



HAL
open science

Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme

Caroline Marie

► **To cite this version:**

Caroline Marie. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Autre [q-bio.OT]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00196858

HAL Id: tel-00196858

<https://theses.hal.science/tel-00196858>

Submitted on 13 Dec 2007

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.

THESE

présentée par

Caroline MARIE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I.

Ecole doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

SPECIALITE : Santé Environnement

Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme

Directeurs de thèse : Pr. Anne MAITRE et Dr. Jean-Luc RAVANAT

Date de soutenance : 25 octobre 2007

Jury :

Dr. Robert TURESKY, Wadsworth Center, Albany, USA
Pr. Claude VIAU, Université de Montréal, Montréal, Canada
Pr. Alain FAVIER, Université Joseph Fourier de Grenoble
Pr. Anne MAITRE, Université Joseph Fourier de Grenoble
Dr. Jean-Luc RAVANAT, CEA de Grenoble

Rapporteur
Rapporteur
Président
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Thèse financée par l'ADEME et le CEA, et préparée dans les laboratoires :

Environnement et Prédiction de la Santé des Populations, TIMC (UMR 5525), Faculté de Médecine, La Tronche et Lésions des Acides Nucléiques, LCIB/DRFMC (UMR-E 3 CEA-UJF), CEA/Grenoble.

Remerciements

Je tiens à remercier vivement Anne MAITRE, professeur de Médecine et Santé au Travail à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, pour avoir été l'initiatrice de ce projet de recherche et pour son encadrement sur l'aspect médical de cette thèse. Je la remercie pour m'avoir fait entrer dans le monde de la toxicologie, et pour sa confiance en mes capacités et mon travail.

Je remercie chaleureusement Jean-Luc RAVANAT, ingénieur de recherche au Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (LAN), pour son encadrement sur l'aspect fondamental de cette thèse. Je le remercie particulièrement pour sa grande disponibilité, sa toujours bonne humeur et son soutien de tous les jours qui m'ont beaucoup aidée pour la réalisation de ce travail.

Je souhaite remercier l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) pour avoir participé au financement de cette thèse, et Hélène DESQUEYROUX, ingénieur à l'ADEME, pour le suivi régulier de l'avancement des travaux.

J'exprime mes remerciements à Alain FAVIER et Jacques DEMONGEOT pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de leurs laboratoires. Je remercie plus particulièrement Alain FAVIER pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et pour son intérêt dans mon travail malgré ses multiples activités.

Je remercie également les autres membres du jury, Robert TURESKY et Claude VIAU, pour avoir accepté de juger mon travail en étant les rapporteurs de cette thèse, et pour s'être déplacés de loin pour ma soutenance.

Je souhaite remercier Thierry DOUKI, nouveau directeur du LAN, pour ses précieux conseils scientifiques tout au long de ces trois années.

Je tiens à remercier également les personnes qui m'ont aidée d'un point de vue technique dans mon travail : Franck BALDUCCI pour son aide importante lors des analyses statistiques, Martial BILLON, pour son expertise en électrochimie, Marie MARQUES pour sa précieuse aide sur la mise au point des dosages urinaires, Pascale GUIRAUD pour m'avoir fourni les lignées cellulaires utilisées dans ce travail, Jean-Luc Laffont et les internes de pharmacie pour leur aide lors des prélèvements sanguins.

J'exprime mes remerciements chaleureux à Mathilde GATEAU pour sa contribution efficace à la synthèse des adduits de l'ADN lors de son stage de licence professionnelle, et Adeline TARANTINI, doctorante au laboratoire TIMC, pour son aide en culture cellulaire.

Je souhaite remercier Pascale PALENZUELA et Zohra TERMACHE pour leur efficacité sur le plan administratif, et Sylvette LIAUDY pour son aide lors des recherches bibliographiques.

Je remercie Sarah MONTLEVIER et Muriel STOKLOV pour m'avoir initiée aux prélèvements atmosphériques lors de l'intervention au tunnel du Mont-Blanc.

Je tiens à remercier également tous les volontaires qui ont accepté de participer aux prélèvements d'échantillons biologiques, et qui ont ainsi contribué aux résultats de cette thèse.

Je souhaite remercier sans exception toutes les personnes du LAN pour l'excellente ambiance du laboratoire qui a permis la réalisation de ce travail dans des conditions très agréables. J'adresse une pensée particulière aux autres occupants du labo rose, Stéphane MOURET et Olivier FALLETTI, pour toutes les joies et frayeurs partagées autour du spectromètre de masse !

Je tiens à remercier plus particulièrement certaines personnes pour l'amitié que nous avons tissée au cours de ces trois années : les ex-thésards du LAN, Peggy REGULUS et Jean-François MILLAU, pour avoir été mes modèles et m'avoir acceptée dans le cercle des « soirées Lost » ! Mathilde GATEAU et Adeline TARANTINI pour leur gentillesse et leur complicité. Anne-Laure RAFFIN, pour son amitié et pour avoir assuré ma relève en tant que secrétaire d'AITAP ! Christine SAINT-PIERRE pour sa grande gentillesse et pour tous nos échanges artistiques. Sans oublier Sylvain CAILLAT grâce à qui la culture des noix n'a plus de secret pour moi, et Yves N'ZENGUE pour sa précieuse compagnie dans le bureau des étudiants de la fac !

Je souhaite également remercier vivement tous mes amis Grenoblois avec qui j'ai passé trois années formidables, et parmi eux : Tiphaine et Romain pour toutes ces belles randonnées, Estelle et Camille pour notre passion commune : la danse ! et Gut et Myriam pour les bons repas mexicains !

Je remercie infiniment mes parents et mes frères Julien et Hugo pour leur soutien de toujours et sans qui je n'aurais pas pu réaliser cette thèse. Et un grand merci à mes parents pour l'organisation du pot le jour de ma soutenance !

Enfin, je remercie Matthieu, ma plus belle découverte de thèse, pour son soutien et sa grande contribution à ma motivation de tous les jours pour la réussite de ce travail !

Sommaire

Liste des abréviations utilisées	3
Chapitre 1 – Introduction bibliographique	9
I- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	9
II- Métabolisme du B[a]P et cancérogénèse	15
III- Conséquences biologiques des lésions de l'ADN	30
IV- Méthodes de dosage des lésions de l'ADN	42
V- Surveillance biologique de l'exposition aux HAP chez l'homme : notion de biomarqueurs.....	50
VI- Conclusion et objectifs de la thèse	71
Chapitre 2 – Synthèse des adduits de l'ADN du B[a]P et mise au point d'une méthode de dosage par CLHP-SM/SM	75
Chapitre 3 – Etude des adduits de l'ADN du B[a]P dans l'ADN isolé et cellulaire	101
A- Etude des adduits de l'ADN dans l'ADN isolé	101
B- Etude des adduits de l'ADN dans les cellules HaCat et HepG2.....	106
Chapitre 4 – Etude de différents biomarqueurs pour le suivi de l'exposition aux HAP chez l'homme.....	131
A- Etude du 1-OHP et des lésions oxydatives urinaires	131
B- Etude de nouveaux biomarqueurs d'exposition urinaires spécifiques du B[a]P.....	153
C- Recherche des adduits de l'ADN du B[a]P dans les cellules sanguines mononuclées de sujets fumeurs	174
Chapitre 5- Conclusion générale et perspectives	183
Références bibliographiques	189
Publications et communications.....	205
Table des matières	207

Liste des abréviations utilisées

- Ade : Adénine
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADP : Adénosine diphosphate
- AhR : Arylhydrocarbures
- AKR : Aldo-kéto réductase(s)
- ARN : Acide ribonucléique
- ATP : Adénosine triphosphate
- B[a]P : Benzo[a]pyrène
- BAR : Bombardement atomique rapide
- BPDE : 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo[a]pyrene
- CIRC : Centre international de recherche sur le cancer
- CLHP : Chromatographie liquide haute performance
- COL : Gaz de collision
- Cyt : Cytosine
- Cyt. : Cytochrome(s)
- dAdo : 2'-désoxyadénosine
- dCyd : 2'-désoxycytidine
- dGuo : 2'-désoxyguanosine
- DL₅₀ : Dose létale 50
- DMF : Diméthylformamide
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- DSDP : Début de semaine début de poste
- EC : Energie de collision
- EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique
- EL : Détection par électrochimie
- ELISA : pour Enzyme linked immunosorbent assay (Test immuno-enzymatique)
- ERO : Espèce(s) réactive(s) de l'oxygène
- ET : Ecart-type
- FLNS : pour Fluorescence line-narrowing spectroscopy (Spectroscopie de fluorescence par excitation selective par laser à très basse temperature)
- Fluo : Détection de fluorescence

- Fluo laser : Détection de fluorescence induite par laser à basse température
- FSDP : Fin de semaine début de poste
- FSFP : Fin de semaine fin de poste
- GST : glutathion synthétyl-transférase(s)
- Gua : Guanine
- Guo : Guanosine
- HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
- LD : Limite(s) de detection
- Md : Médiane
- MeOH : Méthanol
- Moy : Moyenne
- MRM : pour Multiple Reaction Monitoring (Suivi de réactions multiples)
- MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium
- m/z : Masse/charge
- N : Effectif
- NEB : Gaz nébulisateur
- 3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrène
- 1-OHP : 1-hydroxypyrene
- 8-oxodGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
- 8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine
- 8-oxoGuo : 8-oxo-7,8-dihydroguanosine
- p : valeur de significativité
- PBS : pour Phosphate buffered saline (Tampon phosphate)
- RCT : Réparation couplée à la transcription
- REB : Réparation par excision de base
- REN : Réparation par excision de nucléotides
- RGG : Réparation globale du génome
- RID : Gaz rideau
- S/B : Signal/bruit
- SM/SM : Détection par spectrométrie de masse en mode tandem
- T : Température
- TEA : Triéthylamine
- THF : Tétrahydrofurane

- Thy : Thymine
- TR : Temps de rétention
- UDP : Uracile diphosphate
- VI : Voltage d'ionisation
- VME : Valeur moyenne d'exposition
- Δ jour : taux de variation sur une journée
- Δ sem : taux de variation sur une semaine

Chapitre 1

Introduction bibliographique

Chapitre 1 – Introduction bibliographique

I- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

I-1 Définition

Les HAP sont une famille de plus d'une centaine de composés caractérisés par la présence d'au moins deux cycles aromatiques plus ou moins substitués. Ces molécules sont issues de la décomposition de la matière organique à des températures très élevées, de l'ordre de 1000°C, lors de phénomènes de combustions incomplètes. Selon leur nombre de cycles et donc leur poids moléculaire, les HAP sont présents dans l'atmosphère sous deux formes, gazeuse pour les plus légers (entre deux et quatre cycles), et particulaire pour les plus lourds (de quatre cycles et plus). Les HAP particulaires représentent entre 70 et 80% des HAP totaux de l'atmosphère et sont adsorbés à la surface de particules essentiellement carbonées en suspension dans l'air. Les analyses de l'aérosol particulaire montrent que plus de 50% des HAP totaux sont adsorbés sur les particules fines de moins de 0,5 µm (Rehwagen et al. 2005). De façon plus précise, la plus forte proportion d'HAP par unité de masse particulaire est observée dans la fraction des particules ultra-fines inférieures à 0,11 µm (Kawanaka et al. 2004). Ceci est une caractéristique importante des HAP puisque les particules fines et ultra-fines sont capables de pénétrer en profondeur dans le système broncho-pulmonaire. Enfin, du fait de leur structure aromatique, les HAP sont caractérisés par une très grande lipophilie qui facilite leur pénétration et leur diffusion dans l'organisme, au travers des membranes plasmiques. Les 16 HAP représentatifs des pollutions les plus souvent rencontrées selon l'agence américaine de protection environnementale, sont présentés dans la figure 1.

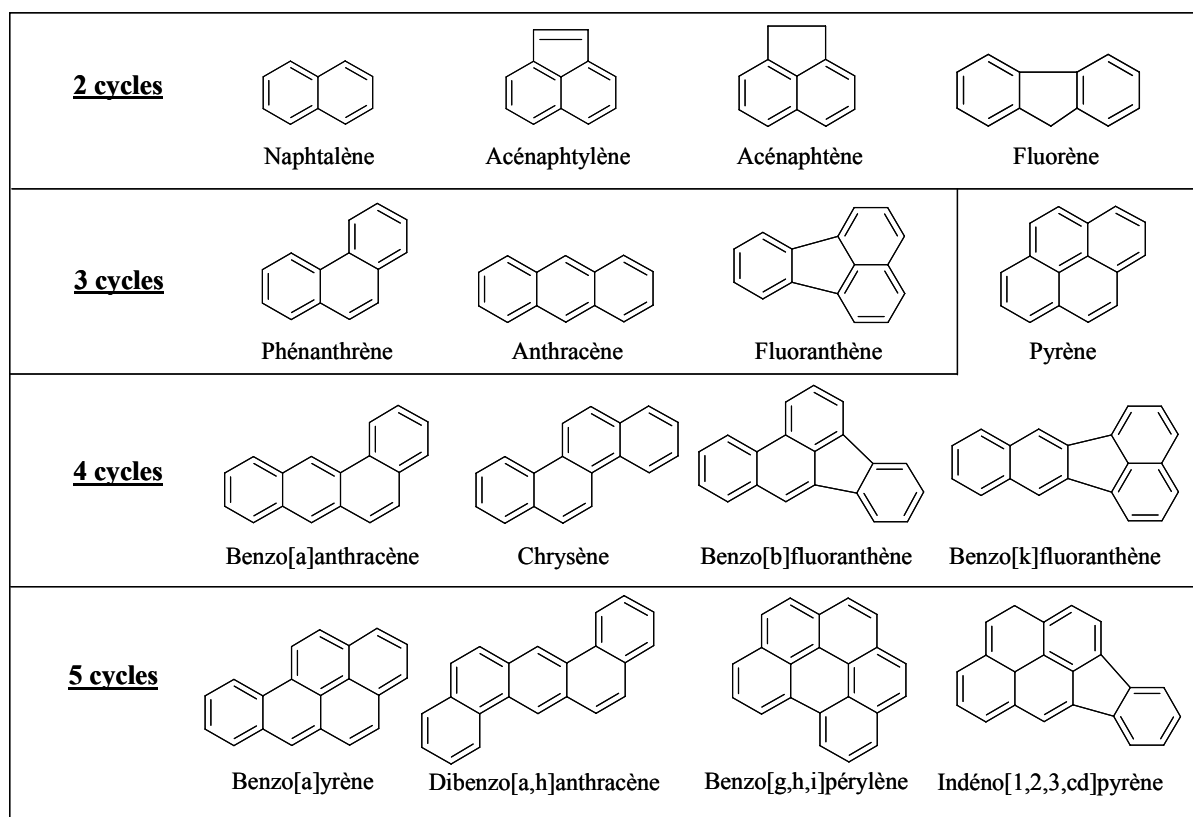


Figure 1 : Principaux HAP.

Dans le cadre de la présente thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un HAP en particulier : le benzo[a]pyrène (B[a]P) qui est un HAP à cinq cycles aromatiques (Figure 2) présent dans l'atmosphère sous forme particulaire.

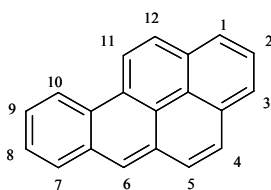


Figure 2 : B[a]P.

I-2 Les HAP dans l'environnement général

Les HAP sont ubiquitaires de l'environnement et sont issus d'une part, de combustions naturelles comme les feux de forêt ou les volcans, et d'autre part, de combustions d'origine

anthropique. Les HAP sont toujours émis sous forme de mélanges, avec des proportions entre les différents HAP variables selon la source d'émission.

Dans l'environnement général, l'ensemble de la population est exposé à de faibles niveaux d'HAP à l'échelle d'une vie entière. L'exposition provient tout d'abord de l'alimentation dans laquelle les aliments grillés et fumés sont connus pour contenir les plus forts taux d'HAP, de l'ordre de 165 ng/g. Néanmoins, plusieurs études ont montré que lorsque ces aliments n'occupent qu'une place occasionnelle dans l'alimentation, la principale source d'HAP provient des céréales et des légumes. En effet, les végétaux contiennent des quantités non négligeables d'HAP, de l'ordre de 25 ng/g, du fait de l'absorption des HAP particuliers de l'atmosphère qui se concentrent dans les parties feuillues (Phillips 1999).

Par ailleurs, l'ensemble de la population est exposée aux HAP du fait de la pollution atmosphérique en zone urbaine, principalement due aux gaz d'échappement des moteurs diesel, au chauffage urbain, et aux émissions industrielles. Les niveaux atmosphériques de B[a]P en zone urbaine varient entre 0,05 et 1 ng/m³ d'air en été, et sont environ cinq fois plus importants en hiver (Prevedouros et al. 2004). La pollution intérieure des habitats par la combustion du bois pour le chauffage et la cuisine peut atteindre des niveaux de B[a]P de 70 ng/m³ d'air (Viau et al. 2000).

Enfin, le tabagisme constitue une source importante d'exposition aux HAP. Plus de 150 HAP ont ainsi été retrouvés dans la fumée de tabac (Lee et al. 1976) et pourraient être impliqués dans les effets néfastes du tabac sur la santé (Boyle 1997). La consommation d'un paquet de cigarettes apporte entre 2 et 5 µg d'HAP par jour (Phillips 1999).

Au total, il est estimé que la dose journalière de B[a]P absorbée par des sujets non-fumeurs est de 1 µg par voie intestinale, 0,1 µg par voie respiratoire et 0,04 µg par voie cutanée (Jacob et al. 1996). Il apparaît clairement que l'alimentation est la principale source d'HAP et est environ dix fois plus importante que l'absorption respiratoire liée à la pollution atmosphérique en milieu urbain (Lodovici et al. 1995). Ceci n'est plus vrai pour les sujets fumeurs pour qui le facteur tabac est prépondérant.

I-3 Les HAP dans l'environnement professionnel

Les plus fortes expositions aux HAP sont retrouvées dans l'environnement professionnel, où les sujets sont exposés sur de plus courtes périodes que dans l'environnement général mais à des niveaux plus élevés. Les activités industrielles concernées sont diverses et comprennent : la gazéification du charbon qui permet de transformer le charbon en gaz combustible, la production de coke (graphite très pur obtenu par distillation de la houille dans un four), les procédés utilisant le goudron de houille (étanchéité des toitures, revêtements routiers...), l'application de créosote (préparation à base de houille utilisée dans le traitement du bois), la production d'aluminium ou de silicium (électrodes et pâtes de réfection des fours ou bains d'électrolyse contenant du brai de houille), la fabrication des électrodes, la production de carbure de calcium utilisé en spéléologie, et l'activité de ramonage des cheminées (Boffetta et al. 1997). Les mécaniciens, les tourneurs et les métalliers peuvent également être exposés par l'utilisation d'huiles minérales à des températures élevées et par les émissions des moteurs. Il est important de souligner que les compositions de certains produits, tels que les bitumes ou les huiles, ont évolué dans le temps et ne contiennent aujourd'hui pratiquement plus de dérivés de houille et donc d'HAP : les bitumes sont produits à partir de dérivés pétroliers et les huiles sont de plus en plus des composés semi-synthétiques.

Les résultats d'une enquête menée en 2003 sous l'égide du ministère chargé du Travail ont permis de dresser une cartographie des expositions des salariés aux principaux risques professionnels en France. Il apparaît qu'environ 1 600 000 sujets seraient professionnellement exposés aux HAP : 727 500 par les émissions des moteurs diesel, 669 100 par l'utilisation d'huiles minérales entières, 117 100 par les dérivés de goudrons de houille, et 92 900 par les procédés de métallurgie (Ministère de l'emploi 2005). Les niveaux d'exposition engendrés sont très variables d'un secteur à l'autre.

L'exposition en milieu industriel est essentiellement respiratoire et cutanée avec des concentrations de B[a]P pouvant atteindre la centaine de ng voire du μg par m^3 d'air. Ces niveaux d'exposition sont environ 1000 fois plus élevés que ceux retrouvés dans l'environnement général. En France, la valeur moyenne d'exposition (VME) au B[a]P à ne pas dépasser selon la Caisse Nationale d'Assurance Maladie en milieu professionnel est de $150 \text{ ng}/\text{m}^3$ d'air.

I-4 Effets des HAP sur la santé

Les HAP présentent une faible toxicité aiguë et sont connus pour être phototoxiques (Wang et al. 2007). Leurs effets sur la santé sont principalement de type chronique liés à la cancérogénicité de ces composés. Selon les résultats d'études épidémiologiques, il a été démontré dans divers secteurs professionnels que l'exposition aux HAP entraîne une augmentation du risque de survenue de cancers du poumon, de la peau et de la vessie (Mastrangelo et al. 1996; Boffetta et al. 1997). En France, ces cancers sont reconnus comme maladies professionnelles dues à l'exposition aux HAP.

En environnement, une corrélation significative entre les HAP contenus dans les cigarettes et le cancer du poumon a également été établie (Denissenko et al. 1996).

I-5 Règlementation

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et l'Union Européenne (UE) proposent des classifications des produits cancérogènes. En France, seule la classification de l'UE a une valeur réglementaire en milieu professionnel. Ces classifications sont présentées ci-dessous.

Classification du CIRC :

- *Catégorie 1* : cancérogène pour les humains.
- *Catégorie 2A* : cancérogène probable pour les humains.
- *Catégorie 2B* : cancérogène possible pour les humains.
- *Catégorie 3* : classification impossible quant au pouvoir cancérogène pour les humains.
- *Catégorie 4* : probablement non cancérogène pour les humains.

Classification de l'UE :

- *Catégorie 1* : substances que l'on sait être cancérogènes pour l'homme.
- *Catégorie 2* : substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'homme.

- *Catégorie 3* : substances préoccupantes pour l’homme en raison d’effets cancérogènes possibles mais pour lesquelles les informations disponibles ne permettent pas une évaluation satisfaisante.

Le CIRC et l’UE ont ainsi classé certains HAP, produits ou activités professionnelles qui entraînent un risque cancérogène chez l’homme. Les données épidémiologiques obtenues chez l’homme pour le B[a]P ont permis au CIRC de classer cet HAP dans le groupe 1 en 2005 (Straif et al. 2005). Dans la classification de l’UE, le B[a]P appartient encore à la catégorie 2, au même titre que sept autres HAP (Tableau 1).

Tableau 1 : Classifications du CIRC et de l’UE de différents produits, secteurs d’activités et HAP.

Produits et secteurs d’activités	CIRC	UE
Goudron et brai de houille	1	1
Huiles minérales	1	1
Suies	1	
Fumée de tabac	1	
Cokerie, aluminium	1	1
Gazéification du charbon	1	1
Fonderie de fer et d’acier	1	
Créosote	2A	
Emissions diesel	2A	2
Raffinage du pétrole	2A	
Extraits noir de charbon	2B	
Emissions essence	2B	
HAP		
Benzo[a]anthracène	2A	2
Benzo[a]pyrène	1	2
Benzo[e]pyrène	2B	2
Dibenzo[a,h]anthracène	2A	2
Benzo[b]fluoranthène	2B	2
Benzo[j]fluoranthène	2B	2
Benzo[k]fluoranthène	2B	2
Chrysène	3	2
Indéno[1,2,3,c,d]pyrène	2B	
Naphtalène	2B	

La classification récente du B[a]P dans le groupe 1 par le CIRC indique que sa cancérogénicité est avérée chez l’homme. Afin de mieux comprendre les effets néfastes de cet

HAP sur la santé, nous présenterons dans la partie suivante les mécanismes de son action cancérigène.

II- Métabolisme du B[a]P et cancérogénèse

Lorsque le B[a]P est absorbé dans l'organisme par voie respiratoire, digestive ou cutanée, il est pris en charge par les systèmes enzymatiques de métabolisation : les mécanismes impliqués ont pour rôle de transformer le B[a]P hydrophobe en un composé plus hydrophile permettant son élimination dans l'urine ou les fèces. Le B[a]P est ainsi transformé par les cytochromes (cyt.) P450 lors de la phase I de la métabolisation, et les métabolites issus de cette transformation sont éliminés lors de la phase II dite de conjugaison. Cependant, suite à la transformation du B[a]P lors de la phase I, certains métabolites formés acquièrent des propriétés électrophiles qui les rendent capables de se fixer aux sites nucléophiles des macromolécules de l'organisme. La phase I qui permet la transformation du B[a]P stable en métabolites actifs chimiquement est ainsi appelée phase d'activation métabolique. Les macromolécules cibles de ces composés électrophiles comprennent les lipides, les protéines, l'acide ribonucléique (ARN) et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Le produit d'addition par liaison covalente d'un métabolite actif du B[a]P sur une macromolécule est appelé adduit. Parmi les différents types de macromolécules cités l'ADN est la plus importante dans la mesure où toute altération de sa structure peut modifier l'information génétique à sa source et avoir ainsi des conséquences irréversibles. La cancérogénicité des HAP réside dans leur capacité à former des adduits de l'ADN. Le métabolisme du B[a]P est représenté de façon simplifiée dans la figure 3.

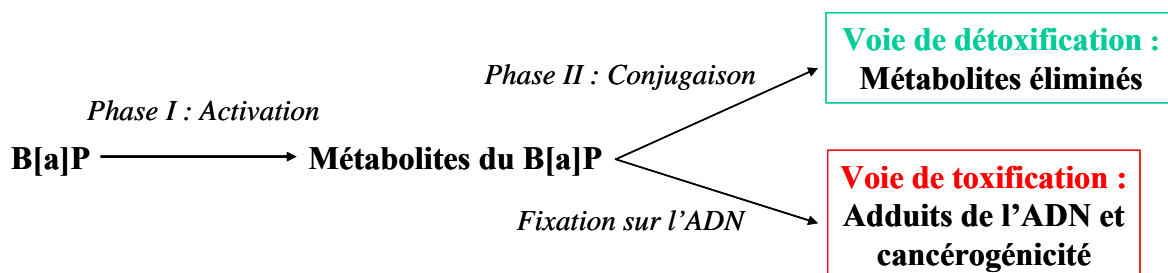


Figure 3 : Métabolisme simplifié du B[a]P.

II-1 Les voies d'activation métabolique du B[a]P

La phase I d'activation métabolique comprend trois voies présentées dans la figure 4 et détaillées une par une par la suite.

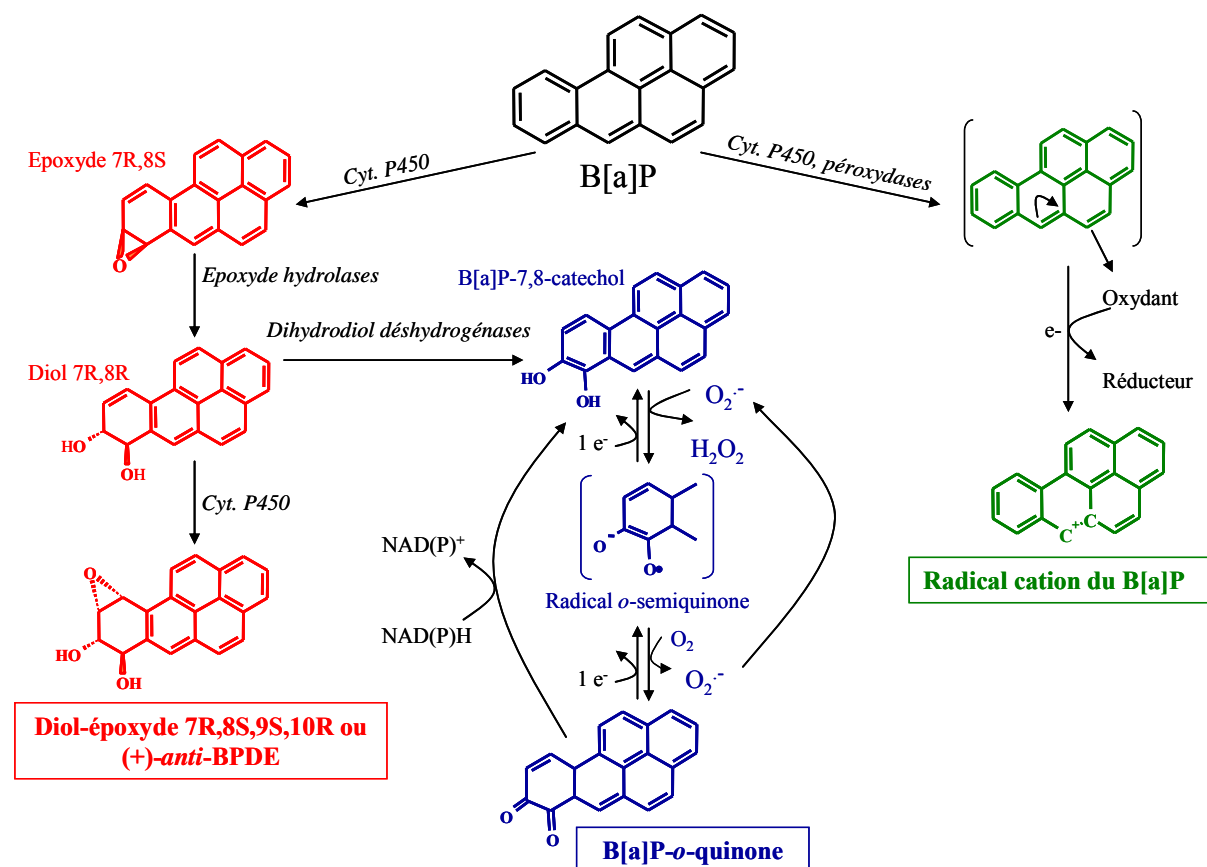


Figure 4 : Voies d'activation métabolique du B[a]P.

II-1-a La voie de mono-oxygénation par les cyt. P450

Cette voie métabolique implique les cyt. P450 qui métabolisent les HAP par des réactions de mono-oxygénation. Les cyt. P450 désignent une famille de mono-oxygénases ; plus de 400 protéines sont connues pour appartenir à cette famille et chez l'homme, une cinquantaine de gènes codants pour ces protéines ont été découverts. Les cyt. P450 sont des hémoprotéines associées à des flavoprotéines liées à la membrane interne du réticulum endoplasmique lisse.

Les cyt. P450 sont fortement exprimés dans le foie mais également dans divers organes, tels que les poumons, le tractus gastro-intestinal, la peau, les reins, etc... Des études *in vitro* effectuées sur différents types de cyt. isolés ont montré que la mono-oxygénation des xénobiotiques est principalement catalysée par les cyt. P450 1A1, et 1B1. Ces cyt. seraient exprimés majoritairement dans les tissus extra-hépatiques comme les poumons et les glandes mammaires. Dans le foie, le cyt. le plus abondant pour la mono-oxygénation des xénobiotiques serait le cyt. P450 1A2 (Xue et al. 2005).

Tous les HAP ne sont pas métabolisés par les cyt. P450 puisque des conditions structurales sont nécessaires pour permettre une prise en charge par ces enzymes. Les HAP doivent comprendre une région baie, comme le B[a]P, ou une région fjord (Figure 5) qui correspondent à des « creux » dans leur squelette carboné (Baird et al. 2005).

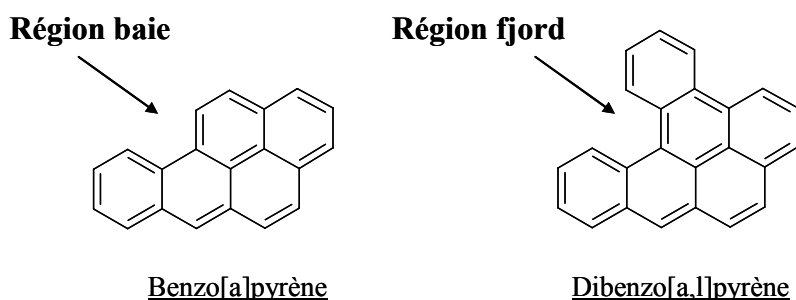


Figure 5 : régions baie et fjord des HAP.

La métabolisation du B[a]P par les cyt. P450 entraîne la formation d'un époxyde sur les carbones C7 et C8 par mono-oxygénation. L'hydrolyse de cet époxyde conduit à la formation d'un diol qui, après une nouvelle époxydation sur les carbones C9 et C10 par les cyt. P450, se transforme en un diol-époxyde, ou 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE), encore appelé métabolite ultime du B[a]P pour sa réactivité vis-à-vis de l'ADN. Cet époxyde comporte deux diastéréoisomères *syn* et *anti*. Chacun des deux diastéréoisomères possède également deux énantiomères optiquement actifs (+) ou (-), ce qui conduit à l'existence de quatre isomères du BPDE (Geacintov et al. 1997). Dans des fractions microsomales de foie de rat, la stéréosélectivité des enzymes des cyt. P450 entraîne presque exclusivement la formation de l'époxyde 7R,8S (Yang 1988) qui est ensuite hydrolysé préférentiellement en diol 7R,8R (Levin et al. 1980). Les fractions microsomales

correspondent à des fragments de réticulum endoplasmique qui peuvent-être isolés des tissus par ultra-centrifugation (Luch 2004). Le diol 7R,8R est finalement converti majoritairement en diol-époxyde 7R,8S,9S,10R, soit l'isomère (+)-*anti*-BPDE dans des fractions microsomales de foie de rat (Xue et al. 2005). La voie de formation de ce diol-époxyde est représentée dans la figure 4.

A chaque stade du processus de bioactivation, les diols formés ainsi que les époxydes après hydrolyse peuvent être également éliminés sous forme conjuguée dans les fèces et l'urine. Cette phase d'élimination sera détaillée en partie B-II-2.

Notons que les cyt. P450 ne participent pas uniquement à l'activation métabolique des HAP par la formation de diol-époxydes. D'autres activités enzymatiques, telles que des hydroxylations, permettent la formation de dérivés phénoliques du B[a]P tels que le 3-hydroxybenzo[a]pyrène (3-OHB[a]P) (Besarati Nia et al. 2002). Ces composés non électrophiles ne sont pas réactifs vis-à-vis de l'ADN et sont éliminés après conjugaison.

II-1-b La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases

Le mécanisme chimique de cette voie est basé sur l'arrachement d'un électron au B[a]P via une oxydation mono-électronique par les activités peroxydases des cyt. P450. Elle conduit à la formation de radicaux cations du B[a]P électrophiles et réactifs vis-à-vis de l'ADN. Trois caractéristiques communes aux HAP entraînent la formation de radicaux cations et leur réactivité vis-à-vis de l'ADN (Cavalieri et al. 1998) :

- Un potentiel d'ionisation bas qui permet l'arrachement d'un électron et la formation d'un radical cation relativement stable. La valeur de 7,35 eV a été proposée comme valeur de potentiel d'ionisation maximale pour permettre ce mécanisme (Cavalieri et al. 1992). Le B[a]P possède un potentiel d'ionisation de 7,23 eV.
- La localisation de la charge sur le radical cation qui rend cette espèce intermédiaire plus réactive vis-à-vis des molécules nucléophiles. Dans le cas du B[a]P, la charge est localisée régio-spécifiquement sur le carbone C6. Ceci s'explique par le fait que la condensation des cycles benzéniques réduit la délocalisation des électrons et entraîne des positions inégales de distribution électronique. Lorsqu'un électron est arraché, c'est l'atome de

carbone possédant la plus forte densité électronique qui va céder son électron et prendre une charge positive.

- Une configuration géométrique optimale qui permet leur intercalation dans l'ADN, ce qui favorise la formation de liens covalents avec les sites nucléophiles de l'ADN.

D'autres HAP peuvent être métabolisés selon cette voie : le dibenzo[a,l]pyrène par exemple qui possède également un potentiel d'ionisation bas de 7,27 eV.

II-1-c La voie de formation des quinones du B[a]P par les aldo-kéto réductases (AKR)

La troisième voie métabolique met en jeu des dihydrodiol déshydrogénases de la famille des AKR qui métabolisent le B[a]P-diol en catéchol. Suite à des réactions d'oxydo-réduction le catéchol est transformé en benzo[a]pyrène-7,8-dione ou B[a]P-*o*-quinone, espèce électrophile réactive vis-à-vis de l'ADN (Xue et al. 2005). Les quinones possèdent également une forte réactivité pour les thiols, le glutathion et la cystéine, permettant la formation de conjugués hydrosolubles facilement éliminés. De plus, cette voie métabolique entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

II-2 L'élimination des métabolites du B[a]P par conjugaison

Comme nous venons de le voir, le métabolisme du B[a]P est complexe et entraîne la formation de nombreux métabolites, de type phénols en 1-, 3-, 7- et 9-, diols en 4,5-, 7,8- et 9,10-, quinones en 1,6-, 3,6-, et 6,12-, ou encore triols, tétraols et époxydes du B[a]P (Peltonen et al. 1995). La phase II de conjugaison permet l'élimination urinaire de ces métabolites sous forme glucurono- (Figure 6A), ou sulfo-conjuguée (Figure 6B), mais aussi après liaison au glutathion qui prend en charge les composés électrophiles comme les époxydes, les radicaux cations, et les quinones (Figure 6C). Des combinaisons sont ensuite possibles entre ces voies de conjugaison donnant lieu à des composés di-sulfates ou di-

glucuronides ou encore sulfo-glucuronide. Concernant la conjugaison au glutathion, il ne s'agit pas de la forme majoritaire retrouvée dans l'urine, car le conjugué du glutathion subit des transformations métaboliques aboutissant à l'excrétion urinaire finale de conjugués de la N-acétyl-cystéine ou acide mercapturique (Haufrond et al. 2005). L'étude des métabolites urinaires excrétés par des rats soumis à une dose unique de B[a]P marqué au ^{14}C montre que les conjugués de la N-acétyl-cystéine représentent 50% de la radioactivité totale excrétée, les conjugués sulfo-glucuronidés 30%, et un conjugué du glutathion n'a été retrouvé qu'à l'état de traces (Yang et al. 1999).

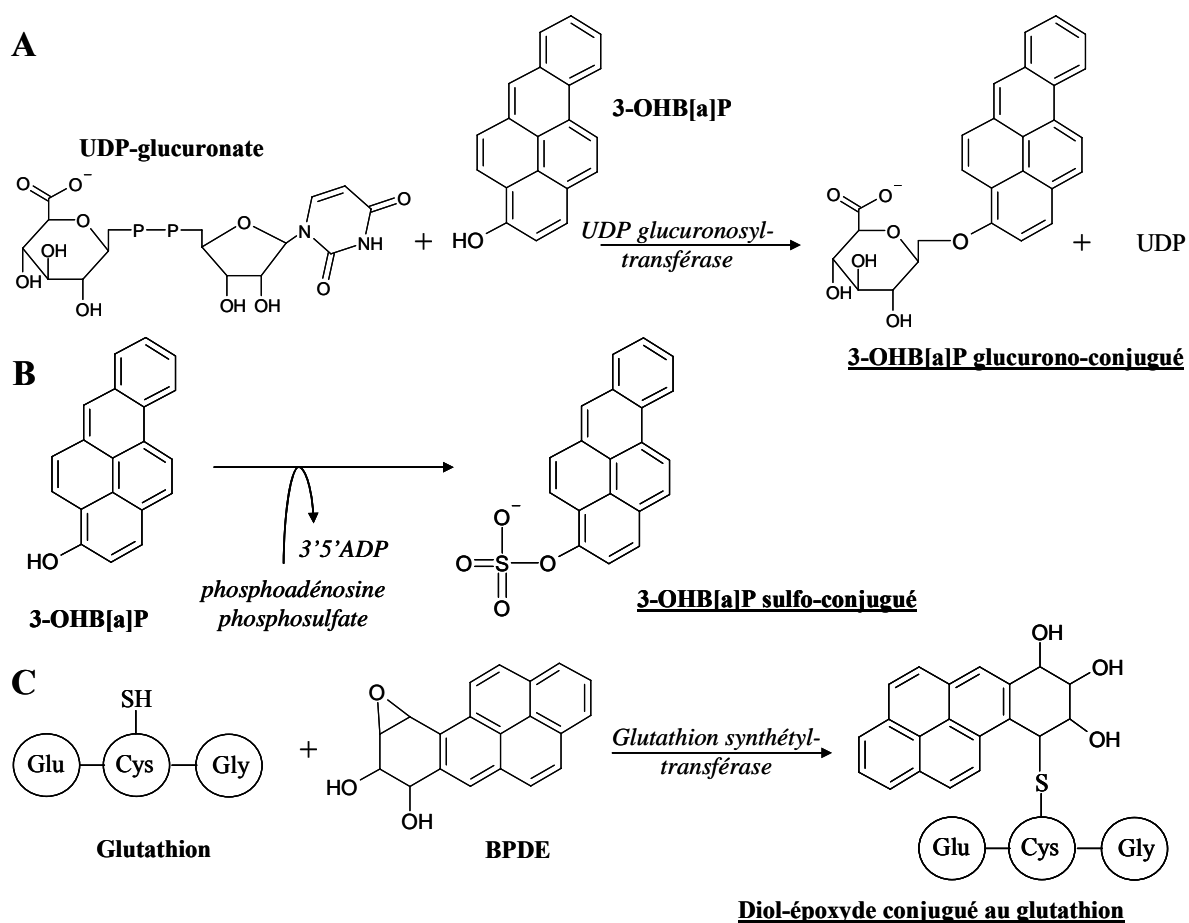


Figure 6 : voies de conjugaison des métabolites du B[a]P avec l'exemple du 3-OHB[a]P et du BPDE. A : glucurono-conjugaison, B : sulfo-conjugaison, C : conjugaison au glutathion.

II-3 La formation des lésions de l'ADN

Le BPDE, le radical cation du B[a]P ou encore la B[a]P-*o*-quinone formés lors de la phase I d'activation du B[a]P possèdent des propriétés électrophiles qui les rendent capables de se lier à l'ADN.

Les sites de l'ADN concernés par ces additions correspondent aux différents sites nucléophiles des acides nucléiques. Les nucléosides puriques comprenant la 2'-désoxyguanosine (dGuo) et la 2'-désoxyadénosine (dAdo) sont plus réactifs que les nucléosides pyrimidiques parmi lesquelles seule la 2'-désoxycytidine (dCyd) possède un site nucléophile.

Il existe donc plusieurs sites de formation de liaisons covalentes possibles entre un métabolite actif du B[a]P et les bases de l'ADN. La localisation de cette liaison détermine la stabilité d'un point de vue chimique de l'adduit formé. Certains adduits, comme ceux en position N2 du groupement exocyclique de la dGuo, sont stables et ne peuvent être éliminés que s'ils sont pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN. D'autres adduits, notamment ceux en position N7 de la guanine (Gua), sont caractérisés par une instabilité chimique qui entraîne la rupture spontanée du lien N-glycosidique et ainsi la formation d'un site abasique par la perte de la base lésée (Figure 7).

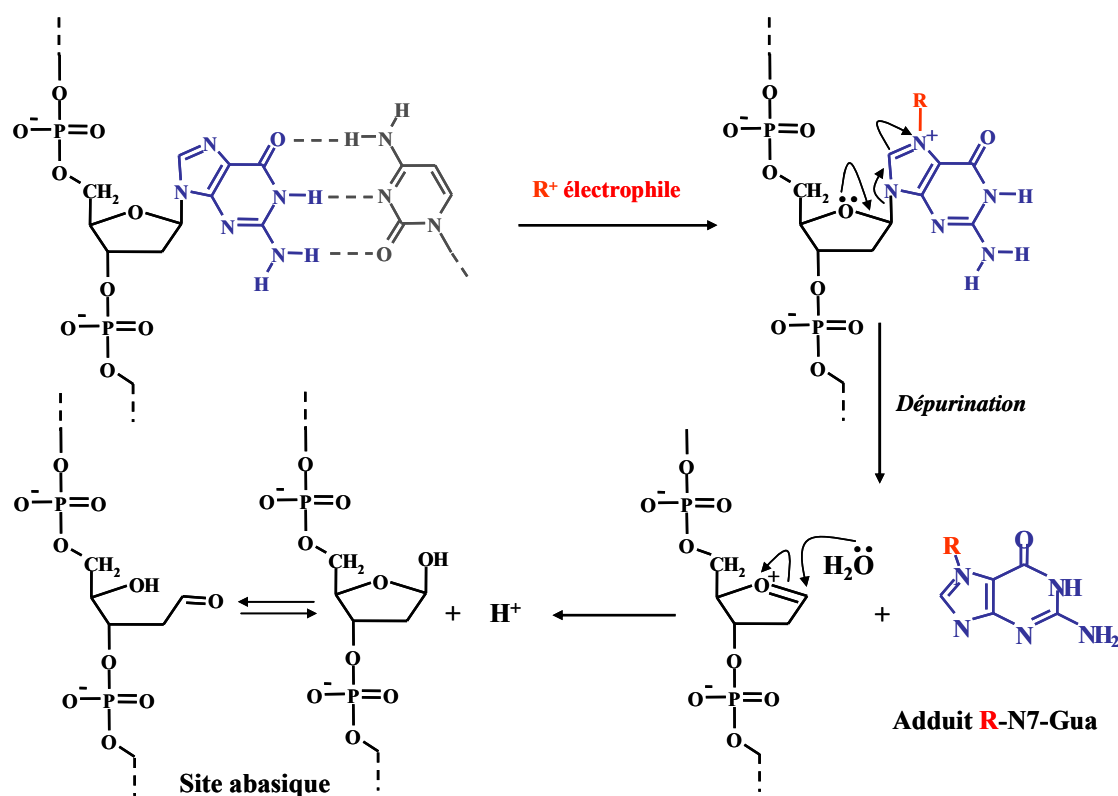


Figure 7 : Représentation de la dépurination d'un adduit formé en N7 de la Gua par un électrophile R^+ .

Il s'agit à présent de détailler les lésions de l'ADN spécifiques de chacune des trois voies métaboliques d'activation du B[a]P.

II-3-a Les adduits de la voie du BPDE

Le BPDE réagit préférentiellement sur les groupements amines exocycliques des acides nucléiques de l'ADN, soit les atomes N2 de la dGuo, N6 de la dAdo, et N4 de la dCyd (Dipple 1994). Dans une moindre mesure, des adduits dépurinants peuvent se former sur l'atome N7 de la Gua (Xue et al. 2005). Les adduits correspondants sont présentés dans la figure 8.

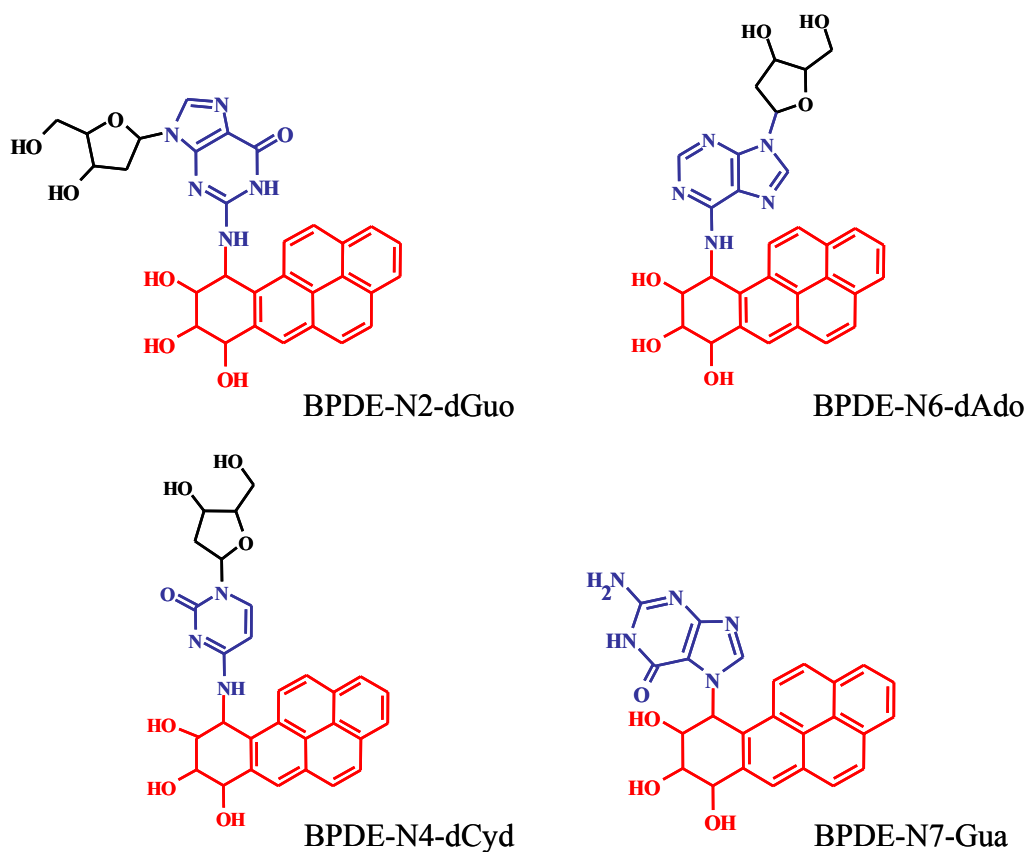


Figure 8 : Principaux adduits de l'ADN du BPDE.

Par ailleurs, nous avons vu qu'il existe quatre isomères du BPDE. Chaque isomère peut donner naissance à deux adduits, *cis* ou *trans* selon l'ouverture de l'époxyde lors de la réaction sur l'ADN. Ces deux types d'adduits sont représentés ci-dessous pour le (+)-*anti*-BPDE (Figure 9).

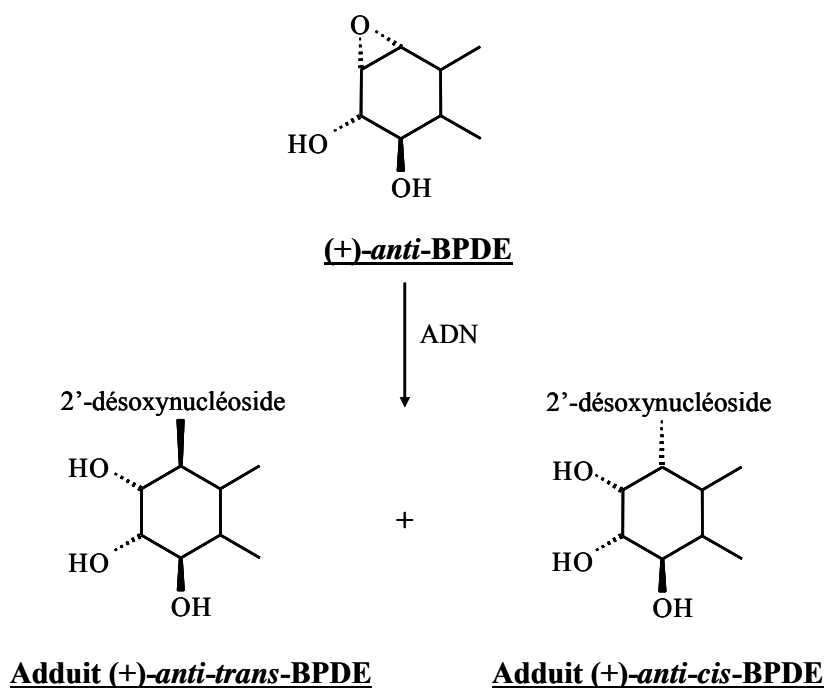


Figure 9 : Conformation des adduits *cis* et *trans* formés à partir du (+)-*anti*-BPDE

Chacun des quatre isomères du BPDE peut ainsi former deux adduits pour chaque site de fixation sur l'ADN, ce qui entraîne la formation potentielle de huit isomères ou quatre paires de diastéréoisomères pour chaque adduit.

Le (+)-*anti*-BPDE est l'isomère du BPDE le plus réactif vis-à-vis de l'ADN, et il est majoritairement responsable de la formation des adduits du BPDE dans des modèles cellulaires et animaux en présence de B[a]P (Dipple 1994). Il est de plus le plus mutagène des quatre isomères dans des modèles cellulaires de mammifères (Geacintov et al. 1997) et le plus tumorigène chez la souris (Buening et al. 1978; Kapitulnik et al. 1978). Ces différences d'activité biologique pourraient être liées à des conformations différentes des adduits selon l'isomère du BPDE impliqué (Banasiewicz et al. 2004).

II-3-b Les adduits du radical cation du B[a]P

Les adduits de l'ADN formés par action du radical cation du B[a]P ont pu être identifiés à partir de différentes synthèses. A l'inverse du BPDE, stable chimiquement bien que très réactif, le radical cation du B[a]P est une espèce chimique très instable. Les adduits du radical

cation ne peuvent donc être formés que si le radical cation est produit en présence d'ADN ou de nucléosides. La formation du radical cation du B[a]P par électrochimie en présence de dGuo apparaît comme l'approche permettant la formation du plus grand nombre d'adduits. Les adduits dépurinants B[a]P-N7-Gua, B[a]P-C8-Gua ainsi que les adduits stables B[a]P-C8-dGuo, B[a]P-N2-dGuo et B[a]P-N3-dGuo ont ainsi pu être obtenus. En présence de dAdo, seule la formation de l'adduit dépurinant de l'adénine (Ade) B[a]P-N7-Ade est observée (Ramakrishna et al. 1992). *In vivo*, sur de la peau de souris traitée au B[a]P, il apparaît que les adduits du radical cation sont majoritairement dépurinants (Chen et al. 1996). Les différents adduits de cette voie sont représentés ci-dessous (Figure 10).

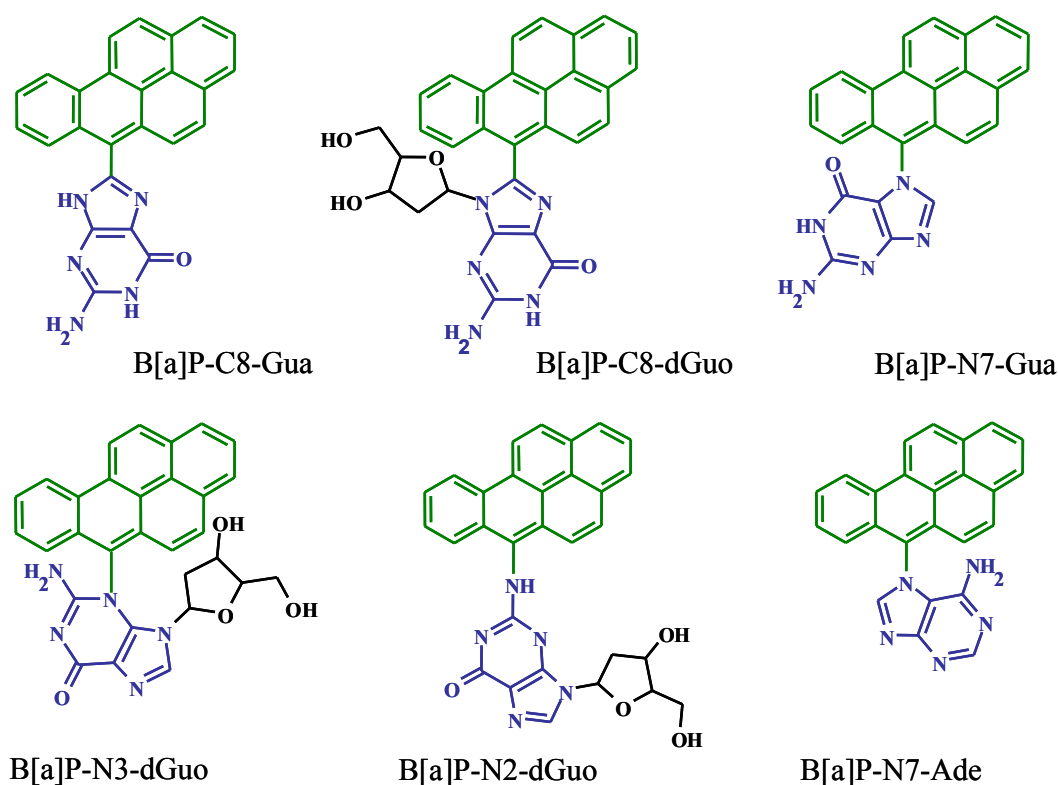


Figure 10 : Principaux adduits de l'ADN du radical cation du B[a]P.

II-3-c La génotoxicité de la voie des quinones du B[a]P

Du point de vue génotoxique, la B[a]P-*o*-quinone serait capable de se fixer à l'ADN. La formation de quatre adduits stables sur la dGuo, de deux adduits sur la dAdo, et d'un adduit dépurinant B[a]P-*o*-quinone-N7-Gua a ainsi été mise en évidence *in vitro* (McCoull et al. 1999). Concernant la formation des adduits de cette voie *in vivo*, une seule étude existe à ce jour et consiste en l'administration intrapéritonéale de B[a]P-*o*-quinone à des rats. Aucun adduit n'a pu être détecté dans le foie, les poumons et les leucocytes 72 h après le traitement (Balu et al. 2004).

En fait, l'action toxique majeure de cette voie pourrait être essentiellement de type oxydatif par la génération d'ERO. Parmi les ERO, le radical hydroxyle OH° , formé à partir de $\text{O}_2^{\circ-}$ et H_2O_2 , est principalement impliqué dans la génération des dommages de l'ADN. Ces dommages sont de deux types, soit le radical hydroxyle s'ajoute sur les bases de l'ADN conduisant à la formation de bases oxydées, soit il réagit avec le 2'-désoxyribose ce qui entraîne des cassures de l'ADN. De nombreuses lésions peuvent être formées suite à l'oxydation des bases de l'ADN, tant sur les purines que sur les pyrimidines. La base oxydée la plus connue est le produit d'oxydation de la dGuo en position C8 ou 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodGuo) (Figure 11).

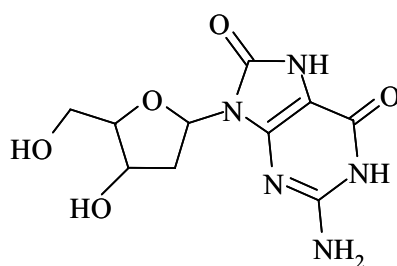


Figure 11 : 8-oxodGuo.

Le traitement d'ADN isolé avec la B[a]P-7,8-dione montre une augmentation significative de la formation de sites abasiques uniquement en conditions oxydo-réductrices. Ces sites abasiques semblent provenir essentiellement de lésions de l'ADN de type oxydatif, et leur formation est environ 100 fois plus importante que celle des sites abasiques issus des adduits

dépurinants de la B[a]P-7,8-dione formés sans conditions oxydo-réductrices (Park et al. 2006).

De plus, la fréquence des mutations du gène p53 exprimé par des levures augmente de façon dose-dépendante avec la quantité de B[a]P-7,8-dione uniquement en conditions oxydo-réductrices, ce qui confirme l'importance de la voie oxydative (Shen et al. 2006).

Par ailleurs, la voie de formation des quinones du B[a]P semble occuper une place importante dans le processus de cancérogénicité du B[a]P puisqu'il a été montré que la B[a]P-dione pourrait activer les cyt. P450 et augmenter de ce fait la formation d'adduits du BPDE par la plus grande métabolisation du B[a]P. Pour étudier les deux voies enzymatiques de l'AKR 1A1 et du cyt. P450 1B1 sur l'activation du B[a]P-diol, des cellules bronchoalvéolaires H358 n'exprimant aucune des deux enzymes sont transfectées de manière à exprimer l'une ou l'autre des enzymes ou les deux. Dans les cellules n'exprimant pas le cyt. P450 1B1, la formation de tétraol provenant de l'hydrolyse du BPDE est pourtant observée, signifiant que la B[a]P-dione pourrait être un inducteur du cyt. P450 1B1. Cette hypothèse est confirmée par la mise en évidence de l'induction de l'expression du cyt. P450 1B1 par la B[a]P-dione de façon temps et dose-dépendante. Notons que le B[a]P-diol induit cette expression de façon significativement moins importante et l'*anti*-BPDE n'entraîne aucune induction (Jiang et al. 2006). De même, cela a été mis en évidence par l'étude de la cinétique de formation des adduits du BPDE dans des cellules bronchoalvéolaires humaines H358 exprimant ou non les gènes des cyt. P450 1A1 et 1B1, et de l'AKR 1A1. Dans les cellules n'exprimant pas les cyt. P450 1A1 et 1B1, la formation des adduits du BPDE est observée avec un retard de 3 h par rapport aux cellules exprimant ces cyt., temps nécessaire à l'induction de ces enzymes par la voie métabolique impliquant l'AKR 1A1 (Ruan et al. 2007).

La voie métabolique de formation des quinones du B[a]P pourrait ainsi participer à la cancérogénicité du B[a]P par des mécanismes de type oxydatif, et par un rôle d'activation des cyt. P450.

II-4 Conclusion sur la cancérogénicité du B[a]P

Historiquement, le pouvoir cancérogène de mélanges contenant des HAP est connu chez l'homme depuis 1775, quand une relation entre l'exposition des ramoneurs à la suie et l'augmentation de l'incidence du cancer du scrotum fut mise en évidence.

La recherche moderne sur le pouvoir cancérogène des HAP débuta ensuite dans les années 1930 avec l'isolement du B[a]P à partir du goudron de houille et l'observation de l'apparition de tumeurs cutanées après des applications répétées sur de la peau de souris (Cook et al. 1933). La cancérogénicité des HAP fut reliée à leur réactivité vis-à-vis de l'ADN quelques années plus tard par l'obtention d'une corrélation positive entre le taux de fixation à l'ADN de différents HAP et leur pouvoir cancérogène sur la peau de souris (Brookes et al. 1964). Une étape clé fut ensuite franchie en observant que le B[a]P-7,8-diol pouvait se fixer sur de l'ADN isolé en quantité dix fois plus importantes que le B[a]P lui-même (Borgen et al. 1973). L'étude du métabolisme du B[a]P permit finalement d'aboutir à la conclusion que le métabolite ultime du B[a]P était un diol-époxyde et que celui-ci réagissait fortement avec l'ADN et essentiellement sur la Gua (Weinstein et al. 1976).

La cancérogénicité du B[a]P s'est ainsi précisée par la découverte de sa capacité à entraîner des dommages de l'ADN, lui conférant un rôle d'initiateur dans la formation des cancers.

