutané de pyrène de la troisième cellule a rejoint celui des deux autres cellules. Le pourcentage cumulatif moyen de pyrène recueilli est de $0,78 \pm 0,36$ % si l'on tient compte des trois cellules.

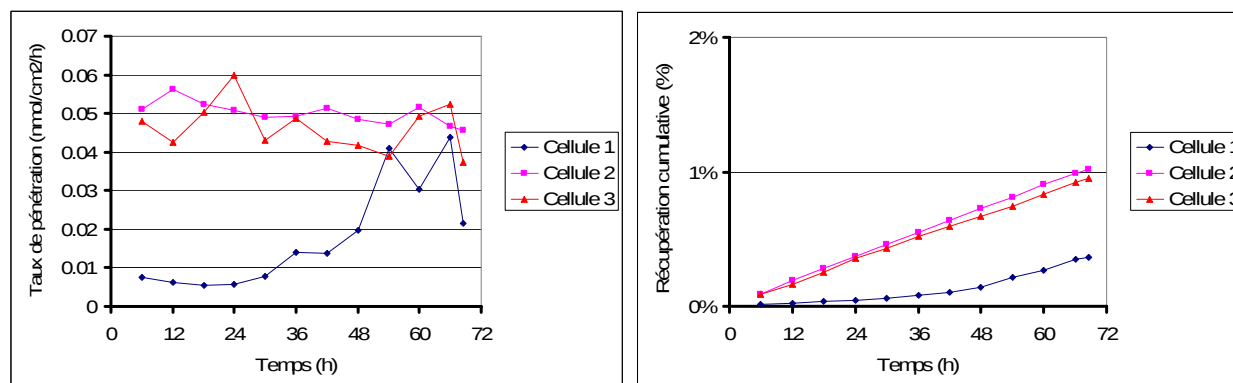


Figure 12. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau congelée de rat; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 12. Effet de la dose appliquée sur les mesures de flux – peau fraîche de rat, pyrène

Dans cette expérience, on a repris le milieu récepteur de l'expérience précédente, mais on a voulu vérifier si le flux transcutané observé varie avec la quantité de pyrène appliquée sur la peau. La réponse à cette question est négative puisque c'est une des deux doses faibles (43 nmol) qui donne les flux absolus les plus grands (figure 13). Par contre, on observe que les flux sont relativement constants pendant la période de collecte de 72 heures pour chacune des cellules. Au total, sur l'ensemble de la période, le pourcentage cumulé moyen pour les doses de 43, 214 et 1070 nmol sont de 3,5 %, 0,2 % et 0,09 %. Ces données cumulatives sur 72 heures suggèrent une apparente saturation du transport avec l'augmentation de la quantité appliquée.

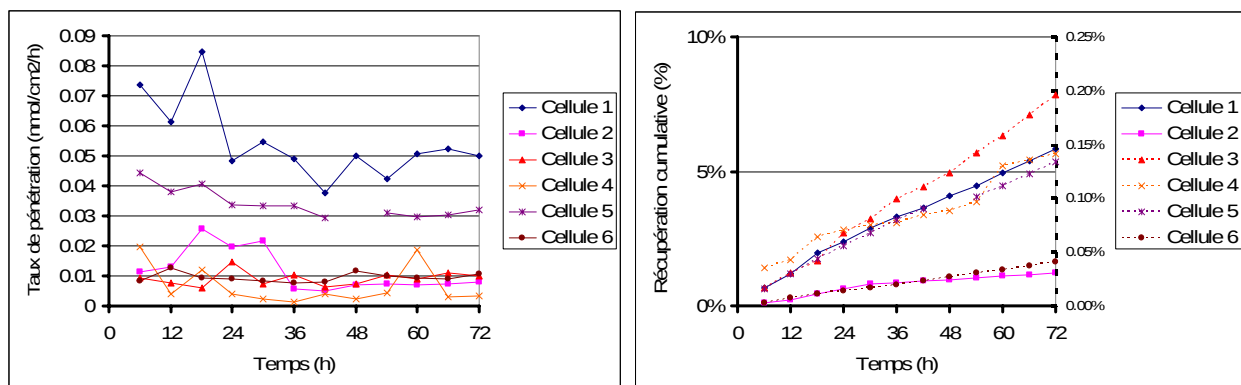


Figure 13. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat; application de 43 (cellules 1 et 2), 214 (cellules 3 et 4) et 1070 (cellules 5 et 6) nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite. Sur le graphique de droite, l'ordonnée de gauche s'applique aux cellules 1 et 2 et l'ordonnée de droite aux cellules 3 à 6.

Expérience 13. Effet de l'hydratation de la peau avant application – peau fraîche de rat, pyrène

Ici, l'accent a été mis sur l'effet potentiel de l'état d'hydratation de la peau sur les flux transcutanés. Les résultats présentés à la figure 14 montrent deux groupes apparents de tracés. Les cellules 2, 4 et 7 donnent des flux plus élevés que les autres malgré le fait que tant la préparation des peaux que la dose appliquée aient été semblables. Notons qu'il n'y avait pas de différences notables dans les épaisseurs des peaux. Pour les cellules « rapides », le pourcentage cumulatif de la dose appliquée récupéré en 48 heures est de $0,74 \pm 0,05$ %. Pour les cellules « lentes », le pourcentage est de $0,12 \pm 0,08$ %. Pour l'ensemble des cellules, il est de $0,38 \pm 0,34$ %.

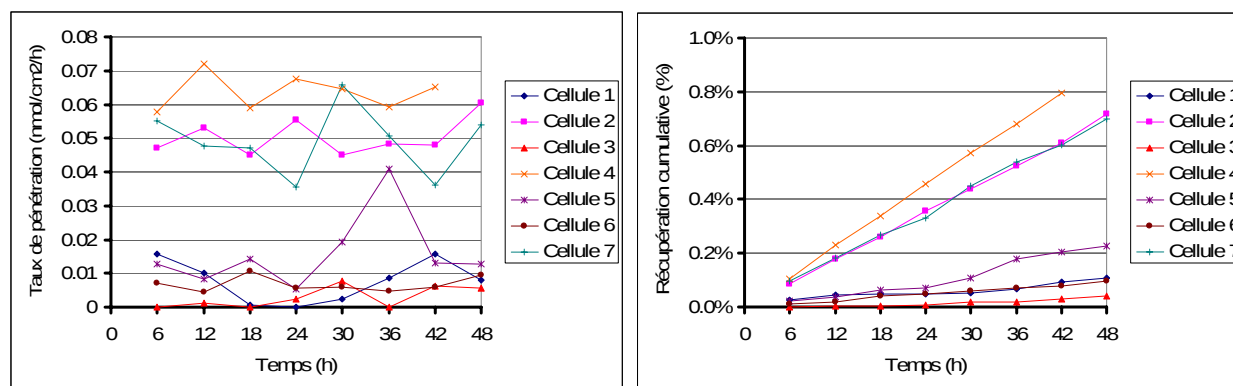


Figure 14. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 14. Mesure du flux à l'aide du pyrène marqué au ^{14}C – peau fraîche de rat

Ces mesures avec le pyrène marqué au carbone-14 montrent une augmentation rapide du flux transcutané jusque vers 8-12 heures suivant l'application (figure 15). À partir de ce moment, le flux continue d'augmenter, mais beaucoup plus lentement ou encore il atteint un plateau. Quelques cellules montrent une accélération du flux vers la fin de la période de collecte des fractions. Encore une fois, on constate d'importantes différences entre les cellules. La récupération cumulative dans les fractions recueillies atteint $0,15 \pm 0,06$ % (plage de 0,06 % à 0,25 %). Notons que cette valeur correspond de très près à la valeur observée pour les cellules qualifiées de « lentes » dans l'expérience #13.

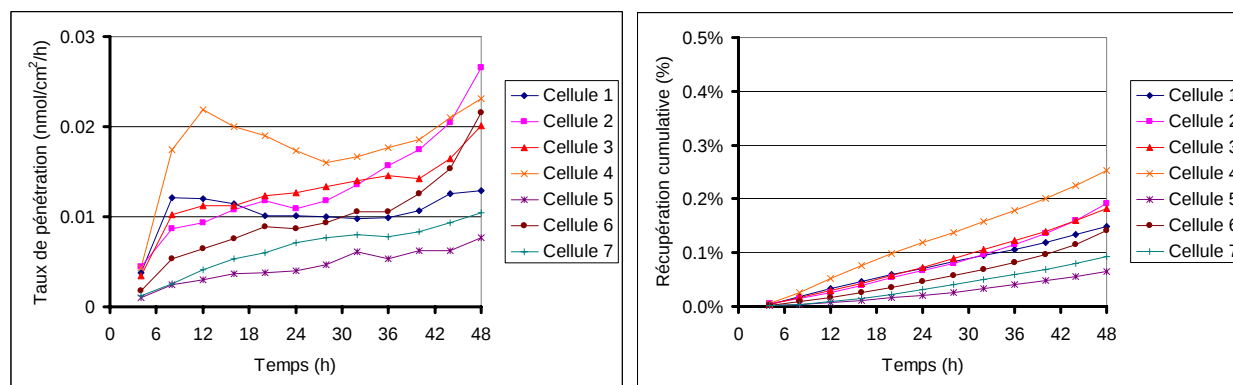


Figure 15. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de rat bien hydratée; application de 214 nmol de pyrène froid et de 16 nmol de pyrène- ^{14}C . Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 15. Mesure du flux à l'aide du pyrène marqué au ^{14}C – peau fraîche de porc

Comme pour l'expérience précédente réalisée avec de la peau de rat, on constate à l'examen de la figure 16 une grande variabilité entre les cellules dans cette expérience menée cette fois sur peau fraîche de porc hydratée. Toutefois, comme dans d'autres situations décrites précédemment, les données se présentent en deux groupes distincts. L'augmentation du flux est cette fois plus

lente au début atteignant un plateau vers 24 heures après l'application. Pour les deux cellules « rapides », la récupération cumulative moyenne dans le liquide récepteur au cours des 72 heures de l'expérience est de 0,35 % de la dose appliquée. Pour les quatre cellules « lentes », la moyenne est de $0,12 \pm 0,03$ %. Pour l'ensemble, cela correspond à $0,20 \pm 0,12$ %. Notons que la moyenne des cellules lentes correspond de très près à la valeur moyenne des mesures effectuées sur la peau fraîche de rat à l'expérience 14.

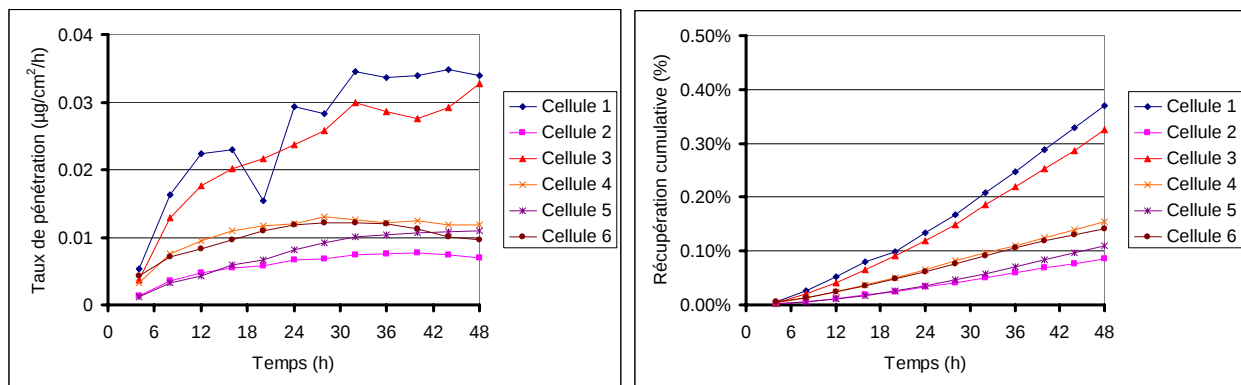


Figure 16. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau fraîche de porc bien hydratée; application de 214 nmol de pyrène froid et de 16 nmol de pyrène- ^{14}C . Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 16. Mesure du flux à l'aide du pyrène marqué au ^{14}C – peau congelée de porc

Les mesures réalisées sur peau fraîche de porc ont été répétées sur des peaux congelées de porc. Les résultats sont assez semblables dans les deux cas. Encore une fois, deux groupes semblent se dessiner, quoique de manière un peu moins évidente que précédemment (figure 17). Pour le groupe « rapide », on obtient une quantité cumulative recueillie correspondant à 0,33 % de la quantité appliquée. Pour les cellules « lentes », la moyenne est de $0,14 \pm 0,03$ %, encore une fois très proche de ce qui a été déjà observé. Pour l'ensemble des cellules, on obtient $0,19 \pm 0,11$ %.

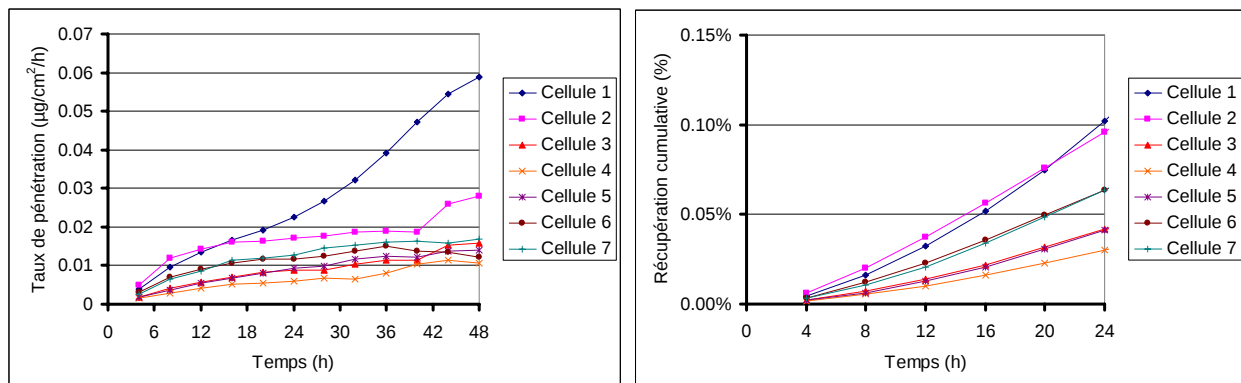


Figure 17. Mesure de la pénétration du pyrène à travers la peau congelée de porc bien hydratée; application de 214 nmol de pyrène froid et de 16 nmol de pyrène- ^{14}C . Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Comparaison des flux transcutanés du pyrène selon les types de peau

La figure 18 illustre la comparaison des flux transcutanés obtenus avec les divers types de peau et deux types de milieu récepteur. Tous les milieux contiennent du HHBSS, de l'albumine, de la gentamycine et du Brij 98 à l'exception de ceux qui sont désignés « Sans Brij 98 » dans lesquels le Brij a été omis. Quatre expériences sur cinq réalisées sur de la peau fraîche de rats donne des récupérations avoisinant les 0,2 % sur les 72 heures de collecte, qu'il y ait du Brij 98 ou pas dans le liquide récepteur. Notons également que les mesures sur peau fraîche de rat hydratée #2 (barre d'histogramme marquée d'un astérisque) ont été réalisées à l'aide de pyrène marqué au carbone-14 et qu'elles donnent les mêmes résultats que ceux qui ont été obtenues par l'analyse chimique du pyrène par CLHP. De même, l'examen des résultats sur peaux fraîches de rat suggèrent que l'hydratation préalable de la peau ne change rien aux résultats. Il est également intéressant de remarquer que les mêmes pourcentages de récupération sont observés pour la peau fraîche de porc, les deux expériences ayant été menées avec du pyrène marqué au carbone-14. Les deux expériences décrites sur ce graphique qui ont été menées sur de la peau congelée donnent des résultats de flux plus élevés avec des flux atteignant environ 0,7 % de la quantité appliquée, soit environ trois fois plus que les résultats obtenus sur des peaux fraîches.