En plus de l'initiation, la notion de promotion, est apparue dans les années 1940 en comparant les effets du B[a]P et du goudron de houille sur l'apparition de tumeurs sur les oreilles de lapin. Alors que le goudron de houille contient de faibles quantités de B[a]P, il pouvait en effet induire l'apparition de tumeurs bien plus rapidement que de grandes quantités de B[a]P, indiquant ainsi l'importance d'autres composés, appelés promoteurs, dans la tumorigénèse (Friedewald et al. 1944). Ceci a été confirmé par des applications uniques d'HAP en tant qu'initiateurs sur de la peau de souris suivies par des applications répétées d'huile de croton en tant que promoteur. Le croton est un végétal dont l'huile possède des propriétés purgatives. Toutefois son utilisation fut arrêtée dès la découverte de ses propriétés cancérogènes. L'huile de croton elle-même est faiblement tumorigénique, mais elle entraîne la rapide apparition de papillomes lorsqu'elle est appliquée après les HAP. A l'inverse, l'application d'huile de croton avant les HAP n'a pas d'effet. La phase d'initiation par les HAP est ainsi rapide et irréversible, tandis que la phase de promotion par l'huile de croton s'étale sur une longue période et nécessite des applications répétées (Berenblum et al. 1947).

Bien que le B[a]P soit essentiellement connu pour être un initiateur puissant, il posséderait également un rôle de promoteur, au même titre que d'autres HAP. Ce rôle de promoteur serait lié à leur affinité pour le récepteur des aryhydrocarbures (AhR), du fait de leur structure aromatique plane. Ce récepteur est un facteur de transcription activé par un ligand, qui après dimérisation avec son translocateur nucléaire, contrôle une batterie de gènes dont certains sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. L'affinité de nombreux HAP pour ce récepteur serait responsable de leur capacité à moduler la croissance cellulaire (Sjogren et al. 1996). De plus, le récepteur AhR contrôlerait également l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques tels que les gènes des cyt. P450. Les HAP pourraient ainsi induire leur propre métabolisme, et amplifier notamment leur rôle d'initiateur. Ainsi, des souris déficientes pour le gène AhR forment moins de tumeurs suite à une exposition au B[a]P. Il n'y a alors pas d'induction des cyt. P450 1A1, 1A2, et 1B1 via le récepteur AhR, si bien que ces souris n'expriment pas de niveaux importants de cyt. P450, et forment donc peu de dommages sur l'ADN (Shimada et al. 2002). Notons que l'induction du cyt. P450 1B1 par la B[a]P-dione pourrait passer également par l'activation du récepteur AhR (Jiang et al. 2006). Ceci a été démontré dans les cellules HepG2 où la B[a]P-dione est un agoniste du récepteur AhR qui se transloque dans le noyau et active la transcription du gène codant pour le cyt. P450 1B1 via un élément de réponse aux xénobiotiques (Burczynski et al. 2000). Notons que, du fait de leur affinité pour le récepteur AhR, les HAP non cancérigènes pourraient jouer un rôle de promoteur et augmenter ainsi la cancérogénicité des mélanges d'HAP contenant notamment du B[a]P.

Le processus de cancérogénèse multi-étapes comprenant les phases d'initiation et de promotion est synthétisé dans la figure 12.

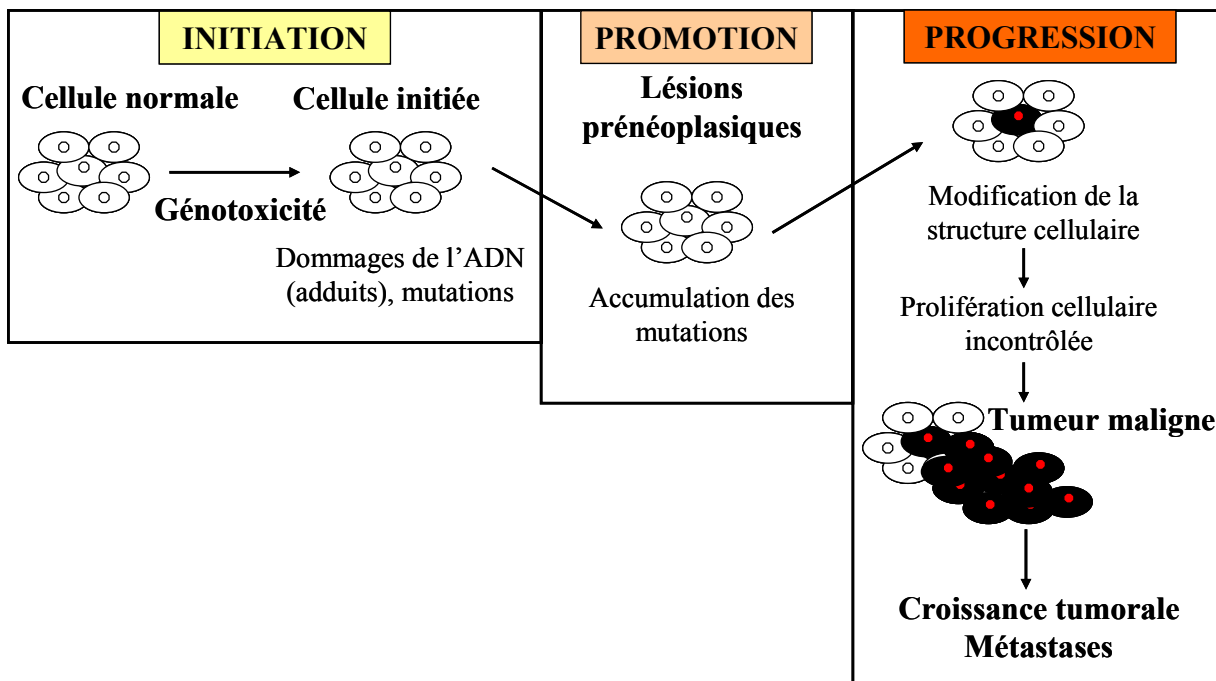


Figure 12 : Processus multi-étapes de la cancérogénèse.

Les molécules telles que le B[a]P, capables d'induire à la fois l'initiation et la promotion dans le processus de cancérogénèse, sont appelées des cancérogènes complets (Rubin 2001).

Après avoir présenté les mécanismes de formation des lésions de l'ADN, nous nous intéresserons dans la partie suivante aux conséquences de ces lésions sur les cellules.

III- Conséquences biologiques des lésions de l'ADN

III-1 Les points de contrôle du cycle cellulaire

Pour permettre la plus grande fidélité de la transmission du matériel génétique d'une cellule mère à ses cellules filles, des mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome ont été mis en place au cours de l'évolution. Il existe ainsi des points de contrôle au cours du cycle cellulaire qui permettent de détecter la présence d'éventuels dommages de l'ADN. Le cycle

cellulaire comprend quatre phases (Figure 13) qui permettent aux cellules de répliquer leur ADN au cours de la phase de synthèse (S), puis de se diviser au cours de la mitose (M). Les phases S et M sont séparées par des phases d'intervalle G1 et G2, pendant lesquelles les cellules synthétisent les protéines nécessaires à leur fonctionnement. Les cellules qui ne se divisent plus sortent du cycle cellulaire pour entrer dans une phase dite de sénescence (G0). Les points de contrôle interviennent en phases G1, S, et G2. Si les dommages sont trop importants, la cellule cesse de se diviser, et reste en phase G0 ou se suicide par apoptose, la mort cellulaire programmée. Si les dommages ne sont pas trop nombreux, les points de contrôle vont induire une pause dans le cycle cellulaire, l'activation de la réparation de l'ADN, le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire le temps de la réparation, puis la ré-initiation du cycle cellulaire (Bartek et al. 2001).

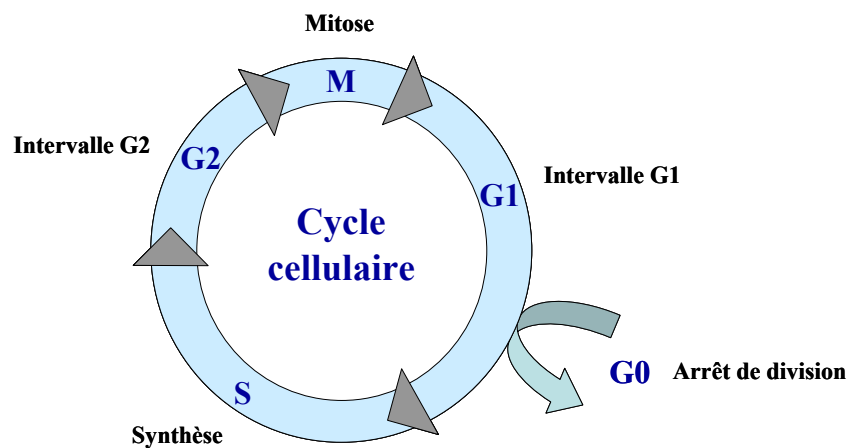


Figure 13 : Cycle cellulaire des cellules eucaryotes.

Les points de contrôle ont été définis comme une succession de signaux cellulaires transmis par trois groupes de protéines : les senseurs des dommages de l'ADN, les transducteurs puis les effecteurs (Figure 14). L'identité des senseurs est encore mal connue. Les transducteurs quant à eux sont composés de quatre classes de protéines conservées. L'une d'entre elles inclue les protéines phospho-inositide kinase ATM et ATR. Ces protéines ont un rôle central dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Elles régulent essentiellement deux protéines kinases Chk1 et Chk2. Sous cette classe de transducteurs, les effecteurs exécutent les réponses en lien avec les dommages de l'ADN. Ils incluent des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription et du cycle cellulaire, comme

BRCA1, Cdc25c ou encore p53. Les protéines kinases Chk1 et Chk2 seraient responsables des arrêts de cycles respectivement en G2 et G1 (Zhou et al. 2000).

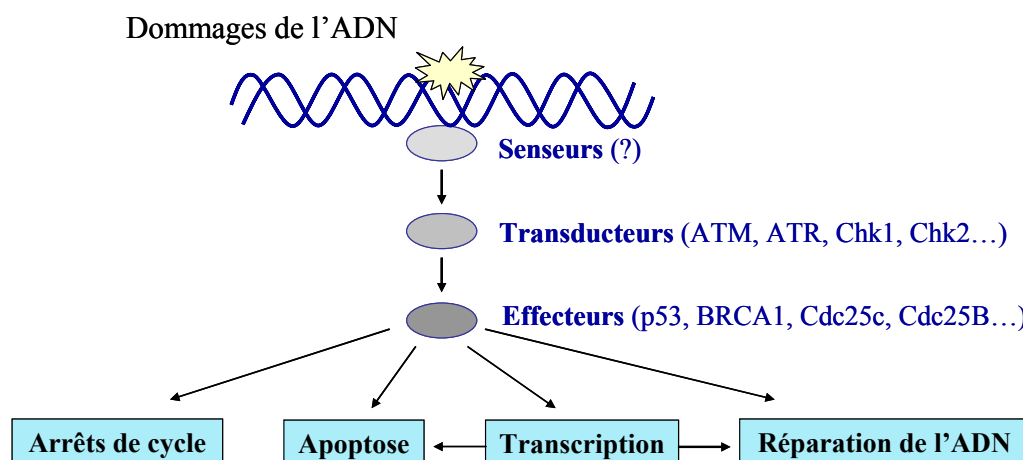


Figure 14 : Réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, d'après (Zhou et al. 2000).

La place centrale d'ATM dans la réponse cellulaire liée aux dommages de l'ADN est mise en évidence par l'existence de la pathologie *Ataxia telangiectasia* dans laquelle le gène ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) est muté. Cette pathologie présente des symptômes graves associant troubles neurodégénératifs, dysfonctions immunitaires, radiosensibilité et prédisposition au cancer (McKinnon 2004).

III-2 Les arrêts de cycle

Les arrêts de cycle constituent une possibilité de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Ces arrêts de cycle sont d'une importance majeure dans le sens où ils évitent à une cellule comportant de nombreux dommages de l'ADN de poursuivre son cycle cellulaire, et de fixer ainsi les lésions sous forme de mutations. Les arrêts de cycle permettent de limiter l'instabilité de l'information génétique à l'origine de pathologies telles que le cancer.

L'induction des arrêts de cycle en cas de dommages de l'ADN est observée dans le cas des HAP. Un effet d'inhibition de la croissance cellulaire par le B[a]P ou ses métabolites a ainsi été mis en évidence. L'incubation avec le B[a]P-7,8-diol de cellules de carcinome bronchoalvéolaire H358 mutées sur le gène p53 inhibe la prolifération cellulaire et augmente

les arrêts de cycle en phase G2. Alors que la voie métabolique entraînant la formation de quinones du B[a]P par les enzymes AKR1 ne serait pas impliquée dans cet effet inhibiteur, le blocage de la voie des cyt. P450 serait déterminant (Caino et al. 2006). Le mécanisme impliqué dans l'arrêt de cycle en G2 passerait donc par la formation de dommages de l'ADN, notamment d'adduits du BPDE, qui déclencheraient les cascades de signalisation cellulaire présentées ci-dessus conduisant à des arrêts de cycle.

A l'inverse de cet effet d'inhibition de la croissance cellulaire, le B[a]P présenterait également une action proliférative sur le cycle cellulaire, en inhibant les arrêts de cycle. Dans des cellules squameuses de carcinome du poumon 128-88T, le BPDE entraîne la surexpression de la protéine Cdc25B, connue pour être réprimée par la kinase Chk1. La surexpression de Cdc25B entraîne ainsi la suppression des arrêts de cycle en phase G2, et une prolifération incontrôlée favorisant l'instabilité génétique (Oguri et al. 2003). De la même façon, dans des cellules embryonnaires humaines de poumon, le B[a]P entraîne la surexpression de la cycline D1 participant à la régulation du passage de la phase G1 à la phase S, et de ce fait une prolifération anormale des cellules. A l'inverse, les acides transrétinoïques, métabolites de la vitamine A, diminueraient la surexpression de la cycline D1 et inhiberaient les passages incontrôlés de la phase G1 à la phase S, indiquant l'influence de nombreux facteurs sur ces mécanismes cellulaires, comme l'alimentation (Jia et al. 2005). Une étude récente a montré que les HAP faiblement mutagènes tels que le benzo[a]anthracène et le benzo[b]fluoranthène mais aussi le B[a]P activeraient la prolifération cellulaire et entraîneraient une augmentation du nombre de cellules entrant en phase S. La prolifération cellulaire passerait également par la perte de l'inhibition de contact. Le fait que ces effets soient significativement atténués dans des cellules n'exprimant plus le récepteur AhR indique l'importance de ce récepteur dans l'effet prolifératif des HAP (Andrysik et al. 2006).

Ainsi, le B[a]P pourrait induire la survenue des arrêts de cycle en lien avec son rôle d'initiateur, mais également inhiber ces événements cellulaires, en lien avec son rôle de promoteur.

III-3 La mort cellulaire

On distingue deux types de mort cellulaire. Tout d'abord, la nécrose est une mort accidentelle qui survient lorsque la toxicité d'un produit est trop importante et endommage tous les compartiments cellulaires. Dans ce cas, la cellule gonfle puis éclate en déversant son contenu dans le milieu extracellulaire ce qui provoque une réaction inflammatoire. Le deuxième type de mort cellulaire correspond à l'apoptose que nous avons présentée ci-dessus en tant qu'une des réponses cellulaires aux dommages de l'ADN. L'apoptose est ainsi une mort volontaire ou programmée de la cellule. D'un point de vue mécaniste, la cellule se fragmente en corps apoptotiques contenant le matériel cytoplasmique et nucléaire et délimités par une membrane plasmique. Ces corps apoptotiques sont ensuite éliminés par les macrophages environnants, sans qu'il n'y ait de réaction inflammatoire. Le B[a]P posséderait un effet d'induction de l'apoptose, lié à la formation des adduits de l'ADN (Andrysik et al. 2006).

III-4 La réparation des lésions de l'ADN

Il existe de nombreux mécanismes de réparation des lésions de l'ADN résultant de la diversité des dommages pouvant altérer la structure de l'ADN. Dans ce travail, nous nous intéresserons aux mécanismes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN liés au HAP, à savoir les adduits, les bases oxydées, les sites abasiques et les cassures de l'ADN.

III-4-a La réparation par excision de nucléotides

(REN)

La REN est le moins spécifique des mécanismes de réparation de l'ADN du fait de sa capacité à réparer un très grand nombre de lésions sans apparentes similitudes structurales. La caractéristique commune des lésions réparées par la REN semble être plutôt une importante taille qui génère une distorsion de la double hélice d'ADN. C'est le cas des lésions alkylées par des molécules exogènes de grande taille, comme les HAP et plus particulièrement le B[a]P. Cela concerne également les lésions principalement induites par le rayonnement UV :

les dimères cyclobutanes et les photoproduits 6-4 formés entre deux pyrimidines adjacentes. Le mécanisme de la REN est complexe et implique une quarantaine de gènes. La déficience pour l'un ou l'autre de ces gènes entraîne la survenue de pathologies, regroupées sous le nom de *Xeroderma pigmentosum* (XP), parmi lesquelles figure le syndrome de Cockayne. Avant l'identification des protéines impliquées dans la REN, les différents types de pathologies XP furent classifiés de XPA à XPD, ce qui permit ensuite de nommer les protéines impliquées lors de leur découverte (Cleaver 2005).

L'élucidation du mécanisme de la REN a débuté par la mise en évidence d'une différence de rapidité de réparation selon l'emplacement des lésions dans des régions codantes ou non-codantes du génome (Mellon et al. 1986). Deux mécanismes distincts de la REN ont alors été identifiés, la réparation couplée à la transcription (RCT) et la réparation globale du génome (RGG). Ces deux mécanismes diffèrent essentiellement dans la phase de reconnaissance des lésions.

Dans la RCT, la reconnaissance initiale du dommage résulte du blocage de l'ARN polymérase II lors de la transcription, tandis que dans la RGG, la lésion est reconnue par un complexe protéique incluant les protéines XPE et XPC.

L'étape suivante correspond à l'ouverture du double brin d'ADN, grâce à la présence d'un complexe protéique de 9 sous-unités parmi lesquelles notamment les hélicases XPB et XPD. La protéine XPA qui se lie au site du dommage permet alors le recrutement des endonucléases XPG et XPF-ERCC1 qui excisent un fragment d'ADN de 24 à 32 nucléotides comprenant la lésion. La dernière étape consiste enfin en la synthèse d'un nouveau brin d'ADN, le brin complémentaire servant de matrice, puis en sa ligature par la ligase I (de Boer et al. 2000). Ces mécanismes, de mieux en mieux élucidés, présentent cependant encore des points d'ombre. Notamment pour la RCT, le devenir de l'ARN polymérase II bloquée par un dommage reste à éclaircir (Mellon 2005).

Notons enfin qu'une fois réparés par le mécanisme de la REN, les adduits du B[a]P pourraient être retrouvés dans l'urine. Cependant, ceci n'a encore jamais été clairement démontré chez l'homme ou l'animal.

III-4-b La réparation par excision de bases (REB)

La REB concerne les lésions de faible taille qui incluent principalement les modifications de bases, et les pertes spontanées ou induites de bases générant des sites abasiques. Dans le cas du B[a]P, cela concerne les bases oxydées ou les sites abasiques générés par des lésions oxydatives ou la dépurination de certains adduits.

A l'inverse de la REN, aucune pathologie n'a été mise en évidence chez l'homme du fait d'un dysfonctionnement de la REB. Son mécanisme a été principalement élucidé par des études sur *Escherichia coli*, et il se trouve que la REB est un des mécanismes présentant le plus de similitude entre la bactérie et l'homme.

La compréhension de la REB a permis de mettre en évidence l'action séquentielle de quatre enzymes (Wallace 1994). La première est une ADN glycosylase qui reconnaît de façon spécifique la base endommagée, coupe son lien N-glycosidique, et génère la formation d'un site abasique. Une incision du brin d'ADN est ensuite réalisée par une endonucléase qui hydrolyse la liaison phosphodiester en 5' du site abasique. Le nucléotide manquant est enfin remplacé par l'action d'une ADN polymérase et d'une ligase, le brin complémentaire servant de matrice. Il est à noter que certaines ADN glycosylases possèdent également une activité lyase qui permet de réaliser l'incision du brin d'ADN en 3' du site abasique. Dans ce cas, le recrutement d'une endonucléase n'est plus nécessaire. Concernant la phase de resynthèse par l'ADN polymérase, deux mécanismes ont été identifiés : le premier correspond à la resynthèse dite courte de un ou deux nucléotides, tandis que le deuxième, dit de resynthèse longue, entraîne la synthèse d'un oligonucléotides de 6 à 13 nucléotides à partir du nucléotide manquant (Frosina et al. 1996). Le premier mécanisme fait intervenir l'ADN polymérase β , tandis que le deuxième ferait intervenir les ADN polymérases δ et ϵ . Le choix de l'un ou l'autre des mécanismes proviendrait de l'ADN glycosylase impliquée dans la première phase de la REB qui serait spécifique de la lésion et recruterait l'une ou l'autre des ADN polymérases. Il a ainsi été identifié que la 8-oxodGuo est excisé par la glycosylase hOGG1 qui entraîne le mécanisme de réparation court avec l'incorporation uniquement d'un nucléotide à la place de la lésion (Fortini et al. 1999).

III-4-c La réparation des cassures de l'ADN

Il existe deux mécanismes de réparation des cassures de l'ADN. Le premier mécanisme est la recombinaison homologue qui permet la réparation des cassures simple et double brins. Le deuxième mécanisme est la réparation non-homologue des cassures double brins.

Le groupe de gènes RAD52 a été identifié, grâce à des études sur la levure, comme étant impliqué dans la recombinaison homologue. La grande conservation au cours de l'évolution de ce groupe de gènes indique l'importance de ce mécanisme de réparation de l'ADN. Les protéines issues de ces gènes, comme RAD51 chez l'homme, se polymérisent sur l'ADN au niveau d'une cassure et créent un filament nucléo-protéique qui cherche une séquence homologue d'ADN sur le chromosome homologue ou encore sur la chromatide sœur. La séquence endommagée est ainsi synthétisée par l'action d'une ADN polymérase et d'une ligase, en prenant comme modèle la séquence homologue non-endommagée. Ce mécanisme de réparation est fidèle puisqu'il n'engendre pas la perte de matériel génétique.

A l'inverse, la réparation non-homologue est peu fidèle puisqu'elle consiste en une ligature des extrémités d'ADN de part et d'autre de la cassure double brins, ce qui peut entraîner la perte de matériel génétique au niveau de la coupure. Un complexe protéique incluant les sous-unités KU70 et KU80, codés par les gènes XRCC4, XRCC5, et XRCC7, est impliqué dans ce mécanisme. Un hétérodimère formé par KU80 et KU70 se lie avec une grande affinité aux extrémités d'ADN, en les protégeant notamment d'une dégradation nucléolytique. Les protéines KU auraient également un rôle dans la juxtaposition des deux extrémités d'ADN. Le mécanisme de ligature des deux fragments d'ADN fait ensuite intervenir des phénomènes de phosphorylation au sein du complexe protéique, mais reste à éclaircir pour la plus grande part. Il pourrait nécessiter l'intervention d'une nucléase et d'une ADN polymérase. La ligase IV a été également identifiée comme intervenant dans cette étape du fait de son interaction avec le gène XRCC4 (Kanaar et al. 1998).

III-5 La réplication des lésions et la survenue de mutations

Les mutations surviennent lorsque les dommages de l'ADN n'ont pas été réparés avant que la cellule n'entre en phase de réplication (S). Les dommages de l'ADN peuvent entraîner en effet une mauvaise reconnaissance des bases de l'ADN endommagées par les ADN polymérasés. La machinerie enzymatique de la réplication de l'ADN est optimisée pour permettre une réplication rapide et fidèle, résultant notamment d'une reconnaissance spécifique des bases de l'ADN. Ceci a pour conséquence une faible capacité d'adaptation du système de reconnaissance des bases de l'ADN lorsque celles-ci sont modifiées, et la possibilité de survenue de mésappariements. Ces mésappariements, s'ils ne sont pas réparés, entraînent l'apparition de mutations lors de la division cellulaire suivante.

D'une manière générale, on distingue les mutations ponctuelles et les mutations chromosomiques. Les mutations ponctuelles sont des petites altérations dans la séquence ou dans le nombre de nucléotides, qui peuvent être aussi petites que la substitution d'un nucléotide par un autre. Les mutations chromosomiques, également appelées aberrations ou anomalies chromosomiques, sont des altérations plus étendues. Elles peuvent changer la position et la direction d'un segment d'ADN, sans pour autant enlever de l'information génétique, mais peuvent également provoquer la perte irréversible d'un fragment d'ADN.

Les adduits de l'ADN entraînent majoritairement la formation de mutations ponctuelles et plus précisément de substitutions d'un nucléotide par un autre. On distingue les transversions, et les transitions, selon les nucléotides impliqués.

Les substitutions peuvent avoir différents types de conséquences. La mutation est dite silencieuse lorsqu'elle n'entraîne pas de modification dans la séquence des acides aminés lors de la traduction. La mutation est dite faux-sens lorsqu'elle entraîne le codage d'un acide aminé différent, ce qui peut avoir des répercussions de modifications fonctionnelles de la protéine synthétisée. La mutation est dite non-sens lorsqu'elle fait apparaître un codon terminateur qui entraîne la synthèse d'une protéine raccourcie et souvent inactive. Outre les substitutions, les mutations ponctuelles comprennent des insertions ou des délétions de nucléotides qui ont pour effet de modifier le cadre de lecture lors de la traduction.

Si les lésions de l'ADN sont volumineuses, comme c'est le cas pour les adduits du B[a]P, les ADN polymérases classiques sont généralement bloquées lors de la réplication au niveau de ces lésions. Depuis une dizaine d'années, l'intervention d'ADN polymérases spécialisées pour la réplication des bases endommagées lors de blocages de la réplication classique a pu être mise en évidence. Ces ADN polymérases appartiennent à la famille Y. Elles présentent une moins grande spécificité que les ADN polymérases classiques, du fait d'un site actif plus large, et peuvent par conséquent assurer la réplication au niveau de bases endommagées. Néanmoins cette réplication translésionnelle peut également être fautive et entraîner des mésappariements et potentiellement des mutations. Dans les cellules humaines, il y a quatre polymérases de la famille Y, pol η , pol ι , pol κ , et Rev1, chacune responsable de la réplication de différentes lésions *in vitro* (Lehmann 2005). Dans le cas des adduits du B[a]P, seules pol η et pol κ ont démontré *in vitro* la capacité d'assurer la synthèse de l'ADN au niveau des adduits du BPDE sur la dGuo et la dAdo, mais elles ne présentent pas les mêmes activités. En effet, pol κ assure la réplication exacte des adduits (\pm)-*trans*-BPDE-dGuo en insérant de façon dominante une cytosine (Cyt.) en face de la lésion, mais est entièrement bloquée par les adduits analogues sur la dAdo. A l'inverse, pol η est partiellement bloquée par les adduits BPDE-dGuo et les adduits (-)-*trans*-BPDE-dAdo, entraînant une réplication fautive, tandis qu'elle permet la synthèse translésionnelle majoritairement fidèle des adduits (+)-*trans*-BPDE-dAdo. La réplication fautive ou non des différents adduits dépendrait essentiellement de leur stéréochimie (Rechkoblit et al. 2002). *In vitro*, il a ainsi été démontré que pol η insère de façon prédominante une Ade en face des adduits (\pm)-*anti-trans*-BPDE-dGuo, mais est rapidement bloquée un nucléotide après la lésion, et que l'extension de la synthèse est poursuivie par pol κ . Ainsi, la mutagénèse due aux adduits du BPDE résulterait en partie d'un mécanisme de réparation fautive en deux étapes, incluant la réplication de la lésion par pol η , et l'extension de la synthèse après la lésion par pol κ . De plus, les adduits (-)-*anti-trans*-BPDE-dGuo seraient répliqués de façon fidèle par pol κ dans une plus large proportion que les adduits (+)-*anti-trans*-BPDE-dGuo. Ceci pourrait être une explication de la plus grande mutagénicité des adduits (+)-*anti-trans*-BPDE-dGuo par rapport aux adduits (-)-*anti-trans*-BPDE-dGuo (Zhang et al. 2002). Par ailleurs, il a été montré que les adduits du BPDE pouvaient entraîner d'autres mutations lors de l'extension de la synthèse par pol κ sur quelques nucléotides après la lésion, du fait de sa moins grande fidélité que les polymérases classiques (Kramata et al. 2003).

Pour résumer, la réplication fautive des adduits du BPDE, pouvant appairer une Ade en face d'une Gua endommagée, serait à l'origine de transversions de la Gua vers la thymine (Randerath et al.).

Plus récemment, la polymérase pol ζ a été identifiée chez la levure comme majoritairement responsable de la synthèse translésionnelle des adduits (+)-*anti*-BPDE et inductrice de transversions de la Gua vers la Cyt. La pol η serait alors majoritairement responsable de délétions ou d'insertion de 1 à 3 nucléotides (Xie et al. 2003).

Le métabolisme du B[a]P peut entraîner également la formation d'adduits dépurinants, générant la présence de sites abasiques dans l'ADN. Chez la levure, il a été montré que les sites abasiques sont majoritairement appariés à une Ade lors de la réplication entraînant des transversions lors de dépurinations et des transitions lors de dépyrimidations (Sagher et al. 1983).

Concernant les dommages oxydatifs, la 8-oxodGuo peut être appariée à une Cyt ou une Ade lors de la réplication. Cette lésion peut donc entraîner des transversions également de la Gua vers la Thy. Notons que la glycosylase hOGG1, encore appelée MutM, majoritairement impliquée dans la réparation de la 8-oxodGuo dans les cellules humaines, répare efficacement la 8-oxodGuo appariée à une dCyd mais pas lorsque celle-ci est appariée une dAdo (Rosenquist et al. 1997). Dans ce cas, une autre enzyme, appelée MutY, est alors capable d'exciser non pas la Gua oxydée mais l'Ade mésappariée (Bridges et al. 1996). Ces mécanismes impliqués dans la réparation de la 8-oxodGuo sont représentés dans la figure 15 ci-après

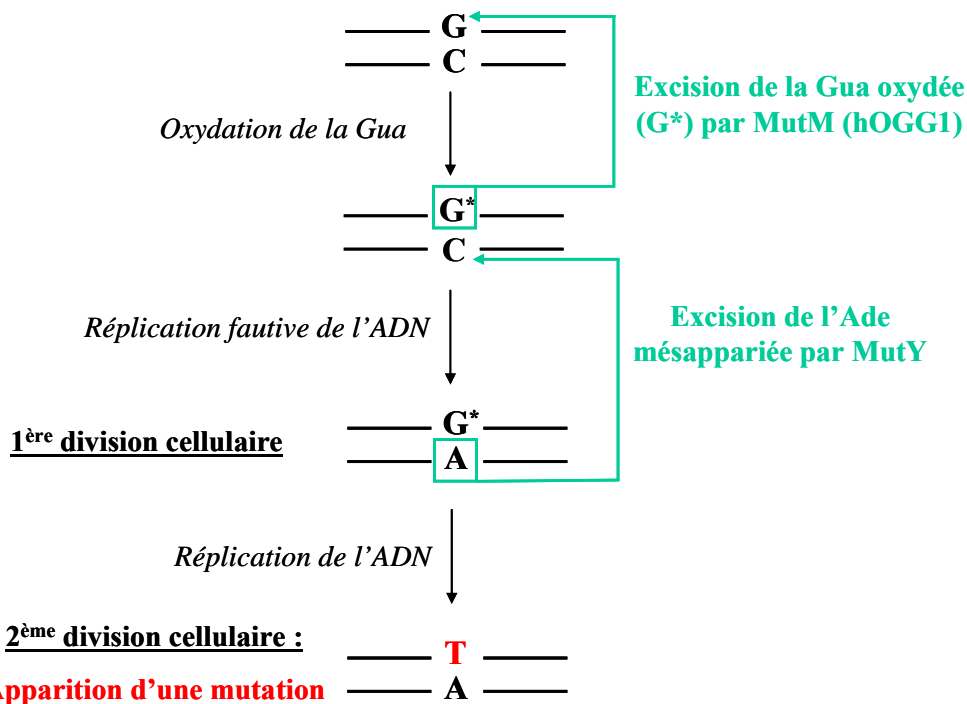


Figure 15 : Mécanismes impliqués dans la réparation de la 8-oxodGua par les enzymes MutM et MutY pour prévenir l'apparition d'une mutation.

En conclusion, un schéma récapitulatif représentant les conséquences biologiques des lésions de l'ADN est présenté en figure 16.

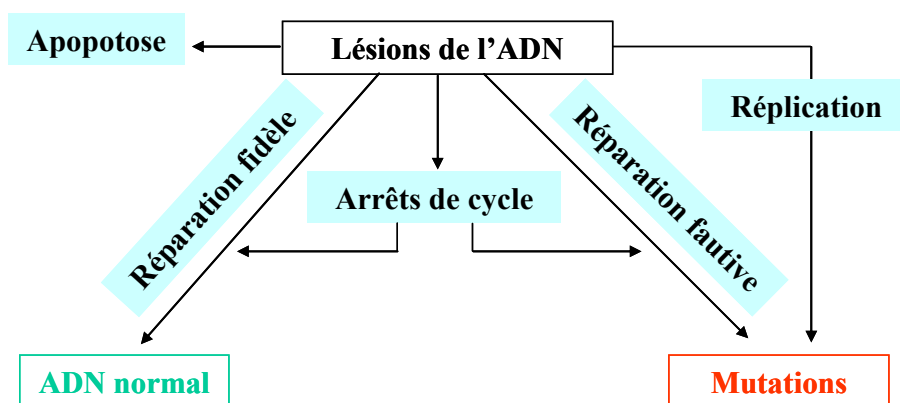


Figure 16 : Conséquences biologiques des lésions de l'ADN.

Les lésions de l'ADN peuvent ainsi avoir des conséquences biologiques irréversibles. Il apparaît donc important de pouvoir mesurer ces lésions qui occupent une place clé dans le processus de cancérogénèse. Par conséquent, nous présenterons dans la partie suivante les méthodes de dosage des lésions de l'ADN.

IV- Méthodes de dosage des lésions de l'ADN

Diverses techniques sont utilisées pour détecter et quantifier les dommages de l'ADN. Toutes présentent leurs avantages et leurs inconvénients mais leur objectif principal est bien souvent de présenter une grande sensibilité pour pouvoir détecter les très faibles taux de lésions de l'ADN présents chez les sujets exposés. Toutefois, la recherche de sensibilité s'effectue souvent au détriment de la spécificité, si bien que peu de méthodes permettent une détection spécifique des lésions de l'ADN, du point de vue de leur nature chimique. Sans réaliser une liste exhaustive de l'ensemble des techniques, nous présenterons les méthodes les plus couramment utilisées pour doser les adduits de l'ADN du B[a]P, les lésions oxydatives et les cassures de l'ADN.

IV-1 Méthodes non chromatographiques

IV-1-a Le test des Comètes

La méthode des comètes est une technique couramment employée pour mesurer les cassures simple et double brins, et les sites alkali-labiles de l'ADN. Cette méthode permet de mesurer les dommages de l'ADN de façon globale.

Les cellules sont fixées sur une lame dans un gel d'agarose puis lysées de façon à obtenir des nucléoïdes contenant l'ADN super enroulé du noyau des cellules. L'application d'un champ électrophorétique à pH élevé permet alors la migration de l'ADN. Après marquage fluorescent, le plus souvent par du bromure d'éthyldium, l'ADN est observé sous microscope. S'il n'est pas lésé, il apparaît sous forme d'une pelote ronde. A l'inverse, la présence de lésions entraîne le relâchement de boucles d'ADN qui perdent leur forme super enroulée, et migrent ainsi plus rapidement lors de l'électrophorèse vers l'anode. Ceci provoque un étalement de la pelote d'ADN prenant la forme d'une comète. La quantification de l'ADN présent dans la queue de la comète permet de mesurer la quantité d'ADN endommagé.

La sensibilité du test des comètes est intéressante puisqu'elle permet de mettre en évidence des différences de niveaux de dommages de l'ADN dans les leucocytes liés à des facteurs environnementaux tels le mode de vie, la pollution de l'air, l'exposition au soleil ou encore l'exercice physique et le régime alimentaire (Moller 2006). Par contre, le test des comètes n'est pas spécifique puisqu'il met en évidence des cassures de l'ADN et des lésions instables à pH alcalin pouvant avoir diverses origines, à savoir des lésions oxydatives ou des adduits produits par de nombreux xénobiotiques.

La sensibilité et la spécificité du test peuvent être légèrement augmentées par incubation des nucléoïdes avec des enzymes de réparation qui reconnaissent de façon spécifique certains dommages de l'ADN et les transforment en cassures, ce qui a alors pour effet d'augmenter la quantité d'ADN dans la queue (Collins 2004). De cette façon, il est possible de mesurer également les capacités de réparation d'extraits cellulaires. L'incubation de nucléoïdes pré-exposés au BPDE, avec des extraits préparés à partir de lymphocytes de volontaires, révèlent ainsi des variations inter-individuelles de capacité de réparation (Langie et al. 2006).

IV-1-b Méthodes immunochimiques

Le principe des méthodes immunochimiques repose sur la reconnaissance par un anticorps d'un antigène, comme par exemple un adduit de l'ADN du B[a]P. Il existe tout d'abord des anticorps polyclonaux, mélanges d'anticorps caractérisés par leur capacité de reconnaissance de plusieurs épitopes sur différents antigènes. Ces anticorps sont issus du sérum d'animaux immunisés avec des adduits purifiés sur une période de deux à trois mois. Les anticorps monoclonaux quant à eux reconnaissent seulement un épitope d'un antigène, mais sont plus longs à obtenir. La méthode de production consiste à immuniser des animaux puis à les sacrifier pour récupérer les cellules de la rate produisant les anticorps souhaités mais incapables de se diviser. Ces cellules sont fusionnées avec des cellules cancéreuses de manière à obtenir des hybridomes producteurs d'anticorps et capables de se diviser. Les clones obtenus sont ensuite isolés puis testés pour la spécificité des anticorps qu'ils produisent. La production des anticorps monoclonaux est ainsi plus longue de 3 à 4 mois par rapport aux anticorps polyclonaux (Santella 1999). Les méthodes immunologiques les plus utilisées pour quantifier les adduits de l'ADN sont les tests compétitifs de type ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). La limite de détection du test dépend de l'affinité des

anticorps pour les adduits mais une sensibilité de l'ordre de 1 à 4 adduits pour 10^8 nucléosides normaux peut être obtenue dans des conditions optimales (de Kok et al. 2002). Outre leur bonne sensibilité, les méthodes immunologiques présentent une facilité de mise en œuvre, et surtout elles présentent l'avantage unique de pouvoir localiser les adduits au niveau tissulaire. En effet, dans des études immunohistochimiques, la localisation des adduits du B[a]P sur des coupes de tissus fixés dans la paraffine est possible. La sensibilité de ces techniques est toutefois assez faible de l'ordre de 1 adduit pour 10^6 nucléosides normaux (Santella 1999).

Un inconvénient majeur des techniques immunologiques réside dans leur manque de spécificité, du fait de réactivités croisées possibles des anticorps, polyclonaux comme monoclonaux (de Kok et al. 2002). Ainsi, l'anticorps monoclonal 8E11 dirigé contre les adduits *anti*-BPDE-dGuo, reconnaît à la fois les HAP libres et les adduits de l'ADN. De la même façon, les sérums ou certains anticorps monoclonaux dirigés contre les adduits du BPDE reconnaissent des adduits de diol-époxydes d'autres HAP (Booth et al. 1994; de Kok et al. 2002).

Les dommages de l'ADN de type oxydatif tels que la 8-oxodGuo peuvent être également mesurés par des tests de type ELISA avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux. Néanmoins, le manque de spécificité est également rapporté pour ce type de dommage de l'ADN. En effet, des taux de 8-oxodGuo urinaires quantifiés par un test ELISA sont deux fois plus élevés que ceux obtenus sur les mêmes échantillons avec une technique chromatographique (Peoples et al. 2005).

IV-2 Méthodes chromatographiques

IV-2-a Le post-marquage

La technique du post-marquage au phosphore 32 (^{32}P) fut décrite en premier lieu par Randerath et al. (Randerath et al. 1981), et a été largement utilisée depuis pour le dosage des adduits de l'ADN résultant d'une exposition aux HAP. Après digestion enzymatique de l'ADN en nucléosides 3'-monophosphate, ceux-ci sont phosphorylés en 5' par la T4 polynucléotide kinase en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ pour former un mélange de nucléosides biphosphates marqués au ^{32}P en 5'. Ce mélange est ensuite séparé par chromatographie sur

couche mince multidirectionnelle et la quantification s'effectue par comptage de la radioactivité. Pour gagner en sensibilité, cette méthode de base a été améliorée par l'ajout notamment d'une étape d'enrichissement en adduits visant à éliminer les nucléosides normaux après la première phase de digestion enzymatique de l'ADN. Une première méthode consiste en une extraction organique (au butanol le plus souvent) du mélange de nucléosides 3'-monophosphate permettant la séparation des adduits hydrophobes des nucléotides normaux. Une autre approche repose sur la déphosphorylation préférentielle par la nucléase P1 des nucléosides 3'-monophosphate normaux qui, n'étant plus un substrat pour la polynucléotide kinase, ne peuvent plus être marqués au ^{32}P . Enfin une dernière possibilité est de séparer les adduits des nucléotides normaux par chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Du fait de ces améliorations, qui peuvent être utilisées de façon combinée, la technique du post-marquage est devenue une technique très sensible permettant d'atteindre des limites de détection de l'ordre d'une lésion pour 10^9 nucléosides normaux. Il s'agit actuellement de la technique la plus sensible pour détecter les adduits de l'ADN.

Par contre, cette méthode souffre d'un inconvénient majeur puisqu'elle ne permet pas une détection spécifique des adduits. Même lorsque des standards d'adduits sont disponibles, la résolution de la chromatographie sur couche mince ne permet pas de tirer des conclusions définitives (de Kok et al. 2002). Une étude a récemment mis en évidence l'influence des conditions chromatographiques sur l'identification des adduits. En effet, les adduits classiquement observés par cette technique dans les tissus pulmonaires de fumeurs, en tant qu'adduits des HAP ou des amines aromatiques, ne semblent plus correspondre aux standards de ces deux types d'adduits dès lors que l'on change les conditions chromatographiques (Arif et al. 2006).

IV-2-b La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection de fluorescence (CLHP-Fluo)

Cette méthode permet la détection des adduits de la voie du BPDE. En effet, cette méthode indirecte permet de détecter par fluorescence le tétraol résultant de l'hydrolyse des adduits du

BPDE. L'hydrolyse est requise car les adduits ne sont que très peu fluorescents par rapport aux tétraols du B[a]P. En effet, les nucléosides diminuent la fluorescence des composés aromatiques auxquels ils sont liés (Yamamoto et al. 1990).

Après l'hydrolyse de l'ADN sous l'action d'HCl 0,1 N à 90°C pendant 4 h, les tétraols sont concentrés puis séparés par CLHP et détectés par fluorescence (Alexandrov et al. 1992).

Cette technique permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre de 1 adduit/10⁸ nucléosides normaux et les résultats sont bien corrélés à la technique du post-marquage (Rojas et al. 1994). Une limite de détection de 0,25 adduit/10⁸ nucléosides normaux a été atteinte pour cette technique par l'équipe de S. Pavanello (Pavanello et al. 2006).

En comparaison avec d'autres méthodes utilisées pour détecter les adduits du B[a]P, la limitation majeure de cette technique est qu'elle ne permet de mesurer qu'un certain type chimique d'adduits (de Kok et al. 2002). La CLHP-Fluo présente donc une spécificité modérée puisque tous les adduits du BPDE sont mesurés de manière globale.

IV-2-c La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique (CLHP-EL)

Cette technique est très adaptée pour le dosage des lésions oxydatives de l'ADN, comme la 8-oxodGuo, avec des limites de détection de l'ordre de quelques lésions pour 10⁸ nucléosides normaux. La détection électrochimique repose sur l'application d'une différence de potentiel supérieure au potentiel d'oxydation de la molécule, permettant son oxydation et la libération d'un électron. La détection du courant généré est dépendante de la quantité de molécule. Cette technique ne permet pas le dosage des adduits du B[a]P.

IV-2-d La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM)

La CLHP-SM/SM apparaît être la technique de choix pour détecter les adduits de l'ADN du B[a]P de façon spécifique. De plus, la sensibilité de cette technique de l'ordre de quelques lésions/10⁸ nucléosides normaux est intéressante (Koc et al. 2002; Boysen et al. 2003; Singh et al. 2006).

Il existe différents types de spectromètres de masse qui sont essentiellement caractérisés par leur source d'ionisation et leur analyseur. Nous détaillerons le système qui a été utilisé dans ce travail. Il s'agit d'un spectromètre de masse composé d'une source d'ionisation de type électrospray, et d'un analyseur triple quadripolaire (Figure 17). La source d'ionisation permet la transformation des composés séparés lors de la CLHP en ions positifs ou négatifs selon le mode choisi. Pour cela, un spray est formé en sortie d'un capillaire par ajout d'azote, et l'échantillon est nébulisé sous forme de petites gouttelettes. Dans la chambre d'ionisation, grâce au champ électrique et à l'application d'azote chaud, les gouttelettes sont soumises au phénomène de désorption de champ ; le solvant s'évapore, le champ électrique augmente et les ions migrent en surface des gouttes jusqu'à ce qu'ils soient libérés par éclatement des gouttes. Les ions peuvent ensuite pénétrer dans le premier quadripôle. Un quadripôle est constitué de quatre cylindres entre lesquels un champ électrique oscillant et un champ électrique fixe se superposent. Selon les conditions de champs électriques appliqués, seuls certains ions, caractérisés par leur rapport masse/charge (m/z), peuvent traverser le quadripôle, selon une trajectoire sinusoïdale, les autres étant défocalisés et perdus dans le quadripôle. Les ions ainsi filtrés peuvent entrer dans le quadripôle suivant. Dans le cas d'un analyseur triple quadripôles, le premier quadripôle permet de sélectionner des ions parents, le second est appelé cellule de collision et permet la fragmentation des ions parents par collision avec un gaz inerte, et le dernier permet de sélectionner des ions fils issus de la fragmentation. Enfin, un détecteur d'ions et un système de conversion permet de transformer les signaux de détection d'ions en des chromatogrammes ou spectres de masse.

Notons que différents modes de fonctionnement de l'analyseur triple quadripôles peuvent être choisis, selon le type de filtration des ions appliqué à chaque quadripôle. Dans notre cas, le mode le plus couramment utilisé et le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) permettant de sélectionner les molécules selon des couples de rapport m/z , également appelés transitions, constitués du rapport m/z de l'ion parent et de l'un de ses ions fils.

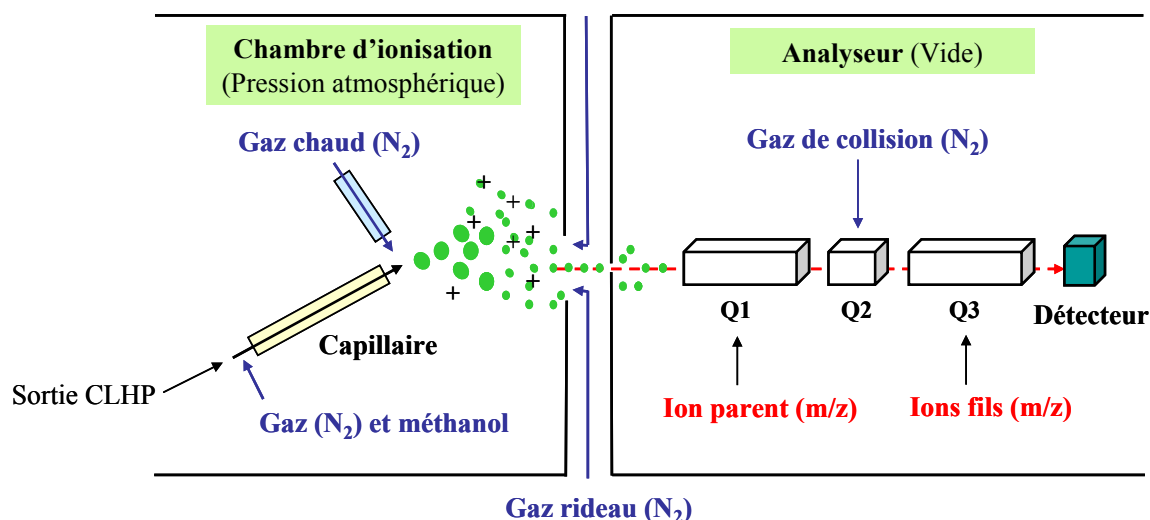


Figure 17 : représentation schématique d'une source électrospray associée à un analyseur triple quadripôles.

Historiquement, la spectrométrie de masse, du fait de sa grande spécificité, était réservée à l'identification de nouveaux adduits qui étaient ensuite détectés par des techniques plus sensibles comme le post-marquage. Plus récemment, le développement de nouvelles technologies, notamment d'ionisation telles que les sources électrospray, a permis d'ouvrir le champ d'application de la spectrométrie de masse à la quantification des adduits de l'ADN, par l'amélioration de la sensibilité de cette technique. L'enjeu a alors été de pouvoir atteindre des limites de détection suffisamment basses pour que les adduits puissent être détectés et quantifiés à de très faibles doses dans des échantillons biologiques. Ceci semble désormais réalisable avec l'atteinte de limites de détection telles que 3 BPDE-N2-dGuo/ 10^8 nucléosides normaux avec environ 100 μg d'ADN (Singh et al. 2006). Les techniques telles que la CLHP-SM/SM qui permettent une détection de masse en mode tandem, en utilisant notamment le mode MRM, sont donc d'un intérêt majeur puisqu'elles combinent haute spécificité et grande sensibilité (Koc et al. 2002).

Pour la détection de la 8-oxodGuo, la CLHP-SM/SM présente une limite de détection comparable à la CLHP-EL. Néanmoins pour les dosages urinaires, la CLHP-SM/SM est préférentiellement utilisée puisqu'elle présente une meilleure spécificité, atout majeur au sein d'une matrice complexe comme l'urine. L'utilisation de la CLHP-EL nécessiterait une purification de l'échantillon urinaire tandis qu'en CLHP-SM/SM l'urine peut quasiment être injectée brute (Ravanat et al. 1998; Weimann et al. 2001).

En conclusion, le tableau 2 présente les différentes limites de détection (LD) obtenues pour les adduits de l'ADN du B[a]P avec les différentes techniques de dosage.

Tableau 2 : limites de détection des adduits de l'ADN du B[a]P selon différentes techniques de dosage.

Référence	Technique	Adduits	LD (adduits/10 ⁸ nucléosides normaux)
(de Kok et al. 2002)	ELISA	Selon les anticorps utilisés	1 - 4
(van Schooten et al. 1995; Godschalk et al. 2002)	³² P	Selon les standards utilisés	≤ 0,1 - 1
(Rojas et al. 2004; Pavanello et al. 2006)	CLHP-Fluo	BPDE-ADN	0,25 - 5
(Ruan et al. 2006; Singh et al. 2006)		BPDE-N2-dGuo	3
(Ruan et al. 2006)	CLHP-SM/SM	BPDE-N2-dGuo, BPDE-N6-dAdo	1 - 5
(Wang et al. 2003)		BPDE-N2-dGuo, BPDE-N6-dAdo, BPDE-N4-dCyd	1 - 10

V- Surveillance biologique de l'exposition aux HAP chez l'homme : notion de biomarqueurs

En raison de la cancérogénicité du B[a]P, il apparaît primordial de mesurer l'exposition des individus afin d'identifier les groupes à risque bien avant la survenue d'une pathologie.

La mesure de l'exposition est classiquement réalisée par la mesure de dose externe par des prélèvements atmosphériques. Toutefois, ce type de mesure ne prend pas en compte divers éléments comme les différentes voies d'absorption, et les facteurs individuels de métabolisation ou encore de réparation de l'ADN. La mesure de dose externe n'est donc pas représentative de la dose de polluant qui a réellement pénétré dans l'individu ni de la dose potentiellement à risque quant à la survenue d'un cancer. Il est donc important de développer des outils de surveillance biologique de l'exposition afin de pallier ces manques ; on parle alors de biomarqueurs. Dans cette partie, nous présenterons les différents biomarqueurs existants pour la surveillance biologique de l'exposition aux HAP.

V-1 Définition des biomarqueurs

La notion de biomarqueur est issue du domaine de l'épidémiologie moléculaire née dans les années 1980. Cette discipline correspond à l'utilisation de la biologie moléculaire et de l'épidémiologie pour comprendre les causes de survenue du cancer, et améliorer la prévention de cette maladie (Perera et al. 2000). En effet, la prise de conscience du caractère multifactoriel de la survenue des cancers, a permis de définir l'influence très importante de facteurs externes non-héréditaires, et notamment de la dose d'exposition à un produit cancérigène, offrant une place importante à la prévention de telles pathologies. La surveillance biologique de l'exposition des individus aux produits cancérigènes apparaît ainsi comme un outil essentiel à la prévention, et celle-ci est permise par l'étude de tout un panel de biomarqueurs pouvant être détectés bien avant la survenue d'un cancer.

Parmi ces biomarqueurs, figurent tout d'abord les biomarqueurs d'exposition. Par définition, ils correspondent à une mesure quantitative du produit cancérigène ou d'un de ses métabolites dans un milieu biologique. Le moment du prélèvement est déterminé en fonction de la cinétique d'absorption, de transformation, et d'élimination de la substance quantifiée. Il existe alors différents biomarqueurs d'exposition : certains sont représentatifs de la dose interne de toxique circulant dans l'organisme, d'autres de la dose dite efficace au niveau des molécules cibles comme l'ADN. Les biomarqueurs d'exposition de dose interne correspondent notamment aux métabolites urinaires, et les biomarqueurs d'exposition de dose efficace aux adduits de l'ADN.

Outre les biomarqueurs d'exposition, les biomarqueurs d'effets permettent de détecter des effets biologiques plus ou moins proches de la survenue de la maladie. Contrairement aux biomarqueurs d'exposition, ils ne sont plus spécifiques de l'exposition à un toxique. La plupart des biomarqueurs d'effets sont dits précoces, comme les lésions oxydatives de l'ADN, les mutations chromosomiques correspondant aux effets cytogénétiques, ou encore les mutations ponctuelles. Certains biomarqueurs d'effets, comme l'activation ou l'inhibition de certains gènes critiques sont dits tardifs car plus proches de la survenue de la maladie.

Enfin, la dernière classe regroupe tous les biomarqueurs de susceptibilité individuelle qui incluent l'ensemble des caractéristiques modulant la susceptibilité des individus vis-à-vis de la survenue du cancer (génotypes à risque, genre, âge, etc...).

Les différents types de biomarqueurs sont représentés dans la figure 18, et sont détaillés un par un par la suite.

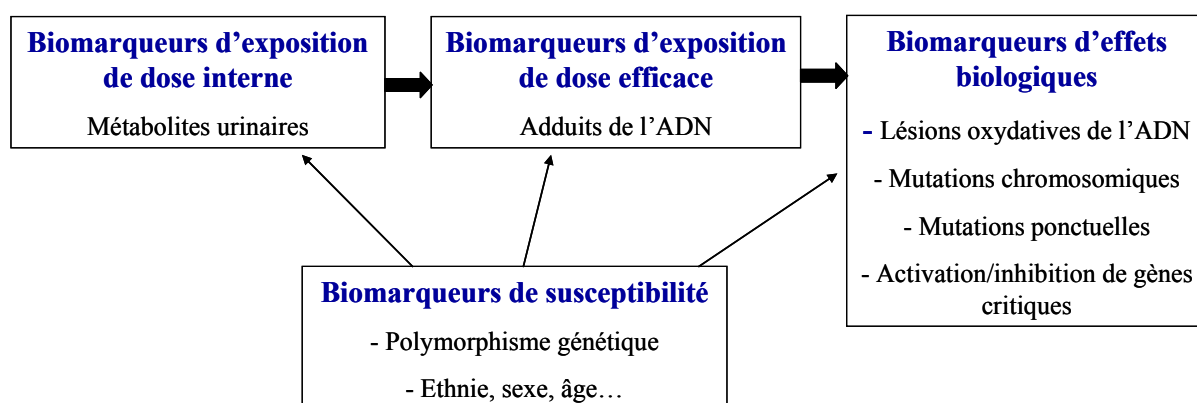


Figure 18 : Les différents niveaux de biomarqueurs, d'après (Perera et al. 2000).

V-2 Biomarqueurs de dose interne des HAP

Les biomarqueurs de dose interne sont d'un grand intérêt puisqu'en comparaison avec les mesures classiques atmosphériques, ils prennent en compte les différentes voies d'absorption, les variations inter-individuelles de métabolisation et l'efficacité des équipements de protection individuelle (masque, gants...).

Les biomarqueurs de dose interne les plus utilisés en milieu professionnel correspondent aux métabolites mesurés dans l'urine du fait de la facilité de recueil de ce milieu biologique. Dans le cas des HAP, le biomarqueur de dose interne le plus couramment mesuré est le 1-hydroxypyrene (1-OHP). Ce métabolite est issu de la monohydroxylation du pyrene qui est un HAP à quatre cycles non cancérigène (Figure 1) présent en grandes quantités dans les mélanges d'HAP. Éliminé principalement dans l'urine où il est retrouvé en grandes quantités, son dosage est classiquement réalisé par CLHP-Fluo comme décrit initialement par Jongeneelen (Jongeneelen et al. 1985). Depuis 1985, la mesure du 1-OHP a été utilisée dans de nombreuses études pour le suivi de l'exposition aux HAP de différentes populations (Brandt et al. 2003). Bien qu'aucun indice biologique d'exposition ayant une valeur réglementaire n'existe à ce jour, la valeur de 1,4 $\mu\text{moles/mole}$ de créatinine a été proposée comme étant la valeur limite au-delà de laquelle des effets cytogénétiques sont observés dans les lymphocytes de sujets exposés (Buchet et al. 1995). De même des valeurs de référence correspondant aux niveaux de 1-OHP en fin de semaine et fin de poste dans les secteurs de la cokerie et de la production d'aluminium ont été proposées et sont respectivement de 2,3 et 4,9 $\mu\text{moles/mole}$ de créatine (Jongeneelen 2001).

Bien que le 1-OHP soit représentatif de l'exposition à un mélange d'HAP, il n'est pas le métabolite d'un HAP cancérigène. De plus, le rapport entre le pyrene et le B[a]P est variable selon la source d'émission. Pour pallier ce problème, les études se sont portées vers des métabolites urinaires d'HAP cancérigènes, notamment du B[a]P, comme le 3-OHB[a]P. Cependant, à l'inverse du 1-OHP, le 3-OHB[a]P est présent en quantités très faibles dans l'urine, entre 1000 et 10 000 fois moins que le 1-OHP, si bien que sa détection est plus difficile. Ceci résulte de la faible élimination des métabolites du B[a]P par voie urinaire, de la plus faible quantité de B[a]P que de pyrene généralement présente dans les mélanges d'HAP, et peut-être aussi de la plus faible biotransformation du B[a]P en 3-OHB[a]P que du pyrene en 1-OHP. Ainsi, suite à une injection intrapéritonéale de B[a]P marqué au ^{14}C à des rats, la

quantité de radioactivité excrétée dans l'urine représente environ 10% de la radioactivité totale (Yang et al. 1999). Les faibles quantités de 3-OHB[a]P dans l'urine nécessitent une phase de purification et de concentration importante des échantillons urinaires. L'urine est généralement purifiée sur des cartouches de silice greffée à des groupements C18 puis concentrée avant l'analyse par CLHP-Fluo. Cette technique de base permet d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 90 ng/L d'urine (Hollender et al. 2000). L'ajout d'une deuxième colonne en amont de la colonne analytique, permet grâce à un système de double pompe d'obtenir une étape supplémentaire de purification de l'urine en ligne, et de diminuer la limite de détection jusqu'à 6 ng/L d'urine (Gündel et al. 2000). La purification de l'urine par commutation de colonnes (ajout de 3 colonnes de purification en amont de la colonne analytique) permet en outre d'augmenter 20 fois la sensibilité de détection par rapport à la même technique sans cette étape de purification (Simon et al. 2000). Les efforts portent également sur l'augmentation de l'intensité de fluorescence. Cela a été réalisé par l'injection d'une solution de NaOH à 0,5% via une post-colonne (Yoshikawa et al. 1990), ou par l'ajout d'acide ascorbique à 1 mg/L à la phase mobile de la CLHP (Bouchard et al. 1994). Cette dernière amélioration associée à une technique de purification de l'urine par commutation de colonnes permet d'atteindre une limite de détection de 0,1 ng/L d'urine (Simon et al. 2000). Dans le cas du 3-OHB[a]P, une technique de CLHP couplée à une détection de fluorescence induite par laser à basse température (CLHP-Fluo laser) a été décrite et permet d'atteindre une limite de détection de 0,5 ng/L d'urine (Ariese et al. 1994). Cette technique, également appelée spectrométrie de Shpol'skii, permet d'accroître l'émission de fluorescence suite à l'excitation induite par laser, et d'augmenter fortement la résolution des spectres de fluorescence par la fixation des molécules par le froid (de l'ordre de 77 °K).

Outre l'aspect analytique nécessaire pour la détection de ces métabolites, il est important d'étudier les facteurs cinétiques d'absorption, de métabolisation et d'élimination de ces composés de façon à déterminer les moments optimaux de prélèvement des échantillons.

Les études de toxicocinétique des métabolites urinaires sont effectuées le plus souvent sur des modèles animaux exposés par voie intraveineuse, intrapéritonéale, orale ou cutanée. Chez le rat, la cinétique d'élimination du 3-OHB[a]P après absorption orale est similaire à celle obtenue après exposition par voie intraveineuse, indiquant que le passage des molécules au niveau de la barrière intestinale est très rapide (Bouchard et al. 1997). La cinétique d'élimination du 3-OHB[a]P après une injection en intraveineuse de B[a]P à des rats a été

comparée à celle observée après injection d'un mélange de métabolites dont le 3-OHB[a]P (Bouchard et al. 1996). Les profils d'excrétion sont comparables, donc la métabolisation du B[a]P en 3-OHB[a]P est très rapide. Toutefois, même après injection de 3-OHB[a]P directement, le maximum d'excrétion n'est atteint que 10 h après le traitement, en comparaison avec le 1-OHP pour lequel le maximum d'excrétion est obtenu très rapidement après l'injection. L'élimination du 3-OHB[a]P est donc retardée par rapport à celle du 1-OHP. Après l'exposition cutanée au B[a]P de rats, l'élimination urinaire du 3-OHB[a]P est encore plus lente, avec un pic d'excrétion maximale entre 24 et 48 h après traitement (Bouchard et al. 1997). La peau pourrait constituer un réservoir qui diffuserait et métaboliserait les molécules de façon lente, entraînant un relargage progressif des métabolites. Cette cinétique d'élimination correspond à celle obtenue après exposition par voie intrapéritonéale qui favorise un stockage dans la graisse abdominale (Bouchard et al. 1996). Pour cette voie d'absorption, l'excrétion de 3-OHB[a]P augmente au cours de la semaine de traitement, et de semaine en semaine, montrant un effet intéressant cumulatif lié à cette notion de stockage (Bouchard et al. 1995).

Il existe moins d'études de toxicocinétique chez l'homme, mais différentes situations d'exposition aux HAP en milieu professionnel ont néanmoins permis de comparer l'excrétion du 1-OHP et du 3-OHB[a]P. Alors que le maximum d'excrétion du 1-OHP apparaît rapidement après la fin de la journée de travail (en moyenne 3 h), le pic d'excrétion de 3-OHB[a]P surviendrait seulement 15 h après la fin la journée de travail. Ainsi, les moments de prélèvement des échantillons urinaires sont actuellement en fin de journée de travail pour le 1-OHP, et au début de la journée suivante pour le 3-OHB[a]P (Gendre et al. 2004).

Outre le 3-OHB[a]P, le tétraol du B[a]P apparaît également intéressant en tant que biomarqueur de dose interne du B[a]P. Les excrétions du 3-OHB[a]P, du B[a]P-7,8-diol, du B[a]P-7,8,9,10-tétraol et du B[a]P ont été simultanément déterminées dans les urines de rats exposés à de la fumée d'asphalte en chambre d'inhalation. De la quantité totale de ces métabolites excrétés, le 3-OHB[a]P représente 30%, le B[a]P-7,8-diol 11,6%, le B[a]P-7,8,9,10-tétraol 54,4%, et le B[a]P 4% (Wang et al. 2003). D'un point de vue quantitatif, le tétraol serait donc excrété dans des quantités plus importantes que le 3-OHB[a]P. De plus le tétraol est issu de l'hydrolyse du BPDE, métabolite ultime du B[a]P, si bien que le tétraol pourrait être représentatif des voies métaboliques de bioactivation conduisant à la formation des adduits du BPDE. Toutefois, les quantités de tétraol excrétées dans l'urine restent du

même ordre de grandeur que celles du 3-OHB[a]P, si bien que les mêmes contraintes analytiques sont applicables au dosage du tétraol dans l'urine. Ce dernier peut être effectué par CLHP-Fluo, mais le rendement photonique du tétraol pourrait être moins important que celui du 3-OHB[a]P du fait de sa moins grande aromaticité. Notons que la technique de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) semble intéressante pour le dosage du tétraol après dérivatisation. Pour le 3-OHB[a]P, une trop faible volatilité est obtenue, même après dérivatisation, pour utiliser cette technique (Ariese et al. 1994).

Le tableau suivant récapitule les niveaux urinaires de 1-OHP, 3-OHB[a]P et tétraol, mesurés chez l'homme, pour différents types de population.

Tableau 3 : Niveaux urinaires de 1-OHP, 3-OHB[a]P, et tétraol dans différentes populations exprimés par la moyenne (moy) ± écart-type (ET) ou les valeurs de minimum et maximum (min-max). Lorsque les métabolites ne sont pas détectés chez tous les sujets, le nombre de sujets pour lesquels une détection est observée sur le nombre de sujets total (N) est indiqué.

Référence	Sujets	N	1-OHP µmoles/mole de créatinine	3-OHB[a]P ng/L	Tétraol ng/L	Technique (3- OHB[a]P, tétraol)	LD 3-OHB[a]P (ng/L)	LD tétraol (ng/L)
Population générale								
(Jacob et al. 2002)	Non-fumeurs	10	0,015-0,1					
(Granella et al. 1993)	Non-fumeurs	19	0,083 ± 0,042					
(Simon et al. 2000)	Non-fumeurs	3		0,2 (1/3)		CLHP-Fluo	0,1	
(Lafontaine et al. 2006)	Non-fumeurs	27	0,01-0,148	<0,013-0,058			0,013	
(Jacob et al. 2002)	Fumeurs	9	0,03-0,3					
(Simon et al. 2000)	Fumeurs	3		0,5 ± 0,3		CLHP-Fluo	0,1	
(Lafontaine et al. 2006)	Fumeurs	27	0,041-0,53	<0,013-0,11			0,013	
(Simpson et al. 2000)	29 ± 6 cigarettes/jour	21			0,15 ± 0,13 (9/21)	CG-SM		1
(Hollender et al. 2000)	Enfants	10	0,033-0,13	Non détecté		CLHP-Fluo	51	
(Simpson et al. 2000)	Traitement pour le psoriasis	20			5,12 ± 5	CG-SM		1
	Administratifs cokerie	5			0,2 (2/5)			
(Wu et al. 2002)	Administratifs cokerie	16	0,4 ± 0,2		0,13 ± 0,13 (3/16)	CG-SM		0,16
(Ariese et al. 1994)	Employés ferroviaires	6	0,53 ± 0,4	6,2 ± 4,6		CLHP-Fluo laser	0,5	
Exposition professionnelle								
(Simon et al. 2000)		3		5,1 ± 4		CLHP-Fluo	0,1	
(Gundel et al. 2000)	Briques réfractaires	19	5,8 (2,6-57)	21 (4,5-300)		CLHP-Fluo	6	
(Xu et al. 2004)	Cokerie	6	8,5 (2,2-19,5)	680 (1/6)		CLHP-SM/SM	0,45	
(Wu et al. 2002)	Cokerie	41	9,7 ± 21,6		1,71 ± 1,28	CG-SM		0,16
(Simpson et al. 2000)	Cokerie	13			1,13 ± 1,37	CG-SM		1
(Ariese et al. 1994)	Cokerie	9	6,2 ± 5,4	16,5 ± 26,6		CLHP-Fluo laser	0,5	
(Bentsen-Farmen et al. 1999)	Pâte Soderberg	17	10,2 ± 6,6		Non détecté	CLHP-Fluo		6,4

V-3 Biomarqueurs de dose efficace

Ainsi, la mesure de la dose interne apparaît plus précise pour estimer les risques sanitaires que la mesure des concentrations atmosphériques en HAP. Néanmoins ce type de mesure ne reflète pas la dose d'HAP qui a réellement réagi avec les cibles cellulaires sensibles telles que l'ADN. Dans ce sens, la mesure de dose efficace apparaît d'un intérêt majeur puisqu'elle prend en compte non seulement les facteurs de métabolisation mais aussi les phénomènes de formation et de réparation des lésions moléculaires (Perera et al. 2000). Parmi ces lésions, celles de l'ADN sont les plus importantes pour estimer les risques de survenue des cancers, de par leur rôle dans l'initiation des processus de cancérogénèse. Nous présenterons dans cette partie les biomarqueurs de dose efficace des HAP, à savoir les adduits de l'ADN. Dans le cas de l'ADN, les biomarqueurs de dose efficace sont également appelés biomarqueurs de dose génotoxique.

Les adduits de l'ADN peuvent être mesurés dans différents tissus, mais pour des raisons pratiques et éthiques les organes cibles des HAP ne sont pas facilement accessibles à la surveillance de l'exposition. Seuls certains tissus, comme les tissus pulmonaires, peuvent être analysés lorsque la survenue d'un cancer est déclarée et qu'une intervention chirurgicale est nécessaire. Ces études permettent de mieux comprendre les mécanismes de l'initiation des cancers au niveau des organes cibles. Pour des sujets fumeurs atteints de cancer du poumon, il semble que les adduits soient présents en quantités plus importantes dans les tissus périphériques de la tumeur plutôt que dans les tissus tumoraux eux-mêmes. Une hypothèse pour expliquer cette différence serait la prolifération cellulaire rapide des tissus tumoraux entraînant un phénomène de dilution des adduits plus important dans ces tissus que dans les tissus sains. Chez ces mêmes sujets, le taux d'adduits du BPDE mesurés par CLHP-Fluo dans les cellules bronchiques non-tumorales serait corrélé à la consommation de tabac (Gyorffy et al. 2004). Aucun adduit n'est détecté dans les cellules plus profondes du parenchyme indiquant une pénétration limitée du B[a]P présent dans la fumée de tabac dans l'épithélium respiratoire, et une initialisation des cancers au niveau des cellules bronchiques plus superficielles (Rojas et al. 2004).

Classiquement, les adduits sont recherchés dans les cellules sanguines plus accessibles, et plus précisément dans les leucocytes. La question qui se pose est de savoir si la formation des adduits dans les leucocytes est représentative de celle qui survient dans les organes cibles. Chez des rats exposés à une dose de B[a]P par voie orale, intratrachéale ou cutanée, une relation entre les taux d'adduits mesurés dans les leucocytes et dans les poumons est observée pour les trois voies d'exposition. Toutefois, les quantités d'adduits sont plus faibles dans les leucocytes que dans les poumons, de l'ordre de cinq fois pour l'exposition intratrachéale par exemple. De ce fait, la mesure des adduits dans les leucocytes pourrait sous-estimer la quantité d'adduits formés dans les tissus cibles (Godschalk et al. 2000). De même, chez les sujets fumeurs atteints d'un cancer du poumon, les taux d'adduits seraient deux fois supérieurs dans les tissus périphériques de la tumeur que dans l'ADN lymphocytaire (Gyorffy et al. 2004).

Chez l'homme, la relation entre la quantité d'adduits mesurés dans les cellules du sang et dans les tissus pulmonaires est observée uniquement lorsque les adduits sont mesurés dans les cellules mononuclées, incluant les lymphocytes et les monocytes. D'une manière générale, l'utilisation des cellules mononuclées semble permettre d'obtenir des résultats plus pertinents que celle des leucocytes totaux (Godschalk et al. 2003). Cette constatation pourrait être expliquée par les différences de durée de vie et de quantités des différents types de leucocytes. En effet, les granulocytes et les monocytes, représentant respectivement environ 60% et 5 à 10% des leucocytes, ont une durée de vie courte de l'ordre d'une journée, et seraient représentatifs d'une exposition récente. A l'inverse, les lymphocytes comptant pour 20 à 40% des leucocytes ont une durée de vie longue de l'ordre de plusieurs années, et seraient représentatifs d'une exposition à long terme. De plus, des différences de métabolisation du B[a]P importantes semblent exister entre ces types cellulaires, les granulocytes contenant des taux d'adduits beaucoup plus faibles que les monocytes et lymphocytes (Besarati Nia et al. 2002).

L'étude des adduits de l'ADN dans les cellules du sang présente enfin l'intérêt d'être représentative de toutes les voies d'absorption (Godschalk et al. 2003). En effet, d'autres tissus périphériques peuvent être utilisés comme les frottis des cavités nasales et buccales, ou encore les lavages bronchoalvéolaires et les crachats mais ces derniers sont représentatifs de l'exposition par voie nasopharyngée uniquement (Besarati Nia et al. 2002).

Outre le type de tissu, les cinétiques de formation et d'élimination des adduits dans le tissu concerné sont à prendre en compte afin d'être en mesure de relier les taux d'adduits à

l'exposition. Actuellement les études de cinétique ont essentiellement été réalisées dans des modèles animaux. L'exposition de rats à une dose unique de B[a]P par voies intratrachéale, cutanée ou orale, et la mesure des adduits formés dans quatre tissus, à savoir les poumons, la peau, l'estomac et les leucocytes, ont permis de mettre en évidence un niveau maximum d'adduits atteint deux jours après le traitement pour toutes les voies d'exposition et tous les tissus (Godschalk et al. 2000). Toutefois, les quantités d'adduits formés et leur cinétique d'élimination sur 21 jours sont différentes selon la voie d'exposition. Ainsi, alors que le taux maximum d'adduit est trois fois moins important dans les poumons après une exposition orale qu'après une exposition intra-trachéale, 74% des adduits sont encore présents 21 jours après l'exposition orale, contre seulement 34% après l'exposition intra-trachéale. De plus, la cinétique d'élimination semble varier selon les tissus. En effet, le traitement par voie orale de rats à une dose unique de B[a]P confirme la présence d'un taux maximum d'adduits deux jours après traitement dans le foie et les poumons, mais l'élimination des adduits après deux jours est beaucoup plus rapide dans le foie que dans les poumons (Briede et al. 2004).

Chez l'homme, la cinétique d'élimination des adduits formés dans les leucocytes de sujets fumeurs semble présenter deux phases après arrêt du tabac : une phase rapide d'élimination, puis une phase plus lente qui se stabilise à un niveau résiduel d'adduits. La demi-vie alors estimée des adduits dans les cellules mononuclées du sang serait de 10 à 12 semaines. Les deux phases d'élimination des adduits pourraient être liées à la différence de durée de vie des monocytes et des lymphocytes. En effet, une semaine après traitement au coal-tar de patients atteints de psoriasis, le taux d'adduits serait de retour au niveau basal dans les monocytes et granulocytes, mais encore persistant dans les lymphocytes (Godschalk et al. 2003).

Enfin, certains adduits de l'ADN peuvent être retrouvés dans l'urine suite à leur dépurination. La quantité d'adduits éliminée est alors très faible, et de même que pour les métabolites urinaires, l'étape de purification et concentration de l'urine est primordiale. Environ 0,013 % du B[a]P marqué au ¹⁴C administré à des rats est ainsi éliminé sous forme de B[a]P-N7-Gua dans l'urine, et 0,008 % dans les fèces. De plus, environ 80% du B[a]P-N7-Gua éliminé dans l'urine sont excrétés le deuxième jour après traitement, tandis que 80% du B[a]P-N7-Gua éliminé dans les fèces sont excrétés le troisième jour (Rogan et al. 1990).

En plus de l'exposition, les adduits de l'ADN pourraient être représentatifs du risque de survenue de cancers. Dans l'étude de Tang et al. (Tang et al. 2001) 22000 médecins de sexe masculin ont été suivis pendant 13 ans et un prélèvement sanguin avec une mesure des

adduits leucocytaires par la technique du post-marquage a été effectuée au moment de l'entrée dans la cohorte. Parallèlement, des informations sur l'histoire tabagique des sujets ont été recueillies grâce à des questionnaires réguliers. Au bout de 13 ans, 89 cas de cancers du poumon déclarés ont permis de constituer les cas de l'étude. 173 témoins ont été choisis au sein de la cohorte de manière à prendre en compte l'âge et le statut tabagique des sujets. Il s'avère que pour des sujets fumeurs ayant la même consommation tabagique évaluée en nombre de cigarettes par jour, ceux qui présentent un fort taux d'adduits lors de l'entrée dans la cohorte ont un risque trois fois plus élevé de développer un cancer 13 ans plus tard que ceux ayant un faible taux d'adduits. A l'inverse, aucune augmentation du risque de survenue de cancer n'est observée pour les sujets non-fumeurs ou ex-fumeurs présentant des taux d'adduits élevés au début de l'étude. De plus, pour les sujets fumeurs, le taux d'adduits leucocytaires mesurés au moment du diagnostic est environ deux fois supérieur chez les cas que chez les témoins, alors qu'aucune différence significative n'est établie entre les cas et témoins non-fumeurs ou ex-fumeurs. La prédictivité de la mesure des adduits quant à la survenue d'un cancer n'est donc pas observée chez tous les types de sujets.

Une méta-analyse a permis de regrouper les résultats de mesures d'adduits par post-marquage ou ELISA dans les leucocytes ou dans les tissus pulmonaires périphériques de tumeurs de plusieurs études cas-témoins réalisées chez des sujets atteints de cancers du poumon, des voies digestives, ou de la vessie. De même que précédemment, les taux d'adduits des cas sont significativement plus élevés (de 83%) que ceux des témoins uniquement chez les sujets fumeurs. Les fumeurs actuels ayant un fort taux d'adduits présentent ainsi un risque accru de développer un cancer du poumon ou de la vessie (Veglia et al. 2003).

De même des sujets fumeurs atteints d'un cancer du poumon auraient entre 1,7 et 2,4 fois plus d'adduits de l'ADN mesurés par post-marquage, dans les tissus tumoraux, périphériques de tumeurs, et dans les bronches, par rapport à des sujets non-fumeurs atteints d'un cancer du poumon (Gyorffy et al. 2004). Enfin, les taux d'adduits mesurés dans les zones périphériques de tumeurs sont significativement plus élevés chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (Godschalk et al. 2002).

Les adduits de l'ADN sont de plus en plus étudiés en tant que biomarqueurs d'exposition génotoxique aux HAP dans différentes populations exposées. Toutefois, il est important de préciser qu'actuellement les taux d'adduits mesurés, la plupart du temps dans l'ADN

leucocytaire, démontrent une corrélation peu satisfaisante avec l'exposition aux HAP (Brandt et al. 2003).

Le tableau 4 présente les niveaux d'adduits de l'ADN mesurés dans différents types de populations.

Tableau 4 : Niveaux d'adduits de l'ADN (adduits/10⁸ nucléosides normaux) mesurés dans différents types de populations.

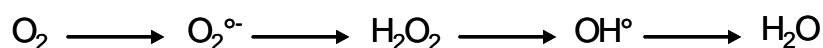
Référence	Sujets	N	Adduits	Cellules	Moy ± ET (min-max).	Technique	LD
Population générale							
(Palli et al. 2001)	Résidents de Florence	100	Adduits volumineux	Leucocytes	1,1	³² P	
Non-fumeurs							
(Georgiadis et al. 2001)	Etudiants d'Athènes	225	Adduits volumineux	Lymphocytes	1,25 ± 1,19	³² P	0,1
(Peluso et al. 1998)	Travail de bureau	36	Adduits volumineux	Leucocytes	0,94 (0,1-3,7)	³² P	
(Peluso et al. 2004)	Patients avec bronchoscopie	12	ADN-HAP	Lavage nasal	0,82 ± 0,63	³² P	
		10		Bronches	0,62 ± 0,30		
		11		Lymphocytes	0,33 ± 0,22		
Fumeurs							
(Lodovici et al. 2004)	< 10 cigarettes/jour	14	ADN-BPDE	Leucocytes	0,9 ± 0,2	CLHP-Fluo	0,5
	> 10 cigarettes/jour	27			1,4 ± 0,2		
(Godschalk et al. 2002)	25 ± 9 cigarettes/jour	24	ADN-BPDE	Lymphocytes + monocytes	0,76 ± 0,41	³² P	≤ 0,1
(Peluso et al. 2004)	Patients avec bronchoscopie	42	ADN-HAP	Lavage nasal	1,18 ± 0,65	³² P	
		35		Bronches	0,89 ± 0,60		
		42		Lymphocytes	0,60 ± 0,41		
Cancer du poumon							
(Alexandrov et al. 1992)	Fumeurs	13	ADN-BPDE	Poumon sain	3,6 (0,6-9,9)	CLHP-Fluo	1
(Rojas et al. 2004)	Fumeurs	22	ADN-BPDE	Cellules épithéliales	84,7 ± 38,4	CLHP-Fluo	5
	Non-fumeurs			bronchiques	37,6 ± 22,2		
Exposition professionnelle							
(Palli et al. 2001)	Travailleurs sur routes	114	Adduits volumineux	Leucocytes	1,37	³² P	
(Peluso et al. 1998)	Policiers non-fumeurs	34	Adduits volumineux	Leucocytes	1,3 (0,1-5,5)	³² P	
(Ruchirawa et al. 2002)	Policiers non-fumeurs	89	Adduits volumineux	Lymphocytes	1,6 (0,4-4,3)	³² P	
(Pavanello et al. 1999)	Cokerie	15	ADN-BPDE	Lymphocytes + monocytes	19,5 ± 32,2	CLHP-Fluo	2
	Ramoneurs	19			5,5 ± 8,4		
	Aluminium	36			11,5 ± 44,3		
(Mensing et al. 2005)	Briques réfractaires	26	ADN-BPDE	Leucocytes	0,9 (0,5-2,8)	CLHP-Fluo	0,5
	Cokerie	9			2,1 (0,5-41)		
(Rojas et al. 1995)	Cokerie	39	ADN-anti-BPDE	Lymphocytes + monocytes	15,7 ± 37,8	CLHP-Fluo	1
(van Schooten et al. 1995)	Aluminium fumeurs	12	ADN-HAP	Leucocytes	51,5 ± 49,8	³² P	1
	Aluminium non-fumeurs	17			31 ± 34,5		

V-4 Biomarqueurs d'effets biologiques précoces

Nous présenterons dans cette partie les biomarqueurs d'effets biologiques précoces. Comme les biomarqueurs d'exposition de dose efficace, ils peuvent être mesurés directement dans les organes cibles ou dans un tissu périphérique tel que les cellules du sang. Dans le cas des HAP, ils comprennent essentiellement les lésions oxydatives, les effets cytogénétiques et les mutations.

V-4-a Les lésions oxydatives

Il existe dans tout organisme aérobie une production endogène d'ERO dans les mitochondries liée à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau pour produire de l'énergie. Cependant au cours de cette réaction, présentée ci-dessous, les ERO intermédiaires peuvent s'échapper et entraîner des dommages de type oxydatif.



La production d'ERO est ainsi permanente dans l'organisme, mais elle est équilibrée par la présence d'espèces anti-oxydantes naturelles ou apportées par l'alimentation. La formation des lésions oxydatives est donc dépendante de la balance entre la production des ERO et leur désactivation par les systèmes de protection anti-oxydante. De nombreuses pathologies et divers xénobiotiques, peuvent accroître la production d'ERO et entraîner une formation importante de dommages oxydatifs. Il est donc important de préciser que la formation des dommages oxydatifs est multi-factorielle, et n'est pas spécifique du B[a]P qui, comme nous l'avons vu précédemment, fait partie des xénobiotiques qui peuvent générer des ERO au cours de leur métabolisme.

La 8-oxodGuo est le biomarqueur classiquement mesuré pour évaluer les dommages oxydatifs de l'ADN. Cette lésion peut être recherchée directement dans l'ADN, comme les adduits, mais aussi dans l'urine. En effet, la 8-oxodGuo est présente en quantité non négligeable dans l'urine ce qui rend sa détection possible dans la population générale.

Une question essentielle se pose néanmoins quant à l'origine de la 8-oxodGuo urinaire. Une première hypothèse a été que la 8-oxodGuo pouvait avoir une origine alimentaire, mais elle a été infirmée par des études chez l'animal et l'homme. La comparaison d'analyses d'urines de rats nourris normalement ou avec un régime sans acides nucléiques a permis de mettre en évidence l'indépendance de l'excrétion urinaire de la 8-oxodGuo vis-à-vis de l'alimentation (Park et al. 1992). Ceci a ensuite été démontré pour l'excrétion urinaire de la 8-oxo-7,8-dihydro-guanine (8-oxoGua) et de la 8-oxodGuo chez la souris (Rozalski et al. 2004) et chez l'homme (Gackowski et al. 2001). Tous ces résultats tendent donc à prouver que les biomarqueurs de lésions oxydatives comme la 8-oxoGua et la 8-oxodGuo mesurées dans l'urine ne sont pas d'origine alimentaire. D'autres résultats basés sur le suivi de l'ingestion d'ADN marqué isotopiquement au ^{15}N montreraient que l'ADN ingéré serait éliminé dans les fèces (Cooke et al. 2005).

Le renouvellement cellulaire a également été proposé en tant que source possible de 8-oxodGuo dans l'urine, mais les résultats de diverses études tendent à réfuter cette hypothèse (Cooke et al. 2005).

Enfin la présence de 8-oxodGuo dans l'urine pourrait être la conséquence de la réparation de l'ADN. La réparation de la 8-oxodGuo est essentiellement prise en charge par le système de la REB entraînant l'excrétion urinaire de 8-oxoGua. Cependant, bien que le système de la REN prenne en charge essentiellement les lésions de l'ADN volumineuses, il a été mis en évidence *in vitro* que ce système pouvait également réparer de petites lésions comme la 8-oxodGuo. La vitesse de réparation, marquée par la génération d'oligomères de 20 à 30 nucléotides, apparaît ainsi similaire à la vitesse de réparation des dimères de Thy connus pour être réparés *in vivo* par la REN (Reardon et al. 1997). A ce propos, notons que la recherche d'oligomères contenant de la 8-oxodGuo dans de l'urine humaine s'est avérée infructueuse. Des oligonucléotides sont pourtant excrétés dans l'urine mais ils ne contiennent pas de dommages oxydatifs (Weimann et al. 2004). Il semblerait que d'autres mécanismes, tels que des activités endonucléasiques, interviennent alors dans la dégradation de ces oligomères suite à la REN, mais ils restent encore à élucider.

Une endonucléase a également été décrite comme pouvant réparer la 8-oxodGuo. Son manque d'activité glycosylase entraînerait l'élimination de 8-oxo-3',5'-dGuo-diphosphate (8-oxo-3',5'-dGuo-DP) qui sous l'action de nucléotidases pourrait aboutir à l'élimination urinaire de 8-oxodGuo (Bessho et al. 1993).

Une dernière origine possible pour la 8-oxodGuo urinaire serait enfin liée à l'élimination de 8-oxodGuo-monophosphate (8-oxodGuo-MP) par l'enzyme 8-oxodGuo-TPase au sein des désoxynucléotides-triphosphate (dNTP) disponibles pour la réplication de l'ADN.

La réparation de l'ADN semble ainsi être la voie la plus probable expliquant la présence de 8-oxodGuo dans l'urine. Le schéma ci-dessous (Figure 19) illustre les différentes sources possibles de 8-oxodGuo dans l'urine en lien avec la réparation de l'ADN.

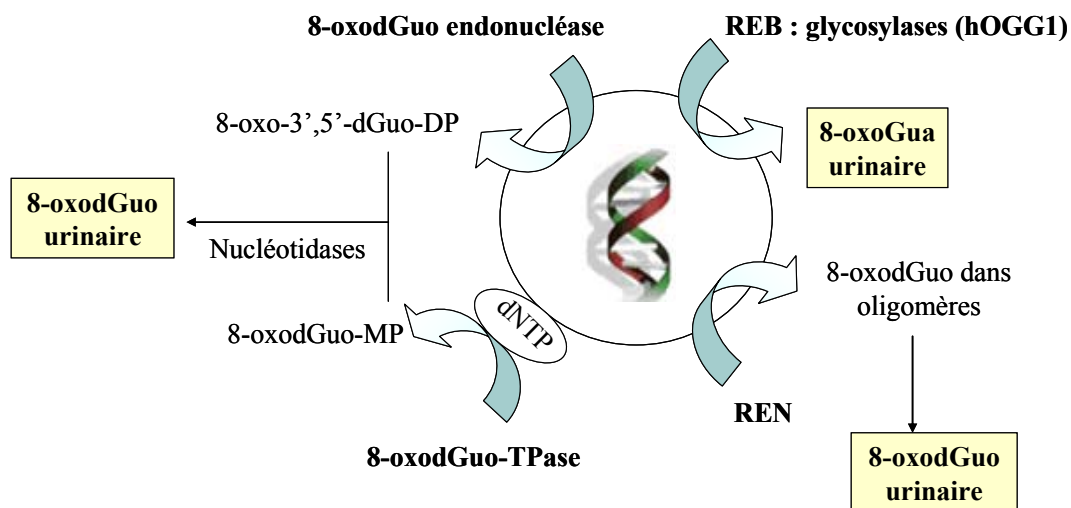


Figure 19 : Origines possibles de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGua dans l'urine en lien avec la réparation de l'ADN, d'après (Cooke et al. 2005).

En plus de la 8-oxodGuo, les lésions correspondantes sur la Gua et sur la guanosine (Guo), 8-oxoGua et 8-oxo-7,8-dihydro-guanosine (8-oxoGuo) respectivement, peuvent être également mesurés dans l'urine de la population générale (Weimann et al. 2002).

Dans le cas de l'exposition aux HAP, la 8-oxodGuo est mesurée dans les leucocytes ou dans l'urine de sujets exposés. Pour des raisons pratiques, le dosage dans l'urine est souvent privilégié. Toutefois, que ce soit pour les dosages sanguins ou urinaires, il n'est pas toujours possible de relier ce biomarqueur d'effet à l'exposition aux HAP.

Dans le tableau 5 sont présentés les niveaux urinaires de 8-oxodGuo mesurés dans différents types de populations.

Tableau 5 : Niveaux de 8-oxodGuo urinaire (μ moles/mole de créatinine) mesurés chez différents types de sujets et selon différentes techniques.

Référence	Sujets	Tabac	N	Technique	8-oxodGuo Moy \pm ET (min-max)
Population générale					
(Harri et al. 2005)	Hiver	Non-fumeurs	17	CLHP-EL	1,56 \pm 0,61
	Été				1,43 \pm 0,49
(Pilger et al. 2001)	Non-fumeurs		45		1,62 \pm 0,50
	Fumeurs		23		1,95 \pm 0,40
(Hu et al. 2004)	Administratifs cokerie		49	CLHP-SM/SM	2,2 \pm 1,32
				ELISA	5,81 \pm 5,08
(Liu et al. 2006)	Non-fumeurs		6	CLHP-EL	1,0 (0,7-1,2)
	Fumeurs		25		1,7 (1,0-4,6)
Exposition professionnelle					
(Harri et al. 2005)	Particules diesel, hiver		29	CLHP-EL	1,52 \pm 0,44
	Particules diesel, été				1,61 \pm 0,33
(Hu et al. 2004)	Cokerie		91	CLHP-SM/SM	3 \pm 1,79
				ELISA	5,9 \pm 3,69
(Liu et al. 2006)	Non-fumeurs		35	CLHP-EL	2,9 (1,5-30)
	Fumeurs		12		1,9 (1,1-5,5)
(Wu et al. 2003)	Cokerie – Sommet du four		217	CLHP-EL	3,69 \pm 3,2

V-4-b Les effets cytogénétiques et les mutations

Bien que peu sensibles, ces biomarqueurs sont d'un grand intérêt puisqu'ils mettent en évidence des effets irréversibles. Toutefois, aucun de ces biomarqueurs n'est actuellement utilisé pour la surveillance biologique en routine, au même titre que les adduits de l'ADN.

Les effets cytogénétiques correspondent aux mutations chromosomiques, ou anomalies de nombre ou de structure. Deux tests principaux permettent de mettre en évidence ces anomalies, le test des micro-noyaux et le test des échanges de chromatides sœurs.

La mesure des micro-noyaux permet de détecter la perte d'un chromosome entier ou d'un fragment de chromosome par la détermination et le dénombrement, au sein d'une population cellulaire en interphase, des cellules présentant une ou plusieurs entités nucléaires

indépendantes du noyau principal. Ce test est proposé pour le suivi de l'exposition génotoxique des populations (Fenech 2000). Dans le cas des HAP, le nombre de micronoyaux est significativement plus élevé dans les lymphocytes de sujets exposés à des émissions de four à coke que de sujets non-exposés (Siwinska et al. 2004; Liu et al. 2006). La mesure des échanges de chromatides sœurs, elle, permet de mettre en évidence des échanges de segments d'ADN entre des chromatides sœurs. L'augmentation de la fréquence des échanges de chromatides sœurs est classiquement rapportée chez des sujets fumeurs par rapport à des sujets non-fumeurs (DeMarini 2004).

Un autre type d'effet biologique correspond aux mutations ponctuelles : l'analyse des mutations de l'ADN permet de mettre en évidence des anomalies à des sites spécifiques de l'ADN. Toutefois, ce type de mesure, plus lourd à mettre en œuvre que la mesure des aberrations chromosomiques, n'est pas classiquement utilisé pour le suivi de l'exposition des populations. Il permet essentiellement d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de mutagenicité des toxiques. Les techniques de biologie moléculaire comme la technique d'amplification en chaîne par polymérase, permettent actuellement de détecter des mutations à un stade précoce de la cancérogénèse, bien avant que les cellules mutées n'entrent en expansion clonale. Certains gènes sont apparus comme des gènes cibles, dans le sens où ces gènes sont fréquemment mutés dans de nombreux cancers. C'est le cas du gène suppresseur de tumeur p53 qui est muté dans 60% des cas de cancers du poumon chez l'homme (Hollstein et al. 1991). Ce gène n'est pas muté uniquement dans les cancers du poumon mais trois caractéristiques distinguent les mutations de p53 dans les cancers du poumon par rapport aux mutations de ce gène dans d'autres cancers. La première réside dans la prédominance de transversions de la Gua vers la Thy et la seconde, dans le fait que les Gua sont essentiellement mutés sur le brin non-transcrit. La troisième résulte de la mutation de certains codons dits préférentiels qui compte pour environ 50% de toutes les mutations de p53 (Shen et al. 2006). Ces caractéristiques peuvent toutes être reliées à une exposition aux HAP contenus dans la fumée de cigarettes, responsables de la survenue de nombreux cancers du poumon. Précédemment, nous avons vu que les adduits du B[a]P pouvaient entraîner des transversions de la Gua vers la Thy, or celles-ci sont trois fois plus importantes dans les cancers du poumon de fumeurs que chez les non-fumeurs (Pfeifer et al. 2003). De la même façon, nous avons présenté les mécanismes de réparation de la REN qui entraînent une réparation plus efficace dans les zones codantes du génome, et pourraient être à l'origine de la

persistance plus importante des adduits sur les brins non transcrits (Denissenko et al. 1998). Enfin, d'un point de vue mécaniste, la distribution de l'adduit (\pm)-anti-BPDE a été cartographiée sur le gène p53 et il s'avère que cet adduit se forme préférentiellement sur certains codons, à savoir les codons 154, 157, 158, 245, 248, 249 et 273. Or ces mêmes codons, notamment les codons 157, 248 et 273 sont les sites de mutations majoritaires dans les cancers du poumon chez l'homme (Hollstein et al. 1991; Denissenko et al. 1996). Ces mutations caractéristiques sont ainsi considérées comme une signature des HAP dans les cancers du poumon (Hainaut et al. 2001).

Plus récemment, une étude sur la levure a montré que les transversions de la Gua vers la Thy sur le gène p53 pourraient être attribuées majoritairement aux dommages oxydatifs par la voie de métabolisation des quinones du B[a]P, plutôt qu'aux adduits du BPDE. En effet, la mutagénicité de la B[a]P-7,8-dione, par la formation de 8-oxodGuo en conditions oxydo-réductrices, induirait majoritairement des transversions de la Gua vers la Thy, tandis que la BPDE induirait majoritairement des transversions de la Gua vers la Cyt (Shen et al. 2006). Ceci pourrait être mis en relation avec la synthèse translésionnelle des adduits du BPDE par la pol ζ qui induit majoritairement des transversions de la Gua vers la Cyt (Xie et al. 2003).

V-5 Biomarqueurs de susceptibilité

Cette catégorie de biomarqueurs concerne toutes les caractéristiques innées ou acquises modulant la susceptibilité des individus vis-à-vis de la survenue de pathologies. C'est aussi la catégorie de biomarqueurs qui génère le plus d'interrogations sur le plan éthique (Perera 1997; Van Damme et al. 2003). Les biomarqueurs de susceptibilité incluent les prédispositions génétiques, l'ethnicité, l'âge, le genre, l'état de santé ou encore le statut nutritionnel. Concernant les HAP, une susceptibilité particulièrement importante a été démontrée chez les enfants par rapport aux adultes, du fait notamment d'une absorption accrue, et de mécanismes de détoxification et de réparation de l'ADN réduits. De même, chez les fumeurs, les femmes ont un risque entre 1,7 et 3 fois plus élevé de développer un cancer du poumon que les hommes (Perera 1997). La susceptibilité génétique est également de plus en plus documentée. Elle concerne essentiellement des facteurs génétiques communs qui ne sont pas responsables de pathologies à eux seuls mais qui peuvent favoriser leur survenue, tels que les gènes codant pour les enzymes intervenant dans l'activation et la détoxification des

HAP. Les gènes codant pour les enzymes de phase I comme la famille des cyt. P450 sont polymorphes. Environ 10% de la population caucasienne possède une forme du cyt. P450 1A1 entraînant un risque accru de cancer du poumon chez les fumeurs. Cette augmentation de risque est plus importante, chez les fumeurs légers (de l'ordre de sept fois), que chez les gros fumeurs, pour qui elle n'est que de deux fois (Perera 1997). De même la mutagénicité de l'urine est significativement plus élevée chez des fumeurs ayant une forte activité métabolique du cyt. P450 1A2, par rapport à des fumeurs ayant une faible activité métabolique (Pavanello et al. 2002). En lien avec sa capacité d'induction des cyt. P450, le polymorphisme génétique du récepteur AhR peut également moduler la formation des adduits de l'ADN. Ainsi, dans deux lignées humaines d'adénocarcinome pulmonaire présentant les mêmes niveaux de récepteur AhR, l'activité enzymatique du cyt. P450 1A1 et la formation d'adduits de l'ADN ne sont fortement induites par le B[a]P que dans une des deux lignées (Chang et al. 1999). Chez l'homme, un polymorphisme rare du récepteur AhR a été associé à une inductibilité accrue de l'expression du cyt. P450 1A1 par les dioxines (Wong et al. 2001).

Il existe également un polymorphisme génétique au niveau des gènes codant pour les enzymes de phase II, telles que les époxydes hydrolases, les glutathion synthétyle-transférases (GST), les N-acétyl-transférases, et les sulfo-transférases. Par exemple, le gène GSTM1 est totalement inactif dans environ 50% de la population caucasienne, et ce phénotype a été associé à un risque plus élevé de 1,7 et 1,4 fois de survenue de cancers de la vessie et du poumon respectivement (Perera 1997). Parallèlement au risque accru de cancer, la déficience pour le gène GSTM1 entraîne une augmentation des taux d'adduits du BPDE chez les personnes exposées aux HAP. C'est le cas de travailleurs de four à coke qui présentent une augmentation significative du taux d'adduits du BPDE dans les cellules mononuclées du sang en cas de déficience pour le gène GSTM1 (Pavanello et al. 2005). Cependant, cette augmentation du taux d'adduits dans les poumons de fumeurs pour le génotype GSTM1 déficient n'est observée que lorsque les adduits du BPDE sont quantifiés de manière spécifique. Lorsque les adduits sont mesurés de façon plus globale, avec les techniques notamment de post-marquage ou immunologiques, aucun effet du polymorphisme des gènes GSTM1 ou en encore du cyt. P450 1A1 ne peut être mis en évidence. Ceci souligne l'importance de détecter les adduits du B[a]P de façon spécifique (Alexandrov et al. 2002). D'autres cancers pourraient également être modulés par le polymorphisme génétique dans le cas d'une exposition aux HAP. C'est le cas du cancer du sein pour lequel le tabac apparaît

comme un facteur de risque. Dans une étude cas-témoin la susceptibilité vis-à-vis du BPDE de lymphocytes mis en culture, mesurée par les cassures de chromatides, est plus importante chez les cas que chez les témoins. Le taux de cassures des chromatides est associé à un risque plus élevé de survenue de cancer du sein, de l'ordre de trois fois. Ce risque est encore plus élevé pour les sujets de moins de 45 ans, fumeurs de longue date, consommateurs d'alcool, et porteurs du gène GSTT1 déficient (Xiong et al. 2001). La susceptibilité plus grande des cas par rapport aux témoins vis-à-vis de la formation des cassures de l'ADN est reliée à une capacité de réparation de l'ADN réduite chez les cas de cancers du sein par rapport aux témoins (Shi et al. 2004).

Les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN constituent ainsi également des biomarqueurs de susceptibilité. Une relation dose-dépendante entre le nombre d'allèles à risque sur trois gènes de réparation, et le taux d'adduits de l'ADN évalués par post-marquage dans les cellules mononuclées du sang a ainsi été mise en évidence dans une population de 628 individus (Matullo et al. 2003).

Enfin, la nutrition peut influencer la susceptibilité des individus. La consommation de quatre tasses de thé vert pendant quatre mois entraîne une diminution de la 8-oxodGuo urinaire chez des fumeurs mais cet effet n'est pas observé lors de la consommation de thé noir (Hakim et al. 2003). De la même façon, la complémentation nutritionnelle en vitamine C et E pendant 15 mois chez des femmes qui fument permet de diminuer de 30% le taux d'adduits du B[a]P mesurés dans les lymphocytes. Aucun effet n'a été observé chez les hommes (Mooney et al. 2005).

VI- Conclusion et objectifs de la thèse

L'exposition au B[a]P est incontestablement reconnue comme une cause de survenue de cancers chez l'homme. Il apparaît donc primordial de pouvoir évaluer l'exposition des individus au B[a]P, notamment en milieu professionnel où les niveaux d'exposition peuvent être très élevés.

La surveillance biologique de l'exposition aux HAP est classiquement réalisée par la mesure du 1-OHP. Bien que ce métabolite présente des facilités de mesure dans l'urine, et représente globalement l'exposition aux HAP pour une source donnée, il est important de développer de nouveaux biomarqueurs d'exposition qui soient spécifiques du B[a]P, afin d'évaluer plus précisément l'exposition génotoxique chez l'homme.

Outre les métabolites urinaires du B[a]P qui apportent une mesure spécifique de la dose interne, les adduits de l'ADN apparaissent d'un intérêt majeur pour évaluer l'exposition génotoxique : ils permettent en effet d'évaluer la dose de B[a]P au plus près de son site d'action toxique, à savoir l'ADN. De plus, la mesure des adduits prend en compte divers éléments, comme les phénomènes d'absorption, de métabolisation, et de réparation de l'ADN. Les adduits de l'ADN reflètent ainsi les niveaux d'exposition mais également les facteurs individuels pouvant moduler l'action cancérigène du B[a]P. Deux voies métaboliques majoritaires conduisent à la formation d'adduits de l'ADN du B[a]P : la voie du BPDE et la voie du radical cation du B[a]P, la voie métabolique des quinones du B[a]P étant principalement une voie oxydative. Bien que la formation des différents adduits du B[a]P soit bien connue *in vitro*, très peu d'études à ce jour ont permis d'évaluer les proportions relatives des divers adduits potentiellement formés *in cellulo* ou *in vivo*.

Chez l'homme, les adduits sont mesurés le plus souvent en tant que biomarqueurs d'exposition aux HAP dans les cellules mononuclées du sang. Toutefois, une faible corrélation entre les niveaux d'adduits mesurés et l'exposition aux HAP est souvent rapportée. Ceci pourrait être relié au fait que, dans la plupart des études, les adduits sont mesurés de façon non spécifique par la technique du post-marquage. Cette technique présente une très bonne sensibilité mais ne permet qu'une mesure globale des adduits, et il n'est souvent pas possible de connaître la nature chimique des adduits mesurés. Ce manque de spécificité est également retrouvé avec l'utilisation de la CLHP-Fluo qui permet la mesure

globale des adduits de la voie métabolique du BPDE. Par contre, la CLHP-SM/SM apparaît comme la technique de choix pour le dosage spécifique des adduits au regard de leur nature chimique. Toutefois, cette technique plus récente est actuellement peu utilisée pour les études de suivi de l'exposition chez l'homme.

Il semble ainsi que la mesure actuelle des adduits de l'ADN en tant que biomarqueurs d'exposition aux HAP chez l'homme souffre d'un manque important de spécificité.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de définir de nouveaux biomarqueurs d'exposition génotoxique aux HAP, en identifiant la nature chimique des adduits majoritaires du B[a]P générés au niveau cellulaire, puis en les recherchant dans les milieux biologiques de sujets exposés.

Pour cela, le présent travail se décline en trois grandes parties visant à :

- Mettre au point une méthode permettant le dosage spécifique des différents adduits de l'ADN, issus tant de la voie métabolique de mono-oxygénation que de celle d'oxydation mono-électronique du B[a]P, en utilisant la CLHP-SM/SM.
- Déterminer les adduits majoritairement formés dans des milieux biologiques adaptés tels que des modèles cellulaires humains, et étudier leur pertinence en tant que biomarqueurs d'exposition au regard de leurs cinétiques de formation et d'élimination.
- Rechercher les adduits de l'ADN identifiés dans les modèles cellulaires chez des sujets exposés aux HAP, et comparer la pertinence de ces biomarqueurs par rapport à d'autres biomarqueurs d'exposition et d'effet oxydatif plus classiques.

L'intérêt de ce travail est qu'il repose sur deux aspects complémentaires : un aspect fondamental d'étude des lésions de l'ADN sur le plan chimique et analytique, et un aspect appliqué à l'humain dans le cadre de la médecine du travail, comme en témoigne la co-direction de cette thèse.

Chapitre 2

Synthèse des adduits de l'ADN du B[a]P et mise au point d'une méthode de dosage par CLHP-SM/SM

Chapitre 2 – Synthèse des adduits de l'ADN du B[a]P et mise au point d'une méthode de dosage par CLHP-SM/SM

I- Matériels et méthodes

I-1 Réactifs et produits

Le (±)-*anti*-BPDE et le B[a]P solides proviennent du National Cancer Institute (NCI) (Bethesda, MD). Une solution de (±)-*anti*-BPDE (7,32 mM) est préparée selon les recommandations du NCI dans du tétrahydrofurane (THF) contenant 5% (v/v) de triéthylamine (TEA). L'ADN isolé de thymus de veau, la dGuo, la nucléase P1 (*penicillium citrium*), la phosphodiesterase II et la déféroxamine sont des produits Sigma (St Quentin-Fallavier, France). L'alkaline phosphatase est commercialisée par Roche (Neuilly sur Seine, France), et la phosphodiesterase I (*Crotalus adamentus Venom*) par Amersham (Piscataway, NJ). Les solvants utilisés pour la CLHP sont de pureté analytique. L'eau désionisée est préparée par un système de purification Millipore Milli-Q (Molsheim, France).

I-2 Digestion enzymatique de l'ADN

Tout au long de ce travail, les échantillons d'ADN, solubilisés dans l'eau ou la déféroxamine, sont digérés de façon enzymatique selon un protocole commun. Pour cela, 0,025 unité de phosphodiesterase II, 2,5 unités de DNase II, 0,5 unité de nucléase P1 et 2,5 µL de tampon (acide succinique 200 mM, CaCl₂ 100 mM, pH 6) sont ajoutés à la solution d'ADN. Après une incubation de 2 h à 37°C, 0,015 unité de phosphodiesterase I, 2 unités de phosphatase alcaline et 6 µl de tampon (Tris 500 mM, acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) 1

mM, pH 8) sont ajoutés au mélange. Après 2 h d'incubation supplémentaires à 37°C, 3,5 µL d'HCl (0,1 N) sont ajoutés pour neutraliser la solution.

I-3 Synthèse des adduits du BPDE

La synthèse des adduits du BPDE est réalisée par action de (±)-*anti*-BPDE (1,5 µmoles) sur de l'ADN isolé (4 mg) dans 2 mL d'eau désionisée. Le mélange est placé à 37°C et à l'obscurité pendant 5 jours. L'ADN est ensuite précipité, puis dissous dans 2 mL d'eau. Le protocole de digestion enzymatique précédemment décrit est appliqué à 500 µL de la solution d'ADN obtenue (2 mg/mL). En fin de digestion, l'ADN non digéré est précipité avec 10% (v/v) de NaCl (4 M) et 2,5 volumes d'éthanol froid. Après évaporation à sec, le mélange de nucléosides normaux et d'adduits est repris dans l'eau.

La purification des adduits est réalisée sur un système CLHP-SM/SM composé d'un appareil Agilent (Massy, France) 1100 CLHP équipé d'une pompe binaire, un injecteur automatique thermostaté, et un détecteur UV, couplé à un spectromètre de masse API 3000 de Applied Biosystems comprenant une source de type électrospray et un analyseur triple quadripolaire en mode tandem. La purification est effectuée sur une colonne Uptisphère de silice greffée C18 (250×4.6 mm, 5 µm) d'Interchim (Montluçon, France), avec un gradient linéaire de 30 à 70% d'acétonitrile (ACN) dans du formiate d'ammonium à 10 mM pendant 30 min. Les adduits sont détectés par SM/SM. La mise en place d'une dérivation en sortie de colonne permet de ne laisser que 5% du débit total entrer dans le spectromètre de masse, les 95% restants pouvant ainsi être collectés. Les fractions collectées correspondant aux adduits sont évaporées à sec puis reprises dans l'eau pour être calibrées par spectroscopie UV, en utilisant le coefficient d'absorption moléculaire du BPDE de 41000 à 279 nm dans l'eau (Barry et al. 1996).

I-4 Synthèse électrochimique des adduits du radical cation du B[a]P

La procédure suivie est celle décrite par Rogan et al. (Rogan et al. 1988). La synthèse électrochimique est réalisée dans une cuve (cf. Figure 20) contenant 35 mL de diméthylformamide (DMF) fraîchement distillé et 0,5 M de potassium perchlorate (KClO_4). Le KClO_4 permet d'assurer la conductivité de la solution. Dans la cuve sont plongées trois électrodes : une électrode de référence en argent (Ag^+ 10 mM/Ag), une contre électrode et une électrode de travail en platine ($0,7 \text{ cm}^2$). 0,5 mmole de dGuo solide puis 0,05 mmole de B[a]P solide sont ajoutées dans la cuve et mélangées à l'aide d'un barreau aimanté jusqu'à parfaite solubilisation. Le potentiel de l'électrode de travail est porté à 850 mV puis maintenu constant pendant toute la synthèse. Le paramètre suivi lors de la réaction est la charge, correspondant au courant passant dans les électrodes. La réaction est arrêtée quand la charge consommée correspond à 65% de la charge théorique.

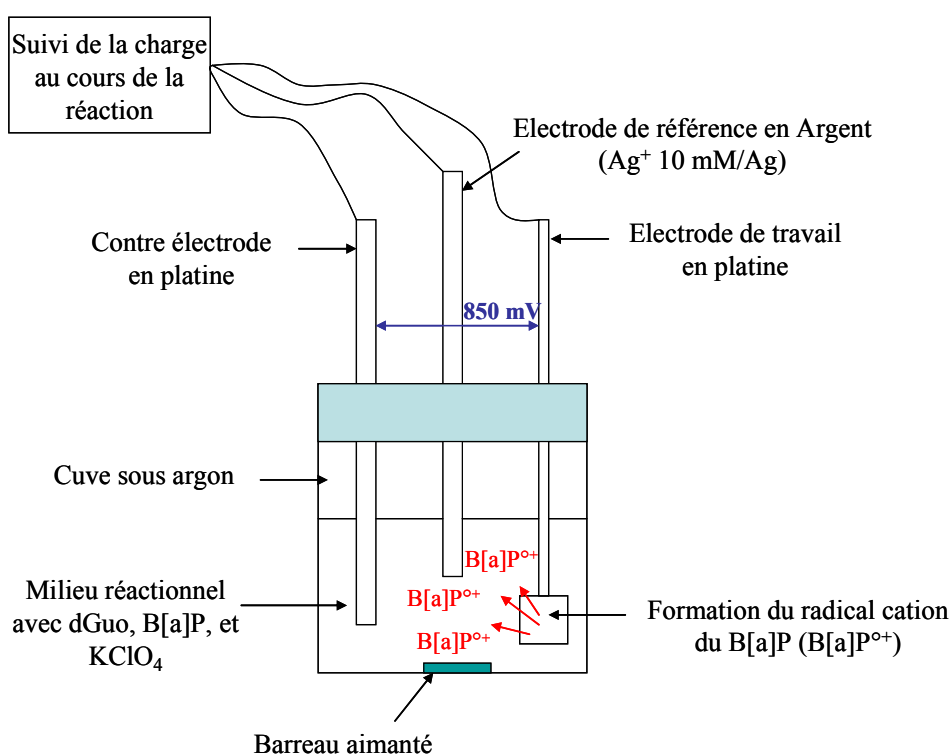


Figure 20 : Montage expérimental de la synthèse électrochimique.

Après évaporation du mélange réactionnel, le résidu sec est repris dans un mélange de diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'eau (2:3, v/v) puis purifié par CLHP préparative. La purification est effectuée à l'aide d'une pompe Merck L-6200 sur une colonne Uptisphère de silice greffée C18 (250×4.6 mm, 5 µm) d'Interchim, et le gradient est linéaire de 15% d'ACN dans du formiate d'ammonium à 10 mM (pH 6,8) jusqu'à 100% d'ACN en 45 min. La détection des adduits est réalisée par UV à 296 nm à l'aide d'un détecteur UV L-4000 HPLC. Les fractions collectées sont évaporées à sec puis reprises dans du méthanol (MeOH) pour être calibrées par spectroscopie UV. Les coefficients d'absorption moléculaire utilisés sont ceux du B[a]P dans le MeOH ($\epsilon = 22909$ à $\lambda = 364$ nm), en prenant en compte le fait que le spectre des adduits du B[a]P est décalé de 8-10 nm par rapport au spectre du B[a]P seul (Rogan et al. 1988).

I-5 Mise au point d'une méthode de dosage par CLHP-SM/SM

Les différents paramètres de détection du spectromètre de masse sont optimisés grâce à des analyses en flux correspondant à l'injection de quantités constantes de chaque adduit directement dans le spectromètre de masse. Les paramètres sont retenus lorsque l'aire des pics correspondant à la détection des adduits est maximale. Les paramètres à optimiser portent sur l'étape d'ionisation et correspondent aux différents gaz intervenant dans la source électrospray, gaz nébulisateur (NEB) et gaz rideau (RID), à la température (T) et au voltage appliqué pendant l'ionisation (VI). Il s'agit également de définir quel est le mode d'ionisation, positive ou négative, le plus adapté. Les paramètres de fragmentation, comprenant la quantité de gaz de collision (COL) et l'énergie de collision (EC) qui correspond à l'énergie cinétique des ions entrant dans la cellule de collision, sont optimisés dans un second temps. L'optimisation de la fragmentation permet de définir les transitions spécifiques de chaque adduit qui seront utilisées pour leur détection. Des conditions chromatographiques sont définies de manière à séparer tous les adduits de l'ADN en une seule injection. La linéarité de la méthode de détection est étudiée pour chaque adduit, par l'injection de différentes quantités en triplicat. Les valeurs de limites de détection sont obtenues pour un rapport signal/bruit (S/B) égal à 3.

I-6 Essais d'identification de l'adduit BPDE-Gua

Une solution d'ADN (1 mg/mL) dans l'eau est traitée à 7,5 μ M de (\pm)-*anti*-BPDE pendant 3 h à 37°C. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 10% de NaCl (4 M) et de 2,5 volumes d'éthanol froid. Le culot d'ADN est repris dans 50 μ L d'eau avant d'être digéré de façon enzymatique, puis lyophilisé. Le culot d'ADN sec ainsi que le surnageant préalablement évaporé à sec sont repris dans un mélange méthanol (MeOH) et eau, MeOH:H₂O (50:50 v/v), puis analysés en CLHP-SM/SM. La colonne de séparation est une colonne Uptisphere de silice greffée C8 (150×2 mm, 5 μ m) d'Interchim. Le gradient utilisé est linéaire de 0 à 15% d'ACN dans le formiate d'ammonium 2 mM en 10 min, puis linéaire de 15 à 100% d'ACN en 20 min.

II- Résultats

II-1 Synthèse des adduits du BPDE

Les adduits du BPDE synthétisés par action de (\pm)-*anti*-BPDE sur de l'ADN isolé sont purifiés en ligne par CLHP en utilisant le spectromètre de masse comme détecteur. La synthèse de l'adduit BPDE-N2-dGuo par F. Leblond (Leblond 2004) a permis de connaître la fragmentation de cet adduit et de définir les transitions pour sa détection en CLHP-SM/SM en mode d'ionisation positive.

La fragmentation de l'adduit BPDE-N2-dGuo de rapport m/z 570 amu consiste en la perte du 2'-désoxyribose de masse 116 Da résultant dans la détection d'un fragment de rapport m/z 454 amu, l'obtention d'un fragment de rapport m/z 303 amu correspondant au BPDE, ainsi que l'obtention de deux fragments de rapport m/z 285 et 257 amu correspondants à deux fragments du BPDE, [BPDE - H₂O]⁺ et [BPDE - H₂O - CO]⁺ (Figure 21).

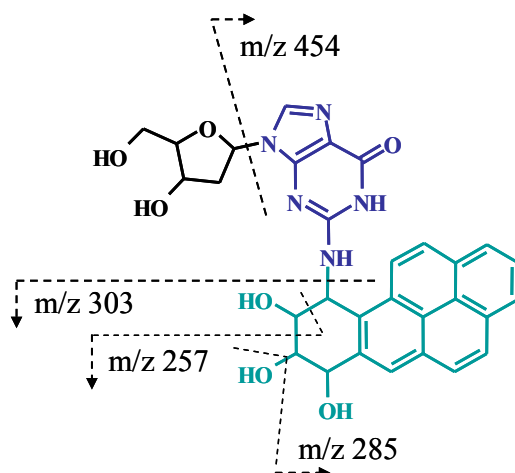
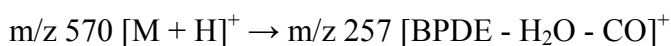
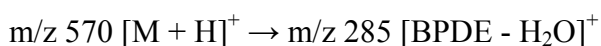
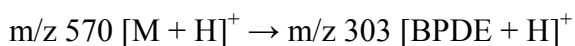
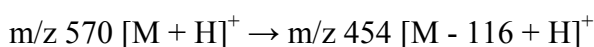


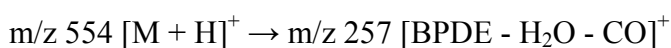
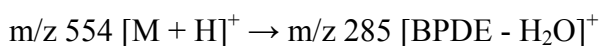
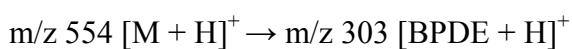
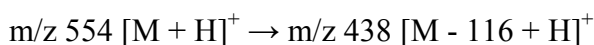
Figure 21 : Fragmentation de l'adduit BPDE-N2-dGuo.

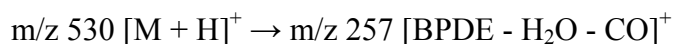
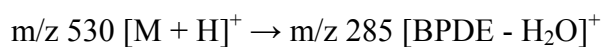
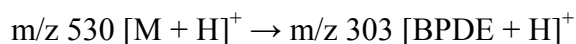
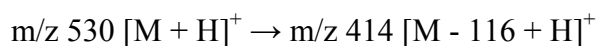
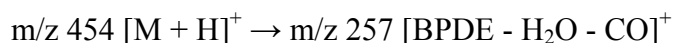
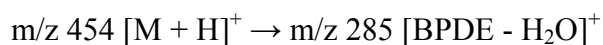
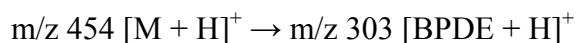
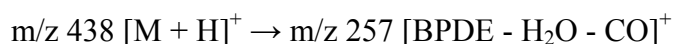
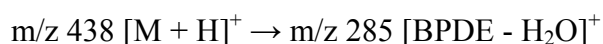
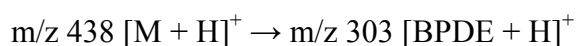
La transposition de cette fragmentation aux adduits du BPDE sur la dAdo et la dCyd, à savoir BPDE-N6-dAdo de rapport m/z 554 amu et BPDE-N4-dCyd de rapport m/z 530 amu en mode d'ionisation positive, a permis de définir un premier groupe de transitions pour détecter les adduits stables du BPDE en CLHP-SM/SM. La transposition de la fragmentation de BPDE-N2-dGuo aux adduits du BPDE sur les bases Gua et Ade, de rapport m/z 454 et 438 respectivement en mode d'ionisation positive, a également permis de définir des transitions pour détecter la formation d'éventuels adduits dépurinants du BPDE. Notons que les paramètres de détection ne sont pas optimisés à ce stade, mais suffisants pour permettre la détection des adduits. Toutes les transitions utilisées lors de la purification en ligne des adduits du BPDE figurent ainsi ci-dessous :

BPDE-N2-dGuo :



BPDE-N6-dAdo :



BPDE-N4-dCyd :**BPDE-Gua :****BPDE-Ade :**

Avec l'utilisation de ces transitions, le chromatogramme obtenu pour l'injection en CLHP-SM/SM du mélange brut de synthèse est présenté dans la figure 22.