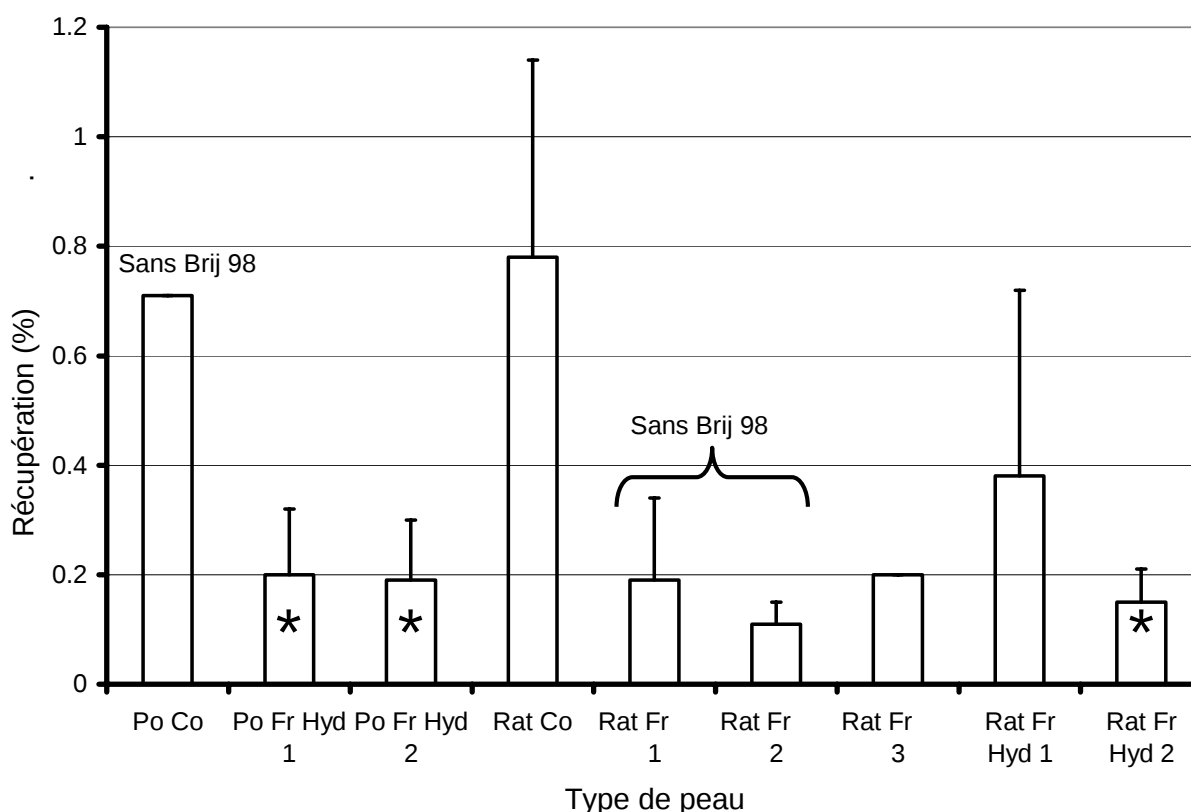


Figure 18. Comparaison des flux transcutanés de pyrène, exprimés en pourcentage de la dose de 214 nmol appliquée récupérée en 72 heures dans le liquide récepteur, selon les types de peau. Po Co = peau congelée de porc; Po Fr Hyd = peau fraîche de porc hydratée; Rat Co = peau congelée de rat; Rat Fr = peau fraîche de rat; Rat Fr Hyd = peau fraîche de rat hydratée. Les barres d'histogramme comportant des astérisques représentent des expériences menées avec du pyrène ¹⁴C. Les milieux récepteurs contiennent du HHBSS, de l'albumine, de la gentamycine et du Brij 98 sauf celles qui sont désignées « Sans Brij 98 » où le Brij 98 a été omis.

Exploration de solutions de méthanol comme liquide récepteur

Des essais ont été réalisés en utilisant un liquide récepteur qui assure une meilleure solubilité des composés lipophiles. Il s'agissait de tester l'intérêt d'un système simple qui pourrait permettre d'établir les flux transcutanés relatifs entre des substances lipophiles à l'aide d'un milieu récepteur apte à solubiliser facilement de telles substances. L'éthanol avait d'abord été testé puis le méthanol a été essayé. Dans ce dernier cas, nous avons exploré des concentrations diverses de méthanol en solution aqueuse. Bien entendu, des concentrations de 30 %, 50 % et 70 % de méthanol ne sont pas compatibles avec la survie cellulaire des cellules cutanées. Aussi l'utilisation d'échantillons de peau congelée a-t-elle semblé adéquate pour cette partie du travail.

Expérience 17. Mesure des flux individuels de trois HAP en milieu récepteur méthanol à 50 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène

Dans la première expérience, réalisée à 50 % de méthanol dans le liquide récepteur, des flux plus importants sont obtenus comparativement au milieu HHBSS. Comme le montre la figure 19, les flux sont plus rapides pour le phénanthrène, intermédiaires pour le pyrène et plus lents pour le benzo(a)pyrène (les valeurs doivent être lues sur l'axe des ordonnées de droite pour ce dernier). Les pourcentages de la dose appliquée recueillis dans le liquide récepteur en 72 heures sont respectivement de 18 %, 3,8 % et 0,23 % pour ces trois HAP. Notons cependant que comparativement à l'éthanol, le pyrène présente des flux plus lents avec un milieu récepteur à 50 % de méthanol qu'à 50 % d'éthanol, les deux expériences ayant été réalisées sur des peaux congelées de rat et une même quantité de pyrène appliquée.