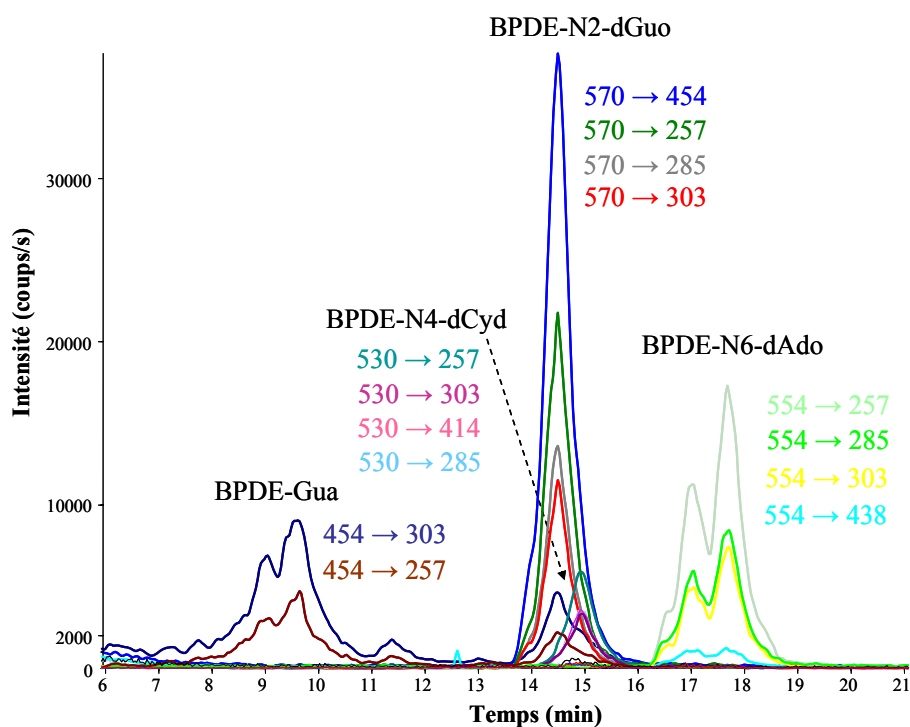


Figure 22 : Chromatogramme obtenu en CLHP-SM/SM pour l'injection du mélange brut de synthèse des adduits du BPDE.

La superposition des différentes transitions recherchées pour un adduit à un temps de rétention donné assure la détection spécifique de cet adduit. Comme le montre la figure 22, le traitement d'ADN isolé par du (\pm)-*anti*-BPDE entraîne la formation de trois adduits stables sur les nucléosides dGuo, dAdo et dCyd. La formation d'un adduit dépurinant sur la base Gua est également mise en évidence.

Les deux pics détectés pour les adduits BPDE-Gua et BPDE-N6-dAdo sont collectés ensemble de façon respective. L'adduit BPDE-N2-dGuo est collecté uniquement en début de pic afin d'éviter une contamination par l'adduit BPDE-N4-dCyd. Des essais de purification de l'adduit BPDE-N4-dCyd ont été réalisés dans un second temps, mais cette seconde étape a vraisemblablement entraîné une importante perte de cet adduit qui n'a pas pu être quantifié par UV. Cet adduit ne sera donc pas inclus dans notre méthode de dosage. De même, l'adduit BPDE-Gua ne sera pas non plus inclus dans la méthode en raison de son caractère dépurinant. En effet, les adduits du BPDE ne sont pas connus pour être majoritairement dépurinants. De plus, des difficultés d'identification de cet adduit sont rencontrées. Ce point sera détaillé dans la partie II-4.

En revanche, les adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo, obtenus en quantités suffisamment importantes pour être calibrés par UV, sont inclus dans notre méthode de dosage, et ces adduits constituent les standards des adduits stables de la voie du BPDE pour la suite du travail.

II-2 Synthèse des adduits du radical cation du

B[a]P

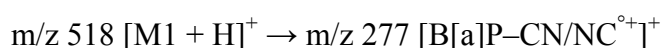
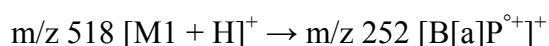
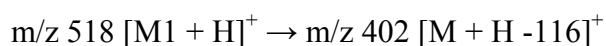
Les adduits du radical cation du B[a]P sont synthétisés par électrochimie en présence de dGuo. Les différentes fractions obtenues après purification par CLHP préparative du mélange réactionnel de la synthèse sont analysées par CLHP-SM/SM. Il s'agit de déterminer si elles correspondent à des adduits du B[a]P sur la dGuo, ou encore à des adduits du B[a]P sur la Gua obtenus par dépurination des adduits formés sur la dGuo.

Tous les adduits du B[a]P sur la dGuo, et ceux du B[a]P sur la Gua possèdent la même masse molaire, soit $M_1 = 517$ Da, et $M_2 = 401$ Da, respectivement. Du point de vue de leur fragmentation, les adduits formés sur la dGuo sont susceptibles de perdre le 2'-désoxyribose

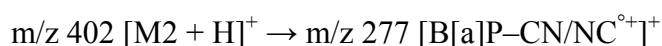
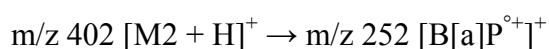
correspondant à la perte d'un fragment de 116 Da. De plus la détection des adduits du B[a]P sur la dGuo par bombardement atomique rapide et spectrométrie de masse en mode tandem (BAR-SM/SM) montre la formation de deux fragments de m/z 252 et 277 en mode d'ionisation positive. Le fragment de 252 amu correspond au radical cation du B[a]P, et le fragment de 277 amu correspond au groupement (B[a]P-NC)^{o+} ou (B[a]P-CN)^{o+} selon le site de fixation du radical cation du B[a]P sur la dGuo (Ramakrishna et al. 1992).

Ces informations nous permettent de définir les transitions suivantes pour analyser en CLHP-SM/SM en mode d'ionisation positive les différents produits obtenus lors de la synthèse :

B[a]P-dGuo :



B[a]P-Gua :



Un produit est ainsi identifié comme un adduit stable du B[a]P sur la dGuo s'il présente au moins l'une des trois premières transitions mentionnées ci-dessus, et comme un adduit dépurinant du B[a]P sur la Gua s'il possède au moins l'une des deux dernières transitions.

Selon l'analyse par CLHP-SM/SM, cinq produits sont identifiés comme des adduits du B[a]P. Les chromatogrammes correspondant à ces cinq adduits sont représentés dans la figure 23 : trois composés possèdent au moins une transition caractéristique des adduits stables du B[a]P (adduits B[a]P-dGuo 1, 2, 3) et deux possèdent au moins une transition caractéristique des adduits dépurinants du B[a]P (adduits B[a]P-Gua 4 et 5).

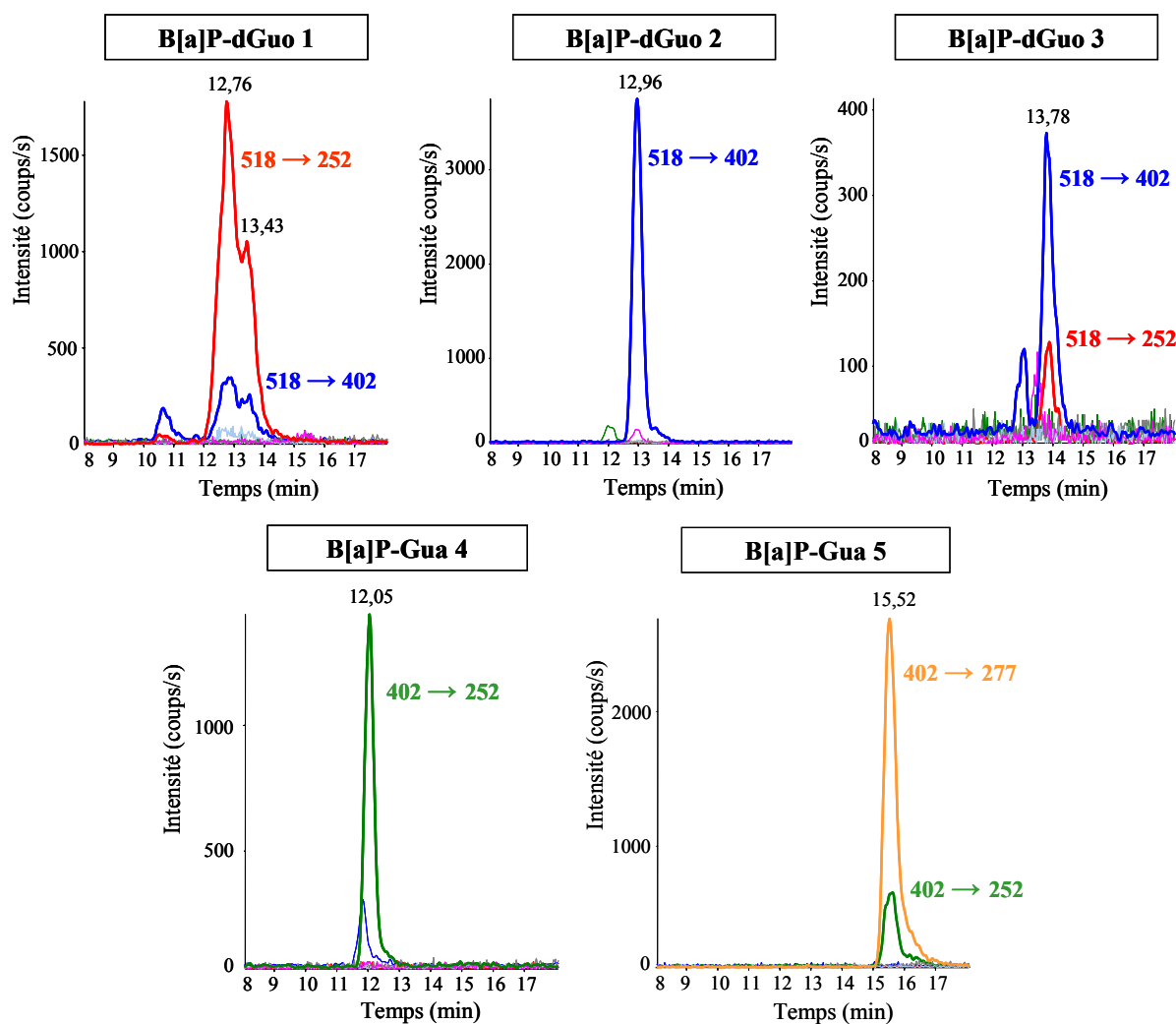


Figure 23 : chromatogrammes obtenus en CLHP-SM/SM pour les cinq produits synthétisés par électrochimie et identifiés comme des adduits du radical cation du B[a]P.

Du fait des temps de rétention et des intensités relatives des transitions détectées différents, nous pouvons affirmer que les trois adduits stables d'une part, et les deux adduits dépurinants d'autre part, sont des composés distincts. La différence entre ces adduits provient sans doute du fait qu'ils ne comportent pas le même site de fixation du radical cation du B[a]P sur la dGuo ou la Gua. Toutefois, avec la détection par CLHP-SM/SM, il n'est pas possible de définir la nature chimique exacte des adduits. Nous ne pouvons donc pas déterminer à ce stade quels adduits parmi les cinq obtenus pourraient être plus intéressants que les autres. De plus, les adduits du radical cation sont connus pour être essentiellement dépurinants (Chen et al. 1996), mais la cinétique de dépurination de ces adduits est peu connue. Nous ne savons donc pas a priori sous quelle forme, stable ou dépurinée, ces adduits pourraient être retrouvés

dans l'ADN. C'est pourquoi nous décidons d'inclure tous les adduits synthétisés, stables et dépurinants, dans notre méthode de dosage.

Après calibration, les cinq adduits obtenus constituent les standards d'adduits du radical cation du B[a]P pour la suite du travail.

II-3 Mise au point d'une méthode de dosage des adduits du B[a]P par CLHP-SM/SM

II-3-a Optimisation des paramètres de détection par SM/SM

Après l'obtention des standards d'adduits du BPDE et du radical cation du B[a]P, comprenant les adduits BPDE-N2-dGuo, BPDE-N6-dAdo, trois adduits B[a]P-dGuo et deux adduits B[a]P-Gua, nous avons optimisé les paramètres du spectromètre de masse pour la détection et la quantification de ces adduits. Les paramètres optimisés de l'étape d'ionisation, T, RID, NEB, et VI seront présentés dans le tableau 6 de la partie II-3-d.

Concernant l'étape de fragmentation, l'obtention des spectres de fragmentation des adduits permet d'identifier les fragments majoritaires et de définir les transitions appropriées pour leur détection (Figure 24).

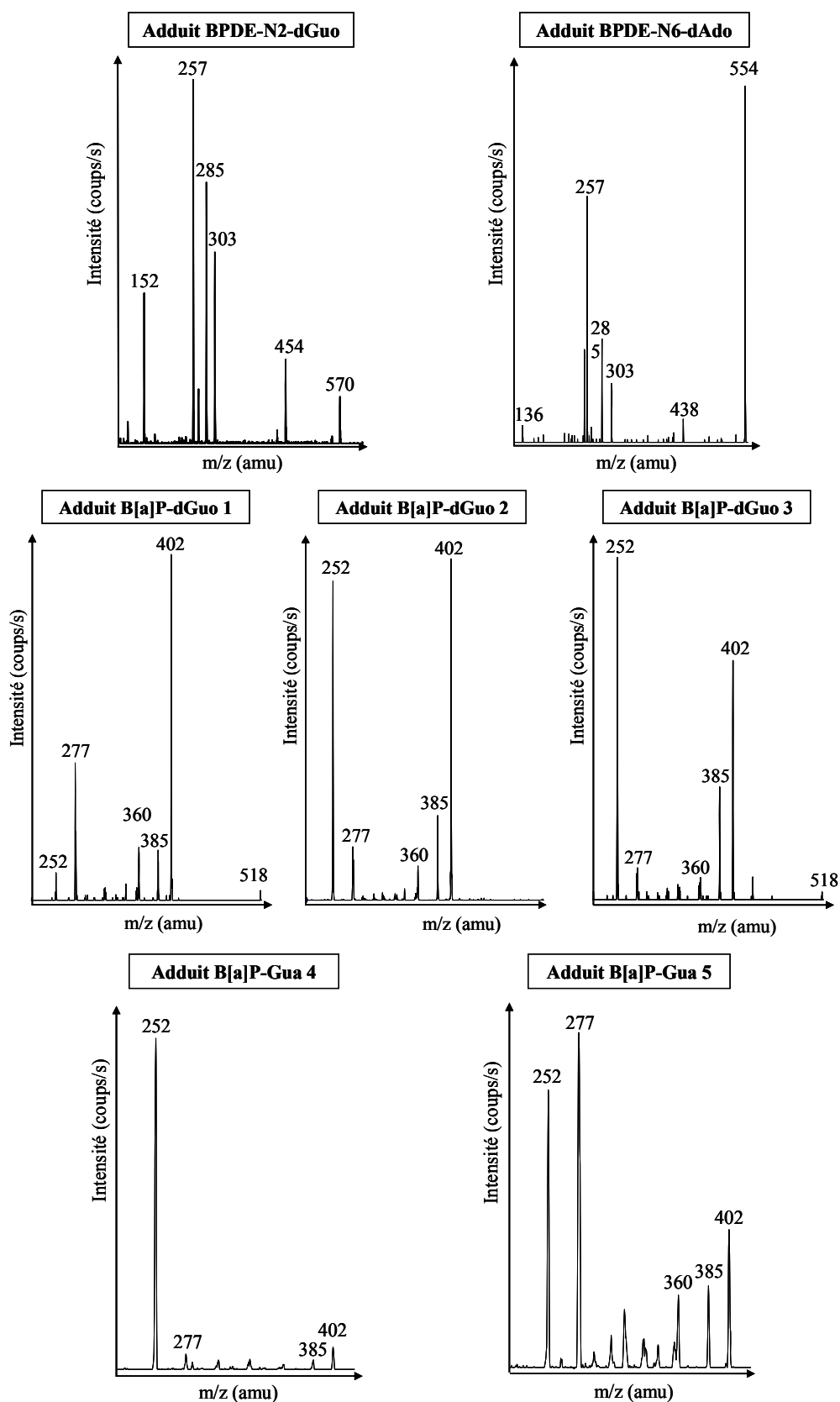


Figure 24 : Spectres de fragmentation des différents adduits de l'ADN du BPDE et du radical cation du B[a]P.

Les transitions choisies pour la détection des différents adduits, ainsi que les paramètres de fragmentation, EC et COL sont également présentés dans le tableau 6.

II-3-b Optimisation des conditions chromatographiques

Nous avons défini des conditions chromatographiques permettant de détecter les sept adduits du B[a]P en une seule injection. Le gradient de 0 à 100% d'acétonitrile (ACN) dans le formiate d'ammonium 2 mM en 30 min permet une bonne séparation sur colonne C8. Deux périodes distinctes sont définies au cours de l'analyse (Figure 25) :

- de 16 à 19 min : suivi des transitions de BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo
- de 19 à 30 min : suivi des transitions des adduits B[a]P-dGuo (1, 2, 3) et B[a]P-Gua (4, 5).

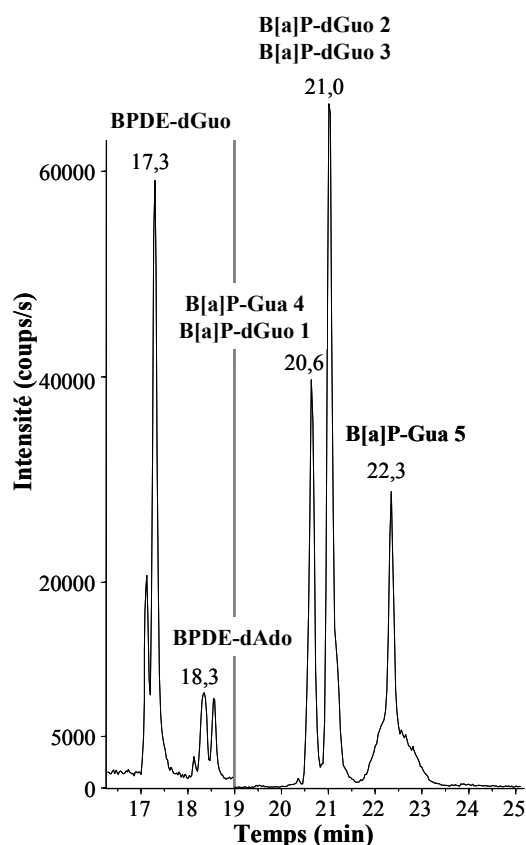


Figure 25 : Chromatogramme obtenu pour l'injection de 500 fmoles de chaque adduit de l'ADN. Chaque pic correspond à la superposition des transitions utilisées pour la détection de l'adduit concerné.

Notons que plusieurs pics sont détectés pour les adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo, et pourraient correspondre aux différents isomères de ces adduits. De plus, les adduits B[a]P-Gua 4 et B[a]P-dGuo 1 d'une part, et B[a]P-dGuo 2 et 3 d'autre part, ne sont pas séparés dans les conditions chromatographiques utilisées, mais peuvent néanmoins être détectés individuellement par SM/SM.

II-3-c Linéarité et limites de détection de la méthode

La linéarité de détection de la méthode est validée dans un premier temps dans un domaine étendu de quantités injectées correspondant à 10, 50, 100, 250 et 500 fmoles injectées (Figure 26). Les adduits de l'ADN sont solubilisés dans le MeOH.

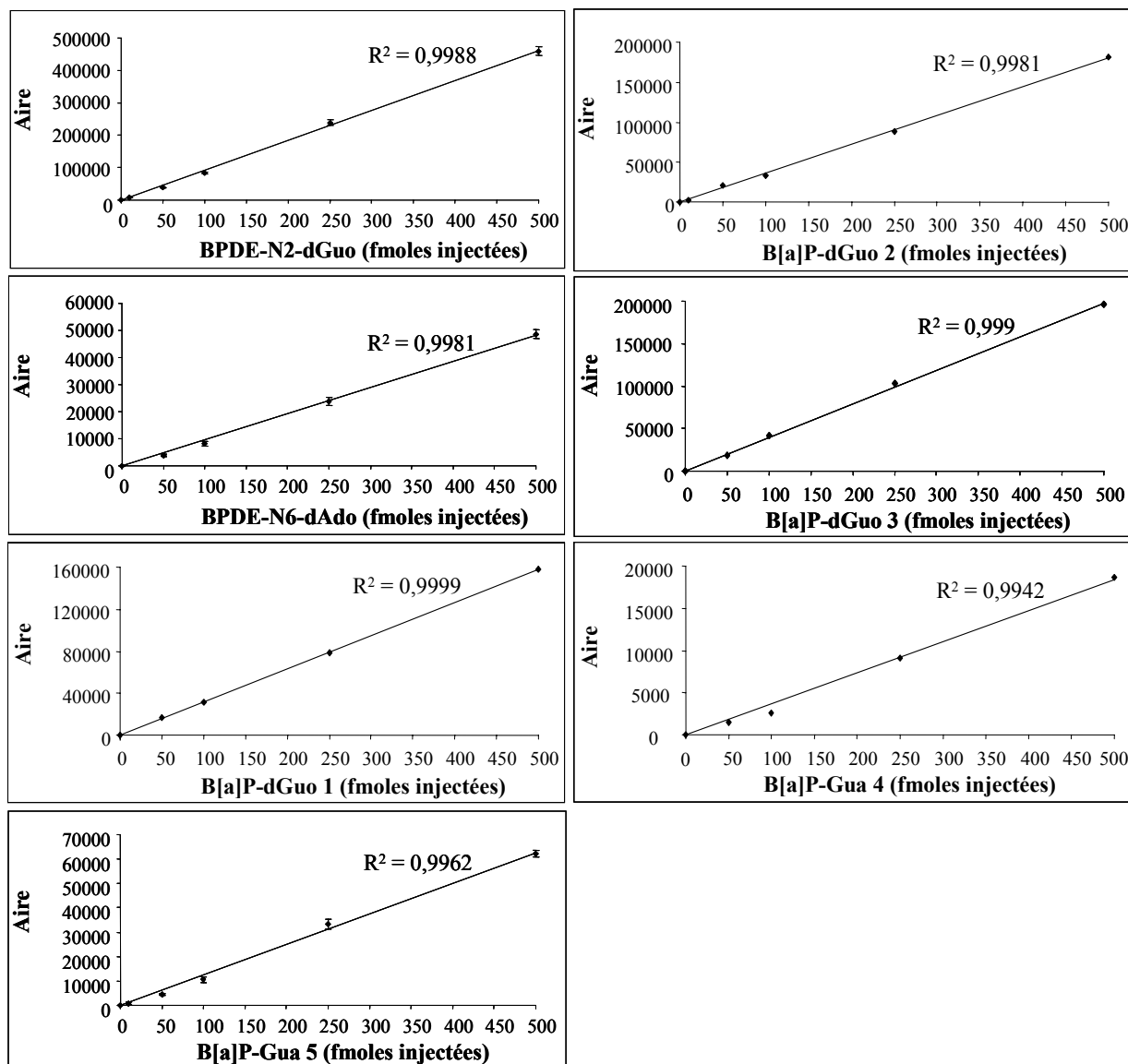


Figure 26 : Gammes d'étalonnage des différents adduits dosés par CLHP-SM/SM.

Tous les adduits présentent une détection linéaire dans la gamme des quantités injectées.

Dans un deuxième temps, la linéarité de détection de la méthode est validée dans un domaine correspondant à de plus petites quantités injectées (de 0,5 à 10 fmoles injectées), proches de la limite de détection. Pour tous les adduits, la détection par CLHP-SM/SM reste linéaire : à titre d'exemple, la gamme d'étalonnage obtenue pour l'adduit BPDE-N2-dGuo est représentée en figure 27.

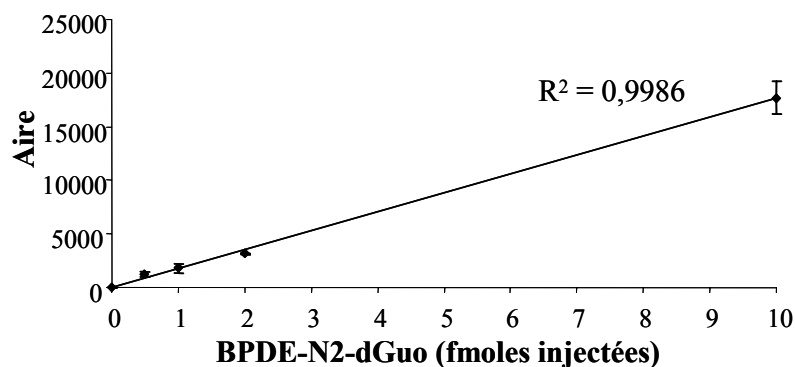


Figure 27 : Gamme d'étalonnage obtenue pour l'injection de 0,5, 1, 2 et 10 fmoles de BPDE-N2-dGuo en CLHP-SM/SM.

Les chromatogrammes obtenus pour les plus petites quantités injectées permettent de définir les limites de détection de la méthode pour chaque adduit. Le chromatogramme obtenu pour l'injection de 1 fmole de BPDE-N2-dGuo, correspondant à la limite de détection pour cet adduit, est présenté ci-dessous (Figure 28).

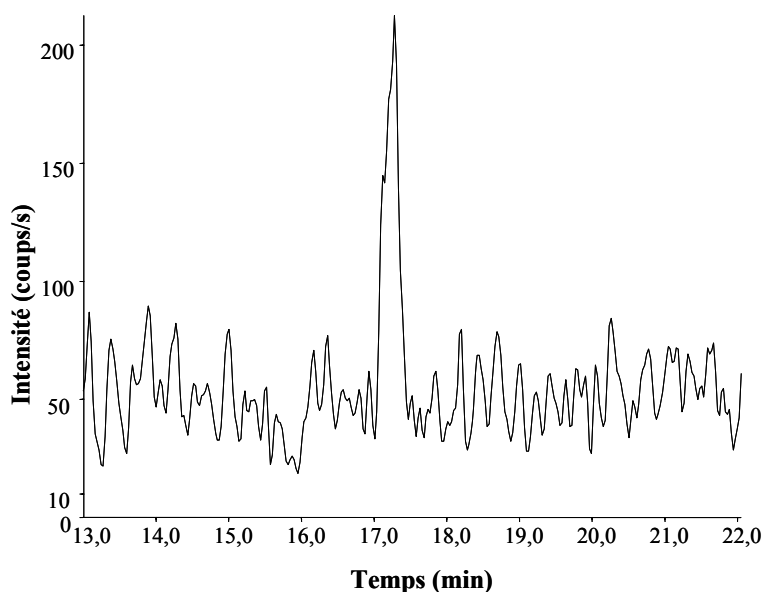


Figure 28 : Chromatogramme obtenu pour l'injection de 1 fmole de BPDE-N2-dGuo en CLHP-SM/SM, et correspondant à la somme des transitions détectées pour cet adduit.

Les limites de détection obtenues de façon similaire pour tous les adduits sont présentées dans le tableau 6. Elles varient entre 1 et 20 fmoles injectées respectivement pour l'adduit BPDE-N2-dGuo et l'adduit B[a]P-Gua 4.

II-3-d Paramètres de la méthode de dosage finale

Tous les paramètres de la méthode de dosage mise au point sont présentés dans le tableau 6 ci-dessous. Sont inclus dans cette méthode sept adduits, deux adduits stables du BPDE, et cinq adduits du radical cation du B[a]P, dont trois stables et deux dépurinants.

Tableau 6 : Paramètres de détection et de quantification des adduits du B[a]P par CLHP-SM/SM. TR : temps de rétention, T : température, VI : voltage d'ionisation, RID : gaz rideau, NEB : gaz nébulisateur, COL : gaz de collision, EC : énergie de collision, LD : limite de détection (S/B = 3). Les intensités relatives de chaque transition par rapport à la transition majoritaire sont indiquées entre parenthèses.

Adduit	TR (min)	T (°C)	VI (V)	RID	NEB	COL	Transitions (%)	EC (eV)	LD (fmoles)
BPDE-N2-dGuo	17,3	450	5500	9	12	6	570,4 → 257,2	45	1
							570,4 → 454,2 (90)	19	
							570,4 → 285,2 (45)	28	
							570,4 → 303,2 (40)	20	
BPDE-N6-dAdo	18,3	450	5000	12	10	6	554,4 → 257,2	55	10
							554,4 → 285,2 (55)	30	
							554,4 → 136,2 (35)	55	
							554,4 → 303,2 (35)	25	
B[a]P-Gua 4	20,6	550	5000	8	8	6	402,2 → 252,2	49	20
B[a]P-dGuo 2	21	450	5500	8	8	6	518,2 → 402,2	40	3
							518,2 → 277,2 (40)	70	
							518,2 → 252,2 (10)	60	
							518,2 → 385,2 (10)	50	
B[a]P-dGuo 1	20,6	450	5500	8	8	6	518,2 → 402,2	40	2
B[a]P-dGuo 3	21						518,2 → 252,2 (45)	65	
							518,2 → 277,2 (20)	90	
B[a]P-Gua 5	22,3	550	5000	8	8	6	402,2 → 277,2	65	5
							402,2 → 252,2 (50)	62	
							402,2 → 385,2 (20)	40	

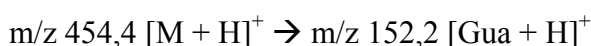
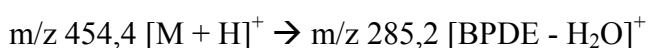
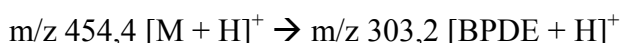
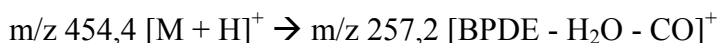
Il est important de préciser qu'en raison de la plus grande solubilité des adduits de l'ADN du B[a]P dans le MeOH que dans l'eau, leur dosage est optimisé lorsque ceux-ci sont solubilisés dans ce solvant. Toutefois, en vue de mesurer les adduits dans des échantillons d'ADN dans la suite du travail, nous souhaitons également pouvoir mesurer les nucléosides normaux dans les mêmes échantillons, de façon à déterminer la concentration des adduits dans l'ADN. Les

nucléosides normaux sont classiquement quantifiés par UV, mais à l'inverse des adduits, ils sont solubles dans l'eau et leur séparation par CLHP est mauvaise dans le MeOH. De ce fait, après des tests d'optimisation des conditions de solubilisation, les échantillons d'ADN seront solubilisés dans un mélange MeOH:H₂O (50:50, v/v) qui permet à la fois le dosage des adduits et celui des nucléosides normaux.

II-4 Essais d'identification de l'adduit BPDE-Gua

En raison de son caractère dépurinant l'adduit BPDE-Gua obtenu dans l'ADN isolé traité au (±)-*anti*-BPDE n'a pas été inclus dans notre méthode de dosage des adduits. Toutefois, la présence d'un adduit BPDE-Gua dans l'ADN n'est pas attendue puisque les adduits dépurinants sont normalement éliminés dans le surnageant issu de la précipitation de l'ADN traité, comme cela a déjà été décrit pour l'adduit BPDE-N7-Gua (Autrup et al. 1986). Nous avons donc souhaité identifier la nature de cet adduit. L'optimisation des paramètres de détection par spectrométrie de masse de l'adduit BPDE-Gua (non présentée) permet de définir les transitions suivantes pour détecter cet adduit :

BPDE-Gua :



En ajoutant ces transitions à notre méthode de dosage, nous avons comparé les adduits obtenus dans de l'ADN traité avec du (±)-*anti*-BPDE et dans les surnageants des mêmes échantillons (Figure 29).

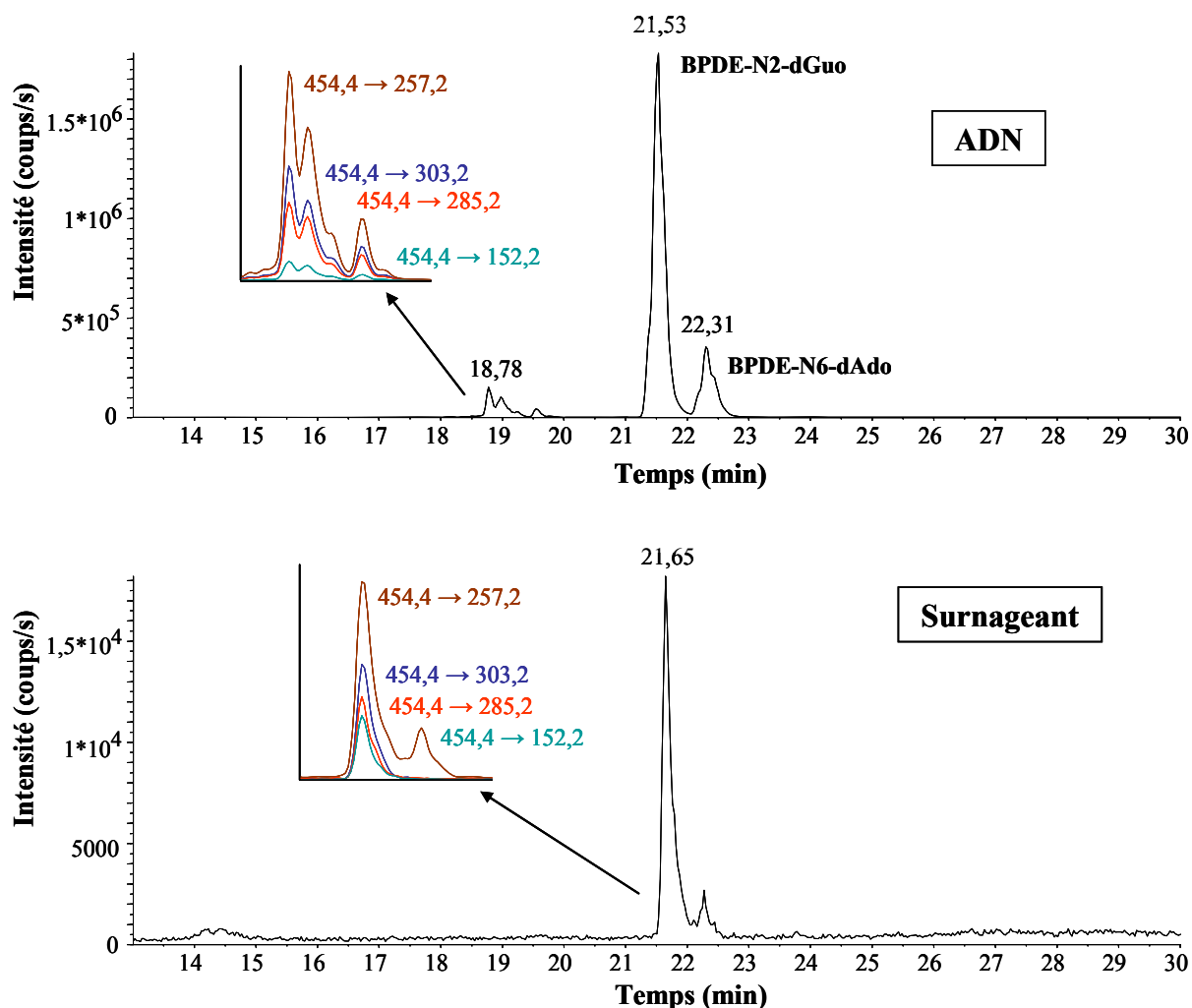


Figure 29 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour de l'ADN traité avec du (\pm)-*anti*-BPDE et le surnageant du même échantillon. Les chromatogrammes correspondent à la superposition des différentes transitions utilisées pour la détection des adduits BPDE-N2-dGuo, BPDE-N6-dAdo et BPDE-Gua. Les intensités relatives des transitions utilisées pour la détection de l'adduit BPDE-Gua sont représentées dans les deux chromatogrammes.

Il apparaît qu'un adduit dépurinant est bien détecté dans le surnageant d'ADN traité avec du (\pm)-*anti*-BPDE, et nous identifions donc cet adduit comme l'adduit BPDE-N7-Gua. Bien que cet adduit possède les mêmes transitions que l'adduit dépurinant que nous détectons dans l'ADN, les temps de rétention sont nettement différents ce qui indique que l'adduit BPDE-Gua présent dans l'ADN n'est pas l'adduit BPDE-N7-Gua. De plus l'intensité relative de la dernière transition est différente pour ces deux adduits.

Une deuxième hypothèse formulée a été de penser que l'adduit BPDE-Gua pouvait être l'adduit BPDE-N2-Gua. Néanmoins l'hydrolyse de l'adduit BPDE-N2-dGuo en présence d'HCl 0,1 M à 37°C pendant 2 h indique que l'adduit BPDE-N2-Gua obtenu possède le même temps de rétention que l'adduit BPDE-N7-Gua et ne correspond donc pas non plus à l'adduit BPDE-Gua retrouvé dans l'ADN.

III- Discussion

Afin de mettre au point une méthode de dosage des adduits de l'ADN issus de la voie du BPDE et de la voie du radical cation, il était nécessaire de synthétiser les différents adduits de chaque voie.

Les adduits du BPDE ont été synthétisés par action du (\pm)-*anti*-BPDE sur de l'ADN isolé, ce diastéréoisomère du BPDE étant majoritairement formé et le plus génotoxique *in vivo*.

La synthèse des adduits du BPDE a permis d'obtenir deux adduits stables et un adduit dépurinant. Concernant les adduits stables obtenus, nous pouvons affirmer qu'il s'agit des adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo. En effet, ces adduits sont connus pour être formés majoritairement dans l'ADN en présence de BPDE, ce dernier réagissant préférentiellement sur les groupements exocycliques des bases puriques (Dipple 1994). L'adduit BPDE-N4-dCyd n'a pas été obtenu en quantités suffisantes pour être inclus dans notre méthode de dosage. Toutefois, cet adduit est connu pour être minoritaire par rapport aux adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo (Wang et al. 2003). L'adduit dépurinant BPDE-Gua n'a pas pu être identifié. Sa présence n'était pas attendue dans le sens où les adduits dépurinants, du fait de leur instabilité, devraient être retrouvés dans les surnageants obtenus par précipitation de l'ADN traité au BPDE, mais pas dans l'ADN lui-même. Nous avons vérifié la présence d'un adduit dépurinant dans le surnageant d'ADN traité avec du (\pm)-*anti*-BPDE classiquement identifié comme l'adduit BPDE-N7-Gua (Autrup et al. 1986). La demi-vie de dépurination de cet adduit a été évaluée à environ 3 h (Osborne et al. 1985), ce qui rend improbable sa détection dans l'ADN après 5 jours. De plus, l'importante différence de temps de rétention entre l'adduit détecté dans le surnageant d'ADN traité avec du (\pm)-*anti*-BPDE et l'adduit retrouvé dans l'ADN indique que ces deux adduits ne sont pas les mêmes. Par ailleurs, il est rapporté que l'adduit BPDE-N2-dGuo présent dans l'ADN peut se dépuriner

dans des conditions particulières comme l'acidification de l'ADN (Osborne et al. 1978). Bien qu'aucune condition acide ne figure dans notre protocole, l'adduit BPDE-N2-dGuo pourrait se dépuriner au moment de la digestion enzymatique, étape de fragilisation de l'ADN. Pourtant, la comparaison entre l'adduit BPDE-Gua obtenu dans l'ADN et l'adduit BPDE-N2-Gua issu de l'hydrolyse acide de l'adduit BPDE-N2-dGuo indique des temps de rétention également très différents, donc il s'agit encore une fois de produits différents. La nature de l'adduit BPDE-Gua détecté dans l'ADN reste donc à élucider. Notons à titre indicatif, que l'adduit BPDE-N7-Gua identifié dans le surnageant d'ADN traité avec du (\pm)-*anti*-BPDE est formé avec une intensité 100 fois moins importante que l'adduit BPDE-N2-dGuo formé dans l'ADN du même échantillon. Bien qu'une différence de sensibilité de la détection par CLHP-SM/SM soit probable entre ces deux adduits, cette observation confirme que l'adduit BPDE-N7-Gua est bien minoritaire par rapport à l'adduit BPDE-N2-dGuo. Dans la peau de souris traité au B[a]P, l'adduit BPDE-N7-Gua représente ainsi 10% de la formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo (Chen et al. 1996). Les adduits stables du BPDE sont donc les plus représentatifs de la voie métabolique du BPDE, et nous choisissons donc de nous intéresser préférentiellement à ces adduits dans notre étude.

Plusieurs pics sont détectés par CLHP-SM/SM pour les adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo, selon les conditions chromatographiques (Figures 21 et 24). Ces différents pics pourraient correspondre aux quatre isomères pouvant être formés pour chaque adduit à partir du (\pm)-*anti*-BPDE. Des conditions chromatographiques ont été proposées pour permettre de séparer ces isomères (Ruan et al. 2006). Toutefois, dans notre étude, nous avons choisi de doser l'ensemble des isomères de chaque adduit, si bien que la séparation totale des différents isomères n'est pas nécessaire.

La synthèse des adduits du radical cation du B[a]P nécessite la synthèse du radical en présence d'ADN ou de nucléosides. Divers types de synthèse ont été testés dans la littérature, comme l'activation du B[a]P par des peroxydases, par des lysosomes humains (Chen et al. 1996), par oxydation à l'iode (Hanson et al. 1998) ou encore par électrochimie (Rogan et al. 1988). Du fait de la diversité des adduits et des rendements de formation des adduits obtenus par électrochimie, nous avons opté pour ce type de synthèse. De plus, les adduits du radical cation étant majoritairement formés sur la dGuo (Chen et al. 1996), nous avons réalisé une synthèse électrochimique des adduits du B[a]P en présence de dGuo.

Par synthèse électrochimique, nous avons obtenu cinq adduits du radical cation du B[a]P. Ces adduits ont été caractérisés par CLHP-SM/SM selon leur poids moléculaire. Trois adduits sont dits stables puisqu'ils sont formés et obtenus sur la dGuo, et deux adduits sont dits dépurinants puisqu'ils sont formés sur la dGuo mais obtenus sur la Gua. Ces derniers adduits résultent donc d'une dépurination des adduits correspondants sur la dGuo.

Néanmoins, outre leur caractère stable et dépurinant, la CLHP-SM/SM ne permet pas de caractériser les différents adduits obtenus selon le site de fixation du radical cation sur la dGuo. En effet, quel que soit l'emplacement de la liaison covalente établie, tous possèdent la même masse molaire. Pour cela, l'utilisation d'autres techniques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) seraient nécessaires, mais celles-ci nécessitent souvent de grandes quantités d'adduits. Notons que la technique de fluorescence induite par laser à très basse température ou FLNS (Fluorescence line-narrowing spectroscopy) semble intéressante pour caractériser les adduits du B[a]P. Cette technique correspond à la technique Fluo laser, précédemment décrite dans le chapitre 1 pour le dosage du 3-OHB[a]P, mais à de plus basses températures de l'ordre de 4°K, et surtout avec l'ajout d'une excitation sélective des sites intramoléculaires. Ceci permet l'obtention de spectres d'émission caractéristiques de la structure chimique des molécules (Jankowiak et al. 1991). Pour les adduits du radical cation, seulement 50 fmoles d'adduit semblent nécessaires pour l'analyse, et des spectres distincts de fluorescence sont obtenus pour les adduits B[a]P-N7-Gua et B[a]P-C8-Gua (Zamzow et al. 1989).

Nous pouvons toutefois supposer que les trois adduits stables obtenus correspondent aux adduits B[a]P-C8-dGuo, B[a]P-N2-dGuo et B[a]P-N3-dGuo car seuls ces trois adduits stables sont obtenus par synthèse électrochimique. De plus, l'adduit B[a]P-dGuo 1 est obtenu en quantités plus importantes que les adduits B[a]P-dGuo 2 et 3 si bien que cet adduit pourrait être l'adduit B[a]P-C8-dGuo, adduit stable majoritairement obtenu par synthèse électrochimique. De même les deux adduits dépurinants obtenus pourraient correspondre à l'adduit dépurinant B[a]P-N7-Gua majoritairement obtenu par synthèse électrochimique, ainsi qu'à l'adduit B[a]P-C8-Gua également obtenu sous sa forme dépurinée par électrochimie (Ramakrishna et al. 1992).

La description de la fragmentation de B[a]P-N7-Gua dans la littérature (Chen et al. 2005) selon une méthode de CLHP-SM/SM comparable à la notre, pourrait nous permettre de faire l'hypothèse que l'adduit B[a]P-Gua 5 serait l'adduit B[a]P-N7-Gua. En effet, les deux spectres de masse obtenus sont très similaires et présentent les mêmes intensités relatives pour

les fragments de rapport m/z 252, 277, 360 et 385. A l'inverse l'adduit B[a]P-Gua 4 donne presque exclusivement le fragment 252, et par déduction il pourrait être l'adduit B[a]P-C8-Gua. De plus, l'adduit B[a]P-Gua 5 est obtenu en quantités légèrement plus importantes que l'adduit B[a]P-Gua 4. Enfin, l'ordre d'élution obtenu pour les adduits B[a]P-Gua 4 et 5, comparé à celui rapporté dans la littérature pour les adduits B[a]P-C8-Gua et B[a]P-N7-Gua, concorde avec cette hypothèse (Ramakrishna et al. 1992).

Dans la littérature il a été proposé que le ratio entre les intensités obtenues pour les fragments 252 et 277 puisse permettre de différencier ces deux adduits, l'adduit B[a]P-C8-Gua donnant majoritairement le fragment 277 à l'inverse de l'adduit B[a]P-N7-Gua. Ceci serait expliqué par une plus grande stabilité du fragment $(B[a]P-CN)^{\circ+}$ par rapport au fragment $(B[a]P-NC)^{\circ+}$ (Rogan et al. 1988). Cette observation ne concorde pas avec notre hypothèse, l'adduit B[a]P-Gua 5 que nous supposons être l'adduit B[a]P-N7-Gua ayant un fragment 277 plus intense que le fragment 252. Toutefois, une telle observation a été effectuée à partir de l'analyse des adduits par BAR-SM/SM incluant un autre type d'analyseur que celui de notre étude, ce qui pourrait entraîner une différence de fragmentation.

La méthode de dosage mise au point pour le dosage des sept adduits du B[a]P synthétisés présente une grande spécificité puisque chaque adduit possède au moins trois transitions pour sa détection, excepté l'adduit B[a]P-Gua 4 qui possède un fragment largement majoritaire. Notre méthode permet également le dosage simultané des adduits de la voie du BPDE, et ceux de la voie du radical cation.

Du point de vue de la sensibilité, la meilleure limite de détection correspondant à 1 fmole injectée est obtenue pour l'adduit BPDE-N2-dGuo. Si l'on considère un échantillon de 100 μg d'ADN cela équivaudrait à une limite de détection d'environ 0,5 adduit/ 10^8 nucléosides normaux. Cette limite de détection est meilleure que la limite de détection déjà obtenue pour cet adduit en CLHP-SM/SM (Ruan et al. 2006; Singh et al. 2006).

Par ailleurs, la limite de détection obtenue pour l'adduit B[a]P-Gua 5 (2,5 adduits/ 10^8 nucléosides normaux), qui comme nous l'avons vu précédemment pourrait correspondre à l'adduit B[a]P-N7-Gua, est équivalente à celles décrites dans la littérature pour des techniques de spectrométrie de masse (Casale et al. 2001; Chen et al. 2005).

Bien que les limites de détection obtenues restent supérieures à celles permises par la technique du post-marquage, notre méthode de dosage semble être intéressante puisqu'elle présente une sensibilité meilleure ou équivalente aux méthodes de dosage par CLHP-SM/SM

décrites dans la littérature. De plus, à l'inverse de la technique du post-marquage, notre méthode de dosage par CLHP-SM/SM présente le grand avantage de combiner sensibilité et spécificité de détection des adduits.

Après avoir mis au point notre méthode analytique, il s'agit à présent d'identifier les adduits majoritairement formés dans des modèles cellulaires adaptés. Pour cela, nous avons choisi une lignée de kératinocytes (HaCat) en tant que cellules cibles des HAP, et une lignée d'hépatocytes (HepG2) reconnue comme un modèle compétent pour l'étude des cancérogènes.

Chapitre 3

Etude des adduits de l'ADN du B[a]P dans l'ADN isolé et cellulaire

Chapitre 3 – Etude des adduits de l’ADN du B[a]P dans l’ADN isolé et cellulaire

A- Etude des adduits de l’ADN dans l’ADN isolé

A-I Matériels et méthodes

A-I-1 Analyses des adduits par CLHP-SM/SM

Toutes les analyses des adduits par CLHP-SM/SM sont effectuées selon la méthode précédemment mise au point. Le système CLHP-SM/SM est décrit dans le chapitre 2. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Uptisphere de silice greffée C8 (150×2 mm, 3 µm) d’Interchim. Le gradient est linéaire de 0 à 100% d’ACN dans le formiate d’ammonium à 2 mM pendant 30 min, et le débit est de 200 µL/min. La détection des adduits est effectuée en mode MRM. Les adduits sont quantifiés par calibration externe, en utilisant les deux transitions majoritaires. Une gamme d’étalonnage préparée dans le domaine de 5 à 500 fmoles injectées de chaque adduit est injectée avant et après chaque série d’analyses. La quantité de nucléosides normaux est déterminée par calibration externe et détection UV à 270 nm. Le volume d’injection est de 20 µL. Les résultats, correspondant à la moyenne de deux ou trois valeurs indépendantes, sont exprimés en nombre d’adduits par million de nucléosides normaux.

A-I-2 Traitement d'ADN isolé avec du (±)-anti-BPDE

Des échantillons d'ADN isolé de thymus de veau dans l'eau (250 µg/250 µL) sont incubés pendant 72 h à 37°C avec des concentrations croissantes de (±)-anti-BPDE (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 µM) dilué dans l'éthanol à partir de la solution mère à 7,32 mM (cf. Chapitre 2). L'ADN est ensuite précipité avec 10% (v/v) de NaCl (4 M) et 2,5 volumes d'éthanol froid, puis repris dans 250 µL d'eau. Ces échantillons sont alors digérés enzymatiquement, puis lyophilisés et repris dans 50 µL de MeOH:H₂O (50:50 v/v) avant d'être analysés par CLHP-SM/SM.

A-I-3 Cinétique de formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé

Des échantillons d'ADN isolé de thymus de veau dans l'eau (100 µg/150 µL) sont incubés avec du (±)-anti-BPDE à une concentration de 1 µM, et 5, 10, 20, 40 et 60 min après le début de l'incubation, l'ADN est précipité avec 10% (v/v) de NaCl (4 M) et 2,5 volumes d'éthanol froid. Les culots d'ADN sont repris dans 50 µL d'eau puis digérés enzymatiquement. Les échantillons sont ensuite lyophilisés puis repris dans 50 µL de MeOH:H₂O (50:50, v/v) avant d'être analysés par CLHP-SM/SM.

A-II Résultats

A-II-1 Formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé

La formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé traité avec du (±)-anti-BPDE est représentée dans la figure 30 ci-dessous.

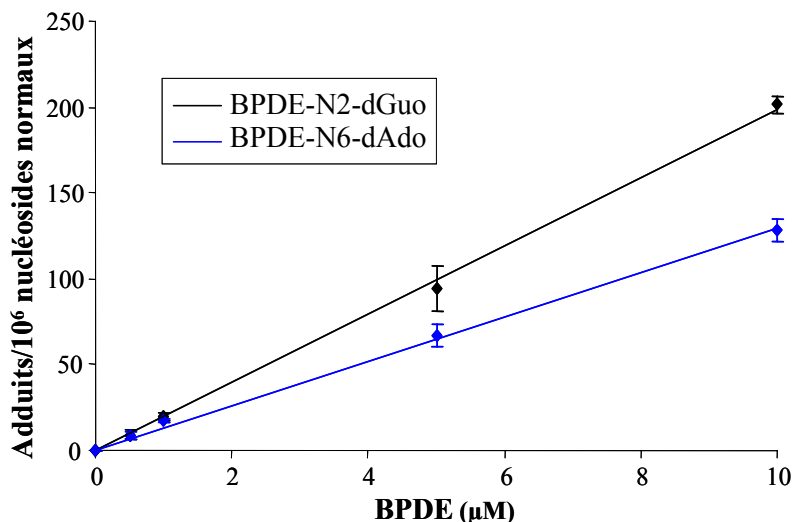


Figure 30 : Formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé traité au (±)-*anti*-BPDE à 0,5, 1, 5 et 10 μM pendant 72 h.

Les deux adduits stables BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo sont détectés dans l'ADN isolé traité au (±)-*anti*-BPDE, et leur formation est linéaire dose-dépendante. L'adduit BPDE-N2-dGuo est l'adduit majoritaire, et la formation de l'adduit BPDE-N6-dAdo représente environ 70% de sa formation.

De plus, nous pouvons estimer qu'environ 10% de la quantité de (±)-*anti*-BPDE conduit à la formation d'adduits du BPDE dans l'ADN isolé traité au (±)-*anti*-BPDE.

A-II-2 Cinétique de formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé

Afin d'étudier la cinétique de formation des adduits du BPDE, de l'ADN isolé est traité avec du (±)-*anti*-BPDE pendant différents temps d'incubation. La formation de l'adduit majoritaire BPDE-N2-dGuo est représentée dans la figure 31.

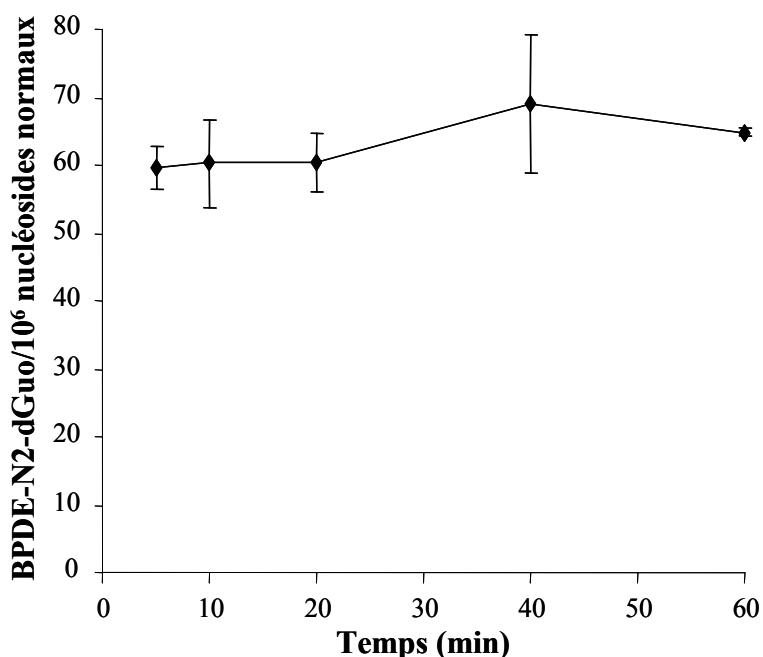


Figure 31 : Cinétique de formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo dans l'ADN isolé traité à 1 μ M de (\pm)-*anti*-BPDE pendant 5, 10, 20, 40 et 60 min.

La cinétique de formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo est très rapide, puisque dès 5 min le taux maximum d'adduits formés est atteint. Aucune variation du taux d'adduits n'est ensuite observée pour des temps de traitement plus longs. Cela témoigne de la très grande réactivité du (\pm)-*anti*-BPDE pour l'ADN. La même cinétique de formation est observée pour l'adduit BPDE-N6-dAdo (non présentée).

A-III Discussion

Ce travail préliminaire sur l'ADN isolé permet de valider notre méthode de dosage des adduits du BPDE dans l'ADN. La formation linéaire dose-dépendante des adduits du BPDE indique que les conditions de traitement avec le (\pm)-*anti*-BPDE sont adaptées au regard notamment de la faible solubilité du (\pm)-*anti*-BPDE dans l'eau. Cela suggère fortement que l'étape de digestion enzymatique de l'ADN est quantitative, et cela confirme enfin la linéarité de détection de notre méthode de dosage par CLHP-SM/SM.

L'adduit BPDE-N2-dGuo est l'adduit majoritaire, et l'adduit BPDE-N6-dAdo représente 70% de la formation de BPDE-N2-dGuo ce qui est plus élevé que les 2,5% déterminés par Ruan et

al. dans l'ADN isolé (Ruan et al. 2006). De telles différences sont difficiles à expliquer, mais des raisons d'ordre méthodologique pourraient être avancées.

La cinétique de formation des adduits du BPDE met en évidence une formation très rapide de ces adduits et souligne la grande réactivité du (\pm)-*anti*-BPDE pour l'ADN. Cependant, nous avons estimé que dans l'ADN isolé traité avec du (\pm)-*anti*-BPDE, seulement 10% de la quantité de (\pm)-*anti*-BPDE conduit à la formation d'adduits du BPDE. Ainsi, malgré la grande réactivité du (\pm)-*anti*-BPDE pour l'ADN, tout le (\pm)-*anti*-BPDE mis en présence d'ADN ne réagit pas pour former des adduits, une part importante étant probablement hydrolysée avant de réagir avec l'ADN. La mesure du tétraol du B[a]P dans les surnageants issus de la précipitation de l'ADN isolé traité permettrait de confirmer cette hypothèse.

Une étude similaire dans l'ADN isolé n'est pas possible pour les adduits du radical cation qui nécessitent un système d'activation métabolique du B[a]P. C'est pourquoi il convient de s'intéresser à présent à la formation des adduits du B[a]P dans les modèles cellulaires HaCat et HepG2 dont le métabolisme devraient permettre l'étude simultanée de la formation des adduits du BPDE et du radical cation du B[a]P.

B- Etude des adduits de l'ADN dans les cellules HaCat et HepG2

B-I Matériels et méthodes

B-I-1 Produits et matériels

Le (\pm)-*anti*-BPDE est utilisé à partir de la solution mère à 7,32 mM diluée dans DMSO. Une solution mère de B[a]P est préparée à 10 mg/mL (39,6 mM) dans le DMSO.

Le milieu de culture Dubelcco's Modified Eagle's medium (DMEM) à 4500 mg/L de glucose, enrichi en glutamine (4 mM) et pyruvate (1 mM), le milieu de culture Roswell Park Memorial Institute (RPMI) à 1640 mg/L de glucose, le glutamax (glutamine), le sérum de veau fœtal, le tampon phosphate (PBS \pm CaCl₂ et MgCl₂), et la trypsine (2,5%) proviennent de Gibco (Grand Island, NY). L'EDTA à 0,02% (p/v), la solution d'acides aminés non-essentiels minimum essential medium (MEM), le collagène de queue de rat de type I sont commercialisés par Sigma (St Quentin-Fallavier, France). L'eau stérile provient de Fresenius Kabi. Les cultures sont réalisées dans des flacons Nunc à bouchons ventilés et inclinés de 25 ou 75 cm², ou des microplaques de 96 puits.

Les enzymes utilisées pour l'extraction de l'ADN proviennent de Sigma, exceptées la protéase qui est de Qiagen (Hilden, Allemagne) et la RNase T1 de Roche Diagnostics (Manheim, Allemagne).

B-I-2 Lignées et culture cellulaires

B-I-2-a Cellules HepG2

La lignée cellulaire HepG2 (Aden et al. 1979) est issue d'un hépatocarcinome humain de la banque américaine de culture cellulaire. Les cellules HepG2, adhérentes et cultivées en monocouche, sontensemencées à $5 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans des flacons de 75 cm² contenant 15 mL de milieu DMEM dans lequel sont ajoutés 1% (v/v) d'acides aminés non essentiels, 10% (v/v) de sérum de veau foetal, 100000 unités/L de pénicilline et 100 mg/L de streptomycine. Les flacons sont préalablement traités pendant 30 min à 37°C avec 4 mL de collagène (1 mg/mL) dilué au 100^{ème} dans de l'eau stérile, puis rincés 3 fois avec du tampon phosphate (PBS - CaCl₂ - MgCl₂). Ce traitement peut être effectué jusqu'à une semaine avant l'utilisation des flacons. La culture s'opère dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Le repiquage est effectué une fois par semaine avec un changement du milieu de culture en milieu de semaine. Pour le repiquage, les cellules sont rincées 3 fois avec de l'EDTA (3 mL), puis détachées du flacon sous l'action de trypsine (3 mL) pendant 6 min. L'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 7 mL de milieu de culture. Après centrifugation (1000 tours/min, 5 min, 4°C), le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez avant d'êtreensemencées dans un rapport de 1/6 dans des flacons de 75 cm² pour l'entretien, ou dans d'autres supports (flacons de 25 cm² ou microplaques) à la densité nécessaire pour les différentes expériences.

B-I-2-b Cellules HaCat

La lignée cellulaire HaCat est issue de l'immortalisation de kératinocytes humains (Boukamp et al. 1988). Les cellules HaCat, adhérentes et cultivées en monocouche, sontensemencées à $5 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans des flacons de 75 cm² contenant 15 mL de milieu RPMI complété avec 1% de glutamine (v/v), 10% (v/v) de sérum de veau foetal, $2 \cdot 10^6$ unités/L de pénicilline et 2 g/L de streptomycine. Le repiquage de la culture est effectué une fois par semaine avec un changement du milieu de culture en milieu de semaine. Pour le repiquage, les cellules sont

rincées 3 fois avec du tampon phosphate (PBS - CaCl₂ - MgCl₂), puis détachées du flacon en présence de trypsine (3 mL) pendant 5 min. L'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 7 mL de milieu de culture. Après centrifugation (1000 tours/min, 5 min, 22°C), le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez avant d'êtreensemencées dans un rapport de 1/10 dans des flacons de 75 cm² pour l'entretien, ou dans d'autres supports (flacons de 25 cm² ou microplaques) à la densité nécessaire pour les différentes expériences.

B-I-3 Mesure de la cytotoxicité

La cytotoxicité du (±)-*anti*-BPDE et du B[a]P est évaluée par le test du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium (MTT). Les cellules HaCat ou HepG2 sontensemencées dans des microplaques de 96 puits à une densité de 20000 cellules/puits et incubées pendant 24 h à 37°C dans du milieu de culture. Après 24 h, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture contenant du (±)-*anti*-BPDE ou du B[a]P dissous dans le DMSO, la concentration en DMSO dans le milieu de culture n'excédant pas 0,5% (v/v). Après 24 h de traitement, les cellules sont rincées deux fois avec du tampon phosphate (PBS - CaCl₂ - MgCl₂) et incubées 2 h dans du MTT (5mg/mL dans du PBS + CaCl₂ + MgCl₂) dilué au 1/10^{ème} dans du milieu de culture. Les cellules sont enfin rincées avec du tampon phosphate (PBS - CaCl₂ - MgCl₂), lysées dans le DMSO, puis agitées 15 min. L'intensité de la coloration est mesurée par une lecture de densité optique à 570 nm. Les résultats obtenus pour chaque condition correspondent à la moyenne de huit mesures indépendantes.