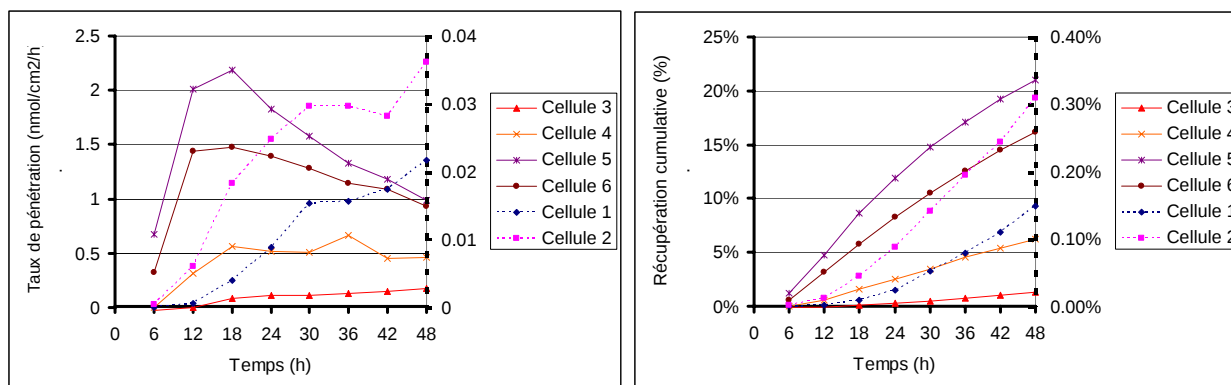


Figure 19. Mesure de la pénétration de trois HAP à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Liquide récepteur à 50 % de méthanol. Cellules 1 et 2 → benzo(a)pyrène (lire sur l'échelle de droite sur les deux graphiques); cellules 3 et 4 → pyrène; cellules 5 et 6 → phénanthrène. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 18. Mesure des flux individuels de trois HAP en milieu récepteur méthanol à 30 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène

On voit à la figure 20 qu'avec un milieu récepteur à 30 % de méthanol, les flux de benzo(a)pyrène sont non mesurables, ceux du pyrène sont plus faibles que ce qui avait été obtenu avec un milieu HHBSS et les flux de phénanthrène sont disparates entre les deux cellules où ce produit avait été appliqué. Il y a une possible contamination pour la première fraction de la cellule 5. Si l'on inclut malgré tout les résultats de cette dernière, les pourcentages de la dose

appliquée recueillis dans le liquide récepteur en 72 heures sont respectivement de 0,3 %, 0,04 % et 0 % pour le phénanthrène, le pyrène et le benzo(a)pyrène.

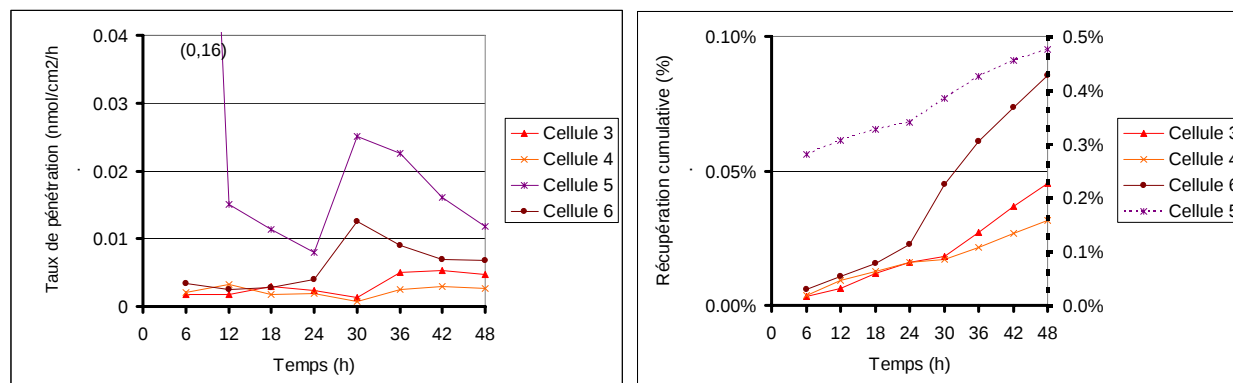


Figure 20. Mesure de la pénétration de trois HAP à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Liquide récepteur à 30 % de méthanol. Cellules 3 et 4 → pyrène; cellules 5 et 6 → phénanthrène. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite. Il n'y a pas de données pour le benzo(a)pyrène, non détectable dans ces conditions. Les données pour la cellule 5 doivent être lues sur l'ordonnée de droite dans le graphique de la récupération cumulative.

Expérience 19. Mesure des flux individuels de trois HAP en milieu récepteur méthanol à 70 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène

Comme cela était prévisible, lorsque le milieu récepteur contient davantage de méthanol, 70 % dans ce cas, les flux transcutanés des trois HAP sont supérieurs à ceux qui ont été observés à des concentrations inférieures. Ici, les flux de phénanthrène et de pyrène sont maxima dès la première fraction et ils décroissent rapidement par la suite (figure 21). En ce qui concerne le BaP, le flux augmente progressivement jusqu'à 18-24 heures avant d'atteindre un plateau. Les pourcentages de la dose appliquée recueillis dans le liquide récepteur en 72 heures sont respectivement de 56 %, 66 % et 14 % pour phénanthrène, le pyrène et le benzo(a)pyrène. On remarque que la récupération du pyrène est légèrement supérieure à celle du phénanthrène.

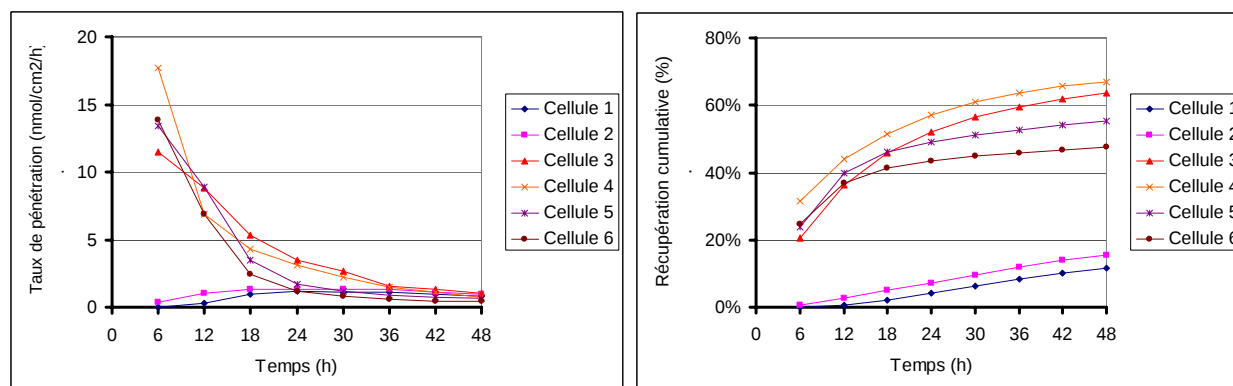


Figure 21. Mesure de la pénétration de trois HAP à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 214 nmol. Liquide récepteur à 70 % de méthanol. Cellules 1 et 2 → benzo(a)pyrène; cellules 3 et 4 → pyrène; cellules 5 et 6 → phénanthrène. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite

Expérience 20. Mesure des flux de trois HAP en mélange en milieu récepteur méthanol à 50 % - phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène

Pour cette dernière expérience, les trois HAP ont été préparés en mélange dans une même solution, mais au tiers de la concentration molaire de chacune afin que la concentration molaire totale de HAP soit identique à celles qui avaient été utilisées dans les expériences 17, 18 et 19. La figure 22 montre que les flux de phénanthrène et de pyrène augmentent rapidement pour décroître par la suite alors que les flux de benzo(a)pyrène augmentent progressivement pendant toute la durée de l'expérience ou alors plafonnent vers la fin des 72 heures.

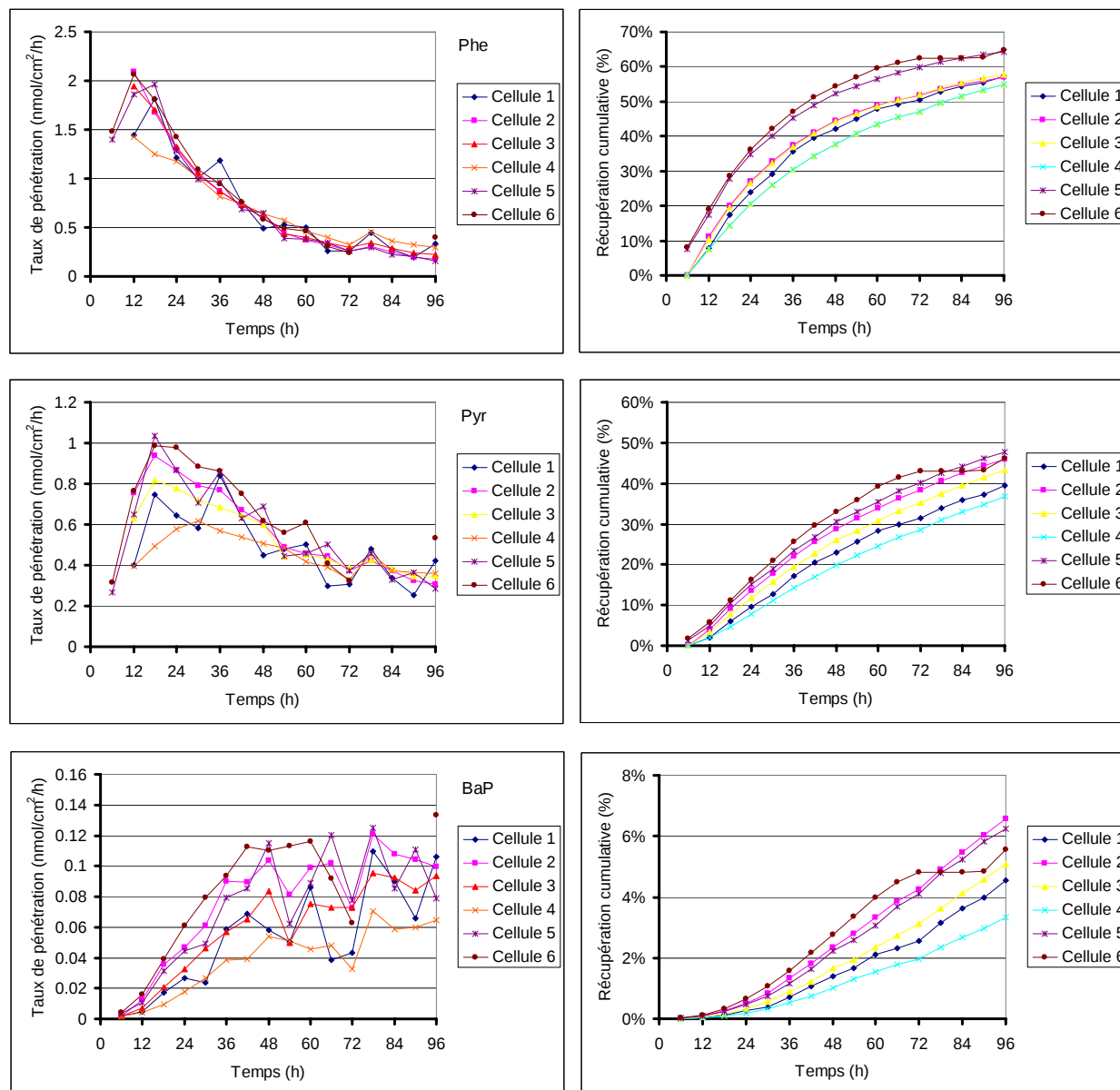


Figure 22. Mesure de la pénétration de trois HAP en mélange à travers la peau congelée de rat bien hydratée; application de 71 nmol chacun de phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène. Liquide récepteur à 50 % de méthanol. Taux de pénétration à gauche et récupération cumulative en % de la dose appliquée à droite. Les graphiques du haut correspondent au phénanthrène, les intermédiaires au pyrène et ceux du bas au benzo(a)pyrène

Analyse comparative des profils de flux transcutanés de trois HAP en milieu récepteur contenant du méthanol

La figure 23 montre la relation entre les flux des trois HAP et la concentration en méthanol du liquide récepteur. On remarque que la relation semble suivre un comportement log-linéaire pour chacun des trois HAP et les trois courbes semblent remarquablement parallèles. De plus, l'ordre croissant des flux suit bien l'ordre des masses moléculaires des composés à savoir : phénanthrène > pyrène > benzo(a)pyrène. À noter également que le BaP n'était pas détectable dans le liquide récepteur pour la solution à 30% de méthanol comme mentionné précédemment et qu'il semble y avoir saturation du flux pour le phénanthrène aux fortes concentrations de méthanol.

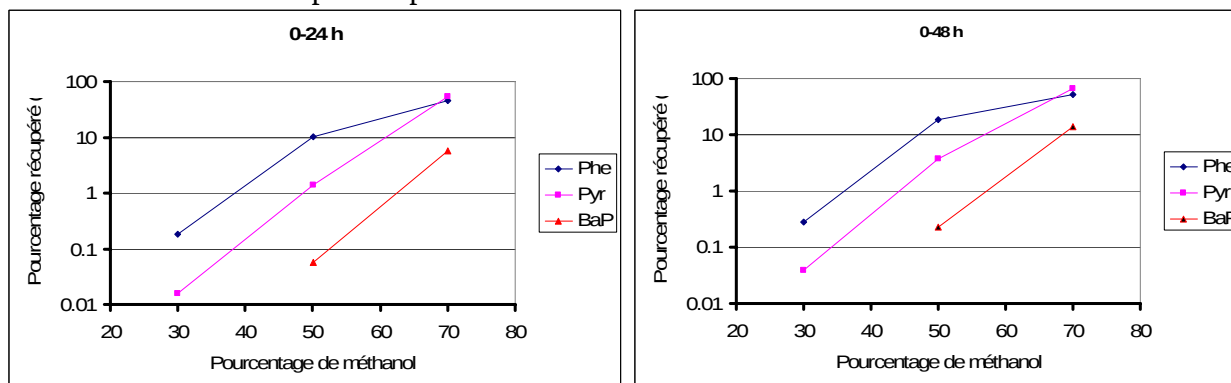


Figure 23. Pourcentage de la quantité appliquée de phénanthrène (Phe), pyrène (Pyr) et benzo(a)pyrène (BaP) récupéré dans le liquide récepteur en fonction de la proportion de méthanol dans ce liquide suite à l'application de 214 nmol de HAP par cellule. Chaque courbe représente la moyenne de deux essais. La figure de gauche présente les résultats obtenus pour la période de 0 à 24 heures et celle de droite pour la période de 0 à 48 heures.

La figure 24 présente les mêmes données, mais selon la taille des HAP cette fois, à savoir selon l'ordre croissant phénanthrène (178 g/mol), pyrène (202 g/mol) et benzo(a)pyrène (252 g/mol). On constate la diminution attendue des flux avec l'accroissement de la taille des HAP, sauf pour le fluide récepteur à 70 % de méthanol où le flux du pyrène est légèrement supérieur à celui du phénanthrène. En d'autres termes, le flux est le plus grand pour le phénanthrène, moindre pour le pyrène et le plus faible pour le benzo(a)pyrène.