B-I-4 Traitement des cellules avec du (±)-anti-BPDE ou du B[a]P

Les cellules sontensemencées dans des flacons de 25 cm² à une densité de 8*10⁴ cellules/cm² et en triplicats pour chaque condition des différentes expériences. Après trois jours de croissance cellulaire, les cellules sont traitées avec du (±)-*anti*-BPDE ou du B[a]P dissous dans le DMSO, la concentration en DMSO dans le milieu de culture n'excédant pas 0,5%

(v/v). Pour étudier la cinétique de formation des adduits du (\pm)-*anti*-BPDE, les cellules HepG2 sont traitées à 2 μ M de (\pm)-*anti*-BPDE pendant 10 min, 1 et 2 h. Pour l'étude de la formation des adduits du (\pm)-*anti*-BPDE, les cellules HaCat et HepG2 sont traitées pendant 30 min à 0,1, 1 et 2 μ M de (\pm)-*anti*-BPDE. Pour déterminer la cinétique de réparation des adduits du BPDE, les adduits sont mesurés directement après le traitement des cellules pendant 1 h avec 0,5 μ M de (\pm)-*anti*-BPDE ainsi qu'à 6, 24, 48 et 70 h après deux rinçages et remise en culture des cellules dans du milieu de culture neuf. Pour étudier la cinétique de formation des adduits du B[a]P, les cellules HaCat et HepG2 sont incubées avec 200 μ M de B[a]P pendant 3, 6, 9 et 24 h, et avec 50 μ M de B[a]P pendant 2, 5, 8, et 24 h, respectivement. Pour l'évaluation de la formation des adduits du B[a]P, les cellules HaCat et HepG2 sont traitées pendant 24 h à 100, 200 et 400 μ M et 1, 10 et 50 μ M de B[a]P, respectivement. Pour étudier l'évolution des taux d'adduits après un traitement des cellules au B[a]P, les adduits sont mesurés directement après 24 h d'incubation à 200 μ M ou 10 μ M de B[a]P pour les cellules HaCat et HepG2, respectivement, puis après deux rinçages et remise en culture dans du milieu de culture neuf, à 3, 7, 24 et 48 h ou 4, 8, 24 et 48 h pour les cellules HaCat et HepG2, respectivement.

Pour la mesure des adduits, les cellules HaCat et HepG2 sont rincées après les traitements avec du tampon phosphate (PBS - CaCl₂ - MgCl₂) ou de l'EDTA respectivement, avant d'être récoltées par action de la trypsine et centrifugation. Si l'extraction de l'ADN n'est pas réalisée immédiatement après la récolte, les culots cellulaires sont congelés à -80°C.

B-I-5 Recherche des adduits dépurinants dans les milieux de culture

De façon à rechercher les adduits dépurinants du radical cation du B[a]P potentiellement excrétés hors des cellules, 200 μ L de chaque milieu de culture correspondant aux traitements des cellules HaCat et HepG2 à 100, 200, 400 μ M et 1, 10, 50 μ M de B[a]P respectivement, sont transférés sur des tubes filtrants "vecta spin Micro 30K MWCO" (Whatman, Maidstone, UK) et centrifugés à 5000 g pendant 10 min. 200 μ L de MeOH sont ensuite transférés sur les filtres et les adduits sont élués par une nouvelle centrifugation à 5000 g pendant 10 min. Les fractions collectées sont ensuite analysées par CLHP-SM/SM. Les rendements d'extraction

des adduits sont calculés à partir de milieu extracellulaire provenant des cultures témoins n'ayant pas reçu de traitement de B[a]P dans lequel sont ajoutées des quantités connues des différents standards d'adduits. Le milieu de culture dopé en adduits est traité selon le protocole décrit précédemment, et l'injection de cet échantillon en CLHP-SM/SM est comparée à l'injection des mêmes quantités d'adduits dans le MeOH sans traitement de l'échantillon.

B-I-6 Extraction et digestion enzymatique de l'ADN

L'ADN des cellules HaCat et HepG2 est extrait selon un protocole d'extraction chaotrope à l'iodure de sodium (NaI) permettant de limiter l'oxydation artéfactuelle de l'ADN (Ravanat et al. 2002).

Ce protocole comprend plusieurs étapes :

1- Lyse de la membrane plasmique : les culots cellulaires sont repris dans 1,5 mL de tampon de lyse A (320 mM de sucrose, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de déféroxamine, et 1% de triton X-100, pH 7,5). Des pipetages répétés sont nécessaires pour dissocier les cellules HaCat et HepG2 qui peuvent former des agrégats limitant l'action du tampon de lyse. Après centrifugation (1500 g, 5 min, 4°C), les surnageants sont éliminés et cette étape est répétée une deuxième fois.

2- Lyse de la membrane nucléaire et élimination de l'ARN et des protéines : les culots nucléaires sont repris dans 600 µL de tampon de lyse B (5 mM d'EDTA-Na₂, 10 mM de Tris-HCl, 0,15 mM de déféroxamine, pH 8). Après agitation 35 µL de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10% sont ajoutés. Les échantillons sont incubés 15 min à 50°C après ajout de 3 µL de RNase A (100 mg/mL) et 7 µL de RNase T1 (1 unité/µL), puis 1 h à 37°C après ajout de 30 µL de protéase (20 mg/mL).

3- Précipitation de l'ADN : l'ADN est précipité par 1,2 mL de solution de NaI (20 mM d'EDTA-Na₂, 7,6 M de NaI, 40 mM de Tris-HCl, 0,3 mM de déféroxamine, pH 8) et 2 mL d'isopropanol (100%). Après agitation des tubes par retournement et centrifugation (5000 g, 5 min, 4°C), les culots d'ADN sont repris dans 1 mL d'isopropanol (40%) et de nouveau centrifugés (5000 g, 5 min, 4°C). Les culots sont repris dans 1 mL d'éthanol (70%) et

centrifugés une dernière fois dans les mêmes conditions. Finalement, les culots d'ADN sont repris dans 100 μ L de déféroxamine (0,1 mM).

Les échantillons d'ADN sont remis en suspension par des pipetages répétés avant d'être digérés enzymatiquement, puis lyophilisés et repris dans un mélange MeOH:H₂O (50:50 v/v) avant d'être analysés par CLHP-SM/SM.

B-II Résultats

B-II-1 Etudes cytotoxiques sur les cellules HaCat et HepG2

B-II-1-a Cytotoxicité du (\pm)-anti-BPDE

La dose létale 50 (DL₅₀) est évaluée à environ 2 μ M et 5 μ M de (\pm)-anti-BPDE pour les cellules HaCat et HepG2 respectivement (Figure 32). Bien que la sensibilité des deux lignées cellulaires pour le (\pm)-anti-BPDE soit dans la même gamme de concentration, les cellules HaCat pourraient être plus sensibles puisqu'à 5 μ M de (\pm)-anti-BPDE une mortalité de 100% est atteinte tandis que, pour les cellules HepG2, plus de 50% des cellules restent viables jusqu'à 10 μ M de (\pm)-anti-BPDE.

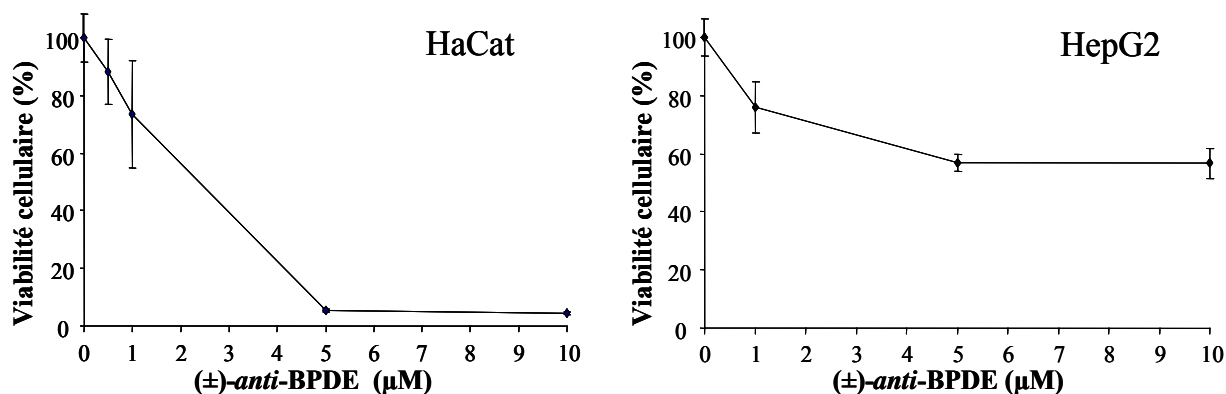


Figure 32 : Cytotoxicité du (\pm)-anti-BPDE sur les cellules HaCat et HepG2.

B-II-1-b Cytotoxicité du B[a]P

La DL_{50} est évaluée à environ 1000 μM de B[a]P pour les cellules HaCat et à 50 μM pour les cellules HepG2 (Figure 33). Les cellules HaCat apparaissent donc environ 20 fois plus résistantes au B[a]P que les cellules HepG2.

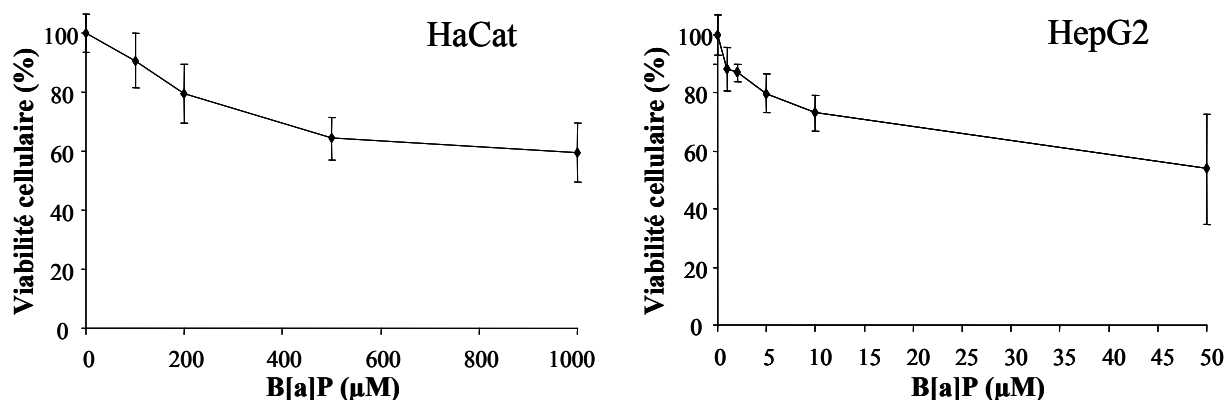


Figure 33 : Cytotoxicité du B[a]P sur les cellules HaCat et HepG2.

B-II-2 Etude des adduits de l'ADN dans les cellules HaCat et HepG2 en présence de (\pm)-anti-BPDE

B-II-2-a Cinétique de formation des adduits dans les cellules HepG2 en présence de (\pm)-anti-BPDE

La cinétique de formation des adduits du BPDE dans les cellules HepG2 est présentée dans la figure 34.

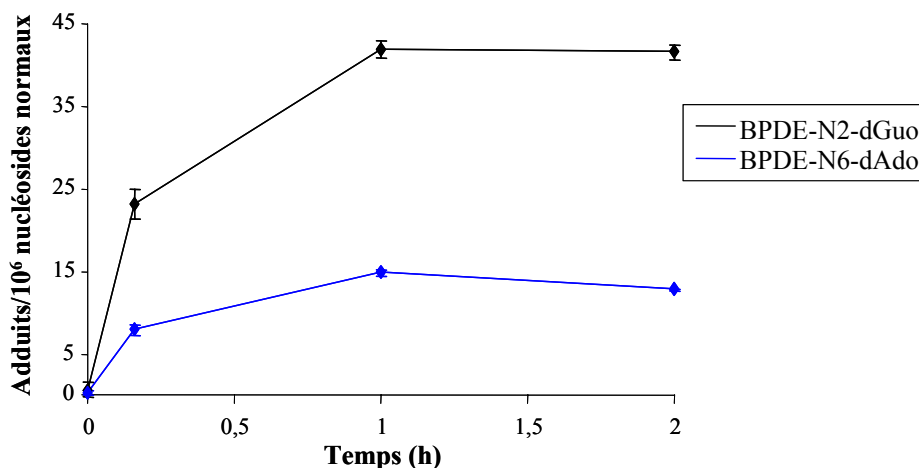


Figure 34 : Cinétique de formation des adduits du BPDE dans les cellules HepG2 traitées à 2 μM d'(±)-*anti*-BPDE pendant 10 min, 1 et 2 h.

Les deux adduits stables du BPDE, BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo, sont détectés dans l'ADN des cellules HepG2 traitées au (±)-*anti*-BPDE. L'adduit BPDE-N2-dGuo est l'adduit majoritaire, et l'adduit BPDE-N6-dAdo représente environ 30% de la formation de BPDE-N2-dGuo. Les deux adduits présentent une cinétique de formation similaire avec le maximum d'adduits atteint entre 30 min et 1 h suivant le début du traitement.

Dans la suite du travail, l'incubation des cellules avec le (±)-*anti*-BPDE sera donc réalisée pendant 30 min ou 1 h selon les expériences.

B-II-2-b Formation des adduits dans les cellules HaCat et HepG2 en fonction de la dose de (±)-*anti*-BPDE

Afin de comparer la formation des adduits du BPDE dans les deux types cellulaires, les adduits sont mesurés 30 min après le traitement des cellules HaCat et HepG2 aux mêmes concentrations en (±)-*anti*-BPDE (Figure 35).

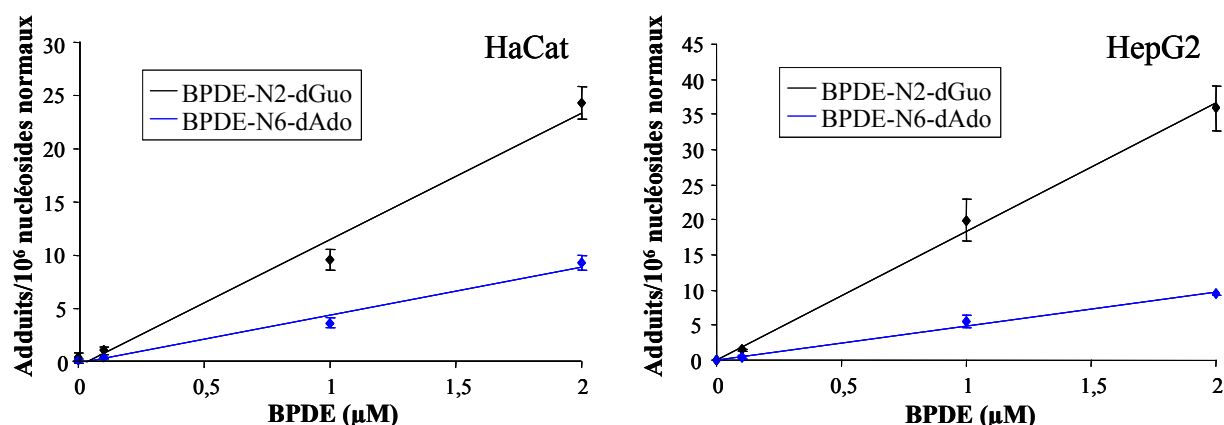


Figure 35 : Formation des adduits du BPDE dans les cellules HaCat et HepG2 traitées pendant 30 min à 0,1, 1 et 2 µM de (±)-*anti*-BPDE.

Dans les deux types cellulaires, les deux adduits du BPDE, BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo, sont détectés et leur formation est dose-dépendante avec la quantité de (±)-*anti*-BPDE. L'adduit BPDE-N2-dGuo est l'adduit majoritaire dans les cellules HepG2 comme dans les cellules HaCat. L'adduit BPDE-N6-dAdo représente environ 40% et 30% de la formation de BPDE-N2-dGuo dans les cellules HaCat et HepG2 respectivement. De plus, les niveaux d'adduits formés sont comparables dans les deux lignées cellulaires.

La formation des adduits du BPDE en présence de (±)-*anti*-BPDE apparaît ainsi similaire dans les types cellulaires HaCat et HepG2.

B-II-2-c Réparation des adduits après traitement des cellules HaCat et HepG2 au (±)-*anti*-BPDE

La réparation des adduits du BPDE est étudiée dans les deux types cellulaires par le suivi du taux de l'adduit majoritaire BPDE-N2-dGuo après un traitement des cellules à une faible dose de (±)-*anti*-BPDE pendant 1 h (Figure 36).

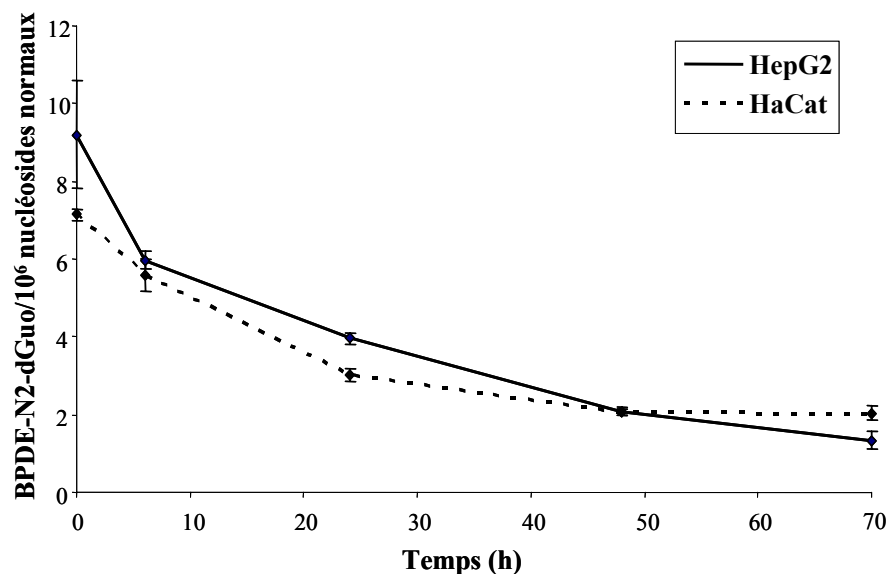


Figure 36 : Cinétique de réparation de l'adduit BPDE-N2-dGuo dans les cellules HaCat et HepG2 traitées à 0,5 μ M de (\pm)-*anti*-BPDE pendant 1 h. Les adduits sont mesurés à 6, 24, 48 et 70 h après l'arrêt du traitement.

La cinétique de réparation de l'adduit BPDE-N2-dGuo est similaire dans les cellules HaCat et HepG2. Afin d'étudier la cinétique de réparation uniquement, il est préférable d'exclure le point au temps $t = 0$ dans la mesure où selon la figure 34, la formation des adduits n'est peut-être pas totalement terminée après une heure de traitement, même après arrêt du traitement. En considérant la cinétique à partir de $t = 6$ h, on obtient une mono exponentielle avec un R^2 égal à 0,997. La cinétique de réparation de l'adduit BPDE-N2-dGuo est donc une cinétique monophasique. La même cinétique est observée pour l'adduit BPDE-N6-dAdo dans les deux lignées cellulaires (non présentée). Notons que des comptages de la population cellulaire, lors de l'arrêt du traitement et 70 h après, indiquent que les cellules HaCat et HepG2 croissent de 1,05 et 2,5 fois respectivement pendant les 70 h de suivi de la réparation.

La réparation des adduits du BPDE est identique dans les cellules HaCat et HepG2, et il s'agit d'une réparation lente avec une persistance de 25% des adduits 48 h après la fin du traitement.

B-II-3 Etude des adduits de l'ADN dans les cellules HaCat et HepG2 en présence de B[a]P

B-II-3-a Cinétique de formation des adduits dans les cellules HaCat et HepG2 en présence de B[a]P

La cinétique de formation des adduits du B[a]P est étudiée dans les deux types cellulaires pendant 24 h suivant un traitement au B[a]P (Figure 37). Des études préalables nous ont permis de constater que des quantités importantes de B[a]P sont nécessaires pour détecter les adduits du BPDE dans les cellules HaCat. Des doses différentes des B[a]P sont donc choisies pour les deux lignées cellulaires.

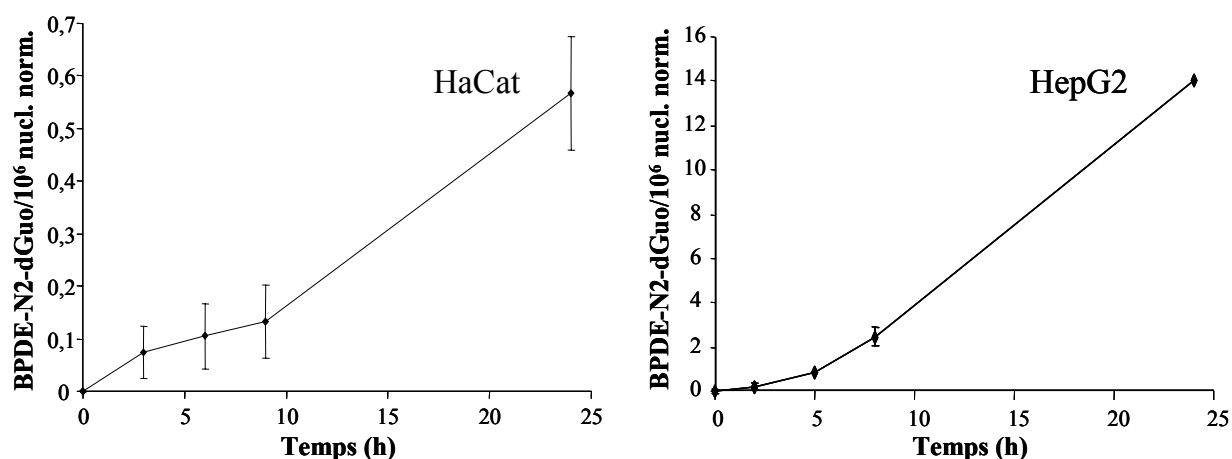


Figure 37 : Cinétique de formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo dans les cellules HaCat et HepG2 traitées à 200 μ M et 50 μ M de B[a]P respectivement.

Seul l'adduit BPDE-N2-dGuo est détecté dans les cellules HaCat et HepG2 traité au B[a]P. L'adduit BPDE-N6-dAdo est détecté uniquement dans les cellules HepG2 après 24 h d'incubation avec le B[a]P. La formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo est temps-dépendante dans les deux lignées cellulaires, et croît jusqu'à 24 h après le début du traitement au B[a]P. Ce temps sera donc choisi comme temps d'incubation des cellules avec le B[a]P dans la suite du travail.

La cinétique de formation des adduits semble comparable dans les deux lignées cellulaires puisque le taux d'adduits augmente d'environ six fois sur une même période de temps dans les cellules HaCat et HepG2 (période comprise entre les deux derniers points de la cinétique). Il semblerait que la cinétique de formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo soit biphasique, avec une première phase lente jusqu'à environ 5 h après le traitement, puis une phase plus rapide jusqu'à 24 h après le traitement.

Cependant, bien que les cinétiques de formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo soient similaires dans les deux lignées cellulaires, une importante différence de taux d'adduits formés est mise en évidence. En effet, dans les cellules HaCat une quantité de B[a]P 5 fois plus importante que dans les cellules HepG2 est nécessaire pour générer des taux d'adduits 25 fois plus faibles. Les cellules HaCat forment ainsi environ 125 fois moins d'adduits que les cellules HepG2. Aucun adduit de la voie du radical cation n'est détecté dans les deux types cellulaires dans ces conditions expérimentales. Toutefois, les doses de B[a]P utilisées ne sont pas équivalentes dans les deux lignées au regard de la cytotoxicité respective du B[a]P dans ces cellules. Il s'agit donc de vérifier ces premières observations par l'étude de la formation des adduits après 24 h d'incubation en fonction de la dose de B[a]P.

B-II-3-b Formation des adduits dans les cellules HaCat et HepG2 en fonction de la dose de B[a]P

La formation des adduits du B[a]P dans les cellules HaCat et HepG2 est présentée en figure 38.

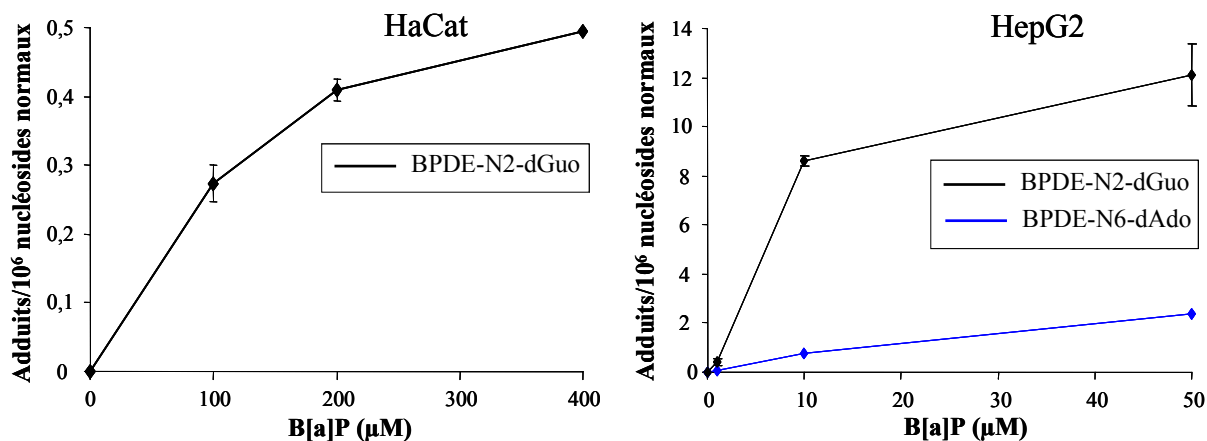


Figure 38 : Formation des adduits du B[a]P dans les cellules HaCat et HepG2 traitées pendant 24 h à 100, 200, 400 µM de B[a]P et 1, 10, 50 µM de B[a]P respectivement.

Dans les deux types cellulaires l'adduit BPDE-N2-dGuo est l'adduit majoritairement formé. Dans les cellules HepG2, l'adduit BPDE-N6-dAdo est également détecté et représente environ 20% de la formation de BPDE-N2-dGuo. Comme observé précédemment, les taux d'adduits formés sont environ 200 fois plus faibles dans les cellules HaCat que dans les cellules HepG2.

De même, aucun adduit de la voie du radical cation du B[a]P n'est détecté dans l'ADN des cellules traitées au B[a]P. Selon les limites de détection des adduits du radical cation du B[a]P et la quantité d'ADN présente dans les échantillons analysés, si ces adduits sont présents dans l'ADN des cellules traitées au B[a]P, ils le sont à des quantités inférieures à environ 5 adduits/10⁸ nucléosides normaux.

Un chromatogramme obtenu pour l'analyse de l'ADN extrait des cellules HepG2 traitées à 50 µM de B[a]P est présenté en figure 39 (partie droite), en comparaison avec l'analyse des standards d'adduits (partie gauche).

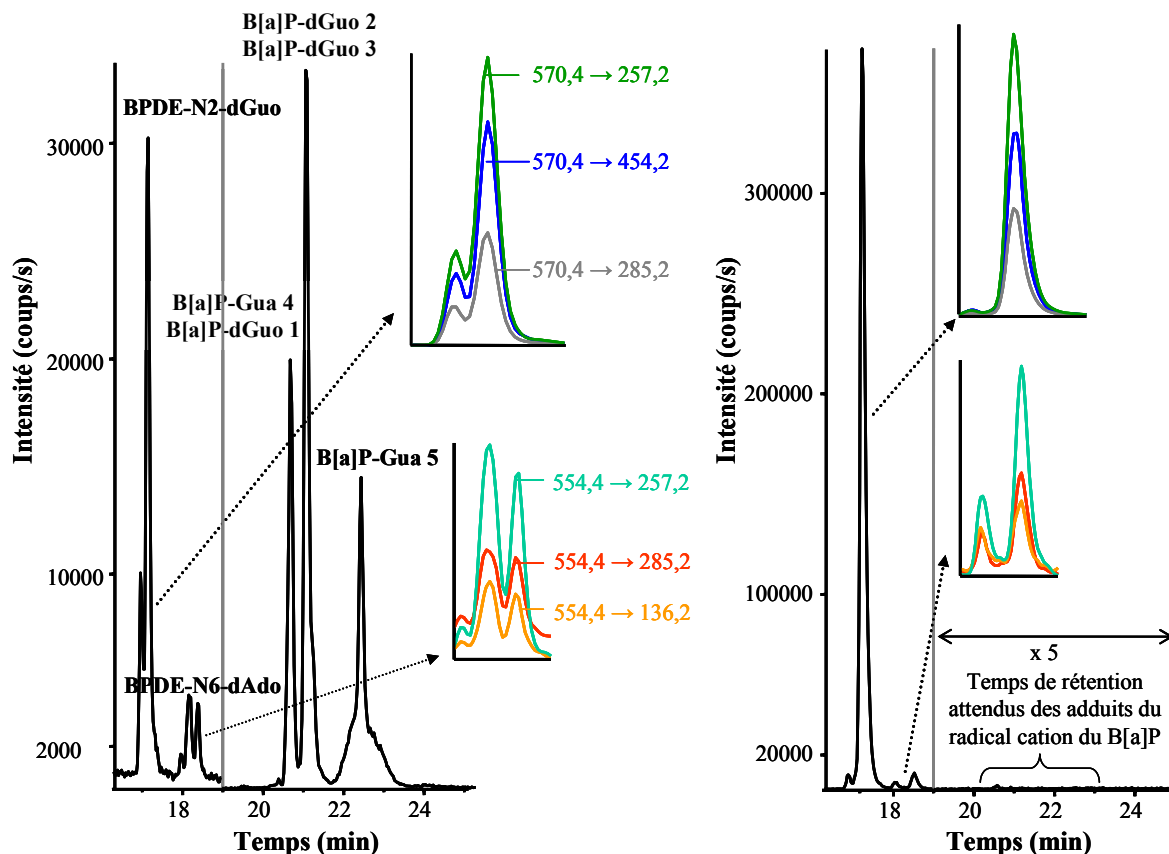


Figure 39 : *Partie gauche* : chromatogramme obtenu pour l'analyse de 500 fmoles de chaque adduit. *Partie droite* : chromatogramme obtenu pour l'analyse d'un échantillon d'ADN de cellules HepG2 traitées à 50 μ M de B[a]P pendant 24 h. Les intensités relatives des transitions majoritaires utilisées pour la détection des isomères d'adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo sont représentées dans les deux chromatogrammes.

Il est important de remarquer que les profils d'élution des adduits BPDE-N6-dAdo et BPDE-N2-dGuo sont différents entre les standards et l'échantillon d'ADN cellulaire analysé, indiquant une différence probable de formation des adduits dans l'ADN isolé traité au (\pm)-*anti*-BPDE et dans l'ADN de cellules exposées au B[a]P.

Enfin, l'analyse des milieux de culture, correspondant aux traitements des cellules HaCat et HepG2 aux différentes doses de B[a]P présentées ci-dessus, n'a permis de détecter aucun adduit. Les rendements d'extraction obtenus pour les différents adduits varient de 38 à 76%.

B-II-3-c Evolution des taux d'adduits après un traitement des cellules HaCat et HepG2 au B[a]P

L'évolution du taux de l'adduit BPDE-N2-dGuo après un traitement des cellules au B[a]P est représentée dans la figure 40.

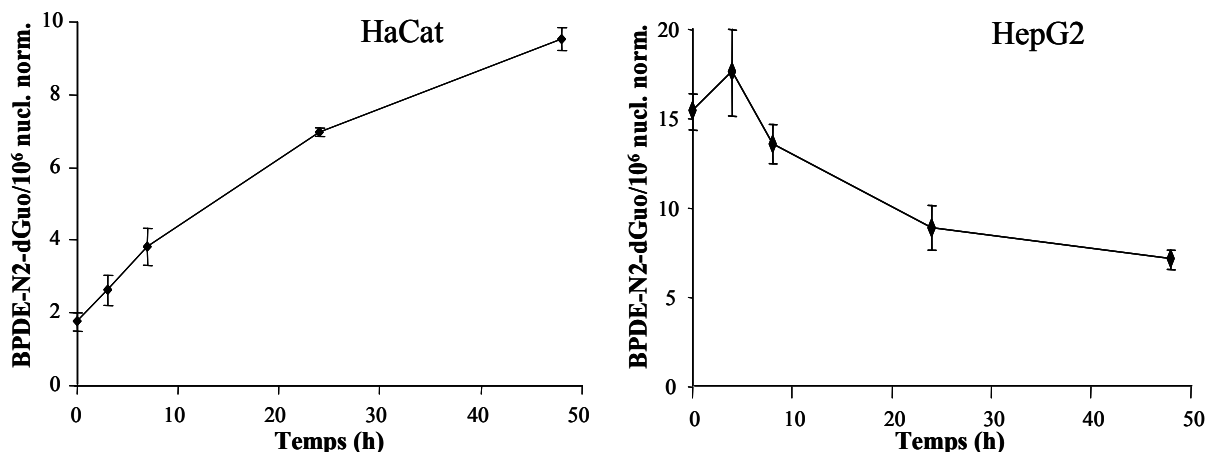


Figure 40 : Evolution du taux de l'adduit BPDE-N2-dGuo après un traitement pendant 24 h à 200 μ M et 10 μ M de B[a]P pour les cellules HaCat et HepG2, respectivement. Les adduits sont mesurés à 3, 7, 24 et 48 h et 4, 8, 24 et 48 h après le traitement des cellules HaCat et HepG2, respectivement.

Dans les cellules HepG2, le taux de l'adduit BPDE-N2-dGuo atteint son maximum rapidement après l'arrêt de l'incubation avec le B[a]P, puis décroît indiquant que les cellules sont capables de réparer les adduits formés. Après 48 h, 60% des adduits sont réparés. La même cinétique d'élimination est observée pour l'adduit BPDE-N6-dAdo (non présentée).

A l'inverse, l'évolution du taux de l'adduit BPDE-N2-dGuo dans les cellules HaCat est totalement différente puisque celui-ci continue à croître même après rinçage des cellules et remise en culture dans du milieu de culture sans B[a]P. Ceci signifie que le B[a]P est rentré dans les cellules lors du traitement, et est ensuite métabolisé progressivement même après l'arrêt du traitement. La formation des adduits, alors plus importante que la réparation des adduits, entraîne une augmentation globale du taux d'adduits.

B-III Discussion

L'incubation des cellules HaCat et HepG2 avec du (\pm)-*anti*-BPDE entraîne la formation des adduits stables BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo, et ceci de façon dose-dépendante. Les taux d'adduits formés sont similaires dans les deux lignées traitées avec les mêmes doses de (\pm)-*anti*-BPDE pendant la même durée. Ceci indique que la réaction du (\pm)-*anti*-BPDE avec l'ADN est indépendante du type cellulaire ou que les cellules HaCat et HepG2 présentent les mêmes capacités de détoxification du (\pm)-*anti*-BPDE par les enzymes de phase II telles les glutathion-transférases. Notons que les quantités de (\pm)-*anti*-BPDE utilisées pourraient également surpasser ces capacités si bien que les résultats obtenus seraient finalement le reflet de la grande réactivité du (\pm)-*anti*-BPDE pour l'ADN.

L'adduit BPDE-N2-dGuo est l'adduit majoritairement formé, et l'adduit BPDE-N6-dAdo représente environ 30% de sa formation dans les deux types cellulaires. La formation relative de l'adduit BPDE-N6-dAdo par rapport à l'adduit BPDE-N2-dGuo est plus faible dans l'ADN cellulaire que dans l'ADN isolé où elle est de 70%. Ces pourcentages sont supérieurs aux 0,4% et 2,5% déterminés par Ruan et al. dans les cellules et l'ADN isolé respectivement (Ruan et al. 2006), mais cet auteur rapporte également une moindre formation de l'adduit BPDE-N6-dAdo dans l'ADN cellulaire par rapport à l'ADN isolé. A l'inverse, nos résultats sont plus faibles que les 82% déterminés dans le tissu pulmonaire de souris exposées à des fumées d'asphalte (Wang et al. 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, de telles différences concernant la formation relative des adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo sont difficiles à expliquer. Toutefois, la moindre formation de l'adduit BPDE-N6-dAdo dans l'ADN cellulaire par rapport à l'ADN isolé, pourrait être liée à une différence d'accessibilité des groupements nucléophiles de la dGuo et de la dAdo, selon que l'ADN double-brin est libre en solution ou compacté dans le noyau des cellules.

Afin d'étudier la réparation des adduits du BPDE formés dans les deux types cellulaires, nous avons mesuré les adduits de l'ADN directement après l'incubation des cellules avec une dose non cytotoxique de (\pm)-*anti*-BPDE, puis sur une période de 70 h après remise en culture des cellules dans du milieu de culture sans (\pm)-*anti*-BPDE. La cinétique de réparation des adduits apparaît similaire entre les deux lignées. Environ 60 et 75% des adduits sont réparés en 24 et 48 h respectivement. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature indiquant qu'après 24 h 67% des adduits du BPDE sont réparés dans des fibroblastes humains traités

avec 1,5 μM de BPDE (Kaneko et al. 1982). Une réparation légèrement plus rapide, de 75% d'adduits réparés en 6 h, a cependant été rapportée dans des cellules épithéliales de carcinome de poumon A549 (Dreij et al. 2005). La cinétique de réparation lente observée est en accord avec l'implication du système de réparation de la REN (Dreij et al. 2005). Notons que l'atteinte d'un taux d'adduits résiduels persistant pourrait être mise en évidence puisqu'aucune diminution n'est observée entre 48 et 70 h notamment dans les cellules HaCat. La plus importante diminution du taux d'adduits dans les cellules HepG2 entre 48 et 70 h pourrait être liée à une plus importante prolifération cellulaire de ces cellules dans nos conditions expérimentales. De façon intéressante, les adduits de l'ADN de la 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine, une amine hétérocyclique formée dans la viande grillée et connue pour être réparée par le mécanisme de la REN, sont réparés dans les cellules HepG2 avec la même cinétique que celle décrite dans notre étude (Bacon et al. 2003). Il s'agit d'une cinétique de réparation lente en comparaison à la cinétique de réparation d'autres lésions de l'ADN, tels que les lésions oxydatives réparées en quelques heures (Hofer et al. 2005).

L'adduit BPDE-N2-dGuo est également l'adduit majoritairement formé dans les cellules HepG2 et HaCat exposées au B[a]P. L'adduit BPDE-N6-dAdo n'est détecté que dans les cellules HepG2 dans une proportion relative par rapport à l'adduit BPDE-N2-dGuo similaire à celle déterminée dans les cellules exposées au (\pm)-*anti*-BPDE. Comme présenté dans la figure 39, les profils d'élution des adduits BPDE-N2-dGuo et BPDE-N6-dAdo obtenus dans l'ADN cellulaire suite au traitement au B[a]P sont légèrement différents de ceux obtenus par traitement au (\pm)-*anti*-BPDE. En effet, le traitement d'ADN isolé avec du (\pm)-*anti*-BPDE, permet la formation de quatre diastéréoisomères pour chaque adduit qui correspondent aux isomères *cis* et *trans* des deux énantiomères de l'*anti*-BPDE. Dans nos conditions CLHP, les quatre diastéréoisomères sont résolus en deux pics majoritaires. Dans les cellules HepG2 traitées au B[a]P, un seul pic est observé pour l'adduit BPDE-N2-dGuo, tandis que l'abondance relative des deux pics majoritaires pour l'adduit BPDE-N6-dAdo est inversée. Ceci pourrait être attribué à la stéréosélectivité des cyt. P450 qui génèrent préférentiellement l'énantiomère (+)-*anti*-BPDE (Xue et al. 2005) et donne donc naissance à une paire de diastéréoisomères majoritaire pour chaque adduit.

Alors que la formation des adduits du BPDE apparaît similaire dans les deux lignées cellulaires exposées au B[a]P d'un point de vue qualitatif, une importante différence d'ordre

quantitatif est mise en évidence. En effet, le taux d'adduits générés dans les cellules HepG2 est 200 fois plus important que dans les cellules HaCat. Du fait des similitudes entre les deux lignées cellulaires, que ce soit pour la formation ou la réparation des adduits du BPDE après une exposition au (\pm)-*anti*-BPDE, la différence de formation des adduits observée après une incubation des cellules avec du B[a]P est plutôt à attribuer à une différence de métabolisation du B[a]P dans ces cellules. Le foie étant l'organe de la détoxification, les hépatocytes possèdent les enzymes de métabolisation des xénobiotiques comme les cyt. P450, tandis que les kératinocytes pourraient être plus démunis pour ces enzymes. Le fait que les cinétiques de formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo soient similaires dans les deux lignées cellulaires pourrait indiquer que l'activité métabolique des cyt. P450 présents dans les cellules HaCat n'est pas plus lente que dans les cellules HepG2 mais que les quantités de cyt. P450 sont moins importantes dans les kératinocytes, entraînant une activité métabolique globale plus faible. Il a en effet été montré que les niveaux d'expression des cyt. P450 sont beaucoup plus bas dans la peau que dans le foie chez les rongeurs (Swanson 2004). Dans des cultures primaires de kératinocytes murins, l'activité catalytique des cyt. P450 1A1 et 1A2, évaluée par la mesure de l'activité ethoxyresorufin-*O*-deethylase, est 100 fois moins importante que dans des hépatocytes de rat (Reiners et al. 1990). La comparaison de l'activité métabolique basale des cyt. P450, par la même méthode, dans les cellules HaCat et HepG2 indique finalement une activité 4 fois plus faible dans les kératinocytes que dans les hépatocytes (Ledirac et al. 1997). Outre la différence des niveaux d'expression des cyt. P450 à l'état basal, la capacité d'induction de l'expression des cyt. P450 en présence de B[a]P est à prendre en compte. Il a ainsi été montré que les niveaux d'expression du récepteur AhR, impliqué dans les mécanismes d'induction des cyt. P450 par les HAP, sont significativement plus bas dans des kératinocytes que dans des cellules de foie (Swanson 2004). Il a de plus été vérifié que le B[a]P pouvait induire l'expression des cyt. P450 1A1, 1A2, et 1B1 dans les cellules HepG2 (Misaki et al. 2007). Ceci pourrait alors expliquer la cinétique de formation biphasique observée dans les cellules HepG2 traitées avec du B[a]P dans notre étude.

La plus faible métabolisation du B[a]P dans les cellules HaCat pourrait expliquer leur plus grande résistance au B[a]P qui pour être toxique doit être auparavant métabolisé. Nous pouvons alors remarquer que la cytotoxicité du B[a]P corrèle avec le taux d'adduits générés. En effet, la DL₅₀ des cellules HaCat est 20 fois plus élevée que celle des cellules HepG2, et le taux d'adduits formés est environ 200 fois plus faible. Cependant, il ne peut pas être exclu que

la résistance au B[a]P des cellules HaCat puisse venir également de leur mutation pour le gène p53.

Un autre point majeur de notre étude réside dans l'absence de détection des adduits du radical cation du B[a]P dans l'ADN des cellules exposées au B[a]P. Aucun adduit stable ou dépurinant synthétisé par électrochimie n'est en effet détecté, que ce soit dans les cellules HaCat ou HepG2 qui possèdent d'importantes capacités de métabolisation, traitées à de fortes concentrations en B[a]P. Une première hypothèse pouvant être mise en avant pour expliquer ce point pourrait être une déficience en enzymes permettant une activation du B[a]P par mono-oxydation électronique dans les deux lignées cellulaires étudiées. Pourtant, il a été montré que les prostaglandines-endopéroxydes synthétases, peroxydases essentiellement impliquées dans l'activation des HAP, sont présentes au niveau des kératinocytes (Tafazoli et al. 2005), ainsi qu'au niveau des hépatocytes et plus précisément des cellules HepG2 (Hawi et al. 1998). De plus, il est connu que les cyt. P450 peuvent également prendre en charge des réactions d'oxydation mono-électronique (Tafazoli et al. 2005). L'absence des adduits du radical cation du B[a]P dans l'ADN des cellules pourrait alors être due à une très courte durée de vie du radical cation dans les cellules qui empêcherait ou réduirait significativement la formation des adduits de l'ADN. Une autre explication pourrait être liée au fait que les adduits du radical cation sont connus pour être majoritairement dépurinants (Chen et al. 1996). Bien que la stabilité de ces adduits puisse être suffisante pour permettre leur détection dans l'ADN des cellules, ces adduits pourraient être excrétés majoritairement hors des cellules après leur formation. Malheureusement, nos essais de mesure des adduits dépurinants dans les milieux de culture n'ont pas permis de les mettre en évidence. Cependant, nous ne pouvons exclure que notre approche expérimentale ne soit pas adaptée. En effet, nous avons réalisé l'extraction des adduits sur un petit volume de milieu de culture (0,2 mL) ce qui permet au mieux de détecter 2% des adduits totaux présents dans le milieu de culture. De plus, il semble que les adduits puissent adhérer au verre (Ramakrishna et al. 1992) ainsi qu'aux autres composants du milieu de culture, rendant ainsi l'extraction des adduits plus difficile sur de petits volumes. Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences, en réalisant notamment une extraction organique sur la totalité des milieux de culture préalablement évaporés à sec comme décrit par Rogan et al. (Rogan et al. 1993). Outre les extractions organiques, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les adduits du B[a]P pourrait être envisagée pour purifier les milieux de culture. Notons que l'adduit dépurinant BPDE-N7-

Gua, dont la formation a été mise en évidence dans le surnageant d'ADN isolé traité au BPDE, pourrait être ajouté à notre méthode de dosage, afin de comparer sa formation à celle des adduits du radical cation. Une autre approche pour mettre en évidence les phénomènes de dépurination dans l'ADN, pourrait être de quantifier les sites abasiques formés dans l'ADN. Une méthode de dosage des sites abasiques par CLHP-SM/SM a récemment été décrite (Roberts et al. 2006). Cela pourrait permettre de comparer les quantités d'adduits stables et dépurinants formés dans l'ADN. Toutefois, en vue de mettre au point de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux HAP, une telle approche serait moins spécifique que la mesure directe des différents adduits dépurinants dans les milieux de culture. De plus, les sites abasiques sont des lésions dont la réparation est rapide au niveau cellulaire, de l'ordre de quelques heures, comme cela est classiquement mis en évidence par le test des Comètes (Calini et al. 2002). Par ailleurs, les adduits stables de l'ADN pourraient être également recherchés de façon simultanée dans les milieux de culture cellulaire. Cela pourrait permettre d'apporter de nouveaux arguments quant à la possible excrétion de ces adduits dans l'urine suite à la réparation de l'ADN. La mise au point du dosage des adduits dans les milieux de culture cellulaire permettrait finalement de déterminer la proportion des adduits dépurinants du radical cation par rapport aux adduits stables et dépurinants du BPDE dans des cellules humaines.

A ce jour, la proportion relative entre les adduits du radical cation et les adduits du BPDE n'a été déterminé que dans les poumons et la peau de souris (Chen et al. 1996; Banasiewicz et al. 2004). Selon ces études, il semble que les adduits de la voie du radical cation soient majoritaires par rapport aux adduits du BPDE. Après une injection intrapéritonéale de B[a]P à des souris, l'adduit B[a]P-N7-Gua est détecté et quantifié dans le tissu pulmonaire d'une souris sur six. Dans cette souris l'adduit B[a]P-N7-Gua représente 73% de tous les adduits stables mesurés par post-marquage incluant majoritairement l'adduit BPDE-N2-dGuo. Les adduits dépurinants sont extraits de l'ADN sur des cartouches type Sep-Pak dans du MeOH puis concentrés et extraits 3 fois dans le dichlorométhane. L'analyse des adduits est ensuite réalisée par électrophorèse capillaire et spectroscopie par fluorescence induite par laser à température ambiante. La caractérisation de l'adduit est réalisée par FLNS (Banasiewicz et al. 2004). De même, dans de la peau de souris traitée au B[a]P marqué au ^3H , 71% de tous les adduits formés sont des adduits dépurinants dont 66% sont des adduits du radical cation (Chen et al. 1996). Les adduits dépurinants sont extraits de la peau par Soxhlet permettant une extraction organique à chaud pendant 48 h. Les adduits dépurinants sont quantifiés par

comptage de la radioactivité et caractérisés par FLNS, et les adduits stables sont analysés par post-marquage. Les proportions obtenues entre les différents adduits sont les suivantes :

Adduits dépurinants :

- B[a]P-6-C8-Gua (34%)
- B[a]P-6-N7-Gua (10%)
- B[a]P-6-N7-Ade (22%)
- BPDE-10-N7-Ade (3%)
- BPDE-10-N7-Gua (2%)

Adduits stables :

- BPDE-10-N2-dGuo (23%)
- Non identifiés (6 %)

Ainsi, les adduits du radical cation semblent être formés dans des proportions importantes *in vivo*, mais ces adduits sont majoritairement dépurinants, puisque les adduits stables de cette voie pourraient correspondre au maximum au 6% d'adduits stables non-identifiés. De ce fait, et comme le suggèrent nos résultats, les adduits stables majoritaires dans l'ADN semblent être ceux du BPDE. Alors que les adduits dépurinants du radical cation seraient représentatifs d'une exposition à court terme, les adduits du BPDE et plus particulièrement ceux sur la dGuo apparaissent comme des biomarqueurs pertinents d'une exposition à long terme. De plus, nous avons mis en évidence une réparation lente de ces adduits, caractéristique essentielle d'un biomarqueur qui doit être persistant sur d'assez longues périodes de temps pour permettre sa détection dans des échantillons biologiques.

Afin d'évaluer la cinétique d'élimination des adduits du BPDE après une exposition au B[a]P, nous avons suivi le taux de l'adduit BPDE-N2-dGuo pendant 48 h après une incubation des cellules avec du B[a]P. Comme cela a déjà été rapporté dans des fibroblastes embryonnaires humains de poumon A549 (Binkova et al. 2004), le taux de l'adduit BPDE-N2-dGuo continue de croître même après arrêt du traitement au B[a]P dans les cellules HaCat. Ceci peut être expliqué par la faible métabolisation de ces cellules qui ne permet pas une métabolisation complète du B[a]P pendant le temps de traitement. La faible métabolisation entraîne ainsi une faible formation des adduits mais celle-ci peut continuer plusieurs jours après le traitement.

Ceci signifie également que les cellules n'ont pas la capacité d'éliminer le B[a]P autrement qu'après métabolisation. Les kératinocytes pourraient alors jouer un rôle de réservoir de B[a]P qui serait métabolisé progressivement, et un phénomène d'accumulation des adduits pourraient ainsi se produire, d'autant plus que le système de la REN ne permet pas une réparation rapide des adduits. A l'inverse, la cinétique d'élimination des adduits dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P est similaire à celle observée après une exposition des cellules au (\pm)-*anti*-BPDE. Ceci indique que le B[a]P a été totalement métabolisé durant l'incubation. Il faut noter toutefois que la différence observée entre les deux types cellulaires est renforcée par la nécessité d'utiliser une dose plus importante de B[a]P dans les cellules HaCat que dans les cellules HepG2.

Par ailleurs, la faible capacité de métabolisation des kératinocytes, mise en évidence au travers de la formation des adduits de l'ADN, pourrait rendre possible la diffusion du B[a]P vers d'autres organes où les capacités de métabolisation peuvent être plus importantes. Des adduits de l'ADN sont ainsi retrouvés dans les cellules du sang et dans les poumons de rats traités au B[a]P par la seule voie cutanée. En termes d'évolution du taux d'adduits après leur formation, une plus grande persistance des adduits est observée dans le poumon après une exposition par voie cutanée en comparaison à une exposition par voie intratrachéale ou orale ; aucune diminution du taux d'adduits n'est observée jusqu'à 21 jours après le traitement (Godschalk et al. 2000). Le phénomène de réservoir de la peau pourrait alors être responsable de cette persistance des adduits résultant de leur formation progressive simultanément à leur réparation. Il serait alors intéressant de connaître la proportion de B[a]P qui est métabolisé après pénétration dans les kératinocytes et celle qui diffuse à travers la peau. Ainsi, les cinétiques de formation et d'élimination des adduits dépendent non seulement de la voie d'exposition mais aussi des tissus. Le phénomène de diffusion du B[a]P au travers de la peau permettrait en outre d'expliquer la plus lente excrétion urinaire des métabolites du B[a]P, tels que le 3-OHB[a]P, observée chez des rats exposés à une dose unique de B[a]P par voie cutanée que par voie orale ou intraveineuse (Bouchard et al. 1997), ou encore le décalage de 3 à 6 h de l'excrétion urinaire du 1-OHP observé après une exposition aux HAP par voie cutanée en comparaison avec une exposition par voie respiratoire chez l'homme (Lafontaine et al. 2002).

Enfin, nous avons vu précédemment que dans l'ADN isolé traité avec du (\pm)-*anti*-BPDE, environ 10% des molécules de (\pm)-*anti*-BPDE conduisent à la formation d'adduits du BPDE, ce qui indique qu'une part importante du BPDE est probablement hydrolysée avant de réagir avec l'ADN. Quand les cellules sont traitées avec du (\pm)-*anti*-BPDE, la fraction de (\pm)-*anti*-BPDE donnant naissance à des adduits est deux ordres de grandeur plus petite que celle obtenue dans l'ADN isolé. Ceci pourrait être expliqué par la réaction possible du (\pm)-*anti*-BPDE avec d'autres constituants cellulaires comme les protéines, ainsi que par les processus de détoxification cellulaire. Le traitement des cellules HepG2 avec du B[a]P indique que le rendement de formation de l'adduit BPDE-N2-dGuo est deux ordres de grandeur plus faible que le rendement obtenu dans les cellules traitées avec du (\pm)-*anti*-BPDE, ce qui signifierait qu'environ 100 000 molécules de B[a]P seraient nécessaires pour générer un adduit de l'ADN. Compte tenu de l'efficacité du (\pm)-*anti*-BPDE pour générer des adduits, cela signifierait qu'environ 1% du B[a]P est converti en (\pm)-*anti*-BPDE pendant la métabolisation dans les cellules HepG2, et donc seulement 0,01% dans les cellules HaCat. Bien entendu, de telles estimations sont approximatives, et elles ne prennent pas en compte notamment la probable différence d'efficacité du (\pm)-*anti*-BPDE pour générer des adduits, liée à l'efficacité des systèmes de détoxification, quand le (\pm)-*anti*-BPDE est formé dans les cellules ou lorsqu'il est présent dans le milieu de culture.

En conclusion, les adduits stables du BPDE, comprenant l'adduit majoritaire BPDE-N2-dGuo, apparaissent comme des biomarqueurs d'exposition au B[a]P intéressants : leur formation est dépendante de la dose, et leur réparation lente permet leur détection plusieurs heures voire plusieurs jours après l'exposition, selon les capacités de métabolisation des cellules concernées.

Après avoir identifié la nature chimique des adduits de l'ADN apparaissant comme les biomarqueurs d'exposition au B[a]P les plus pertinents, il convient à présent de rechercher ces adduits chez des sujets exposés aux HAP, dans le cadre de la surveillance biologique de l'exposition aux HAP.

Chapitre 4

Etude de différents biomarqueurs pour le suivi de l'exposition aux HAP chez l'homme

Chapitre 4 – Etude de différents biomarqueurs pour le suivi de l'exposition aux HAP chez l'homme

Du fait de la facilité de recueil de l'urine pour les études de suivi de l'exposition chez l'homme, les biomarqueurs d'exposition aux HAP ont tout d'abord été étudiés dans ce milieu biologique chez des sujets professionnellement exposés aux HAP. Avant d'étudier les biomarqueurs novateurs que constituent les adduits de l'ADN, nous avons souhaité comparer au 1-OHP, biomarqueur classique de l'exposition aux HAP, les biomarqueurs d'effets constitués par les lésions oxydatives aisément mesurables dans l'urine. Il s'agit notamment de déterminer si ces biomarqueurs d'effets sont représentatifs de l'exposition aux HAP, dont le métabolisme entraînerait la production d'ERO. Pour cela, nous étudierons les lésions oxydatives de l'ADN et de l'ARN.

A- Etude du 1-OHP et des lésions oxydatives urinaires

A-I Matériels et méthodes

A-I-1 Population

Soixante-seize salariés d'une entreprise de métallurgie sont inclus dans l'étude. Pour chaque salarié, un questionnaire est rempli au moment des prélèvements des échantillons urinaires pour connaître le sexe, l'âge et le statut tabagique des sujets, ainsi que le poste dans l'entreprise qui peut correspondre soit à un salarié exposé aux HAP pendant la production de

métaux soit à un salarié des services administratifs travaillant sur le site de l'entreprise. Le tabagisme est défini de façon qualitative selon le critère fumeur ou non-fumeur.

A-I-2 Echantillons urinaires

Les 76 salariés bénéficient d'un prélèvement urinaire en fin de semaine fin de poste de travail (FSFP). De plus, un prélèvement urinaire est réalisé en début de semaine début de poste de travail (DSDP) chez 55 sujets ou en fin de semaine début de poste de travail (FSDP) chez 22 sujets. Notons qu'un salarié bénéficie d'un prélèvement en DSDP et en FSDP.

Après prélèvement, les échantillons urinaires sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Pour la décongélation, les échantillons sont placés 30 min à 37°C et agités pour dissoudre les précipités et homogénéiser les échantillons. La créatinine urinaire est dosée par colorimétrie (méthode de Jaffé). Les valeurs de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo sont rendues en $\mu\text{moles/mole}$ ($\mu\text{mol/mol}$) de créatinine afin de tenir compte des variations dues à l'effet de dilution ou de concentration des urines.

A-I-3 Dosage du 1-OHP

Un aliquot de 2 mL de chaque urine est prélevé et dilué dans 2 mL de tampon acétate (pH 4,6). L'ajout de β glucuronidase-aryl sulfatase pendant une nuit à 37°C permet d'hydrolyser le 1-OHP présent dans l'urine sous forme conjuguée. 200 μL de ce mélange sont injectés sur un système Waters, composé d'une pompe 510, d'un sélecteur de solvant et d'une vanne 10 positions et 2 voies, permettant l'extraction en ligne du 1-OHP. La précolonne d'extraction est une colonne Supelguard C18 de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Après injection de l'urine, la précolonne est rincée pendant 7,20 min avec un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (50:50 v/v), puis le 1-OHP est élué dans 100% de MeOH et injecté sur un système CLHP-Fluo composé d'une chaîne Alliance 2695 Waters et d'un détecteur de fluorescence 2475 Multi λ Waters. La séparation analytique est effectuée sur une colonne Lichrospher C18 (250 \times 4 mm, 5 μm) de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le gradient d'éluion est linéaire de 15 à 94% de MeOH dans l'eau pendant 10 min, à un débit de 1 mL/min. Les longueurs d'ondes utilisées pour la détection du 1-OHP par fluorescence sont 333 nm pour l'excitation,

et 390 nm pour l'émission. La quantification du 1-OHP est réalisée à l'aide d'une gamme d'étalonnage de 1-OHP (de 0 à 25 µg/L) préparée à l'aide d'une urine témoin.

A-I-4 Dosage de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGuo

Un aliquot de 100 µL de chaque urine est prélevé et dilué dans 100 µL de formiate d'ammonium à 5 mM et contenant 0,05 µM de standard interne 8-oxodGuo [M+5]. Les échantillons sont placés 30 min à 37°C, agités, avant d'être centrifugés à 5000 g pendant 5 min. Les surnageants sont transférés dans des vials pour l'analyse par CLHP-SM/SM.

Les paramètres de détection par CLHP-SM/SM de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGuo [M+5] ont été définis précédemment pour des analyses dans l'urine, et correspondent au suivi des transitions m/z 284 $[M + H]^+ \rightarrow m/z$ 168 $[M - 116 + H]^+$ et m/z 289 $[M + H]^+ \rightarrow m/z$ 173 $[M - 116 + H]^+$ respectivement (Ravanat et al. 1998). Les paramètres de détection par CLHP-SM/SM de la 8-oxoGuo mis au point pour l'ARN cellulaire et correspondant au suivi de la transition m/z 300 $[M + H]^+ \rightarrow m/z$ 168 $[M - 132 + H]^+$ (Hofer et al. 2005) ont été ajoutés de manière à obtenir une méthode de détection simultanée de la 8-oxodGuo, 8-oxodGuo [M+5] et 8-oxoGuo. La quantification de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGuo est effectuée par calibration interne en utilisant la 8-oxodGuo [M+5] comme standard interne. Pour la 8-oxoGuo, la droite du rapport des aires de 8-oxoGuo et de 8-oxodGuo [M+5] en fonction du rapport des concentrations est bien linéaire ($r^2 = 0,997$), et sa pente de 1,11 indique une détection légèrement plus sensible pour la 8-oxoGuo que pour la 8-oxodGuo [M+5].

A-I-5 Présentation et analyse statistique des résultats

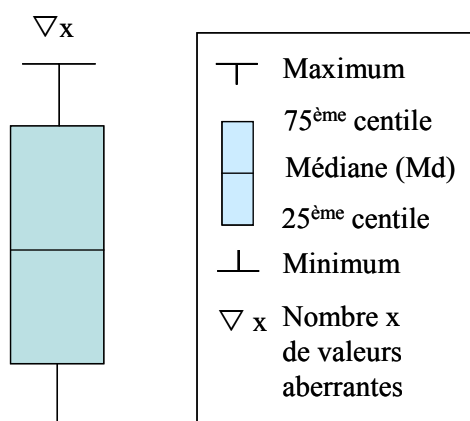
Les données sont traitées grâce au logiciel SPSS.

A-I-5-a Niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo, et étude de leurs variations sur une journée et sur une semaine de travail

Afin d'étudier les variations des niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo sur une journée ou une semaine de travail, deux nouvelles variables sont définies. Elles correspondent aux taux de variation sur une journée de travail (Δ_{jour} 1-OHP, Δ_{jour} 8-oxodGuo, Δ_{jour} 8-oxoGuo) et aux taux de variation sur une semaine de travail (Δ_{sem} 1-OHP, Δ_{sem} 8-oxodGuo, Δ_{sem} 8-oxoGuo). Ces taux de variation, exprimés en pourcentages, sont calculés pour chaque individu selon les formules suivantes :

$$\Delta_{\text{jour}} = \frac{FSFP - FSDP}{FSDP} \times 100 \quad \text{et} \quad \Delta_{\text{sem}} = \frac{FSFP - DSDP}{DSDP} \times 100 .$$

Les niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo ainsi que les taux de variation Δ_{jour} et Δ_{sem} de ces biomarqueurs sont représentés graphiquement sous forme de boîte à moustaches. Une boîte à moustaches modèle et sa légende sont représentées ci-dessous :



La comparaison des concentrations de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo entre les sujets exposés et les témoins, et celle entre les différents moments de prélèvement est faite par des tests non paramétriques du fait des faibles effectifs dans certains groupes : test de Mann-Whitney pour séries indépendantes ou test de Wilcoxon pour séries appariées.

A-I-5-b Etude des corrélations entre les trois biomarqueurs urinaires

La corrélation entre le 1-OHP, la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo sur l'ensemble des prélèvements urinaires de DSDP, FSDP et FSFP, ainsi que la corrélation entre les niveaux en DSDP et en FSFP pour la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo sont étudiées par le calcul des coefficients de corrélation de Pearson.

Les transformées logarithmes népériens (ln) des variables constituées par les niveaux urinaires des trois biomarqueurs sont utilisées pour normaliser leurs distributions.

A-I-5-c Etudes des facteurs confondants âge et tabac sur les niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo

Les caractéristiques de la population pour les facteurs âge et tabac sont étudiées par des tableaux croisés, et le test du Khi-deux de Pearson ou le test exact de Fisher, selon les effectifs des groupes concernés.

L'âge, variable quantitative, est transformée en une variable qualitative à deux classes de même effectif pour pouvoir étudier par des analyses de variance l'influence du facteur âge sur les transformées ln des concentrations urinaires des trois biomarqueurs et pour pouvoir tester la présence éventuelle d'une interaction entre les facteurs âge et tabac.

A-II Résultats

Préalablement à l'étude des différents biomarqueurs urinaires, il est important de préciser que les niveaux atmosphériques en HAP, et plus précisément en HAP particuliers, ont été mesurés sur le site professionnel de l'étude. Il apparaît que le ratio B[a]P/pyrène est quasiment égal à 1, et les niveaux de B[a]P sont élevés et peuvent atteindre jusqu'à 2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ d'air.

A-II-1 Population d'étude

A-II-1-a Effectifs de la population

Les effectifs de la population d'étude selon les différents marqueurs étudiés et selon les différents moments de prélèvements sont présentés dans le tableau 7. Les effectifs disponibles pour le calcul des taux de variation des marqueurs sur la semaine de travail (Δ_{sem}), ou sur la dernière journée de travail de la semaine (Δ_{jour}) sont également précisés.

Tableau 7 : Effectifs de la population d'étude.

	SUJET	DSDP	FSDP	FSFP	Δ_{sem}	Δ_{jour}
1-OHP	Exposés	55	14	68	55	14
	Administratifs		8	8		8
	Total	55	22	76	55	22
8-oxodGuo	Exposés	51	13	67	51	13
	Administratifs		8	8		8
8-oxoGuo	Total	51	21	75	51	21

Parmi les 76 sujets inclus dans l'étude, 68 sont directement exposés aux émissions d'HAP et 8 sont des salariés des services administratifs travaillant dans la même entreprise. Tous les sujets exposés aux HAP sont de sexe masculin, tandis que la moitié des sujets administratifs sont de sexe féminin.

Le 1-OHP a été dosé en FSFP dans les 76 échantillons correspondant aux 76 sujets de l'étude. La 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo ont pu être dosées sur 75 de ces échantillons. Parmi les 22 sujets qui ont bénéficié d'un prélèvement en FSDP, 8 sont des administratifs et 14 sont des sujets exposés aux HAP. Le 1-OHP a été dosé dans les 22 échantillons, et la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo ont pu être dosées sur 21 de ces échantillons. Les 55 sujets qui ont bénéficié d'un prélèvement en DSDP sont tous des sujets exposés aux HAP. Le 1-OHP a été dosé sur l'ensemble des échantillons alors que la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo n'ont pu être dosées que sur 51 échantillons. Les dosages urinaires de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo manquants sont dus à des volumes urinaires trop faibles pour certains échantillons.

A-II-1-b Caractéristiques de la population pour les facteurs âge et tabac

Le facteur âge est transformé en une variable binaire : la première classe correspondant à la tranche d'âge 19-45 ans (37 sujets), et la deuxième à la tranche d'âge 46-59 ans (39 sujets).

Les sujets administratifs sont plus âgés que les sujets exposés (Md = 51,5 et Md = 45 ans respectivement). Ainsi 75% des administratifs (6 sujets) ont entre 46 et 59 ans alors que seulement 48,5% des sujets exposés (33 sujets) sont dans cette classe d'âge. Cependant, du fait du faible effectif des sujets administratifs, cette différence n'est pas significative.

Le facteur tabac est étudié sur 66 sujets parmi les 76 sujets de l'étude du fait de 10 données manquantes, 1 chez les sujets administratifs et 9 chez les sujets exposés. Les sujets non-fumeurs sont plus nombreux chez les sujets administratifs que chez les sujets exposés. Alors que 86% des administratifs (6 sujets) sont non-fumeurs, seulement 63% des exposés (36 sujets) le sont. Là encore, aucune différence significative ne peut être mise en évidence du fait du faible effectif des sujets administratifs.

Enfin, les sujets non-fumeurs sont significativement plus âgés que les sujets fumeurs (Test du Khi-deux : $p = 0,014$). Ainsi, 60% des sujets non-fumeurs (25 sujets) font partie de la tranche d'âge 46-59 ans alors que seulement 27% des sujets fumeurs (6 sujets) font partie de cette tranche d'âge.

Du fait de ces différences entre les groupes, il sera nécessaire d'étudier l'influence des facteurs âge et tabac de façon indépendante et simultanée sur les concentrations urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo.

A-II-2 Niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo, et étude de leur variations sur une journée et une semaine de travail

A-II-2-a Niveaux urinaires de 1-OHP

Chez les sujets administratifs, les concentrations urinaires de 1-OHP sont toujours inférieures à $0,4 \mu\text{mol/mol}$ créatinine que ce soit en FSDP (Md = $0,13$) ou en FSFP (Md = $0,11$). Ces niveaux sont significativement moins élevés que ceux retrouvés chez les sujets exposés ($p = 0.005$ et $p < 0.001$ en FSDP et FSFP respectivement).

Chez les sujets directement exposés aux HAP, les concentrations urinaires en FSFP sont élevées avec 10% des valeurs (7 sujets) au dessus de $1,4 \mu\text{mol/mol}$ de créatinine (Md = $0,50$). En FSDP, la valeur médiane des niveaux de 1-OHP est de $0,4 \mu\text{mol/mol}$ de créatinine.

Les niveaux urinaires de 1-OHP pour les sujets administratifs et les sujets exposés aux différents moments de prélèvement sont représentés graphiquement ci-dessous.

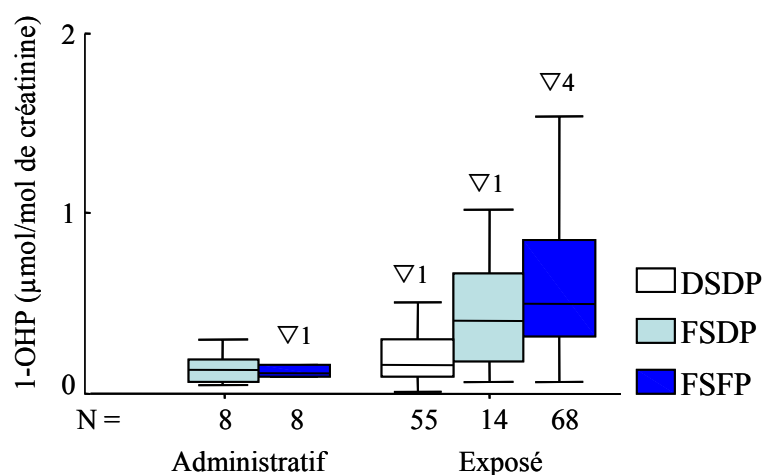


Figure 41 : Niveaux urinaires de 1-OHP en DSDP, FSDP et FSFP pour les sujets administratifs et exposés.

A-II-2-b Niveaux urinaires de 8-oxodGuo

Que ce soit en FSDP ou FSFP, les concentrations urinaires de 8-oxodGuo sont plus élevées chez les sujets administratifs (Md = 4,3 et Md = 4,1 respectivement) que chez les sujets directement exposés aux HAP (Md = 2,8 et Md = 2,9 respectivement). Cette élévation est significative en FSDP et en FSFP ($p = 0,009$ et $p = 0,005$ respectivement).

Les niveaux urinaires de 8-oxodGuo pour les sujets administratifs et les sujets exposés aux différents moments de prélèvement sont représentés graphiquement ci-dessous.

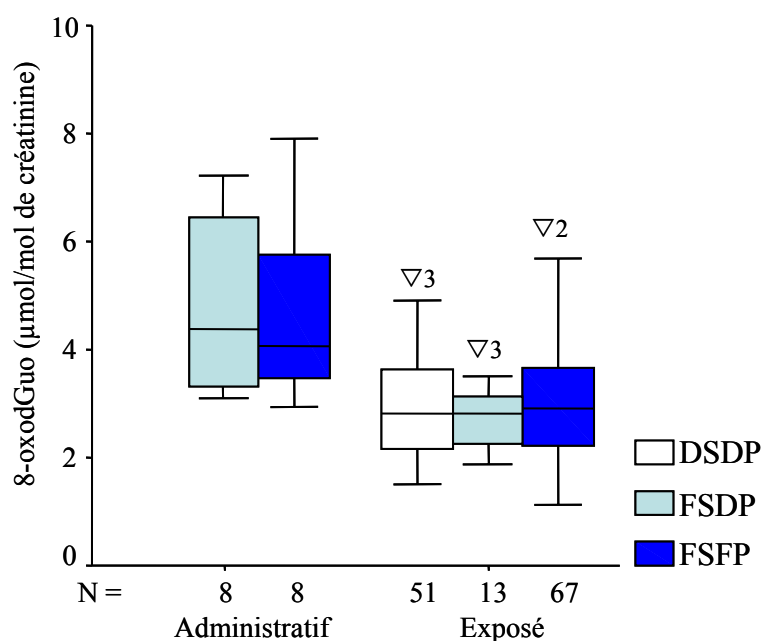


Figure 42 : Niveaux urinaires de 8-oxodGuo en DSDP, FSDP et FSFP pour les sujets administratifs et exposés.

A-II-2-c Niveaux urinaires de 8-oxoGuo

Les concentrations urinaires de 8-oxoGuo sont significativement plus élevées chez les sujets administratifs que chez les sujets exposés aux HAP en FSFP ($p = 0,001$) (Md = 8,1 et Md = 3,6 respectivement), mais il n'y a pas de différence significative en FSDP (Md = 8,0 et Md = 6,5 respectivement).

Les niveaux urinaires de 8-oxoGuo pour les sujets administratifs et les sujets exposés aux différents moments de prélèvement sont représentés graphiquement ci-dessous.

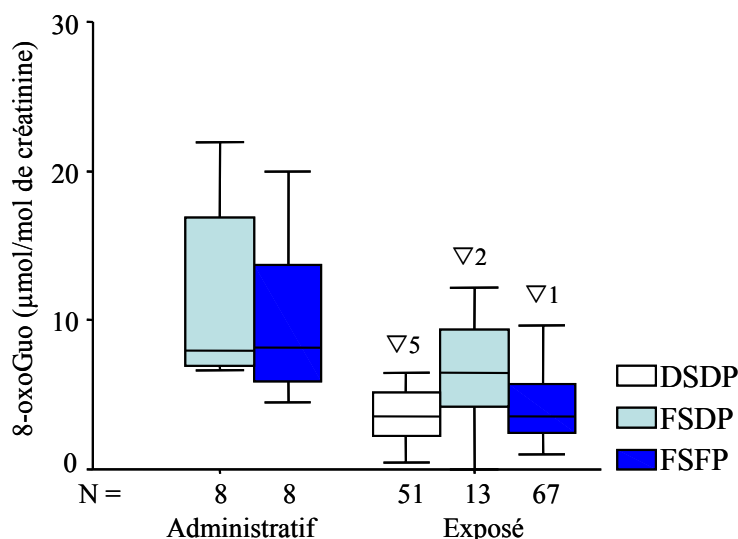


Figure 43 : Niveaux urinaires de 8-oxoGuo en DSDP, FSDP et FSFP pour les sujets administratifs et exposés.

A-II-2-d Variation des niveaux urinaires des biomarqueurs sur une journée de travail

Pour le 1-OHP, les concentrations en FSFP des sujets exposés aux HAP sont significativement plus élevées qu'en FSDP (Test de Wilcoxon, $p = 0,026$), par contre aucune élévation significative n'est mise en évidence chez les sujets administratifs. L'étude des taux de variation Δ jour indique que les concentrations urinaires de 1-OHP augmentent d'une valeur médiane de 16,5% pour les sujets exposés aux HAP. La même variation est observée pour les sujets administratifs (Md = 16%) alors que ces sujets ne sont pas exposés directement aux HAP et présentent des niveaux urinaires de 1-OHP significativement plus bas que ceux des sujets exposés.

Pour la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo, aucune différence significative n'est observée entre les niveaux urinaires de FSFP et FSDP, que ce soit pour les sujets exposés aux HAP ou pour les sujets administratifs. Les médianes des taux de variation Δ jour pour la 8-oxodGuo sont de 10,7% et -8% respectivement pour les sujets exposés aux HAP et les sujets administratifs. Pour la 8-oxoGuo, elles sont égales à -25,6% et -25,9% respectivement pour les sujets exposés aux HAP et les sujets administratifs.

Les taux de variation Δ_{jour} des trois biomarqueurs pour les sujets exposés aux HAP et pour les sujets administratifs sont représentés ci-dessous graphiquement.

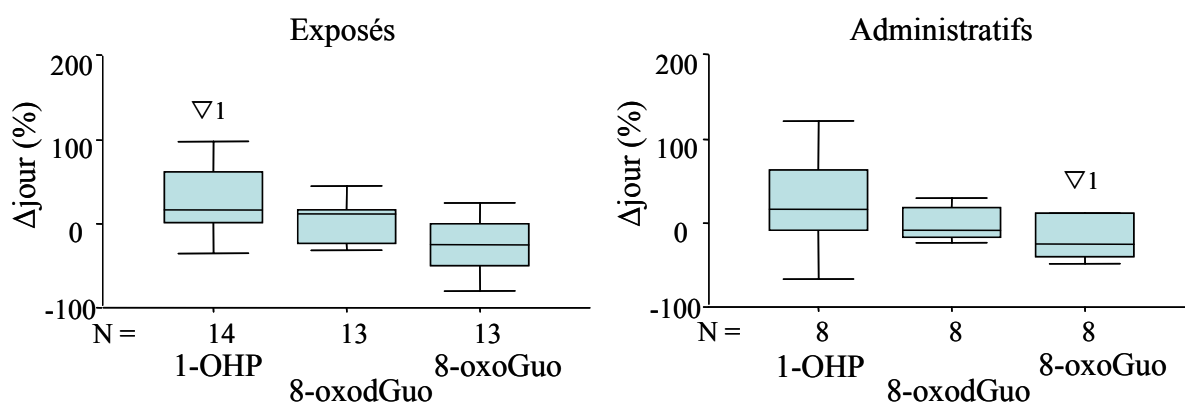


Figure 44 : Taux de variation Δ_{jour} des niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo pour les sujets exposés aux HAP et les sujets administratifs.

A-II-2-e Variation des niveaux urinaires des biomarqueurs sur une semaine de travail

Les 55 sujets ayant eu un prélèvement urinaire en DSDP et en FSFP sont tous des sujets directement exposés aux HAP.

Pour le 1-OHP, les niveaux urinaires en FSFP des sujets exposés aux HAP sont significativement plus élevés qu'en DSDP ($p < 0,001$). En revanche, aucune augmentation significative des niveaux urinaires de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo entre les prélèvements de DSDP et FSFP n'est observée.

L'étude des taux de variation Δ_{sem} indique que les niveaux urinaires de 1-OHP augmentent fortement sur la semaine de travail ($Md = 223\%$), tandis qu'il n'existe aucune augmentation des niveaux de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo ($Md = -0,05\%$ et $Md = -0,42\%$ respectivement).

Les taux de variations Δ_{sem} pour les trois biomarqueurs sont représentés ci-dessous graphiquement.

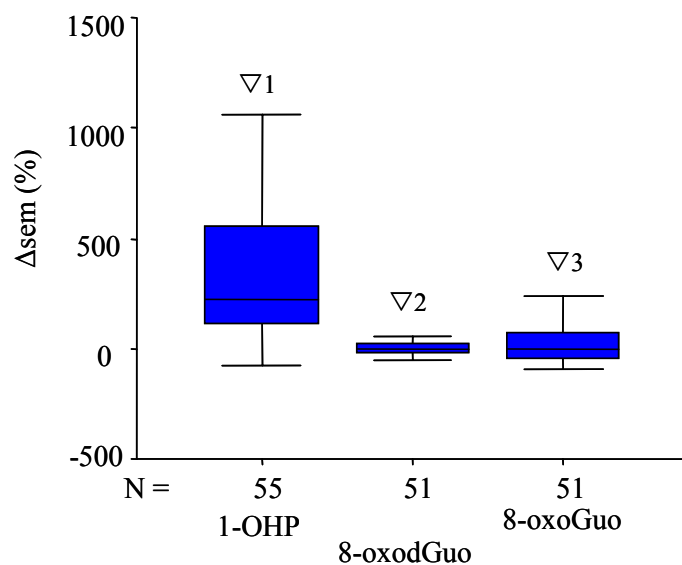


Figure 45 : Taux de variation Δ_{sem} des niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo pour les sujets exposés aux HAP.

A-II-3 Etude des corrélations entre les biomarqueurs urinaires

Les corrélations entre les ln du 1-OHP, de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGuo pour les prélèvements de DSDP, FSDP et FSFP sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 8 : corrélations de Pearson (r) entre les ln des trois biomarqueurs en DSDP, FSDP et FSFP.

DSDP		ln(8-oxodGuo)	ln(8-oxoGuo)
ln(1-OHP)	r	0,12	0,25
	p	0,40	0,077
	N	51	51
ln(8-oxodGuo)	r		0,14
	p		0,33
	N		51
FSDP		ln(8-oxodGuo)	ln(8-oxoGuo)
ln(1-OHP)	r	-0,14	-0,22
	p	0,54	0,36
	N	21	21
ln(8-oxodGuo)	r		0,49
	p		0,027
	N		21
FSFP		ln(8-oxodGuo)	ln(8-oxoGuo)
ln(1-OHP)	r	-0,089	-0,11
	p	0,44	0,33
	N	75	75
ln(8-oxodGuo)	r		0,35
	p		0,002
	N		75

En FSDP et surtout FSFP, les biomarqueurs 8-oxodGuo et 8-oxoGuo apparaissent significativement corrélés entre eux ($p = 0,027$ et $0,002$ respectivement) mais ne sont pas corrélés au 1-OHP. En DSDP, aucune corrélation significative n'est obtenue entre les différents marqueurs.

La corrélation entre la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo est représentée graphiquement pour le prélèvement de FSFP qui présente le plus grand effectif et la meilleure significativité.

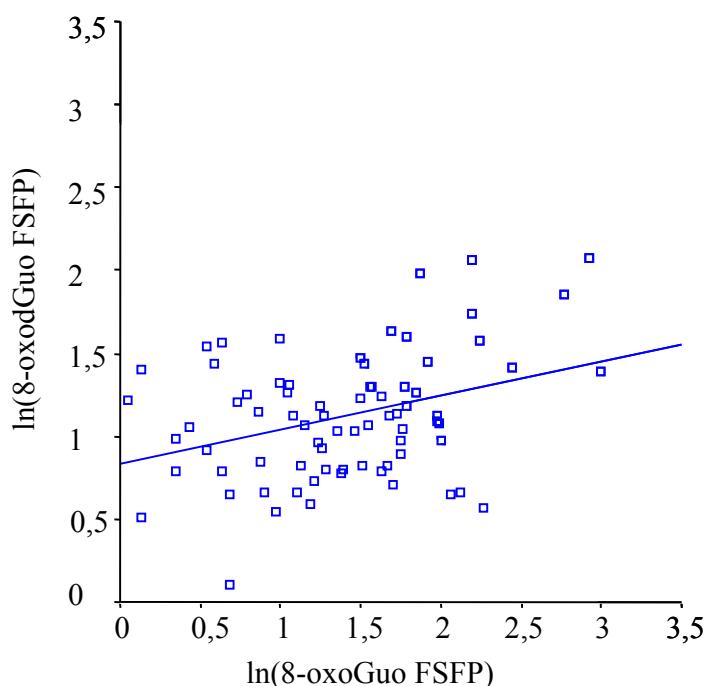


Figure 46 : Corrélation entre les ln des niveaux urinaires de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo en FSFP.

Par ailleurs, les corrélations entre les ln des niveaux urinaires en DSDP et FSFP pour la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 9 : corrélations de Pearson (r) entre les ln des niveaux en DSDP et FSFP pour la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo.

		ln(8-oxodGuo FSFP)
ln(8-oxodGuo DSDP)	r	0,614
	p	< 0,001
	N	51
		ln(8-oxoGuo FSFP)
ln(8-oxoGuo DSDP)	r	0,008
	p	0,96
	N	51

Les niveaux urinaires en DSDP sont très significativement corrélés aux niveaux urinaires de FSFP pour la 8-oxodGuo ($p < 0,001$) mais pas pour la 8-oxoGuo. Ces résultats sont représentés graphiquement ci-dessous.

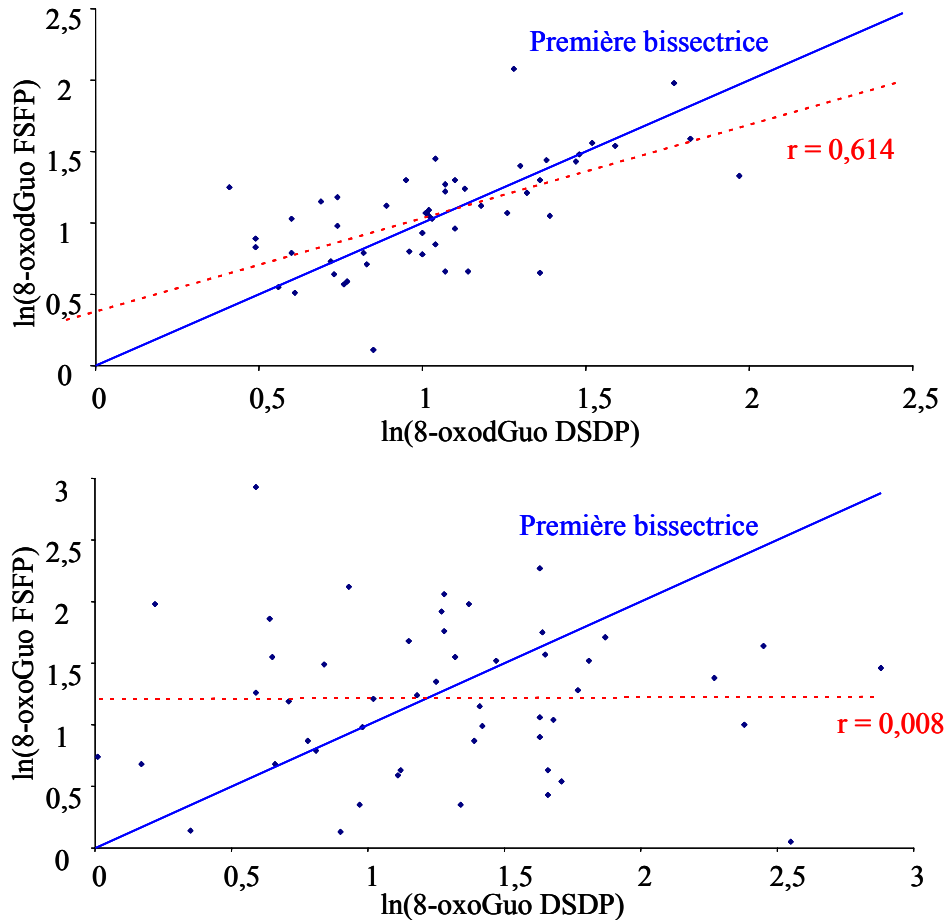


Figure 47 : Corrélation entre les ln des niveaux urinaires en DSDP et FSFP pour la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo.

Les niveaux urinaires de 8-oxodGuo varient très peu entre le début et la fin de la semaine pour chaque individu, comme l'indique la proximité de la droite de régression (en rouge) et de la première bissectrice. Bien qu'une variabilité inter-individuelle soit observée, la variabilité intra-individuelle est très faible pour ce biomarqueur.

A l'inverse, la droite de régression est très éloignée de la première bissectrice pour la 8-oxoGuo. Cela indique que les niveaux urinaires de ce marqueur varient de façon importante entre le début et la fin de la semaine au niveau inter comme intra-individuel.

Selon ces résultats, il apparaît que l'absence de variation des niveaux urinaires pendant la semaine de travail observée précédemment, tant pour la 8-oxodGuo que la 8-oxoGuo, au niveau de l'ensemble des sujets, ne résulte pas des mêmes phénomènes au niveau individuel.

A-II-4 Etude des facteurs confondants âge et tabac sur les niveaux urinaires des trois biomarqueurs

L'influence de l'âge et du statut tabagique des sujets est étudiée sur les niveaux urinaires des trois marqueurs mesurés en DSDP et FSFP en raison des effectifs suffisants pour ces moments de prélèvement.

Quel que soit le moment du prélèvement, aucun effet significatif de l'âge ni du tabac n'est observé sur les concentrations urinaires de 1-OHP.

Pour la 8-oxodGuo, le facteur tabac n'a aucun effet sur les niveaux urinaires que ce soit en DSDP ou FSFP. En revanche, les niveaux urinaires augmentent avec l'âge. Cette augmentation est à la limite de la significativité en DSDP ($p = 0,106$) et elle est significative en FSFP ($p = 0,039$).

En DSDP, le facteur tabac n'a aucune influence sur les niveaux urinaires de 8-oxoGuo. En revanche, les niveaux urinaires de 8-oxoGuo augmentent avec l'âge de façon presque significative ($p = 0,06$).

En FSFP, du fait d'une interaction âge-tabac à la limite de la significativité ($p = 0,087$) sur les niveaux urinaires de 8-oxoGuo, il est nécessaire d'étudier l'effet de l'âge en séparant les fumeurs des non-fumeurs (Tableau 10).

Tableau 10 : Influence de l'âge sur les niveaux urinaires de 8-oxoGuo en FSFP pour les sujets non-fumeurs et fumeurs.

ln(8-oxoGuo FSFP)	Age	N	Moy	ET	p
Non-fumeurs	19-45	17	1,02	0,6	< 0,001
	46-59	25	1,7	0,58	
Fumeurs	19-45	16	1,25	0,52	0,55
	46-59	6	1,4	0,53	

Alors que les niveaux urinaires de 8-oxoGuo augmentent de façon significative avec l'âge chez les non-fumeurs, cette augmentation n'est pas significative chez les sujets fumeurs. Cette observation pourrait être reliée au fait que le tabac augmente légèrement les niveaux urinaires

de 8-oxoGuo chez les sujets jeunes (Moy = $1,25 \pm 0,52$ versus $1,02 \pm 0,6$), si bien que l'effet de l'âge pourrait être atténué chez les sujets fumeurs. Toutefois, les différences d'effectifs des groupes considérés pourraient nuancer ces observations.

En conclusion, le facteur tabac n'est pas un facteur confondant pour les trois biomarqueurs étudiés. En revanche, le facteur âge, qui n'a aucune influence sur les niveaux urinaires de 1-OHP, entraîne une augmentation des niveaux urinaires de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo que ce soit en DSDP ou FSFP.

A-III Discussion

Alors que les niveaux urinaires de 1-OHP sont significativement plus bas pour les sujets administratifs que pour les sujets exposés aux HAP, les niveaux urinaires de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo sont significativement plus élevés, que ce soit en FSFP ou FSDP. Dans le cas de deux usines où les ouvriers sont exposés aux HAP par des fours à coke et où les contrôles de l'étude sont des salariés des mêmes usines travaillant dans les services administratifs, les niveaux urinaires de 8-oxodGuo sont pourtant significativement plus élevés pour les sujets exposés que pour les contrôles (Hu et al. 2004; Liu et al. 2006).

Les niveaux de lésions oxydatives étant significativement corrélés à l'âge dans notre étude, cette différence peut être reliée au fait que les sujets administratifs sont plus âgés que les sujets exposés aux HAP. Dans la littérature, il a été montré que l'âge est un prédicteur significatif de l'excrétion urinaire de 8-oxodGuo qui augmenterait de $0,18 \mu\text{g/g}$ de créatinine par année (Kim et al. 2004). L'élévation des niveaux de 8-oxodGuo avec l'âge a également été mise en évidence dans l'ADN des leucocytes de non-fumeurs, et dans les tissus de l'estomac de sujets sains (Lee et al. 2005; Lodovici et al. 2005). Cependant, l'association entre l'augmentation des niveaux de 8-oxodGuo dans l'urine ou l'ADN et l'âge n'est pas toujours clairement mise en évidence. Aucun effet significatif de l'âge sur l'excrétion urinaire de la 8-oxodGuo n'est ainsi rapporté dans plusieurs études (Tagesson et al. 1993; Pilger et al. 2001; Harri et al. 2005).

Toutefois, malgré l'influence de l'âge sur les niveaux de 8-oxodGuo mesurés chez les sujets administratifs de notre étude, ceux-ci sont plus élevés que ceux retrouvés dans la population

générale non-exposée aux HAP (tableau 5). Selon nos résultats, le tabac ne peut être un facteur explicatif. En effet ce facteur ne semble pas avoir d'influence sur les niveaux urinaires des lésions oxydatives, comme cela est rapporté dans différentes études (Tagesson et al. 1993; Kim et al. 2004; Harri et al. 2005). Cependant, certaines études montrent une augmentation significative des niveaux de 8-oxodGuo chez les fumeurs, que ce soit dans l'urine (Prieme et al. 1998; Pilger et al. 2001), ou dans l'ADN des leucocytes (Asami et al. 1996; Lodovici et al. 2005). Il est alors intéressant de noter que toutes les études qui démontrent un effet significatif de la consommation de tabac sur les niveaux de dommages oxydatifs, définissent le statut de fumeur à partir de données quantitatives sur la consommation de tabac, comme le nombre de cigarettes/jour. A l'inverse, les études ne mettant en évidence aucun effet significatif du tabac, ne tiennent pas compte des niveaux de consommation pour définir le statut de fumeur, comme c'est le cas dans notre étude. Il a en effet été montré que les niveaux urinaires de 8-oxodGuo sont significativement différents entre des fumeurs ne présentant pas la même consommation de tabac : moins de 20 cigarettes/jour, entre 20 et 30, et plus de 30 cigarettes/jour (Prieme et al. 1998). La prise en compte de tous les niveaux de consommation de tabac de façon regroupée dans notre étude pourrait donc expliquer l'absence d'influence significative du statut tabagique sur les niveaux des lésions oxydatives. Enfin, outre le facteur tabac, la présence de femmes dans le groupe de sujets administratifs ne permet pas non plus d'expliquer les niveaux de lésions oxydatives plus élevés dans ce groupe puisqu'il est classiquement rapporté que les femmes ont des niveaux de 8-oxodGuo urinaires plus faibles que les hommes (Loft et al. 1993). Par contre, des différences de niveau social entre les sujets des services administratifs et les sujets exposés aux HAP pourraient être mis en cause. En effet, le mode de vie incluant notamment le régime alimentaire entraîne d'importantes répercussions sur les niveaux de lésions oxydatives. La consommation de café entraîne ainsi une augmentation de l'excrétion urinaire de 8-oxodGuo chez le rat (Sakamoto et al. 2003). Les composés antioxydants de l'alimentation pourraient également activer la réparation des purines oxydées (Moller et al. 2004). Toutefois, ces résultats sont à considérer avec précaution car les différentes études ne concordent pas toujours sur ce point, notamment sur l'effet de la vitamine C sur l'activation de la REN (Poulsen et al. 1998; Lunec et al. 2002). Enfin, l'excrétion de 8-oxodGuo serait significativement corrélée au nombre d'heures de pratique de sport par semaine (Orhan et al. 2004). Enfin, nous pouvons proposer que le faible effectif des sujets contrôles non-exposés de notre étude pourraient entraîner la prédominance de facteurs individuels sur les niveaux de lésions oxydatives mesurés. En effet, de très fortes

variabilités individuelles sont classiquement rapportées, tant sur les niveaux de dommages oxydatifs que sur les capacités de réparation de ces lésions influant par conséquent sur leur excrétion dans l'urine (Asami et al. 1996). De plus forts niveaux de 8-oxodGuo ont déjà ainsi été rapportés dans les leucocytes de sujets non-fumeurs par rapport à des sujets fumeurs (van Zeeland et al. 1999).

Aucune variation significative des niveaux urinaires de 8-oxodGuo et 8-oxoGuo n'est mise en évidence au cours d'une journée ou d'une semaine de travail, alors que l'exposition aux HAP est importante, comme en témoigne la forte augmentation des niveaux de 1-OHP sur la semaine. Dans la littérature, les variations des biomarqueurs urinaires des lésions oxydatives entre le début et la fin d'une activité exposant aux HAP sont peu étudiées. Il est rapporté que les niveaux urinaires de 8-oxodGuo augmentent d'environ 20% au cours de la dernière journée de travail de la semaine de 20 sujets exposés aux fines particules ($\leq 2,5 \mu\text{m}$). Toutefois, l'exposition spécifique aux HAP n'est pas quantifiée dans le cas de ces expositions, et l'augmentation des lésions oxydatives ne peut donc pas être directement reliée à l'exposition aux HAP (Kim et al. 2004). Dans le cas d'une exposition aux particules diesel, les niveaux urinaires de 8-oxodGuo de 29 sujets sont également légèrement plus élevés après une semaine de travail, mais cette augmentation n'est pas significative (Harri et al. 2005). Concernant les sujets administratifs, il est important de préciser que, bien que les niveaux de 1-OHP semblent augmenter de façon individuelle sur une journée de travail, les niveaux restent très faibles, de l'ordre de ceux retrouvés dans la population générale (Tableau 3). Ces sujets sont donc non-exposés aux HAP.

De plus, aucune corrélation n'a été observée dans notre étude entre les marqueurs des lésions oxydatives et le 1-OHP, marqueur spécifique des HAP. Dans la littérature, les données sont également très variables sur ce point. Alors que certaines études rapportent une absence de corrélation entre la 8-oxodGuo urinaire et le 1-OHP (Harri et al. 2005; Liu et al. 2006), d'autres études mettent en évidence une forte corrélation entre ces deux marqueurs, dans le cas par exemple d'une exposition aux HAP par des fours à coke (Hu et al. 2004), ou dans le cas d'une exposition cutanée à des huiles contenant des HAP (Nilsson et al. 2004). Pour des travailleurs de four à coke, il a même été déterminé qu'une augmentation du 1-OHP de 10 fois entraîne une augmentation de la 8-oxodGuo urinaire de 1,9 fois (Wu et al. 2003).

En revanche, les deux marqueurs des lésions oxydatives mesurés dans notre étude, la 8-oxodGuo et la 8-oxoGuo, apparaissent significativement corrélés en FSDP et FSFP. Toutefois, cette corrélation, qui n'est pas observée en DSDP, est à considérer avec précaution puisque nous montrons également que ces deux marqueurs ne présentent pas la même évolution sur une semaine au niveau individuel. Alors que les niveaux urinaires de 8-oxodGuo sont constants pour un individu donné sur la semaine, ceux de 8-oxoGuo sont très variables. Ainsi, la 8-oxodGuo, dont la variabilité inter-individuelle est classiquement rapportée, semble présenter en revanche une faible variabilité intra-individuelle. La différence observée avec la 8-oxoGuo pourrait être expliquée par les origines différentes de ces deux biomarqueurs. Tandis que la 8-oxodGuo proviendrait de la réparation de l'ADN, l'origine de la 8-oxoGuo dans l'urine est encore peu connue, et pourrait résulter de la dégradation de l'ARN. Certaines études proposeraient l'existence de mécanismes de réparation de l'ARN, mais à ce jour, un seul mécanisme spécifique de réparation de l'ARN méthylé a été mis en évidence (Bregeon et al. 2005). De plus, il semble peu probable que des mécanismes de réparation nécessitant l'excision de la base modifiée, comme c'est le cas pour les dommages oxydatifs, puissent exister au niveau de l'ARN qui ne possède pas de brin complémentaire pouvant servir de matrice pour le remplacement de la base modifiée. Du point de vue quantitatif, une technique de dosage simultané de la Gua, dGuo et Guo oxydées par CLHP-SM/SM a permis d'évaluer les proportions respectives de chacune de ces espèces oxydées dans l'urine totale de 24 h de 20 sujets. La 8-oxoGua représente 64% des trois espèces, la 8-oxoGuo 23% et la 8-oxodGuo 13% (Weimann et al. 2002). Nos résultats sont en accord avec ces données puisque la 8-oxoGuo est retrouvée à des concentrations environ deux fois plus élevées que la 8-oxodGuo dans notre étude. Notons que la 8-oxoGua est l'espèce oxydée obtenue de façon majoritaire dans l'urine, mais des problèmes de stabilité de cette molécule rendent difficile son dosage dans l'urine. Les plus grandes quantités de 8-oxoGuo que de 8-oxodGuo retrouvées dans l'urine pourrait être expliquées par un renouvellement de l'ARN plus rapide que la réparation de l'ADN. En effet, les niveaux de base des lésions oxydatives de l'ARN et de l'ADN ne sont pas significativement différents dans des cellules humaines d'épithélium pulmonaire A549, mais en conditions de stress oxydant, la demi-vie d'élimination des dommages oxydatifs de l'ARN est deux fois plus courte que celle des dommages oxydatifs de l'ADN dans les mêmes cellules (Hofer et al. 2005).

Outre l'origine multi-factorielle des lésions oxydatives, il est important de mentionner que, dans le cas de l'exposition aux HAP, les différences de composition des mélanges d'HAP selon les sources d'émission pourraient expliquer en partie les divergences observées entre les différentes études. De plus, des différences d'ordre méthodologique pourraient également être avancées, comme par exemple, la non-spécificité des techniques immunologiques ou encore la préparation des échantillons urinaires. En effet, l'étape d'homogénéisation des échantillons est importante car les éventuels précipités solides présents dans l'urine peuvent contenir de la 8-oxodGuo (Weimann et al. 2001). Pour l'étude de la 8-oxodGuo dans l'ADN, des phénomènes d'oxydation artéfactuelle de l'ADN peuvent également intervenir. Enfin, le nombre de sujets souvent peu élevé dans les différentes études pourrait également expliquer les différences observées.

En conclusion, nos résultats indiquent que les lésions oxydatives de l'ADN et de l'ARN ne semblent pas être de bons biomarqueurs d'effet des HAP. En effet, ces biomarqueurs ne montrent pas d'augmentation en condition d'exposition aux HAP, à l'inverse du 1-OHP, marqueur d'exposition classique des HAP. Ces résultats concordent avec ce qui est rapporté dans le cas du B[a]P. En effet, bien que la voie métabolique des quinones entraîne la formation d'ERO, comme cela est confirmé dans des microsomes de poumon de rat traités au B[a]P (Briede et al. 2004), il ne semble pas que l'exposition au B[a]P induise une augmentation significative de la formation des lésions oxydatives de l'ADN. Ainsi, au niveau cellulaire, il est rapporté que l'exposition au B[a]P n'entraîne ni une augmentation des dommages de l'ADN mesurés par la méthode des Comètes (Crallan et al. 2005), ni une augmentation de la 8-oxodGuo mesurée dans l'ADN (Zhang et al. 2004). La génotoxicité des quinones du B[a]P rapportée dans la littérature (Park et al. 2006; Shen et al. 2006) ne semble ainsi pas liée à la formation spécifique de 8-oxodGuo. L'augmentation des niveaux de 8-oxodGuo dans l'ADN dans le cas d'une exposition au B[a]P est surtout observée en cas d'exposition concomitante avec les UV, et plus particulièrement les UV-A (Liu et al. 1998; Zhang et al. 2004).

Ces résultats renforcent la nécessité de développer des biomarqueurs d'exposition spécifiques du B[a]P comme les adduits de l'ADN. Parallèlement aux biomarqueurs d'exposition de dose efficace, le développement des biomarqueurs de dose interne spécifique du B[a]P apparaît intéressant pour les études urinaires. Outre la recherche des adduits dans l'urine, les mises au

point de dosages de métabolites urinaires du B[a]P par CLHP-Fluo et CLHP-SM/SM seront présentées dans la partie suivante.

B- Etude de nouveaux biomarqueurs d'exposition urinaires spécifiques du B[a]P

B-I Matériels et méthodes

B-I-1 Dosage des adduits de l'ADN dans l'urine

Les adduits de l'ADN sont recherchés dans les dix échantillons urinaires (FSFP) contenant les plus fortes concentrations en 1-OHP non rapportées à la créatinine. 10 mL de chaque urine sont dilués dans 20 mL de tampon acétate (pH 4,6) et 600 µL de NaOH 1 M. L'urine ainsi préparée est purifiée sur des cartouches Sep-Pak Vac RC (500 mg) de Waters (Guyancourt, France) de type C18. Les cartouches sont conditionnées avec 5 mL de MeOH, puis 10 mL d'H₂O. L'urine est ensuite filtrée sur les cartouches. Les cartouches sont rincées avec un mélange H₂O:MeOH (60:40 v/v). L'élution des adduits est enfin réalisée dans 100% de MeOH. La fraction contenant les adduits est évaporée à sec et reprise dans 100 µL de MeOH pour être analysée en CLHP-SM/SM.

La linéarité de la phase de purification et de concentration de l'urine sur les cartouches, est étudiée à l'aide d'une gamme réalisée dans une urine témoin provenant d'un sujet non-exposé aux HAP contenant les standards d'adduits recherchés à différentes concentrations (40, 100 et 200 fmoles injectées et 100, 200 et 400 fmoles injectées pour les adduits B[a]P-Gua 5 et BPDE-N2-dGuo respectivement). La quantification des adduits dans cette gamme, dite extraite, est comparée à une gamme d'adduits dans le MeOH, dite directe, ne comprenant pas l'étape d'extraction de l'échantillon sur les cartouches afin d'évaluer le pourcentage d'extraction de la méthode pour chaque adduit. Le rendement d'extraction correspond au rapport des pentes des deux gammes. Les limites de détection dans l'urine pour les adduits (S/B = 3) sont alors déterminées en prenant en compte le pourcentage d'extraction de la méthode. Les adduits sont quantifiés par calibration externe à partir de la gamme extraite.

B-I-2 Mise au point des dosages du 3-OHB[a]P et du tétraol du B[a]P par CLHP-Fluo

Le 3-OHB[a]P, et le tétraol du B[a]P ((±)-B[a]P-r-7,t-8,9,c-10-tetrahydrotetrol) correspondant à l'ouverture *trans* de l'époxyde (±)-*anti*-BPDE, sont commercialisés en solution dans le MeOH par Promochem (Molsheim, France) et sous forme de poudre par le NCI, respectivement.

La démarche suivie pour le développement du dosage par CLHP-Fluo du 3-OHB[a]P et du tétraol est la même. Il est tout d'abord nécessaire de déterminer les conditions de détection de fluorescence, par la définition des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission optimales. Pour cela, un spectre UV de la molécule concernée est réalisé pour définir un maximum d'absorbance. La longueur d'onde correspondant à ce maximum est utilisée dans un premier temps comme longueur d'onde d'excitation pour réaliser un spectre d'émission et définir la longueur d'onde d'émission optimale. La fixation de cette longueur d'onde d'émission permet finalement de réaliser un spectre d'excitation et de définir la longueur d'onde d'excitation optimale. Il s'agit ensuite de déterminer des conditions chromatographiques adaptées. La linéarité de la méthode de dosage est étudiée sur une gamme de concentrations étendue. La limite de détection est alors déterminée pour un rapport S/B égal à 3.

B-I-3 Mise au point des dosages du 3-OHB[a]P et du tétraol du B[a]P par CLHP-SM/SM

De même que pour la mise au point de la méthode de dosage pour les adduits de l'ADN, il s'agit tout d'abord d'optimiser les différents paramètres de la détection par SM/SM, à savoir les paramètres d'ionisation puis de fragmentation. Des conditions chromatographiques adaptées sont ensuite déterminées. La quantification est réalisée en utilisant la transition majoritaire de chaque métabolite. La linéarité de la méthode de dosage est étudiée sur une gamme de concentrations étendue. La limite de détection est alors déterminée pour un rapport S/B égal à 3.

B-II-Résultats

B-II-1 Les adduits de l'ADN

B-II-1-a Choix des adduits recherchés dans l'urine

Parmi tous les adduits formés lors d'une exposition au B[a]P, les adduits dépurinants sont les plus susceptibles d'être retrouvés dans l'urine.

De plus, bien que cela n'ait jamais été démontré chez l'homme, nous pouvons penser que les adduits stables du BPDE, à l'image de la 8-oxodGuo, pourraient être retrouvés dans l'urine suite à la réparation de l'ADN par le mécanisme de la REN.

Nous avons donc préférentiellement recherché dans les urines de sujets exposés professionnellement : l'adduit dépurinant B[a]P-Gua 5 que nous avons obtenu lors de la synthèse électrochimique et que nous supposons être l'adduit B[a]P-N7-Gua, ainsi que l'adduit BPDE-N2-dGuo.

B-II-1-b Validation de la méthode de dosage dans l'urine

Des gammes directes et extraites contenant les deux adduits recherchés à différentes concentrations sont analysées par CLHP-SM/SM. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures ci-dessous.

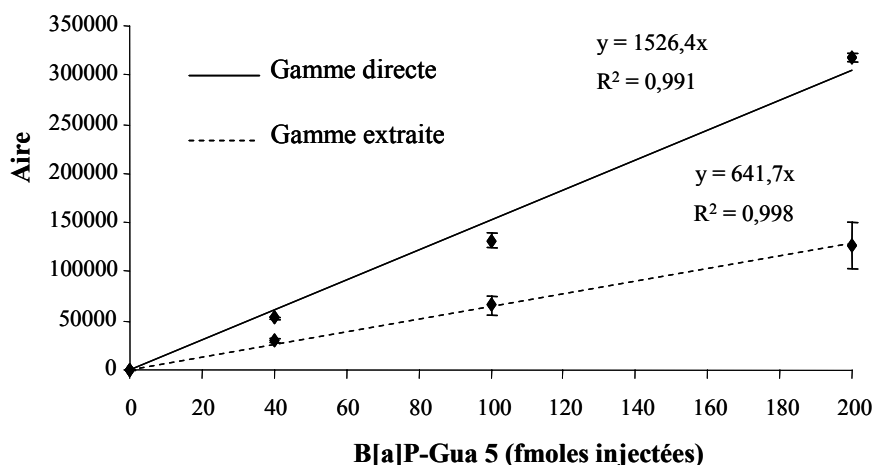


Figure 48 : Gammes directe et extraite de B[a]P-Gua 5.

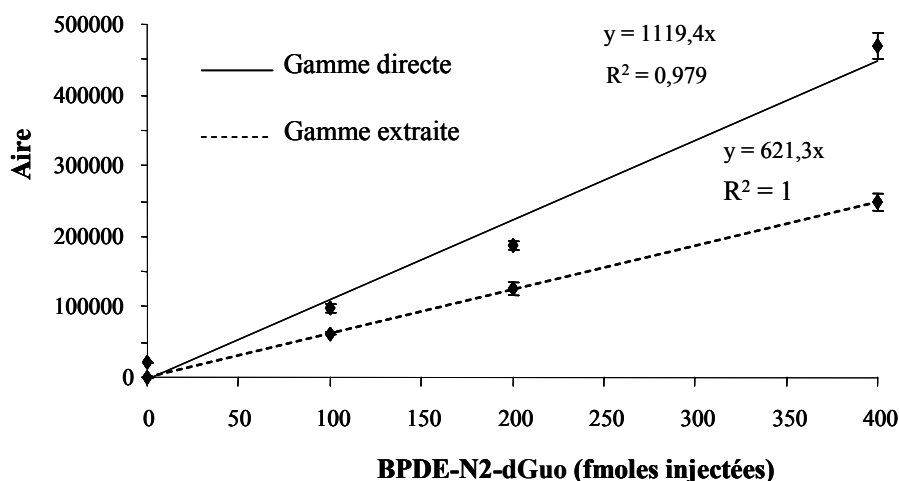


Figure 49 : Gammes directe et extraite de BPDE-N2-dGuo.

La linéarité des gammes extraites permet de valider l'aspect quantitatif de la phase d'extraction de l'urine sur les cartouches. Cette étape permet de concentrer l'urine d'un facteur 100.

Le rendement d'extraction pour l'adduit B[a]P-Gua 5 est de 40%, et celui de l'adduit BPDE-N2-dGuo est de 55%.

Les limites de détection théoriques pour ces adduits, estimées par rapport aux chromatogrammes obtenus pour les premiers points de gamme dans l'urine et compte-tenu des pourcentages d'extraction, sont respectivement de 4 et 9 pmoles/L d'urine pour l'adduit B[a]P-Gua 5 et l'adduit BPDE-N2-dGuo.

B-II-1-c Analyse des urines de sujets exposés aux HAP

Dix échantillons urinaires (FSFP) sont analysés pour les adduits de l'ADN. Ces échantillons urinaires correspondent à des concentrations élevées de 1-OHP allant de 0,02 à 0,1 $\mu\text{mole/L}$ d'urine.

Aucun adduit n'est détecté dans ces échantillons.

Nous pouvons donc affirmer que s'ils sont présents dans l'urine, les adduits B[a]P-Gua 5 et BPDE-N2-dGuo sont présents à des concentrations inférieures aux limites de détection respectives obtenues pour ces adduits.

B-II-2 Les métabolites du B[a]P

B-II-2-a Choix des métabolites urinaires d'intérêt

Le métabolite urinaire le plus couramment utilisé comme biomarqueur d'exposition aux HAP est le 1-OHP du fait de sa présence en quantités importantes dans l'urine. Cependant, le pyrène n'est pas cancérigène, et nous avons envisagé d'étudier de nouveaux biomarqueurs de dose interne spécifiques du B[a]P.

Les métabolites urinaires issus du métabolisme du B[a]P sont nombreux et il s'agit de choisir les métabolites majoritairement formés de façon à optimiser la détection de ces molécules dans l'urine. Nous avons choisi de nous intéresser au 3-OHB[a]P et au tétraol du B[a]P.

Ces métabolites étant présents dans l'urine sous forme conjuguée, il est nécessaire de réaliser une hydrolyse des urines avec l'enzyme β glucuronidase-aryl sulfatase avant le dosage urinaire de ces métabolites.

Avant de mettre au point le dosage du 3-OHB[a]P et du tétraol dans l'urine, nous avons comparé la sensibilité de la CLHP-Fluo et de la CLHP-SM/SM pour le dosage de ces deux métabolites.

B-II-2-b Mise au point du dosage du 3-OHB[a]P par CLHP-Fluo

Les longueurs d'ondes optimisées sont :

- λ excitation (3-OHB[a]P) = 365 nm
- λ émission (3-OHB[a]P) = 439 nm

Les conditions chromatographiques définies consistent en une séparation réalisée sur une colonne Lichrospher C18 (250×4 mm, 5 μ m) de Merck. Le gradient d'élution est linéaire de 70 à 100% de MeOH dans l'eau pendant 15 min puis maintenu constant à 100% de MeOH pendant 5 min. Le débit est de 1 mL/min.

La linéarité de la détection du 3-OHB[a]P par CLHP-Fluo est étudiée dans une gamme de concentrations allant de 0,13 à 2,15 μ g/L dans le MeOH (Figure 50).

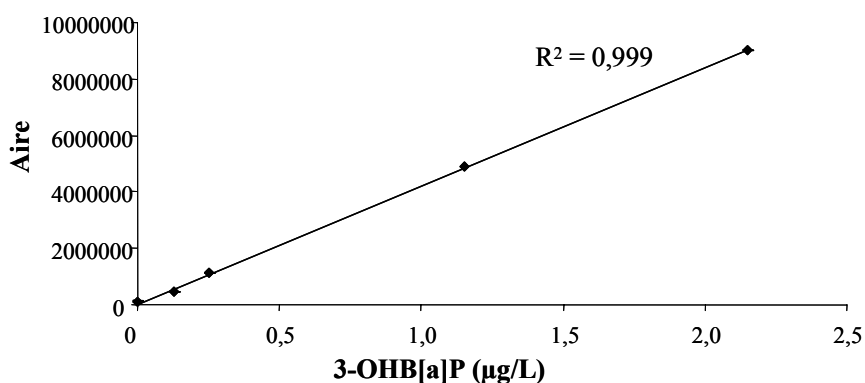


Figure 50 : Gamme de 3-OHB[a]P (0,13 ; 0,25 ; 1,15 et 2,15 μ g/L) mesurée par CLHP-Fluo.

La détection du 3-OHB[a]P apparaît bien linéaire dans la gamme étendue de concentrations étudiée.

La limite de détection est calculée à partir du chromatogramme obtenu pour la plus petite quantité de 3-OHB[a]P injectée correspondant à 0,13 μ g/L (Figure 51).

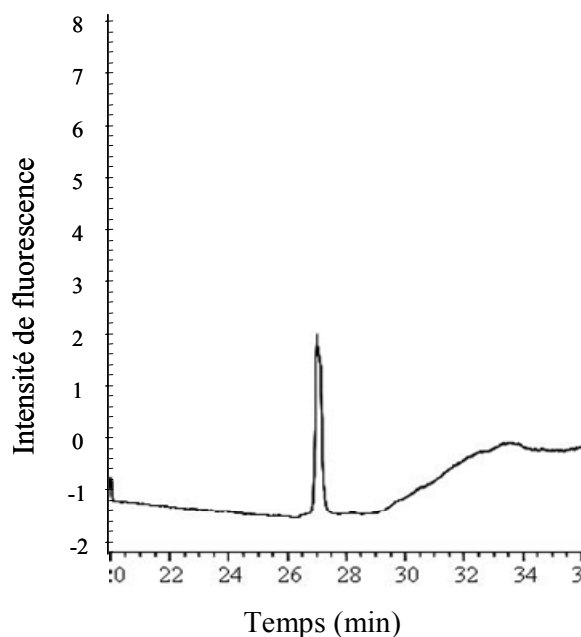


Figure 51 : chromatogramme obtenu pour la détection de 3-OHB[a]P à 0,13 $\mu\text{g/L}$ par CLHP-SM/SM.

Pour la concentration de 0,13 $\mu\text{g/L}$, le rapport S/B est égal à 80 ce qui indique que la limite de détection théorique pour un rapport S/B de 3 serait de 0,005 $\mu\text{g/L}$ soit 5 ng/L.

B-II-2-c Mise au point du dosage du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM

L'optimisation de la détection du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM est réalisée en mode d'ionisation négative ($[\text{M} - \text{H}]^- = 267$). Les paramètres d'ionisation sont présentés dans le tableau 11. Concernant la fragmentation, de fortes énergies de collision sont nécessaires pour obtenir la perte d'un fragment de 28 Da correspondant à un groupement CO. Ceci permet de définir une première transition m/z 267 $[\text{M} - \text{H}]^- \rightarrow m/z$ 239 $[\text{M} - \text{H} - 28]^-$. Du fait de la faible fragmentation du 3-OHB[a]P, nous avons de plus ajouté la transition originale m/z 267 $[\text{M} - \text{H}]^- \rightarrow m/z$ 267 $[\text{M} - \text{H}]^-$. Cette pseudo transition, associée à une énergie de collision élevée mais insuffisante pour fragmenter totalement le 3-OHB[a]P, permet de diminuer fortement le bruit de fond, par fragmentation des autres molécules de même rapport m/z . Ceci permet

d'augmenter la sensibilité par rapport à une méthode de détection de l'ion parent en masse simple.

Cette dernière transition est beaucoup plus intense que la transition m/z 267 $[M - H]^- \rightarrow m/z$ 239 $[M - H - 28]^-$ si bien que la limite de détection est nettement améliorée par l'ajout de cette transition.

Les conditions chromatographiques définies consistent en une séparation réalisée sur une colonne Uptisphère de silice greffée C8 (150×2 mm, 5 μ m) d'Interchim. Le gradient d'élution est linéaire de 60 à 100% d'ACN dans du formiate d'ammonium à 2 mM pendant 15 min, puis constant à 100% d'ACN pendant 10 min, à un débit de 200 μ L/min.

Le rapport des intensités des deux transitions définies est présenté sur le chromatogramme suivant (Figure 52).

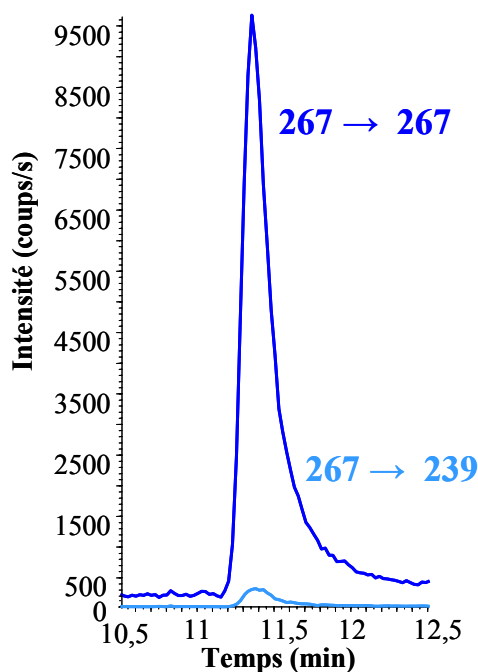


Figure 52 : chromatogramme obtenu pour la détection par CLHP-SM/SM selon deux transitions de 3-OHB[a]P à 1,2 μ g/L.

La linéarité de la détection du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM est étudiée dans la gamme de concentrations allant de 0,06 à 1,2 μ g/L dans le MeOH (Figure 53).

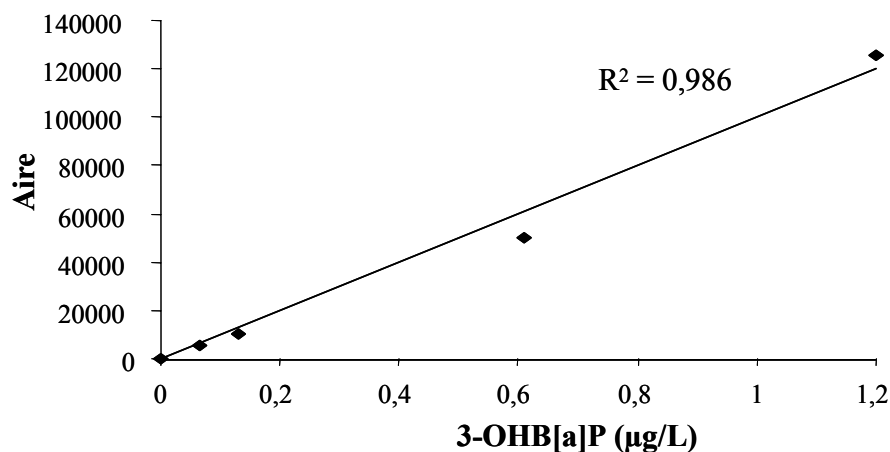


Figure 53 : Gamme de 3-OHB[a]P mesurée par CLHP-SM/SM (0,06 ; 0,13 ; 0,25 ; 0,6 et 1,2 µg/L).

La détection du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM apparaît bien linéaire dans la gamme des concentrations étudiée.

La limite de détection de ce dosage est évaluée à partir du chromatogramme obtenu pour la plus petite quantité de 3-OHB[a]P injectée correspondant à 0,06 µg/L (Figure 54).

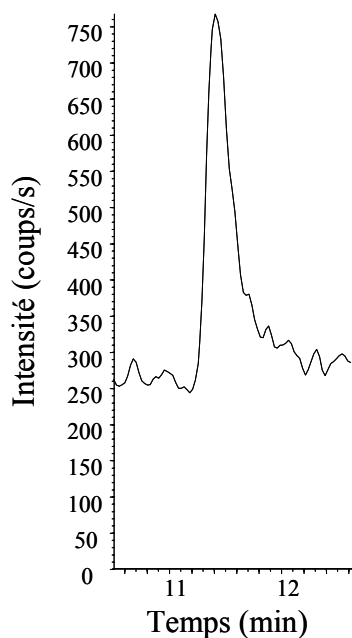


Figure 54 : Chromatogramme obtenu pour la détection de 3-OHB[a]P à 0,064 µg/L par CLHP-SM/SM.

Pour la concentration de 0,06 µg/L, le rapport S/B est égal à 25, ce qui indique que la limite de détection théorique pour un rapport S/B de 3 serait de 0,007 µg/L soit 7 ng/L.

L'ensemble des paramètres de la détection du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Paramètres de détection du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM.

	TR (min)	T (°C)	VI (V)	RID	NEB	COL	Transitions	EC (eV)	LD (ng/L)
3-OHB[a]P	11,4	500	-4200	8	14	8	267,2 → 267,2	-48	7
							267,2 → 239,2 (3)	-40	

En conclusion, la CLHP-Fluo et la CLHP-SM/SM présentent une sensibilité équivalente pour le 3-OHB[a]P, correspondant à une limite détection voisine de 5 ng/L de MeOH.