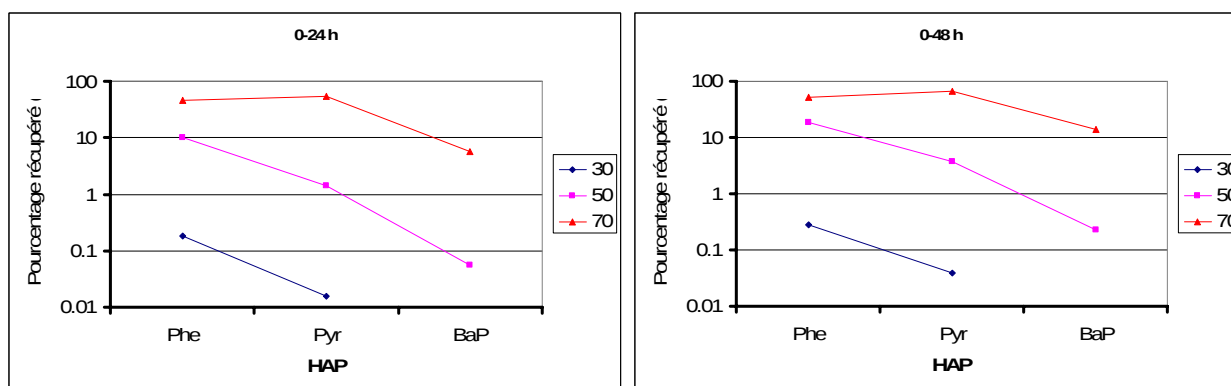


Figure 24. Pourcentage de la quantité appliquée de phénanthrène (Phe), pyrène (Pyr) et benzo(a)pyrène (BaP) récupéré dans le liquide récepteur en fonction de la taille des HAP suite à l'application de 214 nmol de HAP par cellule. Chaque courbe représente la moyenne de deux essais. La figure de gauche présente les résultats obtenus pour la période de 0 à 24 heures (la légende 30, 50, 70 désigne les pourcentages de méthanol dans le liquide récepteur) et celle de droite pour la période de 0 à 48 heures.

La figure 25 permet la comparaison des profils des flux des trois HAP appliqués simultanément en mélange à 6 fragments de peau de rat congelée en utilisant le méthanol à 50% comme milieu récepteur. Ici, les flux ont été normalisés en posant le flux maximal de chaque HAP égale à 100 %. Cela facilite l'examen des profils qualitatifs sur la même échelle des ordonnées. On constate que le flux maximal est atteint assez tôt après l'application, à savoir à $t = 12$ h pour le phénanthrène et $t = 18$ h pour le pyrène alors que le maximum pour le benzo(a)pyrène survient beaucoup plus tard, soit à entre 48 et 78 h. De plus, alors que les flux du pyrène et du phénanthrène vont en décroissant régulièrement à partir du point maximal, celui du BaP reste relativement stable entre 48 et 96 heures. Sur toute la période d'observation de 96 heures, les pourcentages de chaque HAP récupéré par rapport à la quantité appliquée sont de 56 ± 9 , 43 ± 4 et 5 ± 1 respectivement pour le phénanthrène, le pyrène et le benzo(a)pyrène.

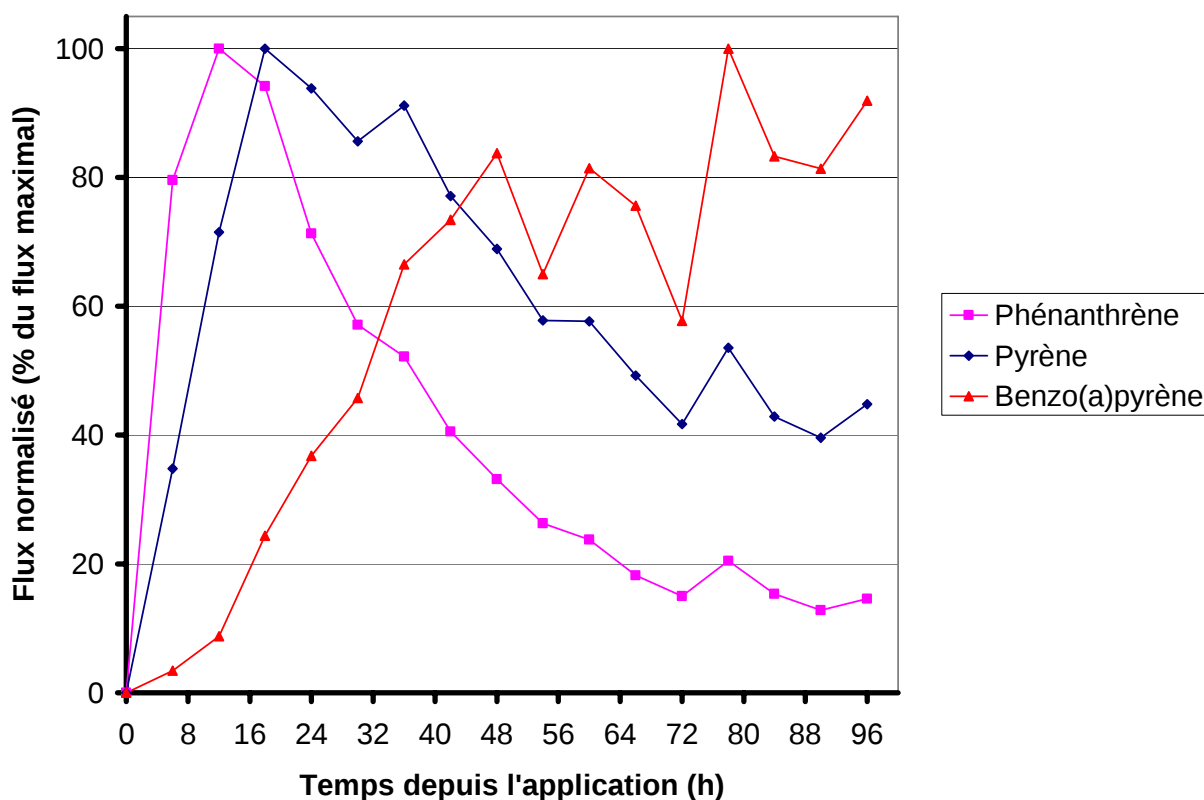


Figure 25. Profils comparatifs des flux transcutanés de trois HAP à travers de membranes de peau de rat congelée. Le liquide récepteur est constitué de méthanol à 50% dans l'eau. Pour fins de comparaison, les flux ont été normalisés par rapport au flux maximal (= 100%). Seule la moyenne est présentée pour éviter l'encombrement du graphique avec les écarts types.

Finalement, étant donné la variabilité parfois importante qui est observée entre les cellules, un examen des rapports entre les quantités de HAP recueillies dans le liquide récepteur pour la totalité des 96 heures de collecte a été réalisé par cellule. Les résultats sont les suivants :

- Rapport phénanthrène/pyrène : $1,4 \pm 0,1$
- Rapport phénanthrène/benzo(a)pyrène : 12 ± 3

- Rapport pyrène/benzo(a)pyrène : 9 ± 1

Mesuré sur la totalité des 96 heures dans ce système non physiologique, le flux transcutané de phénanthrène est 1,4 fois plus rapide en moyenne que le flux de pyrène et 12 fois plus rapide que celui du benzo(a)pyrène. Le flux moyen du pyrène est 9 fois plus rapide que celui du benzo(a)pyrène.

Discussion

Type de peau et mode de préparation

La littérature scientifique suggère que la peau de porc est un substitut valable à la peau humaine en ce qui concerne la détermination de flux transcutanés *in vitro* (Hawkins et Reifenrath 1986). Il s'est toutefois avéré plus difficile que prévu d'obtenir de la peau de porc provenant des oreilles des animaux abattus en abattoirs. Nous avons donc fait quelques comparaisons entre les résultats obtenus sur peau de porc et sur peau de rat. Notons qu'en moyenne, les peaux de porc ont une épaisseur presque deux fois plus importante que celle des peaux de rat (1,4 mm contre 0,8 mm). En ce qui concerne les flux, qu'il s'agisse de composés hydrophiles comme l'acide benzoïque ou de composés lipophiles comme le pyrène, il n'y a pas de différences importantes entre les deux types de peau. Les peaux préalablement congelées semblent présenter des flux plus importants que les peaux fraîches. Il n'y a par ailleurs pas de différences importantes entre les peaux dont on a soigneusement retiré toute trace visible de tissu adipeux sous-cutané et la préparation attentive de routine. Plusieurs auteurs utilisent de la peau dermatomée à 0,35 ou 0,50 mm, mais nous n'avons pas accès à un dermatome dans le cadre de cette activité. L'utilisation de l'un ou l'autre type de préparation ne semble pas produire de résultats très différents pour les substances hydrophiles, mais donne des différences un peu plus marquées (facteur 2-3) pour les substances plus lipophiles (Hotchkiss *et al.* 1992).