B-II-2-d Mise au point du dosage du tétraol du B[a]P par CLHP-Fluo

Les longueurs d'ondes optimisées sont :

- λ excitation (tétraol) = 344 nm
- λ émission (tétraol) = 371 nm

Les conditions chromatographiques définies consistent en une séparation réalisée sur une colonne Lichrospher C18 (250×4 mm, 5 µm) de Merck. Le gradient d'élution passe de 40 à 58% de MeOH et 2% de THF dans l'eau en 1 min, est maintenu constant pendant 9 min, puis passe de 58 à 100% de MeOH et de 2 à 0% de THF en 2 min, et est finalement maintenu constant à 100% de MeOH pendant 1 min. Le débit est de 1 mL/min.

La linéarité de la détection du tétraol par CLHP-Fluo est étudiée dans une gamme de concentrations allant de 0,11 à 11 µg/L dans le MeOH (Figure 55).

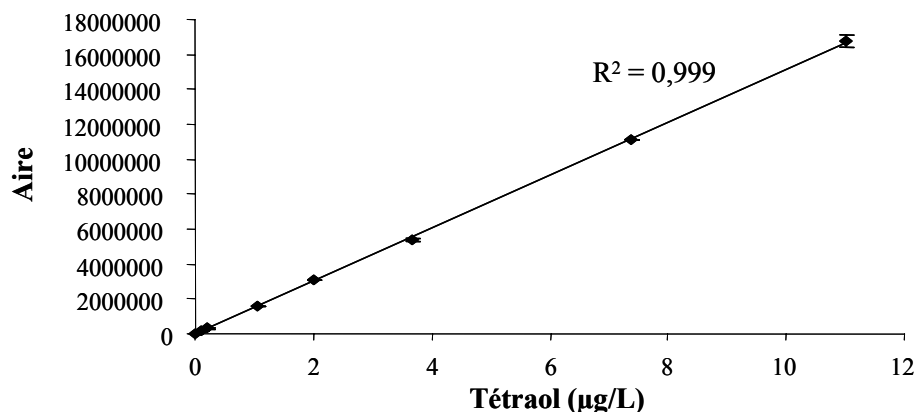


Figure 55 : Gamme de tétraol mesurée par CLHP-Fluo (0,11, 0,22, 1,05, 2, 3,68, 7,36 et 11 µg/L).

La détection du tétraol apparaît bien linéaire dans la gamme large de concentrations étudiée.

La limite de détection ($S/B = 3$) est obtenue pour la plus petite quantité de tétraol injectée correspondant à 0,11 µg/L (Figure 56).

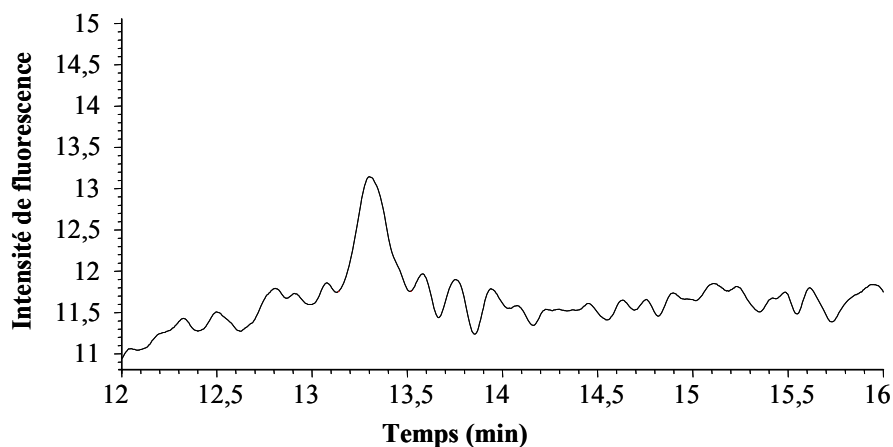


Figure 56 : chromatogramme obtenu pour la détection de tétraol à 0,11 µg/L par CLHP-Fluo.

B-II-2-e Mise au point du dosage du tétraol du B[a]P par CLHP-SM/SM

L'optimisation de la détection du tétraol par CLHP-SM/SM est réalisée en mode d'ionisation négative ($[M - H]^- = 319$). Les paramètres d'ionisation sont présentés dans le tableau 12. Concernant la fragmentation, quatre transitions sont définies :

- m/z 319 $[M - H]^- \rightarrow m/z$ 256 ($[M - 2H_2O - CO]^-$?)
- m/z 319 $[M - H]^- \rightarrow m/z$ 201 ($[M - 4C - 4H_2O]^-$?)
- m/z 319 $[M - H]^- \rightarrow m/z$ 283
- m/z 319 $[M - H]^- \rightarrow m/z$ 229 ($[M - 3C - 3H_2O]^-$)

Une proposition de fragmentation est proposée en Figure 57. Les points d'interrogation indiquent un écart de 1 à 2 amu entre les fragments détectés et ceux proposés.

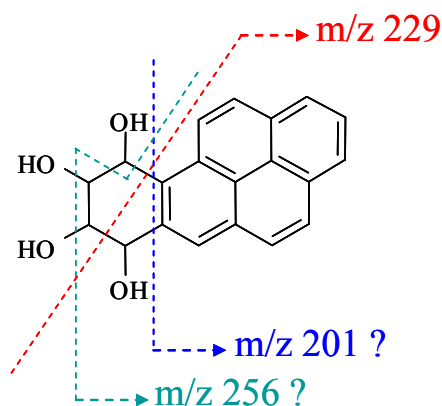


Figure 57 : proposition de fragmentation du tétraol.

Les conditions chromatographiques définies consistent en une séparation réalisée sur une colonne Uptisphère de silice greffée C8 (150×2 mm, 5 μ m) d'Interchim. Le gradient d'élution est linéaire de 0 à 100% de CH_3CN dans du formiate d'ammonium à 2 mM pendant 30 min, à un débit de 200 μ L/min.

Le rapport des différentes transitions est présenté ci-dessous (Figure 58).

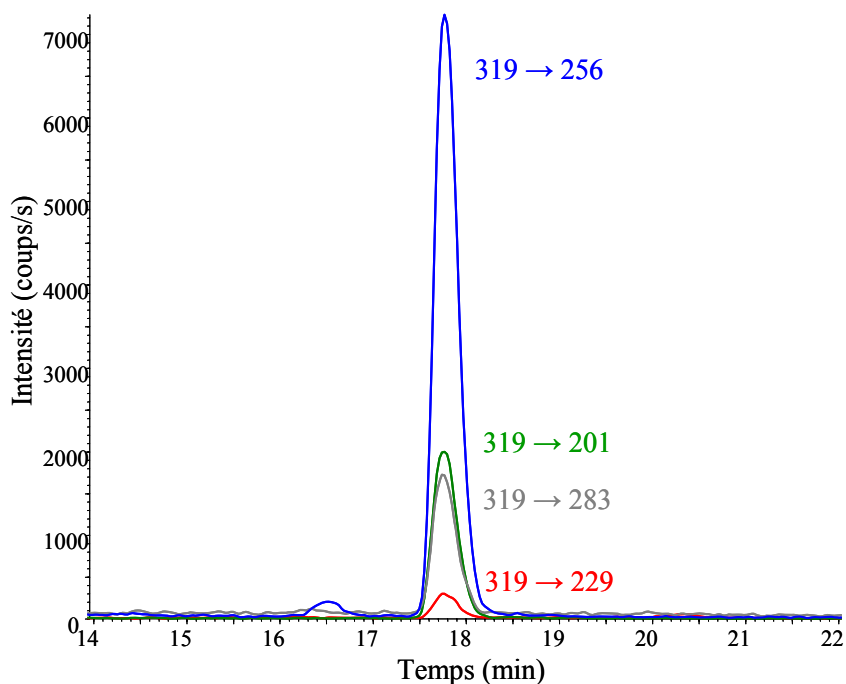


Figure 58 : Chromatogramme correspondant à la détection de 560 µg/L de tétraol par CLHP-SM/SM selon quatre transitions.

La linéarité de la détection du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM est étudiée dans une gamme de concentrations allant de 3,68 à 11 µg/mL de MeOH (Figure 59).

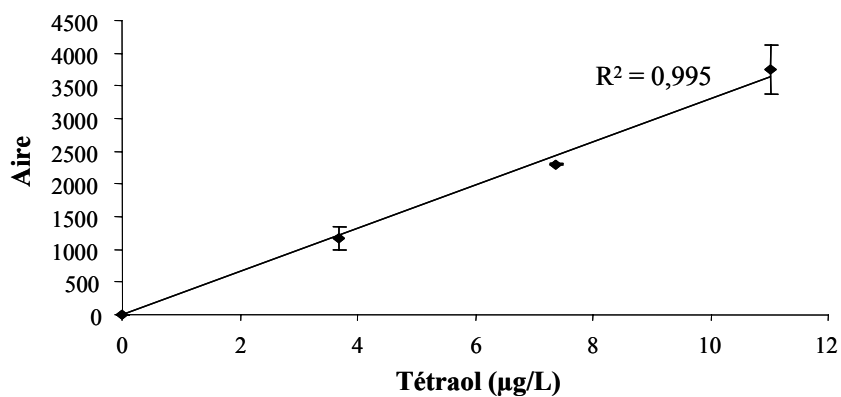


Figure 59 : Gamme de tétraol mesurée par CLHP-SM/SM (3,68, 7,36, 11,02 µg/L).

La détection du tétraol par CLHP-SM/SM apparaît bien linéaire dans la gamme de concentrations étudiée.

La limite de détection de ce dosage est atteinte pour la plus petite quantité de tétraol injectée correspondant à 3,68 µg/L (Figure 60).

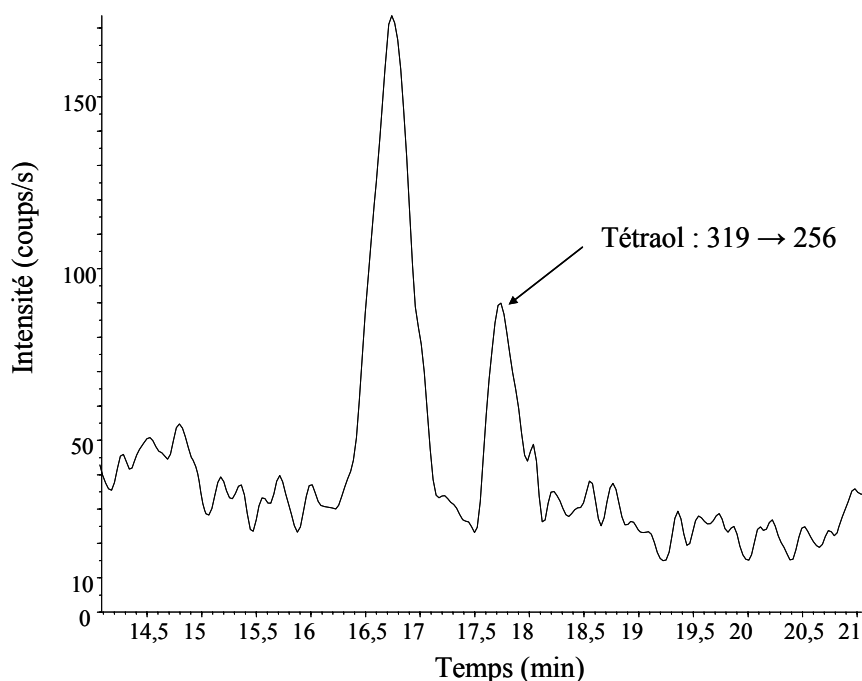


Figure 60 : Chromatogramme obtenu pour la détection de tétraol à 3,68 µg/L par CLHP-SM/SM.

En conclusion, la CLHP-SM/SM apparaît environ 30 fois moins sensible pour la détection du tétraol du B[a]P que la CLHP-Fluo dont la limite de détection est de 0,11 µg/L.

L'ensemble des paramètres de la détection du tétraol par CLHP-SM/SM sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : Paramètres de détection du tétraol par CLHP-SM/SM.

	TR (min)	T (°C)	VI (V)	RID	NEB	COL	Transitions	EC (eV)	LD (µg/L)
							318,8 → 256,6	-20	
Tétraol	13,3	400	-4100	12	10	6	318,8 → 200,8 (30)	-40	3,68
							318,8 → 283 (25)	-15	
							318,8 → 229 (5)	-40	

B-III Discussion

B-III-1 Les adduits de l'ADN

Dans notre étude, nous avons atteint une limite de détection pour l'adduit B[a]P-N7-Gua de 4 pmoles/L d'urine. Malgré cela, cet adduit n'a pas pu être détecté dans les échantillons urinaires de dix sujets exposés aux HAP. Ces sujets sont pourtant exposés à des niveaux élevés de B[a]P et les échantillons urinaires contiennent des concentrations élevées de 1-OHP qui rapportées à la créatinine sont pratiquement toutes plus élevées que l'indice biologique d'exposition de 1,4 $\mu\text{moles/mole}$ de créatinine proposé par Buchet et al. (Buchet et al. 1995).

Dans la littérature, l'excrétion de l'adduit dépurinant B[a]P-N7-Gua dans l'urine a été mise en évidence dans des modèles animaux, mais la quantité de B[a]P excrétée sous cette forme reste faible. En effet, suite à une injection intrapéritonéale de B[a]P marqué au ^{14}C à des rats, environ 0,013% du ^{14}C administré est éliminé sous forme de B[a]P-N7-Gua dans l'urine, et 0,008% dans les fèces (Rogan et al. 1990).

Chez l'homme, l'adduit B[a]P-N7-Gua a été détecté et quantifié à des concentrations allant de 90 à 510 pmoles/L d'urine dans les urines de huit femmes chinoises exposées à des niveaux d'HAP très élevés en conditions domestiques par des fumées de charbon. La concentration moyenne en B[a]P dans les maisons tout au long de la journée est de 0,3 à 19,7 $\mu\text{g/m}^3$ d'air, et 7 h par jour environ les femmes sont exposées à des concentrations moyennes de B[a]P de l'ordre de 14 $\mu\text{g/m}^3$ d'air au-dessus du foyer. L'adduit B[a]P-N7-Ade a également été dosé dans cette étude et cet adduit est présent en quantités 20 à 300 fois moins importantes que l'adduit B[a]P-N7-Gua. Par contre, dans les urines de 12 fumeurs (consommation moyenne de 30 cigarettes/jour), seul l'adduit B[a]P-N7-Ade est détecté (Casale et al. 2001).

Une seule autre étude rapporte la détection de l'adduit B[a]P-N7-Gua dans l'urine d'un travailleur de four à coke à une concentration de 9 pmoles/L d'urine (Chen et al. 2005). Toutefois, après discussion avec l'auteur, il s'avère que ce résultat doit être considéré avec précaution.

Il apparaît donc que seule l'étude de Casale rapporte à ce jour une détection fiable des adduits dépurinants du radical cation du B[a]P dans l'urine. Toutefois, cette détection est obtenue pour des niveaux d'exposition particulièrement élevés. De plus, le protocole de traitement des

échantillons urinaires utilisé permet de concentrer l'urine d'un facteur 10 000, et il est appliqué à des volumes urinaires importants, d'environ 50 mL et 250 mL respectivement pour les femmes exposées aux HAP et les sujets fumeurs, permettant ainsi l'atteinte d'une limite de détection de 0,15 pmoles/L d'urine 25 fois plus basse que la nôtre. La purification de l'urine débute par une extraction sur cartouches Sep-Pak. La fraction contenant les adduits est ensuite lavée avec du CHCl_3 , et la phase organique obtenue est évaporée et 200 μL de DMSO sont ajoutés en fin d'évaporation. Cette étape doit permettre de limiter les pertes dues à l'évaporation à sec de la fraction. Une deuxième phase d'extraction est ensuite réalisée sur un système CLHP-Fluo (365 – 427 nm). Les fractions obtenues sont de nouveau extraites avec du CHCl_3 et concentrée jusqu'à 30 μL de DMSO pour une injection en CLHP-SM/SM.

Ainsi, dans notre étude, les niveaux d'exposition plus faibles et le protocole de traitement des échantillons urinaires, incluant une concentration de l'urine 100 fois moins importante et des volumes urinaires plus petits, pourraient expliquer l'absence de détection des adduits du radical cation du B[a]P.

Ces résultats suggèrent donc que le dosage des adduits dans l'urine n'est pas aisé car il nécessite une limite de détection très faible. Notons que dans le cas de la surveillance biologique de l'exposition en milieu professionnel, l'utilisation de volumes urinaires importants, pouvant correspondre au regroupement de différentes mictions, n'est pas adaptée pour évaluer une exposition au B[a]P, du fait des activités qui sont très souvent de courtes durées, contrairement au milieu domestique.

Les efforts doivent donc porter sur l'étape de préparation de l'échantillon urinaire, qui comme nous l'avons vu peut comprendre plusieurs phases de purification et de concentration. La purification de l'urine sur des colonnes d'immunoaffinité pourrait être envisagée. L'équipe de Casale rapporte que l'utilisation d'une telle approche permet d'atteindre une limite de détection de 0,1 pmole/L d'urine pour l'adduit B[a]P-N7-Gua (Bhattacharya et al. 2003). Par ailleurs, pour le dosage des adduits dans l'urine, il serait important à terme d'utiliser des standards internes d'adduits enrichis isotopiquement. Alors qu'une telle précaution n'est pas fondamentale pour l'analyse d'échantillons d'ADN, elle devient très importante dans l'urine afin de prendre en compte les éventuelles pertes d'adduits liées à des protocoles de préparation des échantillons plus importants.

L'adduit BPDE-N2-dGuo n'a pas non plus été détecté dans les échantillons urinaires analysés. La question sur la potentielle excrétion de cet adduit dans l'urine reste donc entière puisque l'absence de détection pourrait être attribuée à l'absence de l'adduit dans l'urine comme à une limite de détection trop élevée pour permettre sa détection. Aucune donnée de la littérature permettant d'éclaircir cette question n'a été rapportée à ce jour.

Il est important de remarquer que, bien que des gammes directes et extraites n'aient été préparées que pour les adduits B[a]P-Gua 5 et BPDE-N2-dGuo, l'utilisation de notre méthode de dosage par CLHP-SM/SM implique que les cinq autres adduits de notre méthode ont également été recherchés dans les échantillons. Aucune détection de ces adduits n'a non plus été mise en évidence.

Notons enfin que l'adduit BPDE-N7-Gua a été détecté dans les urines d'animaux exposés au B[a]P. Dans l'urine de rats nourris avec de la Gua marquée au ^{14}C et traités à une dose intrapéritonéale de B[a]P marqué au ^3H , environ 0,15% de la dose de B[a]P administrée est éliminée dans l'urine dans les 48 h suivant le traitement sous forme de BPDE-N7-Gua. (Astrup et al. 1986). Selon les résultats sur modèles animaux, l'excrétion de BPDE-N7-Gua semble être 10 fois plus importante que l'excrétion de B[a]P-N7-Gua. Des études plus ciblées sur les adduits dépurinants, incluant l'adduit BPDE-N7-Gua, pourraient être intéressantes à l'avenir pour vérifier ce point.

B-III-2 Les métabolites du B[a]P

La comparaison entre la CLHP-Fluo et la CLHP-SM/SM montre que les deux techniques sont comparables du point de vue de leur sensibilité pour la détection du 3-OHB[a]P. La limite de détection obtenue par les deux techniques est d'environ 5 ng/L de MeOH. Bien que la CLHP-SM/SM soit reconnue pour être une technique de choix pour détecter avec sensibilité les biomolécules (Guetens et al. 2002; Boysen et al. 2003), la structure chimique des molécules étudiées détermine grandement la sensibilité obtenue par cette technique. Dans notre cas, le 3-OHB[a]P est une molécule très stable chimiquement, et la faible sensibilité obtenue pourrait résulter de sa faible fragmentation. L'énergie de collision nécessaire à la perte du fragment CO est en effet très élevée. L'avantage de la CLHP-SM/SM par rapport à la CLHP-Fluo

résiderait plus alors dans l'apport de spécificité. En effet, la détection du 3-OHB[a]P selon les deux transitions définies permet de réaliser une détection spécifique de la molécule. La perte du groupement CO de 28 Da est commune à tous les composés monohydroxylés (Xu et al. 2004). De plus, la transition permettant la détection de l'ion parent du 3-OHB[a]P dans le premier comme le dernier quadripôle, augmente la spécificité de la détection du fait de l'énergie de collision très élevée qu'elle implique. Notons que cette dernière transition est environ 20 fois plus intense que la transition plus classique qui détecte la perte du fragment CO.

L'utilisation de la CLHP-SM/SM rapportée dans la littérature indique une limite de détection de 4 ng/L de MeOH, ce qui est comparable à la nôtre. Néanmoins cette limite de détection est obtenue avec l'utilisation de la seule transition m/z 267 [M - H]⁻ → m/z 239 [M - H - 28]⁻ pour laquelle la détection est donc environ 20 fois plus sensible que la nôtre. L'utilisation d'un spectromètre de masse plus récent que le nôtre pourrait expliquer cette différence (Xu et al. 2004).

Dans notre travail, la CLHP-SM/SM ne permet pas de gain de sensibilité par rapport à la CLHP-Fluo. De plus, la CLHP-Fluo est classiquement utilisée pour le dosage des métabolites des HAP, comme le 1-OHP, et est plus accessible pour le développement d'une utilisation en routine. Nous avons donc choisi de privilégier la CLHP-Fluo pour le développement du dosage du 3-OHB[a]P dans l'urine.

Notre objectif de limite de détection à atteindre pour le dosage urinaire du 3-OHB[a]P correspond à la quantité dans l'urine résultant d'une exposition au 1/10^{ème} de la VME au B[a]P de 150 ng/m³ d'air. Cette quantité est estimée selon des résultats de la littérature qui indiquent que pour une exposition à des concentrations atmosphériques de 1,5 µg/m³ de B[a]P, la concentration moyenne de 3-OHB[a]P dans les urines de 19 travailleurs est de 28 ng/L (Gundel et al. 2000). La quantité de 3-OHB[a]P théorique correspondant au 1/10^{ème} de la VME serait alors de 0,28 ng/L d'urine. Notons que cette valeur peut être variable selon les sources. Ainsi, dans son étude, Lafontaine propose comme valeur biologique limite correspondant à une exposition de 150 ng/m³ la concentration de 1,6 ng/L (Lafontaine et al. 2004).

Chez l'homme, l'atteinte d'une très bonne limite de détection de 0,1 ng/L d'urine en CLHP-Fluo a permis de montrer des différences de concentrations urinaires en 3-OHB[a]P chez

différents sujets selon l'exposition aux HAP : 3 sujets non fumeurs non exposés aux HAP (< 0,1 ng/L urine), 3 fumeurs non exposés (0,5 ng/L urine), et 3 personnes exposés (5 ng/L urine) (Simon et al. 2000). De même Lafontaine et ses collaborateurs rapportent des niveaux urinaires moyens de 3-OHB[a]P rapportés à la créatinine urinaire plus élevés chez 27 sujets fumeurs en comparaison à 27 sujets non-fumeurs (0,030 nmole/mole de créatinine contre 0,014 nmole/mole de créatinine) (Lafontaine et al. 2006). Avec une limite de détection de 6 ng de 3-OHB[a]P/L d'urine en CLHP-Fluo, le 3-OHB[a]P a été détecté dans les urines de 17/19 travailleurs fortement exposés aux HAP dans le cadre d'une usine de production de matériaux à base de goudron (Gündel et al. 2000). Par spectrométrie de masse et avec une limite de détection de 9 ng/L, le 3-OHB[a]P a été détecté chez 1/7 travailleurs exposés aux HAP (Xu et al. 2004). De même une équipe ayant développé une technique de chromatographie liquide à micro-débit couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol a pu détecter le 3-OHB[a]P dans les urines de rats exposés à des fumées d'asphalte. Chez les rats contrôles les quantités restaient inférieures à la limite de détection cependant élevée de l'ordre de 1 µg/L (Wang et al. 2003).

Selon les données de la littérature, il apparaît clair qu'une limite de détection inférieure à 1 ng/L, est essentielle pour permettre le dosage du 3-OHB[a]P chez l'homme en milieu professionnel. Pour atteindre de telles limites de détection, outre la sensibilité de la méthode de détection utilisée, la phase de préparation de l'échantillon urinaire est primordiale. Les limites de détection très variables obtenues selon les études résultent souvent de stratégies différentes de préparation de l'urine. Malgré la présence de 3-OHB[a]P à de très faibles concentrations dans l'urine, ce métabolite urinaire apparaît comme un biomarqueur intéressant de l'exposition au B[a]P. Chez l'animal, l'excrétion de 3-OHB[a]P est dépendante de l'exposition au B[a]P par voie orale (Jongeneelen et al. 1985).

Notre objectif est donc d'atteindre une limite de détection dans l'urine de l'ordre de 0,3 ng/L d'urine. Des premiers essais nous ont permis d'atteindre une limite de détection de 0,5 ng/L d'urine grâce à une purification de l'urine sur des cartouches de type C18 suivie par une extraction du 3-OHB[a]P en ligne sur le système CLHP-Fluo, mais ces premiers résultats restent à confirmer.

Concernant le dosage du tétraol du B[a]P, nous avons mis en évidence la plus grande sensibilité de la CLHP-Fluo par rapport à la CLHP-SM/SM, d'un facteur 30 environ. La

limite de détection obtenue en CLHP-SM/SM est également bien supérieure pour le tétraol que pour le 3-OHB[a]P, alors que le tétraol est plus instable, du fait de la présence de quatre groupements hydroxyles au lieu d'un entraînant une fragmentation plus importante. Toutefois, d'autres paramètres, concernant notamment l'étape d'ionisation, peuvent jouer sur la sensibilité obtenue.

Dans la littérature, la limite de détection rapportée pour une technique de CLHP-SM/SM est comparable à la nôtre, soit 2,5 µg/L de MeOH (Wang et al. 2003). La CLHP-Fluo est également présentée comme plus sensible que la CLHP-SM/SM avec une limite de détection de 0,6 µg/L de MeOH. Toutefois, l'atteinte d'une limite de détection dans l'urine de 6 ng/L ne permet pas de détecter le tétraol dans les urines de 17 travailleurs fortement exposés aux HAP pendant la production de la pâte de Söderberg. En effet, les concentrations urinaires en 1-OHP en fin de poste de ces travailleurs sont très élevées, avec une moyenne de 10,2 µmoles/mole de créatinine (Bentsen-Farmen et al. 1999).

Notons enfin que la CG/SM semble intéressante pour le dosage du tétraol avec des limites de détection rapportées de l'ordre de la fmole (Simpson et al. 2000; Wu et al. 2002). L'atteinte d'une telle limite de détection a permis de mettre en évidence une différence significative entre les niveaux urinaires de travailleurs de four à coke et ceux de témoins non-exposés. De plus, l'excrétion du tétraol a été significativement corrélée à celle du 1-OHP, ainsi qu'à l'exposition atmosphérique individuelle (Wu et al. 2002).

Que ce soit pour le dosage du 3-OHB[a]P ou du tétraol, il est important de préciser que des évolutions d'ordre technologique pourraient permettre d'améliorer la sensibilité de la CLHP-SM/SM pour ces molécules à l'avenir. De plus, certaines sources d'ionisation, telles que la source par photoionisation, semblent plus adaptées que la source par électrospray pour les molécules apolaires difficilement ionisables comme les HAP. Des essais sur ce type de source pourraient être envisagés.

En conclusion, il semble que, du fait des faibles quantités excrétées dans l'urine, tant l'analyse des adduits de l'ADN que des métabolites du B[a]P nécessite des protocoles analytiques élaborés permettant une très grande purification et concentration des échantillons urinaires.

Par conséquent, pour les adduits de l'ADN, il semble que l'urine ne soit pas le milieu biologique le plus adapté pour leur étude, et qu'il faille se tourner vers le dosage des adduits

dans l'ADN de cellules. Dans cette perspective, nous souhaitons déterminer si notre méthode de dosage est assez sensible pour doser les adduits dans les cellules du sang de sujets exposés aux HAP. Pour des raisons pratiques et éthiques, il n'est pas facile de réaliser des prélèvements sanguins sur des sujets professionnellement exposés aux HAP. C'est pourquoi nous réalisons une première étude sur des sujets volontaires fumeurs et non-fumeurs.

C Recherche des adduits de l'ADN du B[a]P dans les cellules sanguines mononuclées de sujets fumeurs

C-I Matériels et méthodes

C-I-1 Population

Sont inclus dans l'étude, 6 sujets non-fumeurs (NF), et 16 sujets fumeurs (F), indépendamment du sexe ou de l'âge des sujets. Chez les sujets fumeurs, la consommation tabagique est quantifiée en nombre de cigarettes/jour. Tous les sujets ont signé un consentement éclairé.

C-I-2 Prélèvements et traitement des échantillons

Les prélèvements sanguins (8 mL) sont effectués sur des tubes CPT (Cell Preparation Tube) contenant du citrate de sodium de chez BD (Le-Pont-de-Claix, France). Les échantillons sont conservés à l'abri de la lumière, et sont traités au maximum 2 h après le prélèvement. Après agitation douce des tubes par retournement pendant 10 min, puis centrifugation (1650 g, 20 min, 20°C), le plasma est éliminé, et la couche cellulaire mononuclée comprenant les lymphocytes et monocytes est transvasée dans un tube de 15 mL. 5 mL de tampon phosphate (PBS - CaCl₂ - MgCl₂) sont alors ajoutés, puis après centrifugation (400 g, 5 min, 4°C) le surnageant est éliminé et 5 mL de tampon phosphate sont de nouveau ajoutés. Après remise en suspension des cellules et centrifugation (400 g, 5 min, 4°C), le culot cellulaire est conservé à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

Le protocole d'extraction de l'ADN suivi correspond à celui décrit dans le chapitre 3, mais deux séries d'extractions sont réalisées :

- **Extraction 1** : Cette série d'extractions est réalisée sur 10 échantillons F et correspond au protocole d'extraction classique précédemment décrit.
- **Extraction 2** : Cette série d'extractions est réalisée sur les 6 échantillons NF, et sur 6 échantillons F. En raison de la présence de dépôts fibreux dans les échantillons, une centrifugation (1500 g, 5 min, 4°C) est ajoutée pendant le protocole d'extraction après l'incubation d'1 h à 37°C avec la protéase. Le protocole d'extraction est ensuite poursuivi sur les surnageants comprenant l'ADN en solution, les dépôts fibreux étant éliminés dans les culots.

La digestion enzymatique de l'ADN est ensuite réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Les échantillons sont finalement centrifugés (5000 g, 5 min, 20°C), puis lyophilisés avant d'être repris dans 40 µL d'un mélange de MeOH:H₂O (50:50 v/v) pour être analysés par CLHP-SM/SM.

La quantité d'ADN dans les échantillons est calculée à partir de la quantité de nucléosides normaux injectée et mesurée par UV. Les quantités d'ADN obtenues par les deux protocoles d'extraction sont évaluées par un test non-paramétrique pour séries indépendantes de Mann-Whitney.

C-I-3 Analyses CLHP-SM/SM

Les analyses CLHP-SM/SM sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment décrites (Chapitre 3). Néanmoins la courbe de calibration des adduits est réalisée sur de plus faibles quantités injectées, soit 2, 5 et 10 fmoles injectées.

C-II Résultats

C-II-1 Population

Les données concernant la population d'étude sont présentées dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Caractéristiques de la population d'étude.

Sujet	Effectif	Cigarettes/jour
F 1	1	3
F 2	1	10
F 3	1	2
F 4	1	30
F 5	1	15
F 6	1	20
F 7	1	15
F 8	1	40
F 9	1	30
F 10	1	30
F 11	1	10
F 12	1	10
F 13	1	15
F 14	1	20
F 15	1	30
F 16	1	10
NF	6	0

C-II-2 Quantités d'ADN obtenues

Les quantités d'ADN obtenues pour chaque échantillon sont présentées dans le tableau 14. Le protocole d'extraction utilisé, 1 ou 2, y est mentionné.

Tableau 14 : Quantités d'ADN extraites selon le protocole d'extraction.

Protocole	Sujet	Quantité d'ADN (μg)
1	F 1	82
	F 2	4
	F 3	107
	F 4	111
	F 5	70
	F 6	88
	F 7	0,7
	F 8	110
	F 9	65
	F 10	25
2	F 11	44,5
	F 12	57,5
	F 13	0,01
	F 14	61,5
	F 15	34
	F 16	6
	NF 1	11
	NF 2	2,5
	NF 3	74,5
	NF 4	21
NF 5	8	
NF 6	35,5	

Les quantités d'ADN extraites sont très variables mais, les quantités d'ADN obtenues avec le protocole 1 sont significativement plus importantes que celles obtenues avec le protocole 2 ($p = 0,04$).

C-II-3 Analyse des adduits de l'ADN

Dans les conditions de notre étude, la limite de détection obtenue pour l'adduit BPDE-N2-dGuo est égale à 1 fmole injectée. Aucun adduit n'a pu être détecté que ce soit dans les échantillons de sujets fumeurs ou non-fumeurs quelle que soit la quantité d'ADN extraite.

Or les quantités maximales d'ADN extraites sont voisines de 100 μg d'ADN, soit 50 μg injectés, dans les échantillons F1, F3, F4, F6, et F8. Chez ces sujets fumeurs la quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo est donc inférieure à la limite de détection d'environ 1 adduit/ 10^8 nucléosides normaux, alors que la consommation tabagique est supérieure ou égale à 20 cigarettes/jour pour 3 de ces 5 sujets (F4, F6 et F8).

C-IV Discussion

Tout d'abord, il est important d'optimiser les quantités d'ADN extraites à partir des prélèvements sanguins. Au cours du protocole d'extraction, la présence de dépôts de type graisseux pouvait limiter le rendement d'extraction de l'ADN, ce qui nous a conduits à introduire dans le protocole initial une étape de centrifugation. Toutefois, cette étape supplémentaire n'a pas eu l'effet attendu. En effet, la quantité moyenne d'ADN extraite par échantillon par le protocole 2 est de $30 \pm 25 \mu\text{g}$ d'ADN tandis que par le protocole 1, sans centrifugation, elle est de $66 \pm 42 \mu\text{g}$ d'ADN. Il se pourrait qu'une partie de l'ADN soit resté piégé dans les dépôts et ait donc été perdu au cours de la centrifugation. Toutefois, il apparaît que les quantités d'ADN extraites, même avec le protocole 1, sont faibles et très variables. En effet, la quantité d'ADN attendue pour des prélèvements sanguins de 8 mL est classiquement de l'ordre de $100 \mu\text{g}$ d'ADN. Plusieurs explications peuvent être avancées pour ce point. Tout d'abord, dans l'échantillon F13, très peu d'ADN est extrait, et cela pourrait être expliqué par un volume sanguin initial plus petit (environ 3 mL) du fait de difficultés pour réaliser ce prélèvement. La grande variabilité observée dans les quantités d'ADN extraites pourrait également être attribuée aux quantités de leucocytes dans le sang, pouvant varier d'un facteur environ 2,5 pour des adultes. Enfin, des problèmes d'extraction inhabituels, rapportés pour d'autres expériences utilisant le même protocole dans le laboratoire à la même période, et attribués à la moindre efficacité de l'un des réactifs, pourraient être mis en cause. La cinétique de réparation des adduits stables du BPDE correspond à une cinétique monophasique lente, la moitié des adduits étant réparés au bout de 30 h environ.

Dans notre étude aucun adduit de l'ADN du B[a]P n'est détecté dans tous les échantillons, même ceux de fumeurs présentant les plus grandes quantités d'ADN (F1, F3, F4, F6, et F8). Parmi ces échantillons, trois correspondent à des consommations de tabac conséquentes de 20, 30 et 40 cigarettes/jour. Selon nos résultats dans les modèles cellulaires, l'adduit BPDE-N2-dGuo devrait être l'adduit majoritairement obtenu, et si cet adduit est présent dans les échantillons de sujets fumeurs de notre étude, il l'est à un taux inférieur à 1 adduit/ 10^8 nucléosides normaux.

Dans la littérature, aucune détection des adduits du BPDE par CLHP-SM/SM n'a été rapportée à ce jour, que ce soit pour des sujets fumeurs, ou d'autres sujets exposés aux HAP. Par la technique plus sensible du post-marquage, le taux d'adduits moyen mesuré chez 24 sujets fumeurs (25 ± 9 cigarettes/jour) dans les lymphocytes et monocytes est de $0,76 \pm 0,41$ adduit/ 10^8 nucléosides normaux, et les taux d'adduits mesurés sont significativement corrélés à la consommation de tabac (Godschalk et al. 2002). De même pour une consommation de tabac de 1 à 10 cigarettes/jour, le taux moyen d'adduits retrouvé dans les lymphocytes de 13 sujets est de $0,47 \pm 0,31$ adduit/ 10^8 nucléosides normaux, et pour une consommation de plus de 10 cigarettes/jour chez 28 sujets fumeurs, il est de $0,64 \pm 0,45$ adduit/ 10^8 nucléosides normaux, alors que chez 11 sujets non-fumeurs, il est de $0,33 \pm 0,22$ adduit/ 10^8 nucléosides normaux. Les taux d'adduits mesurés sont là encore significativement corrélés à la consommation de tabac (Peluso et al. 2004). Il apparaît ainsi que les taux d'adduits mesurés par la technique du post-marquage sont toujours inférieurs à 1 adduit/ 10^8 nucléosides normaux, quelle que soit la consommation de tabac. Par contre, par la technique de CLHP-Fluo, des niveaux plus élevés sont retrouvés. Le taux moyen d'adduits mesuré dans les leucocytes de 27 et 14 sujets est ainsi de $1,4 \pm 0,2$ adduits/ 10^8 nucléosides normaux pour une consommation de plus de 10 cigarettes/jour, et de $0,9 \pm 0,2$ adduit/ 10^8 nucléosides normaux pour une consommation de moins de 10 cigarettes/jour, respectivement. La corrélation entre les taux d'adduits mesurés et la consommation de tabac n'est en revanche pas significative. Ces différences observées par rapport aux mesures réalisées par post-marquage pourraient être attribuées à la différence de nature chimique des adduits mesurés selon ces deux techniques. Notons que la limite de détection obtenue en CLHP-Fluo est de 0,5 adduit/ 10^8 nucléosides normaux, mais que les analyses sont réalisées sur d'importantes quantités d'ADN comprises entre 400 et 500 μg , correspondant à des prélèvements sanguins de 50 mL (Lodovici et al. 2004).

Au regard de ces études, nous pouvons constater que les quantités d'adduits mises en évidence chez des sujets fumeurs ayant des consommations de tabac similaires à celles retrouvées dans notre étude sont pour la plus grande part inférieures à notre limite de détection. De plus, les mesures d'adduits réalisées par post-marquage ou par CLHP-Fluo sont moins spécifiques, si bien que différents types d'adduits sont mesurés de façon globale. Avec notre méthode de dosage par CLHP-SM/SM très spécifique, nous pouvons penser que les taux de l'adduit BPDE-N2-dGuo seraient encore plus faibles que ceux rapportés précédemment.

Il s'agit donc d'améliorer la limite de détection de notre méthode de dosage. Les améliorations pourraient porter sur la préparation de l'échantillon et notamment sur sa purification visant à éliminer les nucléosides normaux. Une étape de purification sur des colonnes d'immunoaffinité contenant des anticorps dirigés contre les adduits du B[a]P pourrait être proposée. Une telle procédure a été décrite en amont de la technique du post-marquage (Randerath et al. 1998). De même, l'équipe de P. Farmer réalise systématiquement une purification des échantillons d'ADN sur des cartouches de silice greffée avant l'analyse des adduits par CLHP-SM/SM, mais la sensibilité obtenue n'est pas meilleure que celle permise par notre méthode de dosage (Singh et al. 2006). Sur des échantillons contenant de faibles quantités d'ADN, il convient toutefois de vérifier l'utilité d'une telle approche qui peut également occasionner une perte d'adduits.

Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure que l'absence de détection des adduits dans notre étude pourrait être liée au petit nombre de sujets, et à la consommation de cigarettes peu élevée pour certains sujets. Il serait alors intéressant de reproduire cette étude sur des sujets fortement exposés aux HAP, notamment en milieu professionnel, en veillant à ce que les conditions d'extraction de l'ADN soient optimales.

Chapitre 5

Conclusion générale et perspectives

Chapitre 5- Conclusion générale et perspectives

Dans cette thèse, nous avons tout d'abord mis au point une méthode de dosage spécifique des adduits de l'ADN par CLHP-SM/SM permettant le dosage simultané de sept adduits provenant de deux voies métaboliques du B[a]P : la voie du BPDE et la voie du radical cation. Bien que moins sensible que la technique du post-marquage, la limite de détection atteinte est intéressante, de l'ordre de 1 adduit/10⁸ nucléosides normaux. Cette méthode analytique nous a permis d'identifier les adduits majoritairement formés dans l'ADN de modèles cellulaires humains de kératinocytes et d'hépatocytes : il s'agit des adduits stables du BPDE avec comme adduit majoritaire l'adduit BPDE-N2-dGuo. Alors que les cinétiques de formation et de réparation des adduits du BPDE sont identiques dans les deux lignées cellulaires étudiées, une importante différence est mise en évidence en présence de B[a]P : les kératinocytes forment 200 fois moins d'adduits que les hépatocytes. Ceci est expliqué par des capacités de métabolisation différentes, les kératinocytes possédant un métabolisme d'activation des xénobiotiques correspondant aux cyt. P450 moins important que les hépatocytes. En lien avec cette capacité de métabolisation faible, les résultats obtenus mettent en évidence une cinétique d'élimination des adduits peu efficace dans les kératinocytes exposés au B[a]P. En effet, la formation des adduits peut se poursuivre pendant plusieurs jours après l'exposition, la cinétique de formation des adduits étant alors plus importante que celle de réparation. *In vivo*, ceci rend possible la diffusion du B[a]P vers d'autres organes avant d'être métabolisé, la peau jouant alors un rôle de réservoir. La lente métabolisation associée à la diffusion du B[a]P expliquent ainsi les retards d'excrétion des métabolites urinaires ou la persistance des adduits dans différents organes après une exposition par voie cutanée rapportés dans la littérature.

De plus, un résultat important est l'absence de détection des adduits du radical cation du B[a]P dans l'ADN des cellules traitées au B[a]P. Cela indique que si des adduits du radical cation sont présents dans l'ADN, ils sont largement minoritaires par rapport aux adduits du BPDE. En revanche, cela n'indique pas que des adduits instables du radical cation ne sont pas formés en quantités plus importantes puisque ceux-ci sont majoritairement dépurinants. Bien que les premiers essais de recherche de ces adduits dans les milieux de cultures cellulaires n'aient pas permis de mettre en évidence leur formation, il serait intéressant à l'avenir de

préciser ce point. En outre, la quantification des adduits excrétés dans les milieux de culture, permettraient d'obtenir une idée plus précise des quantités et des types d'adduits potentiellement présents dans l'urine. Pour cela, le travail devrait porter essentiellement sur l'amélioration du protocole d'extraction et de concentration des adduits à partir des milieux de culture.

Les études cellulaires de ce travail indiquent que l'adduit BPDE-N2-dGuo apparaît comme un biomarqueur potentiel de l'exposition au B[a]P. En vue d'appliquer à terme le dosage des adduits de l'ADN chez l'homme pour le suivi de l'exposition génotoxique au B[a]P, ces lésions ont été recherchées dans les milieux biologiques de populations exposées aux HAP.

Nous avons tout d'abord recherché les adduits de l'ADN, parallèlement à d'autres biomarqueurs, le 1-OHP et les lésions oxydatives de l'ADN et l'ARN, dans l'urine de sujets exposés professionnellement aux HAP, en raison de la facilité de recueil de ce milieu biologique. Nous avons mis en évidence le fait que les lésions oxydatives de l'ARN sont excrétées dans l'urine en plus grandes quantités que celles de l'ADN, en lien avec un renouvellement important de l'ARN au niveau cellulaire. Toutefois, alors que le 1-OHP est représentatif de l'exposition aux HAP, les lésions oxydatives, que ce soit de l'ADN ou de l'ARN, n'apparaissent pas comme des biomarqueurs d'effet intéressants pour évaluer les risques sanitaires d'une population exposée aux HAP. Concernant les adduits de l'ADN, aucun adduit, stable ou dépurinant, n'a pu être détecté dans l'urine de sujets exposés à d'importants niveaux d'HAP. Dans la littérature, la seule étude qui rapporte la détection d'adduits urinaires chez l'homme, a été conduite chez des sujets exposés à de plus fortes doses d'HAP pendant de longues durées. De plus, il apparaît qu'en raison des faibles quantités d'adduits excrétées dans l'urine, un protocole permettant de purifier et concentrer l'urine de façon très importante, de l'ordre de 10 000 fois, soit nécessaire. Les perspectives devraient donc porter sur l'amélioration du protocole de traitement des échantillons urinaires décrit dans ce travail.

De plus, il nous a paru important de développer le dosage de métabolites spécifiques du B[a]P dans l'urine, à savoir le 3-OHB[a]P et le tétraol du B[a]P. Les métabolites du B[a]P étant également présents dans l'urine en quantités très faibles, il était nécessaire dans un premier

temps d'identifier la technique analytique la plus sensible pour ces métabolites. Il apparaît que la CLHP-Fluo présente une meilleure sensibilité que la CLHP-SM/SM pour ces molécules. Il s'agit donc de poursuivre la mise au point des dosages dans l'urine en utilisant la CLHP-Fluo, et de les appliquer à des populations exposées aux HAP. Parallèlement à cela, il pourrait être intéressant de vérifier si le dosage de ces métabolites sous forme conjuguée, notamment de la N-acétyl-cystéine pour le tétraol, ne permettrait pas d'améliorer la sensibilité actuellement permise par la CLHP-SM/SM.

Au regard des résultats obtenus, il semble qu'il soit nécessaire de rechercher les adduits dans l'ADN de cellules plutôt que dans l'urine. Toutefois, la recherche de l'adduit BPDE-N2-dGuo dans l'ADN des cellules mononuclées du sang de sujets fumeurs n'a pas permis de le mettre en évidence. Ceci pourrait être expliqué tant par le faible rendement d'extraction de l'ADN obtenu dans notre étude que par une limite de détection insuffisante de notre méthode de dosage par CLHP-SM/SM. Les efforts devraient porter en premier lieu sur l'amélioration de la préparation des échantillons avant d'effectuer des analyses sur un plus grand nombre de sujets fortement exposés aux HAP. De plus, les rapides avancées de la spectrométrie de masse dans la dernière décennie laissent penser que les futurs progrès d'ordre technologique pourront permettre d'atteindre des limites de détection adaptées à la mesure de ces lésions. Enfin, il serait intéressant de comparer la limite de détection obtenue dans notre étude à la limite de détection permise par la CLHP-Fluo, technique simple qui est décrite comme étant légèrement plus sensible que la CLHP-SM/SM. De plus, cette méthode permet de doser l'ensemble des adduits du BPDE par la mesure du tétraol libéré par hydrolyse, ce qui a pour effet d'augmenter la quantité d'adduits détectés, en diminuant cependant la spécificité.

Par ailleurs, afin de s'affranchir des difficultés de détection des adduits de l'ADN, une proposition serait de mesurer les adduits du BPDE non pas de l'ADN mais de l'ARN. En effet, il semble pertinent de penser qu'en cas d'exposition à un toxique, l'ARN est endommagé en premier lieu et dans de plus grandes proportions que l'ADN, comme le suggère l'étude de Hofer qui met en évidence 20 fois plus de dommages oxydatifs formés dans l'ARN que dans l'ADN dans des cellules humaines d'épithélium pulmonaire traitées avec de l'eau oxygénée (Hofer et al. 2005). La première étape serait de déterminer au niveau cellulaire si les adduits du BPDE sur l'ARN sont effectivement formés dans de plus grandes

quantités que ceux sur l'ADN. L'étape ultérieure serait de rechercher ces lésions de l'ARN chez des sujets exposés aux HAP.

En conclusion, les adduits de l'ADN semblent être des biomarqueurs intéressants pour mesurer l'exposition génotoxique des populations au plus près du site d'action toxique en prenant en compte de nombreux facteurs individuels. Toutefois, il est important de définir leur valeur prédictive quant au risque de survenue d'une pathologie. Pour cela, des études épidémiologiques de suivi des populations exposées sont encore nécessaires.

L'étude des adduits de l'ADN en tant que biomarqueurs d'exposition s'inscrit donc encore dans un cadre de recherche fondamentale. L'approfondissement des connaissances chez l'homme, notamment des relations effet-dose, doit être poursuivi afin de disposer de biomarqueurs sensibles et spécifiques permettant ainsi d'orienter au mieux les actions de prévention vers les populations à risques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aden, D. P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov and B. B. Knowles (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." *Nature* **282**(5739): 615-6.
- Alexandrov, K., I. Cascorbi, M. Rojas, G. Bouvier, E. Kriek and H. Bartsch (2002). "CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation." *Carcinogenesis* **23**(12): 1969-77.
- Alexandrov, K., M. Rojas, O. Geneste, M. Castegnaro, A. M. Camus, S. Petruzzelli, C. Giuntini and H. Bartsch (1992). "An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers' lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity." *Cancer Res* **52**(22): 6248-53.
- Andrýsik, Z., J. Vondracek, M. Machala, P. Krcmar, L. Svihalkova-Sindlerova, A. Kranz, C. Weiss, D. Faust, A. Kozubik and C. Dietrich (2006). "The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells." *Mutat Res* **615**: 87-97.
- Ariese, F., M. Verkaik, G. P. Hoornweg, R. J. van de Nesse, S. R. Jukema-Leenstra, J. W. Hofstraat, C. Gooijer and N. H. Velthorst (1994). "Trace analysis of 3-hydroxy benzo[a]pyrene in urine for the biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." *J Anal Toxicol* **18**(4): 195-204.
- Arif, J. M., C. Dresler, M. L. Clapper, C. G. Gairola, C. Srinivasan, R. A. Lubet and R. C. Gupta (2006). "Lung DNA adducts detected in human smokers are unrelated to typical polyaromatic carcinogens." *Chem Res Toxicol* **19**(2): 295-9.
- Asami, S., T. Hirano, R. Yamaguchi, Y. Tomioka, H. Itoh and H. Kasai (1996). "Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking." *Cancer Res* **56**(11): 2546-9.
- Autrup, H. and T. Seremet (1986). "Excretion of benzo[a]pyrene-Gua adduct in the urine of benzo[a]pyrene-treated rats." *Chem Biol Interact* **60**(2): 217-26.
- Bacon, J. R., G. Williamson, R. C. Garner, G. Lappin, S. Langouet and Y. Bao (2003). "Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes." *Carcinogenesis* **24**(12): 1903-11.
- Baird, W. M., L. A. Hooven and B. Mahadevan (2005). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action." *Environ Mol Mutagen* **45**(2-3): 106-14.
- Balu, N., W. T. Padgett, G. R. Lambert, A. E. Swank, A. M. Richard and S. Nesnow (2004). "Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo[a]pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH." *Chem Res Toxicol* **17**(6): 827-38.
- Banasiewicz, M., G. Nelson, A. Swank, N. Grubor, J. Ross, S. Nesnow, H. Kofeler, G. J. Small and R. Jankowiak (2004). "Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts formed at low adduction level in mice lung tissue." *Anal Biochem* **334**(2): 390-400.
- Barry, J. P., C. Norwood and P. Vouros (1996). "Detection and identification of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to DNA utilizing capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry." *Anal Chem* **68**(8): 1432-8.

- Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 738-47.
- Bentsen-Farmen, R. K., I. V. Botnen, H. Noto, J. Jacob and S. Ovrebø (1999). "Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by high-pressure liquid chromatography after purification on immunoaffinity columns in urine from occupationally exposed workers." Int Arch Occup Environ Health **72**(3): 161-8.
- Berenblum, I. and P. Shubik (1947). "A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse skin." Br J Cancer **1**: 383-391.
- Besarati Nia, A., J. C. Kleinjans and F. J. Van Schooten (2002). "Biomonitoring of tobacco smoke carcinogenicity by dosimetry of DNA adducts and genotyping and phenotyping of biotransformational enzymes: a review on polycyclic aromatic hydrocarbons." Biomarkers **7**(3): 209-29.
- Bessho, T., K. Tano, H. Kasai, E. Ohtsuka and S. Nishimura (1993). "Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells." J Biol Chem **268**(26): 19416-21.
- Bhattacharya, S., D. C. Barbacci, M. Shen, J. N. Liu and G. P. Casale (2003). "Extraction and purification of depurinated benzo[a]pyrene-adducted DNA bases from human urine by immunoaffinity chromatography coupled with HPLC and analysis by LC/quadrupole ion-trap MS." Chem Res Toxicol **16**(4): 479-86.
- Binkova, B. and R. J. Sram (2004). "The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts." Mutat Res **547**(1-2): 109-21.
- Boffetta, P., N. Jourenkova and P. Gustavsson (1997). "Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." Cancer Causes Control **8**(3): 444-72.
- Booth, E. D., J. P. Aston, P. T. van den Berg, R. A. Baan, D. A. Riddick, L. T. Wade, A. S. Wright and W. P. Watson (1994). "Class-specific immunoabsorption purification for polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts." Carcinogenesis **15**(10): 2099-106.
- Borgen, A., H. Darvey, N. Castagnoli, T. T. Crocker, R. E. Rasmussen and I. Y. Wang (1973). "Metabolic conversion of benzo(a)pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolites to deoxyribonucleic acid." J Med Chem **16**(5): 502-6.
- Bouchard, M., C. Dodd and C. Viau (1994). "Improved procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of monohydroxylated PAH metabolites in urine." J Anal Toxicol **18**(5): 261-4.
- Bouchard, M. and C. Viau (1995). "Benzo(a)pyrenediolepoxide-hemoglobin adducts and 3-hydroxy-benzo(a)pyrene urinary excretion profiles in rats subchronically exposed to benzo(a)pyrene." Arch Toxicol **69**(8): 540-6.
- Bouchard, M. and C. Viau (1996). "Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites." Toxicol Appl Pharmacol **139**(2): 301-9.
- Bouchard, M. and C. Viau (1997). "Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration." Can J Physiol Pharmacol **75**(3): 185-92.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." J Cell Biol **106**(3): 761-71.
- Boyle, P. (1997). "Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996." Lung Cancer **17**(1): 1-60.

- Boysen, G. and S. S. Hecht (2003). "Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods." *Mutat Res* **543**(1): 17-30.
- Brandt, H. C. and W. P. Watson (2003). "Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds." *Ann Occup Hyg* **47**(5): 349-78.
- Bregeon, D. and A. Sarasin (2005). "Hypothetical role of RNA damage avoidance in preventing human disease." *Mutat Res* **577**(1-2): 293-302.
- Bridges, B. A., M. Sekiguchi and T. Tajiri (1996). "Effect of mutY and mutM/fpg-1 mutations on starvation-associated mutation in Escherichia coli: implications for the role of 7,8-dihydro-8-oxoguanine." *Mol Gen Genet* **251**(3): 352-7.
- Briede, J. J., R. W. Godschalk, M. T. Emans, T. M. De Kok, E. Van Agen, J. Van Maanen, F. J. Van Schooten and J. C. Kleinjans (2004). "In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism." *Free Radic Res* **38**(9): 995-1002.
- Brookes, P. and P. D. Lawley (1964). "Evidence For The Binding Of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons To The Nucleic Acids Of Mouse Skin: Relation Between Carcinogenic Power Of Hydrocarbons And Their Binding To Deoxyribonucleic Acid." *Nature* **202**: 781-4.
- Buchet, J. P., M. Ferreira, Jr., J. B. Burrion, T. Leroy, M. Kirsch-Volders, P. Van Hummelen, J. Jacques, L. Cupers, J. P. Delavignette and R. Lauwerys (1995). "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* **27**(4): 523-43.
- Buening, M. K., P. G. Wislocki, W. Levin, H. Yagi, D. R. Thakker, H. Akagi, M. Koreeda, D. M. Jerina and A. H. Conney (1978). "Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(11): 5358-61.
- Burczynski, M. E. and T. M. Penning (2000). "Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor." *Cancer Res* **60**(4): 908-15.
- Burdick, A. D., J. W. Davis, 2nd, K. J. Liu, L. G. Hudson, H. Shi, M. L. Monske and S. W. Burchiel (2003). "Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells." *Cancer Res* **63**(22): 7825-33.
- Caino, M. C., J. L. Oliva, H. Jiang, T. M. Penning and M. G. Kazanietz (2006). "Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol promotes checkpoint activation and G2/M arrest in human bronchoalveolar carcinoma H358 cells." *Mol Pharmacol* **71**(3): 744-750.
- Calini, V., C. Urani and M. Camatini (2002). "Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells." *Cell Biol Toxicol* **18**(6): 369-79.
- Casale, G. P., M. Singhal, S. Bhattacharya, R. RamaNathan, K. P. Roberts, D. C. Barbacci, J. Zhao, R. Jankowiak, M. L. Gross, E. L. Cavalieri, G. J. Small, S. I. Rennard, J. L. Mumford and M. Shen (2001). "Detection and quantification of depurinated benzo[a]pyrene-adducted DNA bases in the urine of cigarette smokers and women exposed to household coal smoke." *Chem Res Toxicol* **14**(2): 192-201.
- Cavalieri, E. L. and E. G. Rogan (1992). "The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation." *Pharmacol Ther* **55**(2): 183-99.

- Cavalieri, E. L. and E. G. Rogan (1998). Mechanisms of Tumor Initiation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mammals. PAHs and Related Compounds - Biology. A. H. Neilson. Berlin. **3.J**: 83-117.
- Chang, K. W., H. Lee, H. J. Wang, S. Y. Chen and P. Lin (1999). "Differential response to benzo[A]pyrene in human lung adenocarcinoma cell lines: the absence of aryl hydrocarbon receptor activation." Life Sci **65**(13): 1339-49.
- Chen, L., P. D. Devanesan, S. Higginbotham, F. Ariese, R. Jankowiak, G. J. Small, E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (1996). "Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: their significance in tumor initiation." Chem Res Toxicol **9**(5): 897-903.
- Chen, Y.-L., C.-J. Wang and K.-Y. Wu (2005). "Analysis of N7-(benzo[a]pyrene-6-yl)guanine in urine using two-step solid-phase extraction and isotope dilution with liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **19**: 893-898.
- Cleaver, J. E. (2005). "Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair." Nat Rev Cancer **5**(7): 564-73.
- Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations." Mol Biotechnol **26**(3): 249-61.
- Cook, J. W., C. L. Hewett and I. Hieger (1933). "The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar." J Chem Soc **395**: 1-3.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, R. Dove, R. Rozalski, D. Gackowski, A. Siomek, J. Lunec and R. Olinski (2005). "DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine." Mutat Res **574**(1-2): 58-66.
- Crallan, R. A., E. Ingham and M. N. Routledge (2005). "Wavelength dependent responses of primary human keratinocytes to combined treatment with benzo[a]pyrene and UV light." Mutagenesis **20**(4): 305-10.
- de Boer, J. and J. H. Hoeijmakers (2000). "Nucleotide excision repair and human syndromes." Carcinogenesis **21**(3): 453-60.
- de Kok, T. M., H. J. Moonen, J. van Delft and F. J. van Schooten (2002). "Methodologies for bulky DNA adduct analysis and biomonitoring of environmental and occupational exposures." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **778**(1-2): 345-55.
- DeMarini, D. M. (2004). "Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review." Mutat Res **567**(2-3): 447-74.
- Denissenko, M. F., A. Pao, G. P. Pfeifer and M. Tang (1998). "Slow repair of bulky DNA adducts along the nontranscribed strand of the human p53 gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers." Oncogene **16**(10): 1241-7.
- Denissenko, M. F., A. Pao, M. Tang and G. P. Pfeifer (1996). "Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53." Science **274**(5286): 430-2.
- Dipple, A. (1994). "Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA." IARC Sci Publ(125): 107-29.
- Dreij, K., A. Seidel and B. Jernstrom (2005). "Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene in human cells." Chem Res Toxicol **18**(4): 655-64.
- Fenech, M. (2000). "The in vitro micronucleus technique." Mutat Res **455**(1-2): 81-95.
- Fortini, P., E. Parlanti, O. M. Sidorkina, J. Laval and E. Dogliotti (1999). "The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells." J Biol Chem **274**(21): 15230-6.
- Friedewald, W. F. and P. Rous (1944). "The initiating and promoting elements in tumor production." J Exp Med **80**: 101-126.

- Frosina, G., P. Fortini, O. Rossi, F. Carrozzino, G. Raspaglio, L. S. Cox, D. P. Lane, A. Abbondandolo and E. Dogliotti (1996). "Two pathways for base excision repair in mammalian cells." *J Biol Chem* **271**(16): 9573-8.
- Gackowski, D., R. Rozalski, K. Roszkowski, A. Jawien, M. Foksinski and R. Olinski (2001). "8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet." *Free Radic Res* **35**(6): 825-32.
- Geacintov, N. E., M. Cosman, B. E. Hingerty, S. Amin, S. Broyde and D. J. Patel (1997). "NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adduct: principles, patterns, and diversity." *Chem Res Toxicol* **10**(2): 111-46.
- Gendre, C., M. Lafontaine, P. Delsaut and P. Simon (2004). "Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and excretion of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHBaP): assesment of an appropriate sampling time." *Polycyclic Aromatic Compounds* **24**: 433-439.
- Georgiadis, P., J. Topinka, M. Stoikidou, S. Kaila, M. Gioka, K. Katsouyanni, R. Sram, H. Autrup and S. A. Kyrtopoulos (2001). "Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters." *Carcinogenesis* **22**(9): 1447-57.
- Godschalk, R., J. Nair, F. J. van Schooten, A. Risch, P. Drings, K. Kayser, H. Dienemann and H. Bartsch (2002). "Comparison of multiple DNA adduct types in tumor adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking." *Carcinogenesis* **23**(12): 2081-6.
- Godschalk, R. W., D. E. Feldker, P. J. Borm, E. F. Wouters and F. J. van Schooten (2002). "Body mass index modulates aromatic DNA adduct levels and their persistence in smokers." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(8): 790-3.
- Godschalk, R. W., E. J. Moonen, P. A. Schilderman, W. M. Broekmans, J. C. Kleinjans and F. J. Van Schooten (2000). "Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons." *Carcinogenesis* **21**(1): 87-92.
- Godschalk, R. W., F. J. Van Schooten and H. Bartsch (2003). "A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds." *J Biochem Mol Biol* **36**(1): 1-11.
- Granella, M. and E. Clonfero (1993). "Urinary excretion of 1-pyrenol in automotive repair workers." *Int Arch Occup Environ Health* **65**(4): 241-5.
- Guertens, G., G. De Boeck, M. S. Highley, M. Wood, R. A. Maes, A. A. Eggermont, A. Hanauske, E. A. de Bruijn and U. R. Tjaden (2002). "Hyphenated techniques in anticancer drug monitoring. II. Liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry." *J Chromatogr A* **976**(1-2): 239-47.
- Gündel, J. and J. Angerer (2000). "High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenzo[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers." *Journal of Chromatography B* **738**: 47-55.
- Gundel, J., K. H. Schaller and J. Angerer (2000). "Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenz(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene." *Int Arch Occup Environ Health* **73**(4): 270-4.
- Gyorffy, E., L. Anna, Z. Gyori, J. Segesdi, J. Minarovits, I. Soltesz, S. Kostic, A. Csekeo, M. C. Poirier and B. Schoket (2004). "DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by 32P-postlabelling and immunoassay." *Carcinogenesis* **25**(7): 1201-9.