Composés hydrophiles

L'acide benzoïque a été utilisé ici comme substance test typique des composés hydrophiles présentant une bonne pénétration cutanée. Pour des périodes de collecte de 24 heures ou plus, le pourcentage de la dose appliquée retrouvée dans le liquide récepteur est de plus de 50 %, en accord avec des données de la littérature (Hotchkiss *et al.* 1992). Les peaux congelées de rat donnent des taux de pénétration supérieurs à ceux des peaux fraîches, mais semblables à ceux des peaux congelées de porc. Dans ce dernier cas, il semble que le taux de pénétration diminue légèrement avec la durée de congélation. Il y a parfois une grande variabilité entre les cellules au sein d'une même expérience, mais cette variabilité est moindre lorsque la récupération cumulative dans le liquide récepteur est considérée. Il apparaît donc que la technique *in vitro* implantée dans notre laboratoire donne des résultats comparables à ceux de la littérature scientifique en ce qui concerne un composé hydrophile type, l'acide benzoïque.

Composés lipophiles

Le cas des composés lipophiles est plus problématique. Nos résultats sont très différents de ceux qui sont rapportés dans la littérature, mais très cohérents dans le temps au sein de notre laboratoire. *In vivo*, une étude a rapporté que 50 % d'une dose de pyrène appliqué sur la peau était retrouvée sous forme de métabolites dans l'urine et les fèces (Withey *et al.* 1993).

Semblablement, nos propres données révèlent que les pourcentages d'une dose de benzo(a)pyrène, administrée soit par injection intraveineuse soit par application cutanée, qui sont récupérés dans l'urine sous forme de 3-hydroxybenzo(a)pyrène sont semblables pour ces deux voies d'administration (Bouchard et Viau 1997). Cela suggère que l'absorption de ces HAP par la peau est très importante. On s'attendrait donc en conséquence à des flux transcutanés *in vitro* qui reflètent cette observation *in vivo*.

Influence du milieu récepteur

Yang et coll. (1986) ont étudié l'importance du milieu récepteur sur la vitesse de pénétration *in vitro* de composés lipophiles comme le benzo(a)pyrène à travers la peau de rat non viable. Ces auteurs ont décrit des flux lents lorsque le milieu récepteur était une simple solution saline. Des flux se rapprochant de mesures effectuées *in vivo* étaient obtenus avec un milieu récepteur contenant 6 % de surfactant. Dans ces dernières conditions, les pourcentages de la dose de 40 nmol/cm² appliquée au cours d'une période de 5 jours étaient de 28 % pour la peau entière et de 50 % pour une peau dermatomée à 350 µm.

En utilisant de la peau viable de souris ou de cochon d'Inde, Storm et coll. (1990) trouvent des pourcentages de pénétration de 55 à 60 % pour le benzo(a)pyrène. Moody et coll. (1995) observent une récupération de benzo(a)pyrène marqué au carbone-14 de 51 % dans le liquide récepteur suite à l'application cutanée *in vitro* sur de la peau de rat dermatomée à 0,5 mm.

Sartorelli et coll. (1998) de même que Ng et coll. (1992) ont montré que même des composés lipophiles comme le pyrène et le benzo(a)pyrène diffusaient bien lorsque le milieu récepteur contient 40 g/l d'albumine. Nous avons précisément suivi ces indications pour préparer le milieu récepteur utilisé dans les expériences avec le pyrène. Calculé en pourcentage de la dose appliquée recueillie dans le liquide récepteur en 72 heures, nos résultats donnent des valeurs comprises entre 0,2 et 0,7 % de la dose appliquée de 214 nmol ou 336 nmol/cm² puisque nos cellules présentent une surface exposée de peau de 0,636 cm². Sartorelli et coll. (1999) ont mesuré le passage du pyrène dans un système *in vitro* en utilisant de la peau de singe. Pour une dose appliquée de 9,3 nmol/cm² (application dans un mélange d'acétone et de sueur artificielle), ils récupèrent 2 nmol/cm² de pyrène dans le liquide récepteur au terme de 72 heures. Exprimés dans ce système d'unités, nos résultats sont compris entre 0,7 et 2,5 nmol/cm². Il est possible qu'à la dose de 336 nmol/cm², nous ayons saturé le transport de sorte que l'expression des résultats en pourcentage de la dose appliquée fait ressortir des taux de pénétration apparents qui sont faibles. C'est également ce que suggère l'expérience 12 menée à trois doses de pyrène. La plus faible dose (43 nmol) donne une récupération moyenne de 3,5 %, soit 10 fois plus élevée que les observations faites à la dose habituelle de 214 nmol. Il faut donc se méfier des comparaisons avec la littérature basées sur le pourcentage de produit récupéré dans le liquide récepteur par rapport à la dose appliquée.

Il est notable que toutes les expériences menées avec le pyrène ont donné des résultats semblables (figure 18). Par ailleurs, même les mesures effectuées par comptage du carbone-14 dans les expériences où le pyrène-¹⁴C a été utilisé ont donné les mêmes résultats. Insistons sur le fait que cette autre méthode d'analyse est totalement indépendante de la méthode chromatographique. De plus, lorsque nous avons effectué un bilan de masse au terme des

expériences avec le pyrène-¹⁴C, nous avons constaté que plus de 90 % de la radioactivité étaient retrouvés dans la peau elle-même (résultats non présentés).

Utilisation d'un milieu récepteur contenant du méthanol

Les milieux récepteurs protéinés comme ceux qui contiennent 40 g/l d'albumine bovine employés ici ont l'inconvénient d'ajouter des difficultés analytiques. Aussi avons-nous voulu tester l'intérêt d'un milieu récepteur simple qui assure une bonne solubilisation des composés lipophiles, mais sans l'ajout de protéines ou de surfactants qui peuvent être la source de problèmes analytiques. Ainsi, l'utilisation d'une simple solution aqueuse de méthanol offre à la fois l'avantage d'éviter une prolifération bactérienne du fragment cutané et de permettre une injection directe des fractions recueillies dans le système CLHP. Trois concentrations de méthanol aqueux ont été testées : 30 %, 50 % et 70 %. De même, nous avons voulu compléter ces essais en utilisant trois HAP différents : le phénanthrène, le pyrène et le benzo(a)pyrène. À 30 % de méthanol, le benzo(a)pyrène dans le liquide récepteur était en deçà de la limite de détection du système CLHP que nous avons utilisé, mais nous avons obtenu des données pour le phénanthrène et le pyrène. À l'autre extrémité, soit à 70 %, la quantité de HAP absorbés à travers la peau est si importante dès le début pour le phénanthrène et le pyrène qu'il est probable que le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane diminue rapidement entraînant une diminution du flux. La concentration intermédiaire de 50 % semble donner les résultats les plus intéressants en évitant un passage trop rapide du phénanthrène tout en permettant une détection aisée du benzo(a)pyrène. Donc, d'une part la vitesse de passage transcutané augmente comme prévu avec l'augmentation de la concentration de méthanol dans le liquide récepteur. D'autre part, le flux varie en fonction inverse de la taille des HAP avec les flux les plus rapides pour le phénanthrène, intermédiaires pour le pyrène et plus faibles pour le benzo(a)pyrène.

Cette concentration de 50 % de méthanol dans l'eau a été utilisée pour mesurer les flux comparatifs des trois HAP en mélange dans une même application (figure 22). La représentation normalisée des flux sur un même graphique, en posant le flux maximal égale à 100 %, est particulièrement intéressante. On y voit clairement que le phénanthrène atteint une valeur maximale le plus rapidement, suivi du pyrène. Quant au benzo(a)pyrène, on remarque un décalage marqué du flux maximal vers des temps plus longs. C'est précisément le genre d'observation que nous avons faite récemment dans le cadre d'une étude *in vivo* d'exposition de rats à du benzo(a)pyrène par la voie cutanée (Viau *et al.* 2007). Dans cette étude, nous étudions les profils temporels d'excrétion urinaire du 3-hydroxybenzo(a)pyrène, un important métabolite de ce HAP. On a observé une lente augmentation de l'excrétion urinaire, suivie d'un plateau qui s'est maintenu jusqu'à 96 heures après l'application cutanée du benzo(a)pyrène, semblablement à l'observation faite ici *in vitro*.

Références

- Benford, D. J., Cocker, J., Sartorelli, P., Schneider, T., van Hemmen, J. et Firth, J. G. (1999). Dermal route in systemic exposure. *Scand. J. Work Environ. Health* **25**, 511-520.
- Bouchard, M. et Viau, C. (1997). Urinary excretion of benzo(a)pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo(a)pyrene administration. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 185-192.
- Bronaugh, R. L. et Hood, H. L. (1999). Will cutaneous levels of absorbed material be systemically absorbed? In *Percutaneous Absorption. Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology* (R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, eds.), pp. 235-239. Marcel Dekker, New York.
- Challapalli, P. V. et Stinchcomb, A. L. (2002). In vitro experiment optimization for measuring tetrahydrocannabinol skin permeation. *Int. J. Pharm.* **241**, 329-39.
- Dick, I. P., Hunter, P. J., Blain, P. G. et Williams, F. M. (1997). Usefulness of animal models in predicting human skin permeability for a series of chemicals of different lipophilicities. *Perspectives in Percutaneous Penetration* **5B**, 73-76.
- Hawkins, G. S. et Reifenrath, W. G. (1986). Influence of skin source, penetration cell fluid, and partition coefficient on in vitro skin penetration. *J. Pharm. Sci.* **75**, 378-381.
- Hikima, T. et Maibach, H. (2006). Skin penetration flux and lag-time of steroids across hydrated and dehydrated human skin in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 2270-3.
- Hotchkiss, S. A. M., Hewitt, P., Caldwell, J., Chen, W. L. et Rowe, R. R. (1992). Percutaneous absorption of nicotinic acid, phenol, benzoic acid and triclopyrbutoxyethyl ester through rat and human skin *in vitro*: further validation of an *in vitro* model by comparison with *in vivo* data. *Food Chem. Toxicol.* **30**, 891-900.
- Lauwerys, R. R., Kivits, A., Lhoir, M., Rigolet, P., Houbeau, D., Buchet, J. P. et Roels, H. A. (1980). Biological surveillance of workers exposed to dimethylformamide and the influence of skin protection on its percutaneous absorption. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **45**, 189-203.
- Lotte, C., Hinz, R. S., Rougier, A. et Guy, R. H. (1997). A reconstructed skin model (Testskin LSE) for permeation studies. *Perspectives in Percutaneous Penetration* **5B**, 133-134.
- Moody, R. P., Nadeau, B. et Chu, I. (1995). *In vivo* and *in vitro* dermal absorption of benzo(a)pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. *J. Dermatol. Sci.* **9**, 48-58.
- Ng, K. M. E., Chu, I., Bronaugh, R. L., Franklin, C. A. et Somers, D. A. (1992). Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl)phthalate: Comparison of in Vitro and in Vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 216-223.
- OSHA (2002). Safety and Health Topics: Dermal Exposure. Occupational Safety & Health Administration.

Patrick, E. et Maibach, H. (1994). Dermatotoxicology. In Principles and Methods of Toxicology (A. W. Hayes, ed., pp. 767-803. Raven Press, New York.

Poet, T. S. (2000). Assessing dermal absorption. *Toxicol. Sci.* **58**, 1-2.

Rawlings, J. M., Hilton, J., Trebilcock, K. L., Woollen, B. H. et Wilks, W. F. (1994). Effect of dosing vehicle on the dermal absorption of fluazifop-butyl and fomesafen in rats *in vivo*. *Fundam.Appl.Toxicol.* **23**, 93-100.

Reifenrath, W. G., Lee, B., Wilson, D. R. et Spencer, T. S. (1994). A comparison of *in vitro* skin-penetration cells. *J. Pharm. Sci.* **83**, 1229-33.

Riviere, J. E., Qiao, G. L., Baynes, R. E., Brooks, J. D. et Mumtaz, M. (2001). Mixture component effects on the *in vitro* dermal absorption of pentachlorophenol. *Arch. Toxicol.* **75**, 329-334.

Sartorelli, P., Aprea, C., Cenni, A., Novelli, M. T., Orsi, D., Palmi, S. et Matteucci, G. (1998). Prediction of percutaneous absorption from physicochemical data: a model based on data of *in vitro* experiments. *Ann. Occup. Hyg.* **42**, 267-276.

Sartorelli, P., Cenni, A., Matteucci, G., Montomoli, L., Novelli, M. T. et Palmi, S. (1999). Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: *in vitro* percutaneous penetration from lubricating oil. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **72**, 528-532.

Storm, J. E., Collier, S. W., Stewart, R. F. et Bronaugh, R. L. (1990). Metabolism of xenobiotics during percutaneous penetration: role of absorption rate and cutaneous enzyme activity. *Fundam. Appl. Toxicol.* **15**, 132-141.

Surber, C., Schwarb, F. P. et Smith, E. W. (1999). Tape-stripping technique. In Percutaneous Absorption. Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology (R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, eds.), pp. 395-409. Marcel Dekker, New York.

Viau, C., Bouchard, M., Agbato, I. et Thuot, R. (2007). Essai d'élaboration d'un modèle toxicocinétique du 3-OHBaP urinaire, p. 61. Université de Montréal, Montréal.

Viau, C. et Truchon, G. (2004). Évaluation de l'exposition cutanée. In Manuel d'hygiène du travail (B. Roberge, J. E. Deadman, M. Legris, L. Ménard and M. Baril, eds.), pp. 511-524. Modulo-Griffon, Mont-Royal.

Viau, C. et Vyskocil, A. (1995). Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. *Sci.Total Environ.* **163**, 187-190.

Wester, R. C. et Maibach, H. I. (1999a). *In vivo* methods for percutaneous absorption measurements. In Percutaneous Absorption. Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology (R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, eds.), pp. 215-227. Marcel Dekker, New York.

Wester, R. C. et Maibach, H. I. (1999b). Regional variation in percutaneous absorption. In *Percutaneous Absorption. Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology* (R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, eds.), pp. 107-116. Marcel Dekker, New York.

Withey, J. R., Law, F. C. P. et Endrenyi, L. (1993). Percutaneous uptake, distribution, and excretion of pyrene in rats. *J.Toxicol.Environ.Health* **40**, 625-636.

Yang, J. J., Roy, T. A. et Mackerer, C. R. (1986). Percutaneous absorption of benzo(a)pyrene in the rat: comparison of *in vivo* and *in vitro* results. *Toxicol. Ind. Health* **2**, 409-416.