- Hainaut, P. and G. P. Pfeifer (2001). "Patterns of p53 G-->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke." Carcinogenesis **22**(3): 367-74.
- Hakim, I. A., R. B. Harris, S. Brown, H. H. Chow, S. Wiseman, S. Agarwal and W. Talbot (2003). "Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study." J Nutr **133**(10): 3303S-3309S.
- Hanson, A. A., E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (1998). "Synthesis of adducts formed by iodine oxidation of aromatic hydrocarbons in the presence of deoxyribonucleosides and nucleobases." Chem Res Toxicol **11**(10): 1201-8.
- Harri, M., P. Svoboda, T. Mori, P. Mutanen, H. Kasai and K. Savela (2005). "Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine among workers exposed to diesel particulate exhaust: comparison with urinary metabolites and PAH air monitoring." Free Radic Res **39**(9): 963-72.
- Haufroid, V. and D. Lison (2005). "Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: a minireview." Int Arch Occup Environ Health **78**(5): 343-54.
- Hawi, S. R., S. Rochanakij, F. Adar, W. B. Campbell and K. Nithipatikom (1998). "Detection of membrane-bound enzymes in cells using immunoassay and Raman microspectroscopy." Anal Biochem **259**(2): 212-7.
- Hofer, T., C. Badouard, E. Bajak, J. L. Ravanat, A. Mattsson and I. A. Cotgreave (2005). "Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA." Biol Chem **386**(4): 333-7.
- Hollender, J., B. Koch and W. Dott (2000). "Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene hydroxides." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **739**(1): 225-9.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.
- Hu, C. W., M. T. Wu, M. R. Chao, C. H. Pan, C. J. Wang, J. A. Swenberg and K. Y. Wu (2004). "Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(4): 505-10.
- Jacob, J. and G. Grimmer (1996). "Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human." Cent Eur J Public Health **4 Suppl**: 33-9.
- Jacob, J. and A. Seidel (2002). "Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **778**(1-2): 31-47.
- Jankowiak, R. and G. J. Small (1991). "Fluorescence line narrowing: a high-resolution window on DNA and protein damage from chemical carcinogens." Chem Res Toxicol **4**(3): 256-69.
- Jia, X. W., B. C. Liu, X. L. Shi, A. Gao, B. R. You, M. Ye, F. H. Shen and H. J. Du (2005). "[Inhibition of the pathway of benzo (a) pyrene-induced cell cycle changes by all-trans retinoic acid in lung fibroblast]." Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi **23**(5): 329-32.
- Jiang, H., D. K. Vudathala, I. A. Blair and T. M. Penning (2006). "Competing Roles of Aldo-Keto Reductase 1A1 and Cytochrome P4501B1 in Benzo[a]pyrene-7,8-diol Activation in Human Bronchoalveolar H358 Cells: Role of AKRs in P4501B1 Induction." Chem Res Toxicol **19**(1): 68-78.
- Jongeneelen, F. J. (2001). "Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." Ann Occup Hyg **45**(1): 3-13.

- Jongeneelen, F. J., R. B. Anzion, C. M. Leijdekkers, R. P. Bos and P. T. Henderson (1985). "1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product." Int Arch Occup Environ Health **57**(1): 47-55.
- Jongeneelen, F. J., C. M. Leijdekkers, R. P. Bos, J. L. Theuws and P. T. Henderson (1985). "Excretion of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene and mutagenicity in rat urine after exposure to benzo(a)pyrene." J Appl Toxicol **5**(5): 277-82.
- Kanaar, R., J. H. Hoeijmakers and D. C. van Gent (1998). "Molecular mechanisms of DNA double strand break repair." Trends Cell Biol **8**(12): 483-9.
- Kaneko, M. and P. A. Cerutti (1982). "Excision of benzo[a]pyrene diol epoxide I adducts from nucleosomal DNA of confluent normal human fibroblasts." Chem Biol Interact **38**(3): 261-74.
- Kapitulnik, J., P. G. Wislocki, W. Levin, H. Yagi, D. M. Jerina and A. H. Conney (1978). "Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo(a)pyrene which indicate that (+/-)-trans-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydr obenzo(a)pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice." Cancer Res **38**(2): 354-8.
- Kawanaka, Y., E. Matsumoto, K. Sakamoto, N. Wang and S. J. Yun (2004). "Size distributions of mutagenic compounds and mutagenicity in atmospheric particulate matter collected with a low-pressure cascade impactor." Atmosph Environ **38**: 2125-2132.
- Kim, J. Y., S. Mukherjee, L. C. Ngo and D. C. Christiani (2004). "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates." Environ Health Perspect **112**(6): 666-71.
- Koc, H. and J. A. Swenberg (2002). "Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **778**(1-2): 323-43.
- Kramata, P., B. Zajc, J. M. Sayer, D. M. Jerina and C. S. Wei (2003). "A single site-specific trans-opened 7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-deoxyguanosine adduct induces mutations at multiple sites in DNA." J Biol Chem **278**(17): 14940-8.
- Lafontaine, M., C. Champmartin, P. Simon, P. Delsaut and C. Funck-Brentano (2006). "3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of smokers and non-smokers." Toxicol Lett **162**(2-3): 181-5.
- Lafontaine, M., C. Gendre, P. Delsaut and P. Simon (2004). "Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for determining a biological limite value." Polycyclic Aromatic Compounds **24**: 441-450.
- Lafontaine, M., C. Gendre, Y. Morele and G. Laffite-rigaud (2002). "Excretion of urinary 1-hydroxypyrene in relation to the penetration routes of polycyclic aromatic hydrocarbons." Polycyclic Aromatic Compounds **22**: 579-588.
- Langie, S. A., A. M. Knaapen, K. J. Brauers, D. van Berlo, F. J. van Schooten and R. W. Godschalk (2006). "Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair." Mutagenesis **21**(2): 153-8.
- Leblond, F. (2004). Développement d'un biomarqueur d'exposition aux HAP: mise au point du dosage des adduits ADN-benzo[a]pyrène. Master II Recherche Grenoble.
- Ledirac, N., C. Delescluse, G. de Sousa, M. Pralavorio, P. Lesca, M. Amichot, J. B. Berge and R. Rahmani (1997). "Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor." Toxicol Appl Pharmacol **144**(1): 177-82.

- Lee, B. M., S. J. Kwack and H. S. Kim (2005). "Age-related changes in oxidative DNA damage and benzo(a)pyrene diolepoxide-I (BPDE-I)-DNA adduct levels in human stomach." J Toxicol Environ Health A **68**(19): 1599-610.
- Lee, M. L., M. Novotny and K. D. Bartle (1976). "Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates." Anal Chem **48**(11): 1566-72.
- Lehmann, A. R. (2005). "Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells." FEBS Lett **579**(4): 873-6.
- Levin, W., M. K. Buening, A. W. Wood, R. L. Chang, B. Kedzierski, D. R. Thakker, D. R. Boyd, G. S. Gadaginamath, R. N. Armstrong, H. Yagi, J. M. Karle, T. J. Slaga, D. M. Jerina and A. H. Conney (1980). "An enantiomeric interaction in the metabolism and tumorigenicity of (+)- and (-)-benzo[a]pyrene 7,8-oxide." J Biol Chem **255**(19): 9067-74.
- Liu, A. L., W. Q. Lu, Z. Z. Wang, W. H. Chen, W. H. Lu, J. Yuan, P. H. Nan, J. Y. Sun, Y. L. Zou, L. H. Zhou, C. Zhang and T. C. Wu (2006). "Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, lymphocytic micronuclei, and serum glutathione S-transferase in workers exposed to coke oven emissions." Environ Health Perspect **114**(5): 673-7.
- Liu, Z., Y. Lu, B. Rosenstein, M. Lebowitz and H. Wei (1998). "Benzo[a]pyrene enhances the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by ultraviolet A radiation in calf thymus DNA and human epidermoid carcinoma cells." Biochemistry **37**(28): 10307-12.
- Lodovici, M., S. Caldini, C. Luceri, F. Bambi, V. Boddi and P. Dolara (2005). "Active and passive smoking and lifestyle determinants of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human leukocyte DNA." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(12): 2975-7.
- Lodovici, M., P. Dolara, C. Casalini, S. Ciappellano and G. Testolin (1995). "Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet." Food Addit Contam **12**(5): 703-13.
- Lodovici, M., C. Luceri, F. Guglielmi, C. Bacci, V. Akpan, M. L. Fonnesu, V. Boddi and P. Dolara (2004). "Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(8): 1342-8.
- Loft, S., A. Fischer-Nielsen, I. B. Jeding, K. Vistisen and H. E. Poulsen (1993). "8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage." J Toxicol Environ Health **40**(2-3): 391-404.
- Luch, A. (2004). The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons. London.
- Lunec, J., K. A. Holloway, M. S. Cooke, S. Faux, H. R. Griffiths and M. D. Evans (2002). "Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo?" Free Radic Biol Med **33**(7): 875-85.
- Mastrangelo, G., E. Fadda and V. Marzia (1996). "Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man." Environ Health Perspect **104**(11): 1166-70.
- Matullo, G., M. Peluso, S. Polidoro, S. Guarrera, A. Munnia, V. Krogh, G. Masala, F. Berrino, S. Panico, R. Tumino, P. Vineis and D. Palli (2003). "Combination of DNA repair gene single nucleotide polymorphisms and increased levels of DNA adducts in a population-based study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(7): 674-7.
- McCoull, K. D., D. Rindgen, I. A. Blair and T. M. Penning (1999). "Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts." Chem Res Toxicol **12**(3): 237-46.
- McKinnon, P. J. (2004). "ATM and ataxia telangiectasia." EMBO Rep **5**(8): 772-6.
- Mellon, I. (2005). "Transcription-coupled repair: a complex affair." Mutat Res **577**(1-2): 155-61.

- Mellon, I., V. A. Bohr, C. A. Smith and P. C. Hanawalt (1986). "Preferential DNA repair of an active gene in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8878-82.
- Mensing, T., B. Marczynski, B. Engelhardt, M. Wilhelm, R. Preuss, M. Kappler, J. Angerer, H. U. Kafferlein, M. Scherenberg, A. Seidel and T. Bruning (2005). "DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Int J Hyg Environ Health **208**(3): 173-8.
- Ministère de l'emploi, D. (2005). Les expositions aux produits cancérigènes. Huit produits cancérigènes parmi les plus fréquents. Enquête SUMER. Premières informations, premières synthèses. D. Ministère de l'emploi. Paris, Ministère de l'emploi. **28.1**: 28.1.
- Misaki, K., S. Matsui and T. Matsuda (2007). "Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Nonoxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." Chem Res Toxicol **20**(2): 277-83.
- Moller, P. (2006). "The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures." Basic Clin Pharmacol Toxicol **98**(4): 336-45.
- Moller, P. and S. Loft (2004). "Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair." Mutat Res **551**(1-2): 79-89.
- Mooney, L. A., A. M. Madsen, D. Tang, M. A. Orjuela, W. Y. Tsai, E. R. Garduno and F. P. Perera (2005). "Antioxidant vitamin supplementation reduces benzo(a)pyrene-DNA adducts and potential cancer risk in female smokers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(1): 237-42.
- Nilsson, R., R. Nordlinder, B. E. Moen, S. Ovrebo, K. Bleie, A. H. Skorve, B. E. Hollund and C. Tagesson (2004). "Increased urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine in engine room personnel exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Occup Environ Med **61**(8): 692-6.
- Oguri, T., S. V. Singh, K. Nemoto and J. S. Lazo (2003). "The carcinogen (7R,8S)-dihydroxy-(9S,10R)-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene induces Cdc25B expression in human bronchial and lung cancer cells." Cancer Res **63**(4): 771-5.
- Orhan, H., B. van Holland, B. Krab, J. Moeken, N. P. Vermeulen, P. Hollander and J. H. Meerman (2004). "Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise." Free Radic Res **38**(12): 1269-79.
- Osborne, M. and K. Merrifield (1985). "Depurination of benzo[a]pyrene-diolepoxide treated DNA." Chem Biol Interact **53**(1-2): 183-95.
- Osborne, M. R., R. G. Harvey and P. Brookes (1978). "The reaction of trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA involves attack at the N7-position of guanine moieties." Chem Biol Interact **20**(1): 123-30.
- Palli, D., A. Russo, G. Masala, C. Saieva, S. Guarrera, S. Carturan, A. Munnia, G. Matullo and M. Peluso (2001). "DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample." Int J Cancer **94**(1): 121-7.
- Park, E. M., M. K. Shigenaga, P. Degan, T. S. Korn, J. W. Kitzler, C. M. Wehr, P. Kolachana and B. N. Ames (1992). "Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3375-9.
- Park, J. H., A. B. Troxel, R. G. Harvey and T. M. Penning (2006). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species." Chem Res Toxicol **19**(5): 719-28.
- Pavanello, S., D. Favretto, F. Brugnone, G. Mastrangelo, G. Dal Pra and E. Clonfero (1999). "HPLC/fluorescence determination of anti-BPDE-DNA adducts in mononuclear white blood cells from PAH-exposed humans." Carcinogenesis **20**(3): 431-5.

- Pavanello, S., A. Pulliero, B. O. Saia and E. Clonfero (2006). "Determinants of anti-benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct formation in lymphomonocytes of the general population." Mutat Res **611**(1-2): 54-63.
- Pavanello, S., A. Pulliero, E. Siwinska, D. Mielzynska and E. Clonfero (2005). "Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers." Carcinogenesis **26**(1): 169-75.
- Pavanello, S., P. Simioli, S. Lupi, P. Gregorio and E. Clonfero (2002). "Exposure levels and cytochrome P450 1A2 activity, but not N-acetyltransferase, glutathione S-transferase (GST) M1 and T1, influence urinary mutagen excretion in smokers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(10 Pt 1): 998-1003.
- Peltonen, K. and A. Dipple (1995). "Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation." J Occup Environ Med **37**(1): 52-8.
- Peluso, M., F. Merlo, A. Munnia, F. Valerio, A. Perrotta, R. Puntoni and S. Parodi (1998). "32P-postlabeling detection of aromatic adducts in the white blood cell DNA of nonsmoking police officers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(1): 3-11.
- Peluso, M., M. Neri, G. Margarino, C. Mereu, A. Munnia, M. Ceppi, M. Buratti, R. Felletti, F. Stea, R. Quaglia, R. Puntoni, E. Taioli, S. Garte and S. Bonassi (2004). "Comparison of DNA adduct levels in nasal mucosa, lymphocytes and bronchial mucosa of cigarette smokers and interaction with metabolic gene polymorphisms." Carcinogenesis **25**(12): 2459-65.
- Peoples, M. C. and H. T. Karnes (2005). "Recent developments in analytical methodology for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and related compounds." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **827**(1): 5-15.
- Perera, F. P. (1997). "Environment and cancer: who are susceptible?" Science **278**(5340): 1068-73.
- Perera, F. P. and I. B. Weinstein (2000). "Molecular epidemiology: recent advances and future directions." Carcinogenesis **21**(3): 517-24.
- Pfeifer, G. P. and P. Hainaut (2003). "On the origin of G --> T transversions in lung cancer." Mutat Res **526**(1-2): 39-43.
- Phillips, D. H. (1999). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet." Mutat Res **443**(1-2): 139-47.
- Pilger, A., D. Germadnik, K. Riedel, I. Meger-Kossien, G. Scherer and H. W. Rudiger (2001). "Longitudinal study of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in healthy adults." Free Radic Res **35**(3): 273-80.
- Poulsen, H. E., A. Weimann, J. T. Salonen, K. Nyyssonen, S. Loft, J. Cadet, T. Douki and J. L. Ravanat (1998). "Does vitamin C have a pro-oxidant effect?" Nature **395**(6699): 231-2.
- Prevedouros, K., E. Brorstrom-Lunden, J. H. C, K. C. Jones, R. G. Lee and A. J. Sweetman (2004). "Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations: evidence and implications." Environ Pollut **128**(1-2): 17-27.
- Prieme, H., S. Loft, M. Klarlund, K. Gronbaek, P. Tonnesen and H. E. Poulsen (1998). "Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion." Carcinogenesis **19**(2): 347-51.
- Ramakrishna, N. V., F. Gao, N. S. Padmavathi, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan, R. L. Cerny and M. L. Gross (1992). "Model adducts of benzo[a]pyrene and nucleosides formed from its radical cation and diol epoxide." Chem Res Toxicol **5**(2): 293-302.
- Randerath, K., M. V. Reddy and R. C. Gupta (1981). "32P-labeling test for DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(10): 6126-9.

- Randerath, K., P. Sriram, B. Moorthy, J. P. Aston, R. A. Baan, P. T. van den Berg, E. D. Booth and W. P. Watson (1998). "Comparison of immunoaffinity chromatography enrichment and nuclease P1 procedures for ³²P-postlabelling analysis of PAH-DNA adducts." Chem Biol Interact **110**(1-2): 85-102.
- Ravanat, J. L., T. Douki, P. Duez, E. Gremaud, K. Herbert, T. Hofer, L. Lasserre, C. Saint-Pierre, A. Favier and J. Cadet (2002). "Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up." Carcinogenesis **23**(11): 1911-8.
- Ravanat, J. L., B. Duret, A. Guiller, T. Douki and J. Cadet (1998). "Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **715**(2): 349-56.
- Reardon, J. T., T. Bessho, H. C. Kung, P. H. Bolton and A. Sancar (1997). "In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9463-8.
- Rechkoblit, O., Y. Zhang, D. Guo, Z. Wang, S. Amin, J. Krzeminsky, N. Louneva and N. E. Geacintov (2002). "trans-Lesion synthesis past bulky benzo[a]pyrene diol epoxide N2-dG and N6-dA lesions catalyzed by DNA bypass polymerases." J Biol Chem **277**(34): 30488-94.
- Rehwagen, M., A. Muller, L. Massolo, O. Herbarth and A. Ronco (2005). "Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas." Sci Total Environ **348**(1-3): 199-210.
- Reiners, J. J., Jr., A. R. Cantu, A. Pavone, S. C. Smith, C. R. Gardner and D. L. Laskin (1990). "Fluorescence assay for per-cell estimation of cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities in keratinocyte suspensions and cultures." Anal Biochem **188**(2): 317-24.
- Roberts, K. P., J. A. Sobrino, J. Payton, L. B. Mason and R. J. Turesky (2006). "Determination of apurinic/aprimidinic lesions in DNA with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry." Chem Res Toxicol **19**(2): 300-9.
- Rogan, E. G., E. L. Cavalieri, S. R. Tibbels, P. Cremonesi, C. D. Warner, D. L. Nagel, K. B. Tomer, R. L. Cerny and M. L. Gross (1988). "Synthesis and Identification of Benzo[a]pyrene-Guanine Nucleoside Adducts Formed by Electrochemical Oxidation and by Horseradish Peroxidase Catalysed Reaction of Benzo[a]pyrene with DNA." J. Am. Chem. Soc. **110**: 4023-4029.
- Rogan, E. G., P. D. Devanesan, N. V. RamaKrishna, S. Higginbotham, N. S. Padmavathi, K. Chapman, E. L. Cavalieri, H. Jeong, R. Jankowiak and G. J. Small (1993). "Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in mouse skin." Chem Res Toxicol **6**(3): 356-63.
- Rogan, E. G., N. V. RamaKrishna, S. Higginbotham, E. L. Cavalieri, H. Jeong, R. Jankowiak and G. J. Small (1990). "Identification and quantitation of 7-(benzo[a]pyren-6-yl)guanine in the urine and feces of rats treated with benzo[a]pyrene." Chem Res Toxicol **3**(5): 441-4.
- Rojas, M., K. Alexandrov, G. Auburtin, A. Wastiaux-Denamur, L. Mayer, B. Mahieu, P. Sebastien and H. Bartsch (1995). "Anti-benzo[a]pyrene diolepoxide--DNA adduct levels in peripheral mononuclear cells from coke oven workers and the enhancing effect of smoking." Carcinogenesis **16**(6): 1373-6.
- Rojas, M., K. Alexandrov, F. J. van Schooten, M. Hillebrand, E. Kriek and H. Bartsch (1994). "Validation of a new fluorometric assay for benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adducts

- in human white blood cells: comparisons with 32P-postlabeling and ELISA." Carcinogenesis **15**(3): 557-60.
- Rojas, M., B. Marie, J. M. Vignaud, N. Martinet, J. Siat, G. Grosdidier, I. Cascorbi and K. Alexandrov (2004). "High DNA damage by benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma." Cancer Lett **207**(2): 157-63.
- Rosenquist, T. A., D. O. Zharkov and A. P. Grollman (1997). "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7429-34.
- Rozalski, R., A. Siomek, D. Gackowski, M. Foksinski, C. Gran, A. Klungland and R. Olinski (2004). "Diet is not responsible for the presence of several oxidatively damaged DNA lesions in mouse urine." Free Radic Res **38**(11): 1201-5.
- Ruan, Q., S. L. Gelhaus, T. M. Penning, R. G. Harvey and I. A. Blair (2007). "Aldo-Keto Reductase- and Cytochrome P450-Dependent Formation of Benzo[a]pyrene-Derived DNA Adducts in Human Bronchoalveolar Cells." Chem Res Toxicol **20**(3): 424-31.
- Ruan, Q., H. Y. Kim, H. Jiang, T. M. Penning, R. G. Harvey and I. A. Blair (2006). "Quantification of benzo[a]pyrene diol epoxide DNA-adducts by stable isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **20**(8): 1369-80.
- Rubin, H. (2001). "Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates." Carcinogenesis **22**(12): 1903-30.
- Ruchirawa, M., C. Mahidol, C. Tangjarukij, S. Pui-ock, O. Jensen, O. Kampeerawipakorn, J. Tuntaviroon, A. Aramphongphan and H. Autrup (2002). "Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand--particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers." Sci Total Environ **287**(1-2): 121-32.
- Sagher, D. and B. Strauss (1983). "Insertion of nucleotides opposite apurinic/aprimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides." Biochemistry **22**(19): 4518-26.
- Sakamoto, W., H. Isomura, K. Fujie, J. Nishihira, M. Ozaki and S. Yukawa (2003). "Coffee increases levels of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in rats." Toxicology **183**(1-3): 255-63.
- Santella, R. M. (1999). "Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **8**(9): 733-9.
- Shen, Y. M., A. B. Troxel, S. Vedantam, T. M. Penning and J. Field (2006). "Comparison of p53 Mutations Induced by PAH o-Quinones with Those Caused by anti-Benzo[a]pyrene Diol Epoxide in Vitro: Role of Reactive Oxygen and Biological Selection." Chem Res Toxicol **19**(11): 1441-1450.
- Shi, Q., L. E. Wang, M. L. Bondy, A. Brewster, S. E. Singletary and Q. Wei (2004). "Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients." Carcinogenesis **25**(9): 1695-700.
- Shimada, T., K. Inoue, Y. Suzuki, T. Kawai, E. Azuma, T. Nakajima, M. Shindo, K. Kurose, A. Sugie, Y. Yamagishi, Y. Fujii-Kuriyama and M. Hashimoto (2002). "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 **23**(7): 1199-207.
- Simon, P., M. Lafontaine, P. Delsaut, Y. Morele and T. Nicot (2000). "Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **748**(2): 337-48.

- Simpson, C. D., M. T. Wu, D. C. Christiani, R. M. Santella, S. G. Carmella and S. S. Hecht (2000). "Determination of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in human urine by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry." Chem Res Toxicol **13**(4): 271-80.
- Singh, R. and P. B. Farmer (2006). "Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection." Carcinogenesis **27**(2): 178-96.
- Singh, R., M. Gaskell, R. C. Le Pla, B. Kaur, A. Azim-Araghi, J. Roach, G. Koukouves, V. L. Souliotis, S. A. Kyrtopoulos and P. B. Farmer (2006). "Detection and QUantitaion of Benzo[a]pyrene-Derived DNA Adducts in Mouse Liver by Liquid Chromatography-Tndem Mass Spectrometry: Comparison with ³²P-Postlabeling." Chem Res Toxicol **19**: 868-878.
- Siwinska, E., D. Mielzynska and L. Kapka (2004). "Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers." Occup Environ Med **61**(3): e10.
- Sjogren, M., L. Ehrenberg and U. Rannug (1996). "Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency." Mutat Res **358**(1): 97-112.
- Straif, K., R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi and V. Cogliano (2005). "Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons." Lancet Oncol **6**(12): 931-2.
- Swanson, H. I. (2004). "Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective." Chem Biol Interact **149**(2-3): 69-79.
- Tafazoli, S. and P. J. O'Brien (2005). "Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs." Drug Discov Today **10**(9): 617-25.
- Tagesson, C., D. Chabiuk, O. Axelson, B. Baranski, J. Palus and K. Wyszynska (1993). "Increased urinary excretion of the oxidative DNA adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine, as a possible early indicator of occupational cancer hazards in the asbestos, rubber, and azo-dye industries." Pol J Occup Med Environ Health **6**(4): 357-68.
- Tang, D., D. H. Phillips, M. Stampfer, L. A. Mooney, Y. Hsu, S. Cho, W. Tsai, J. Ma, K. J. Cole, M. Ni Shé and F. P. Perera (2001). "Association between carcinogen-DNA Adducts in White Blood Cells and Lung Cancer Risk in the Physicians health Study." Cancer Res **61**: 6708-6712.
- Van Damme, K. and L. Casteleyn (2003). "Current scientific, ethical and social issues of biomonitoring in the European Union." Toxicol Lett **144**(1): 117-26.
- van Schooten, F. J., F. J. Jongeneelen, M. J. Hillebrand, F. E. van Leeuwen, A. J. de Loeff, A. P. Dijkmans, J. G. van Rooij, L. den Engelse and E. Kriek (1995). "Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cell DNA and 1-hydroxypyrene in the urine from aluminum workers: relation with job category and synergistic effect of smoking." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(1): 69-77.
- van Zeeland, A. A., A. J. de Groot, J. Hall and F. Donato (1999). "8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA from leukocytes of healthy adults: relationship with cigarette smoking, environmental tobacco smoke, alcohol and coffee consumption." Mutat Res **439**(2): 249-57.
- Veglia, F., G. Matullo and P. Vineis (2003). "Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(2): 157-60.
- Viau, C., G. Hakizimana and M. Bouchard (2000). "Indoor exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon monoxide in traditional houses in Burundi." Int Arch Occup Environ Health **73**(5): 331-8.
- Wallace, S. S. (1994). "DNA damages processed by base excision repair: biological consequences." Int J Radiat Biol **66**(5): 579-89.

- Wang, J. J., D. G. Frazer, S. Stone, T. Goldsmith, B. Law, A. Moseley, J. Simpson, A. Afshari and D. M. Lewis (2003). "Urinary Benzo[a]pyrene and Its Metabolites as Molecular Biomarkers of Asphalt Fume Exposure Characterized by Microflow LC Coupled to Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry." Analytical Biochemistry A.
- Wang, J. J., W. D. Marshall, D. G. Frazer, B. Law and D. M. Lewis (2003). "Characterization of DNA adducts from lung tissue of asphalt fume-exposed mice by nanoflow liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry." Anal Biochem **322**(1): 79-88.
- Wang, S., Y. Sheng, M. Feng, J. Leszczynski, L. Wang, H. Tachikawa and H. Yu (2007). "Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: relationship between phototoxicity and excited state properties." Environ Toxicol **22**(3): 318-27.
- Weimann, A., D. Belling and H. E. Poulsen (2001). "Measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA and human urine by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." Free Radic Biol Med **30**(7): 757-64.
- Weimann, A., D. Belling and H. E. Poulsen (2002). "Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." Nucleic Acids Res **30**(2): E7.
- Weimann, A., B. Riis and H. E. Poulsen (2004). "Oligonucleotides in human urine do not contain 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine." Free Radic Biol Med **36**(11): 1378-82.
- Weinstein, I. B., A. M. Jeffrey, K. W. Jennette, S. H. Blobstein, R. G. Harvey, C. Harris, H. Atrup, H. Kasai and K. Nakanishi (1976). "Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo." Science **193**(4253): 592-5.
- Wong, J. M., A. B. Okey and P. A. Harper (2001). "Human aryl hydrocarbon receptor polymorphisms that result in loss of CYP1A1 induction." Biochem Biophys Res Commun **288**(4): 990-6.
- Wu, M. T., C. H. Pan, Y. L. Huang, P. J. Tsai, C. J. Chen and T. N. Wu (2003). "Urinary excretion of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and 1-hydroxypyrene in coke-oven workers." Environ Mol Mutagen **42**(2): 98-105.
- Wu, M. T., C. D. Simpson, D. C. Christiani and S. S. Hecht (2002). "Relationship of exposure to coke-oven emissions and urinary metabolites of benzo(a)pyrene and pyrene in coke-oven workers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(3): 311-4.
- Xie, Z., E. Braithwaite, D. Guo, B. Zhao, N. E. Geacintov and Z. Wang (2003). "Mutagenesis of benzo[a]pyrene diol epoxide in yeast: requirement for DNA polymerase zeta and involvement of DNA polymerase eta." Biochemistry **42**(38): 11253-62.
- Xiong, P., M. L. Bondy, D. Li, H. Shen, L. E. Wang, S. E. Singletary, M. R. Spitz and Q. Wei (2001). "Sensitivity to benzo(a)pyrene diol-epoxide associated with risk of breast cancer in young women and modulation by glutathione S-transferase polymorphisms: a case-control study." Cancer Res **61**(23): 8465-9.
- Xu, X., J. Zhang, L. Zhang, W. Liu and C. P. Weisel (2004). "Selective detection of monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(19): 2299-308.
- Xue, W. and D. Warshawsky (2005). "Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review." Toxicol Appl Pharmacol **206**(1): 73-93.

- Yamamoto, J., R. Subramaniam, A. R. Wolfe and T. Meehan (1990). "The formation of covalent adducts between benzo[a]pyrenediol epoxide and RNA: structural analysis by mass spectrometry." Biochemistry **29**(16): 3966-72.
- Yang, S. K. (1988). "Stereoselectivity of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons." Biochem Pharmacol **37**(1): 61-70.
- Yang, Y., W. J. Griffiths, T. Midtvedt, J. Sjøvall, J. Rafter and J. A. Gustafsson (1999). "Characterization of conjugated metabolites of benzo[a]pyrene in germ-free rat urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry." Chem Res Toxicol **12**(12): 1182-9.
- Yoshikawa, M., K. Arashidani and Y. Kodama (1990). "Analysis of 3-hydroxybenzo[a]pyrene by high-performance liquid chromatography using a post-column method." J Chromatogr **532**(1): 155-61.
- Zamzow, D., R. Jankowiak, R. S. Cooper, G. J. Small, S. R. Tibbels, P. Cremonesi, P. Devanesan, E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (1989). "Fluorescence line narrowing spectrometric analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by one-electron oxidation." Chem Res Toxicol **2**(1): 29-34.
- Zhang, X., R. Wu, W. Fu, L. Xu and P. Lam (2004). "Production of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in KB cells co-exposed to benzo[a]pyrene and UV-A radiation." Chemosphere **55**: 1303-1308.
- Zhang, Y., X. Wu, D. Guo, O. Rechkoblit, N. E. Geacintov and Z. Wang (2002). "Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases eta and kappa." Mutat Res **510**(1-2): 23-35.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-9.

Publications et communications

▪ **Publications :**

Marie, C., Maître, A., Douki, T., Gateau, M., Tarantini, A., Guiraud, P., Favier, A., Ravanat, J.-L. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *Journal of Applied Toxicology*, Oct 2007 (E-publication. Ahead of print).

Marie, C., Ravanat, J.-L., Marques, M., Favier, A., Maître, A. Mise au point de nouveaux biomarqueurs d'exposition génotoxique au benzo[a]pyrène. *Bulletin du cancer* 93, 149, 2006.

Marie, C., Vieu, E., Marques, M., Ravanat, J.L., Favier, A., Maître, A. Measurement of DNA adducts as biomarkers of genotoxic exposure to benzo[a]pyrene using a LC-MS/MS technique. *Epidemiology* 17(6): S294-295, Nov 2006.

▪ **Communications affichées lors de congrès internationaux :**

Marie, C., Marques, M., Ravanat, J.-L., Favier, A., Maître, A. (2006) Biomarkers of benzo[a]pyrene exposure: DNA adducts and urinary metabolites. *36th annual meeting of the European Environmental Mutagen Society*, Prague.

Marie, C., Vieu, E., Marques, M., Ravanat, J.-L., Favier, A., Maître, A. (2006) Measurement of DNA adducts as biomarkers of genotoxic exposure to benzo[a]pyrene using a LC-MS/MS technique. *International Conference on Environmental Epidemiology & Exposure*, Paris.

Marie, C., Maître, A., Guiraud P., Ravanat J.-L. (2007). Formation and repair of major benzo[a]pyrene DNA adducts in cellular models. *International Congress of Toxicology XI*, Montréal.

▪ **Communications affichées lors de colloques nationaux :**

Marie, C., Gateau, M., Ravanat, J.-L., Douki, T., Stoklov, M., Marques, M., Favier, A., Maître, A. (2005) Etude des différents adduits ADN-benzo[a]pyrène en tant que biomarqueurs d'exposition génotoxique. *Journées de la Recherche médicale*, Grenoble.

Marie, C., Vieu, E., Tarantini, A., Ravanat, J.-L., Guiraud, P., Favier, A., Maître, A. (2006) Etude de l'exposition et des effets génotoxiques du benzo[a]pyrène par la mise au point de biomarqueurs spécifiques et la mesure des lésions de l'ADN. *Premières journées scientifiques du cancérpôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes*, Clermont-Ferrand.

Marie, C., Ravanat, J.-L., Douki, T., Favier, A., Maître, A. (2006) Mise au point de biomarqueurs d'exposition génotoxique au benzo[a]pyrène à travers l'étude des lésions de l'ADN. *Technologies pour la santé – 2^{ème} rencontre annuelle*, Grenoble.

Table des matières

Liste des abréviations utilisées	3
Chapitre 1 – Introduction bibliographique	9
I- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	9
I-1 Définition	9
I-2 Les HAP dans l'environnement général	10
I-3 Les HAP dans l'environnement professionnel	12
I-4 Effets des HAP sur la santé	13
I-5 Réglementation.....	13
II- Métabolisme du B[a]P et cancérogénèse	15
II-1 Les voies d'activation métabolique du B[a]P	16
II-1-a La voie de mono-oxygénation par les cyt. P450	16
II-1-b La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases	18
II-1-c La voie de formation des quinones du B[a]P par les aldo-kéto réductases (AKR)	19
II-2 L'élimination des métabolites du B[a]P par conjugaison.....	19
II-3 La formation des lésions de l'ADN	21
II-3-a Les adduits du BPDE	22
II-3-b Les adduits du radical cation du B[a]P	24
II-3-c La génotoxicité de la voie des quinones du B[a]P	26
II-4 Conclusion sur la cancérogénicité du B[a]P	28
III- Conséquences biologiques des lésions de l'ADN	30
III-1 Les points de contrôle du cycle cellulaire.....	30
III-2 Les arrêts de cycle	32
III-3 La mort cellulaire.....	34
III-4 La réparation des lésions de l'ADN.....	34
III-4-a La réparation par excision de nucléotides (REN)	34
III-4-b La réparation par excision de bases (REB).....	36
III-4-c La réparation des cassures de l'ADN.....	37
III-5 La réplication des lésions et la survenue de mutations	38
IV- Méthodes de dosage des lésions de l'ADN.....	42
IV-1 Méthodes non chromatographiques.....	42
IV-1-a Le test des Comètes	42
IV-1-b Méthodes immunochimiques.....	43
IV-2 Méthodes chromatographiques.....	44
IV-2-a Le post-marquage	44
IV-2-b La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection de fluorescence (CLHP-Fluo)	45
IV-2-c La chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique (CLHP-EL).....	46
IV-2-d La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM).....	46
V- Surveillance biologique de l'exposition aux HAP chez l'homme : notion de biomarqueurs	50
V-1 Définition des biomarqueurs.....	50
V-2 Biomarqueurs de dose interne des HAP	52
V-3 Biomarqueurs de dose efficace	57
V-4 Biomarqueurs d'effets biologiques précoces.....	63
V-4-a Les lésions oxydatives	63
V-4-b Les effets cytogénétiques et les mutations.....	66
V-5 Biomarqueurs de susceptibilité	68
VI- Conclusion et objectifs de la thèse	71

Chapitre 2 – Synthèse des adduits de l'ADN du B[a]P et mise au point d'une méthode de dosage par CLHP-SM/SM 75

I- Matériels et méthodes	75
I-1 Réactifs et produits	75
I-2 Digestion enzymatique de l'ADN.....	75
I-3 Synthèse des adduits du BPDE	76
I-4 Synthèse électrochimique des adduits du radical cation du B[a]P	77
I-5 Mise au point d'une méthode de dosage par CLHP-SM/SM	78
I-6 Essais d'identification de l'adduit BPDE-Gua.....	79
II- Résultats	79
II-1 Synthèse des adduits du BPDE.....	79
II-2 Synthèse des adduits du radical cation du B[a]P	82
II-3 Mise au point d'une méthode de dosage des adduits du B[a]P par CLHP-SM/SM.....	85
II-3-a Optimisation des paramètres de détection par SM/SM.....	85
II-3-b Optimisation des conditions chromatographiques	87
II-3-c Linéarité et limites de détection de la méthode.....	88
II-3-d Paramètres de la méthode de dosage finale	91
II-4 Essais d'identification de l'adduit BPDE-Gua	92
III- Discussion	94

Chapitre 3 – Etude des adduits de l'ADN du B[a]P dans l'ADN isolé et cellulaire 101

A- Etude des adduits de l'ADN dans l'ADN isolé	101
A-I Matériels et méthodes	101
A-I-1 Analyses des adduits par CLHP-SM/SM.....	101
A-I-2 Traitement d'ADN isolé avec du (±)-anti-BPDE.....	102
A-I-3 Cinétique de formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé.....	102
A-II Résultats	102
A-II-1 Formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé.....	102
A-II-2 Cinétique de formation des adduits du BPDE dans l'ADN isolé	103
A-III Discussion	104
B- Etude des adduits de l'ADN dans les cellules HaCat et HepG2	106
B-I Matériels et méthodes	106
B-I-1 Produits et matériels.....	106
B-I-2 Lignées et culture cellulaires.....	107
B-I-2-a Cellules HepG2	107
B-I-2-b Cellules HaCat	107
B-I-3 Mesure de la cytotoxicité	108
B-I-4 Traitement des cellules avec du (±)-anti-BPDE ou du B[a]P.....	108
B-I-5 Recherche des adduits dépurinants dans les milieux de culture.....	109
B-I-6 Extraction et digestion enzymatique de l'ADN	110
B-II Résultats	111
B-II-1 Etudes cytotoxiques sur les cellules HaCat et HepG2	111
B-II-1-a Cytotoxicité du (±)- <i>anti</i> -BPDE.....	111
B-II-1-b Cytotoxicité du B[a]P	112
B-II-2 Etude des adduits de l'ADN dans les cellules HaCat et HepG2 en présence de (±)-anti-BPDE	112
B-II-2-a Cinétique de formation des adduits dans les cellules HepG2 en présence de (±)- <i>anti</i> -BPDE	112
B-II-2-b Formation des adduits dans les cellules HaCat et HepG2 en fonction de la dose de (±)- <i>anti</i> -BPDE	113
B-II-2-c Réparation des adduits après traitement des cellules HaCat et HepG2 au (±)- <i>anti</i> -BPDE	114

B-II-3 Etude des adduits de l'ADN dans les cellules HaCat et HepG2 en présence de B[a]P	116
B-II-3-a Cinétique de formation des adduits dans les cellules HaCat et HepG2 en présence de B[a]P	116
B-II-3-b Formation des adduits dans les cellules HaCat et HepG2 en fonction de la dose de B[a]P	117
B-II-3-c Evolution des taux d'adduits après un traitement des cellules HaCat et HepG2 au B[a]P	120
B-III Discussion	121

Chapitre 4 – Etude de différents biomarqueurs pour le suivi de l'exposition aux HAP chez l'homme..... 131

A- Etude du 1-OHP et des lésions oxydatives urinaires	131
A-I Matériels et méthodes	131
A-I-1 Population	131
A-I-2 Echantillons urinaires.....	132
A-I-3 Dosage du 1-OHP	132
A-I-4 Dosage de la 8-oxodGuo et de la 8-oxoGuo	133
A-I-5 Présentation et analyse statistique des résultats.....	133
A-I-5-a Niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo, et étude de leurs variations sur une journée une semaine de travail	134
A-I-5-b Etude des corrélations entre les trois biomarqueurs urinaires	135
A-I-5-c Etudes des facteurs confondants âge et tabac sur les niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo.....	135
A-II Résultats	135
A-II-1 Population d'étude	136
A-II-1-a Effectifs de la population	136
A-II-1-b Caractéristiques de la population pour les facteurs âge et tabac	137
A-II-2 Niveaux urinaires de 1-OHP, 8-oxodGuo et 8-oxoGuo, et étude de leur variations sur une journée et une semaine de travail	138
A-II-2-a Niveaux urinaires de 1-OHP	138
A-II-2-b Niveaux urinaires de 8-oxodGuo	139
A-II-2-c Niveaux urinaires de 8-oxoGuo	139
A-II-2-d Variation des niveaux urinaires des biomarqueurs sur une journée de travail	140
A-II-2-e Variation des niveaux urinaires des biomarqueurs sur une semaine de travail	141
A-II-3 Etude des corrélations entre les biomarqueurs urinaires	142
A-II-4 Etude des facteurs confondants âge et tabac sur les niveaux urinaires des trois biomarqueurs ..	146
A-III Discussion.....	147
B- Etude de nouveaux biomarqueurs d'exposition urinaires spécifiques du B[a]P ...	153
B-I Matériels et méthodes	153
B-I-1 Dosage des adduits de l'ADN dans l'urine	153
B-I-2 Mise au point des dosages du 3-OHB[a]P et du tétraol du B[a]P par CLHP-Fluo	154
B-I-3 Mise au point des dosages du 3-OHB[a]P et du tétraol du B[a]P par CLHP-SM/SM.....	154
B-II-Résultats	155
B-II-1 Les adduits de l'ADN	155
B-II-1-a Choix des adduits recherchés dans l'urine	155
B-II-1-b Validation de la méthode de dosage dans l'urine.....	155
B-II-1-c Analyse des urines de sujets exposés aux HAP.....	157
B-II-2 Les métabolites du B[a]P	157
B-II-2-a Choix des métabolites urinaires d'intérêt.....	157
B-II-2-b Mise au point du dosage du 3-OHB[a]P par CLHP-Fluo	158
B-II-2-c Mise au point du dosage du 3-OHB[a]P par CLHP-SM/SM	159
B-II-2-d Mise au point du dosage du tétraol du B[a]P par CLHP-Fluo	162
B-II-2-e Mise au point du dosage du tétraol du B[a]P par CLHP-SM/SM	163
B-III Discussion	167
B-III-1 Les adduits de l'ADN	167

B-III-2 Les métabolites du B[a]P	169
C Recherche des adduits de l'ADN du B[a]P dans les cellules sanguines mononuclées de sujets fumeurs	174
C-I Matériels et méthodes	174
C-I-1 Population	174
C-I-2 Prélèvements et traitement des échantillons.....	174
C-I-3 Analyses CLHP-SM/SM.....	175
C-II Résultats	176
C-II-1 Population.....	176
C-II-2 Quantités d'ADN obtenues.....	176
C-II-3 Analyse des adduits de l'ADN.....	177
C-IV Discussion.....	178
Chapitre 5- Conclusion générale et perspectives.....	183
Références bibliographiques	189
Publications et communications.....	205
Table des matières	207

Annexe

Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts

Caroline Marie,^{1,2} Anne Maître,² Thierry Douki,¹ Mathilde Gateau,^{1†} Adeline Tarantini,² Pascale Guiraud,² Alain Favier¹ and Jean-Luc Ravanat^{1,*}

¹ Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, LCIB (UMR-E 3 CEA-UJF), DRFMC, CEA/Grenoble, 17 Avenue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex 9, France

² Médecine et Santé au Travail, EPSP-TIMC UMR 5525, Faculté de Médecine, Domaine de La Merci, 38700 La Tronche, France

Received 16 May 2007; Revised 9 August 2007; Accepted 9 August 2007

ABSTRACT: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental contaminants. Some of them, including benzo[a]pyrene (B[a]P), are tumorigenic due to their ability to generate DNA adducts. In order to define potential biomarkers of B[a]P exposure, the aim of the study was to identify the major stable DNA adducts in B[a]P-treated human cells. The role played by cellular metabolism on the nature and frequency of the DNA lesions was investigated using keratinocytes (HaCat) and actively metabolizing hepatocytes (HepG2) cell lines. Quantification of DNA damage was carried out by HPLC coupled to tandem mass spectrometry, a sensitive method making possible the selective detection of the different potential stable DNA adducts of B[a]P. These include two adducts of the 7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE) pathway and three adducts of the radical cation pathway. The results indicate that incubation of cells with B[a]P induces almost exclusively the formation of BPDE DNA adducts on purine bases. The amount of DNA adducts generated in hepatocytes was found to be two orders of magnitude higher than that measured in keratinocytes. Interestingly, the level of the DNA adducts produced in the cells incubated with (\pm)-anti-BPDE was similar in the two cell lines, indicating that the difference observed upon incubation with B[a]P could be attributed to different kinetics of B[a]P metabolism. The repair rate of BPDE DNA adducts was identical in the two cell lines with a half-life estimated to be around 20 h. These data support the use of the stable BPDE DNA adducts, as relevant biomarkers of exposure to B[a]P. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: benzo[a]pyrene; metabolism; benzo[a]pyrene-diol-epoxide; DNA adducts; DNA repair; tandem mass spectrometry

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental ubiquitous pollutants found in tobacco smoke, diesel vehicle exhausts, and grilled or smoked food. In addition, high occupational exposures to PAHs are reported among workers involved in aluminium production, carbon electrode manufacture and paving and roofing with coal-tar pitch. It is now generally agreed that occupational exposure to PAHs can induce lung, skin and bladder cancers in humans (Mastrangelo *et al.*, 1996; Boffetta *et al.*, 1997). Carcinogenic PAHs exert their genotoxic action after being metabolized. Indeed, such hydrophobic compounds need to be transformed into

more water soluble metabolites in order to be eliminated in urine. However, some of their metabolites acquire electrophilic properties and therefore are highly reactive towards nucleophilic sites of biomolecules, such as amino groups of DNA bases. Generated DNA adducts may then induce mutations and initiate the formation of cancers (Baird *et al.*, 2005). Because of such toxicity, it is of great importance to be able to evaluate the exposure of individuals to carcinogenic PAHs. In addition to the classic measures of atmospheric PAHs and urinary metabolites concentrations, the quantification of DNA adducts appears to be of major interest, since it allows exposure assessment directly in DNA, the site of the toxic action of PAHs (Perera and Weinstein, 2000; Farmer, 2004).

Of the PAHs, benzo[a]pyrene (B[a]P) is one of the most tumorigenic compounds and was classified in group 1 by the IARC in 2005 (Straif *et al.*, 2005). Three main metabolic pathways of B[a]P have been identified. The best known implicates the cytochrome P450 family that catalyses the mono-oxygenation of PAHs into epoxides. Upon hydrolysis these epoxides are converted into dihydrodiol intermediates that are further metabolized

* Correspondence to: Jean-Luc Ravanat, Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, LCIB (UMR-E 3 CEA-UJF), DRFMC, CEA/Grenoble, 17 Avenue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex 9, France.
E-mail: jravanat@cea.fr

† Present address: Laboratoire de Spectrométrie Physique, 140 rue de la physique BP 87, 38402 St Martin d'Hères Cedex, France.

Contract/grant sponsor: ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie); CEA (Commissariat à l'Energie Atomique).

into 7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE), among which the (+)-*anti*-BPDE is the most tumorigenic (Buening *et al.*, 1978; Kapitulnik *et al.*, 1978). BPDE is able to react with DNA *in vitro* (Xue and Warshawsky, 2005) to form stable DNA adducts mainly on Gua (guanine) and Ade (adenine) (Sayer *et al.*, 1990). To a lesser extent, adduct formation occurs on the N7 position of Gua generating a reported unstable DNA adduct that gives rise to an abasic site upon depurination (Osborne *et al.*, 1978). The second metabolic pathway involves one-electron oxidation of B[a]P catalysed by peroxidases and cytochromes P450 to produce B[a]P radical cations. These highly reactive radicals are known to induce the formation of several DNA adducts, mainly C8 adducts on Gua and N7 adducts on Gua and Ade (RamaKrishna *et al.*, 1992). These adducts are reported to be mainly depurinating. The third pathway corresponds to the oxidation of B[a]P dihydrodiols into catechols by dihydrodiol dehydrogenases of the aldo-keto reductase family. The catechols are then converted into *o*-quinones, such as benzo[a]pyrene-7,8-dione, that can establish redox cycles and lead to the generation of reactive oxygen species (ROS). Although the formation of stable DNA adducts on Gua and Ade (Balu *et al.*, 2004) and depurinating ones on Gua (McCoull *et al.*, 1999) of B[a]P-7,8-dione was demonstrated *in vitro*, this pathway is mainly known to generate oxidative DNA damage through the transient production of ROS (Park *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006).

Thus, formation of B[a]P DNA adducts may involve the BPDE and B[a]P radical cation pathways, the third metabolism pathway involving B[a]P-*o*-quinones generating mainly oxidative DNA lesions. B[a]P DNA adducts have been extensively studied and their formation has been correlated to B[a]P exposure in cellular models and animal experiments (Godschalk *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Briede *et al.*, 2004). In humans, DNA adducts are being monitored more and more, mostly in DNA extracted from blood cells, as potential biomarkers of exposure. In addition, they have been shown to give further information with regard to the risk of cancers outcomes (Tang *et al.*, 2001; Veglia *et al.*, 2003). However, in most reported studies the measurement of DNA adducts has been performed only in a global manner using the ³²P-postlabeling approach. This method exhibits a high sensitivity allowing the measurement of about one DNA adduct per 10⁹ normal nucleosides using a few µg of DNA, but presents a poor specificity (de Kok *et al.*, 2002). Therefore, it is of major importance to develop sensitive and specific methods that can allow the quantification and identification of the different DNA adducts arising from B[a]P metabolism. During the past few years, HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) has appeared as an elite method to detect and quantify biomolecules (Guetens *et al.*, 2002; Boysen and Hecht, 2003) includ-

ing DNA adducts (Koc and Swenberg, 2002; Singh and Farmer, 2006). This assay combines a high specificity and a good sensitivity, in the order of 1 adduct per 10⁸ normal nucleosides. Using such a technique three stable adducts of BPDE, on 2'-deoxyguanosine (dGuo), 2'-deoxyadenosine (dAdo) and 2'-deoxycytidine (dCyd) were quantified in lung tissue of asphalt fume-exposed mice (Wang *et al.*, 2003a), and all four diastereoisomers of BPDE DNA adducts on both dGuo and dAdo, were quantified simultaneously upon BPDE exposure of either isolated DNA or cells (Ruan *et al.*, 2006).

In summary, both *in vitro* and *in vivo* studies have led to the identification of a wide array of DNA adducts resulting from exposure to B[a]P. However, there is a paucity of studies focused on the determination of the relative frequency of DNA adducts resulting from the different B[a]P metabolism pathways (Chen *et al.*, 1996; Banasiewicz *et al.*, 2004). The present work addresses this question by searching for the different potential DNA adducts in human cultured cells exposed to either B[a]P or its ultimate metabolite BPDE. The targeted lesions were stable adducts because the depurinating ones are unlikely to be recovered from available human samples such as blood cells. In order to obtain information potentially relevant to different types of organ, both poorly and actively metabolizing cell lines were used. Comparisons were thus made between the HaCat cell line, keratinocytes being one of the target cells for PAHs, and a hepatocyte cell line (HepG2) recognized as a competent model for the study of carcinogens (Knasmüller *et al.*, 1998). In addition, the question of the kinetics of formation and repair of the DNA adducts following exposure to either B[a]P or BPDE was addressed. Adducts were quantified by HPLC associated to tandem mass spectrometry following enzymatic hydrolysis of DNA.

Materials and Methods

Caution: PAHs are carcinogens and potentially tumorigenic to humans. These compounds should be handled with care (NIH Guideline for the Use of Chemical Carcinogens).

Chemicals and Reagents

B[a]P and (±)-*anti*-BPDE were purchased from the National Cancer Institute (Bethesda, MD). Calf thymus DNA, dGuo, nuclease P1 (penicillium citrium), phosphodiesterase II and deferoxamine were obtained from Sigma (St Quentin-Fallavier, France). Alkaline phosphatase was from Roche (Neuilly sur Seine, France), and phosphodiesterase I (*Crotalus adamantus* venom) was purchased from Amersham (Piscataway, NJ). Reagents used for cell culture including DMEM medium with L-glutamine and

pyruvate, RPMI medium, fetal calf serum, PBS \pm CaCl₂ and MgCl₂ were from Gibco (Grand Island, NY) and EDTA 0.02%, MEM non-essential amino acids solution, collagen type I rat tail were from Sigma. Solvents used for HPLC were of analytical grade. Deionized water was prepared with a Millipore Milli-Q water purification system (Molsheim, France).

Synthesis of BPDE Adducts and Purification using an On-line HPLC-MS/MS Procedure

A mixture of 1.53 μ mol of (\pm)-*anti*-BPDE and 12.2 μ mol of DNA (4 mg) was dissolved into 2 ml of deionized water and stirred in the dark for 5 days at 37 °C. DNA was then precipitated and subsequently digested to nucleosides as previously described (Ravanat *et al.*, 2002). Briefly, 0.25 μ l of phosphodiesterase II (0.1 U μ l⁻¹), 2.5 units of DNase II, 0.5 unit of nuclease P1 and 10 μ l of MNSPDE buffer (acid succinic 200 mM, CaCl₂ 100 mM, pH 6) were added to 500 μ l of DNA (2 mg ml⁻¹ in H₂O). Then incubation was performed for 2 h at 37 °C. Thereafter, 2 units of phosphatase alkaline was added together with 0.5 μ l of phosphodiesterase I (0.03 U μ l⁻¹) and 6 μ l of Palk buffer (Tris 500 mM, EDTA 1 mM, pH 8) and the incubation was resumed for 2 h at 37 °C. Subsequently, 3.5 μ l of HCl (0.1 N) were added to neutralize the solution and undigested DNA was precipitated with 10% (v/v) of 4 M NaCl and 2.5 volumes of cold ethanol.

The purification of the DNA adducts from the DNA hydrolysate was performed on a C18 reversed-phase Uptisphere octadecylsilyl silica gel (ODB) column (250 \times 4.6 mm i.d., 5 μ m particles size) from Interchim (Montluçon, France) with a linear gradient from 30% to 70% of CH₃CN in 10 mM ammonium formate (pH 6.8). At the output of the column, a split was introduced to allow only 5% of the flow to enter the tandem mass spectrometer, the remaining 95% being collected. Adducts were detected and identified according to their molecular weight and fragmentation pattern (*vide infra*). Collected fractions were pooled and evaporated to dryness and the resulting products were dissolved into water and calibrated by UV absorption using the molar absorption coefficient of (\pm)-*anti*-BPDE determined to be 41 000 at 279 nm in water (Barry *et al.*, 1996).

Electrochemical Synthesis of B[a]P Adducts

The synthesis was conducted with a Voltalab PGZ 301 from Radiometer Analytical. The cell was equipped with a silver reference electrode (Ag⁺ 10 mM/Ag) and a platinum counter electrode. The working electrode (0.7 cm²) was made of platinum. The oxidation potential used for the synthesis (850 mV) was equal to the anodic peak potential of B[a]P measured using cyclic voltammetry.

The synthesis was performed as previously described elsewhere (Rogan *et al.*, 1988). Briefly, 35 ml of freshly distilled dimethylformamide (DMF) containing 0.5 M of KClO₄ was placed in the electrochemical cell under argon. Then 0.5 mmol of dried dGuo was added, and stirring was continued until the solution was clear. Desiccated B[a]P (0.05 mmol) was then added as a solid and after its dissolution the cell was switched on. The electrode potential was gradually raised to 850 mV and kept constant during the electrolysis. The total charge was monitored throughout the experiment and the reaction was stopped when the consumed charge had reached 65% of the calculated theoretical charge.

Thereafter, DMF was removed under vacuum. The dark brown residue was dissolved in Me₂SO/H₂O (2:3 v/v) and the supernatant obtained after centrifugation was analysed by HPLC using an L-6200 Merck pump coupled with a L-4000 UV detector set at 296 nm. The column used was a C18 reversed-phase Uptisphere ODB (250 \times 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) from Interchim and the gradient was linear from 15% of CH₃CN in 10 mM ammonium formate to 100% CH₃CN in 45 min. The major products afforded by HPLC separation were characterized using HPLC-MS/MS taking into account that B[a]P-dGuo adducts have a molecular weight of 517 Da. The B[a]P-dGuo adduct solutions were then evaporated to dryness and dissolved into methanol. The resulting solutions were calibrated by UV absorption using the molar absorption coefficient of B[a]P in alcohol (ϵ = 22 909 at 364 nm) and taking into account the 8–10 nm bathochromic shift in the UV absorption spectra of B[a]P-DNA adducts compared with B[a]P (Rogan *et al.*, 1988).

HPLC-MS/MS Analysis

The system consisted of an Agilent (Massy, France) 1100 HPLC apparatus equipped with a binary pump, a thermostated autosampler and an UV detector. Chromatographic separations were performed using a C8 reversed phase Uptisphere ODB (150 \times 2 mm i.d., 3 μ m particle size) column from Interchim. The elution was linear from 0% to 100% of acetonitrile in 2 mM ammonium formate over 30 min, at a flow rate of 0.2 ml min⁻¹. The HPLC system was coupled to an API 3000 tandem mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with an electrospray ionization source. Measurement of DNA adducts was achieved in the positive ionization mode using the multiple reaction detection method. To improve the sensitivity of the detection all parameters of the MS/MS system were optimized for each adduct. DNA adducts were quantified by external calibration. Prior and after each series of analyses, a calibrated curve was obtained by injection of various amounts ranging from 5 to 500 fmol of a mixture of the synthesized DNA adducts.

The amounts of normal nucleosides were determined with an external calibration by using the UV detector set up at 270 nm as described previously (Ravanat *et al.*, 2002), and results, representing, if not otherwise indicated, the average and standard deviation of three independent determinations, are expressed as the number of DNA adducts per million normal nucleosides.

Cell Lines and Culture

HepG2 human hepatoblastoma cells (Aden *et al.*, 1979) were cultured in DMEM with L-glutamine (4 mM) and pyruvate (1 mM), 10% fetal calf serum v/v, penicillin (100 U ml⁻¹), streptomycin (100 µg ml⁻¹) and non essential amino acids 1% v/v, in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. The flasks were first coated with collagen (1 mg ml⁻¹) diluted to 1% v/v in sterile water for 30 min at 37 °C and then washed twice with PBS prior to cell culture. HaCat (Boukamp *et al.*, 1988) cells were cultured in RPMI medium with L-glutamine (4 mM), 10% v/v fetal calf serum, penicillin (5000 U ml⁻¹) and streptomycin (5000 µg ml⁻¹), in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

Cytotoxicity Assays

A B[a]P stock solution was prepared in Me₂SO at a 10 mg ml⁻¹ (39.6 mM) final concentration and the (±)-*anti*-BPDE stock solution was at a 7.32 mM concentration in THF 5% triethylamine. The cytotoxicity of B[a]P and (±)-*anti*-BPDE on HaCat and HepG2 cells was evaluated with the MTT assay in 96-well plates. The cells were plated at a density of 20 000 cells per well and allow to grow overnight. The culture medium was then removed and cells were incubated for 24 h with B[a]P or (±)-*anti*-BPDE dissolved in Me₂SO so that the final concentration of the solvent in the culture medium did not exceed 0.5% v/v. The cells were then washed twice with PBS and incubated for 2 h at 37 °C in the culture medium containing MTT. The cells were finally rinsed with PBS and lysed with Me₂SO and the absorbance at 570 nm was measured.

Incubation of Cells with B[a]P or (±)-*anti*-BPDE

The cells were seeded in 25 cm² flasks and incubated at early confluence (approximately 4 × 10⁶ cells) with B[a]P and BPDE dissolved in Me₂SO so that the final concentration of the solvent in the culture medium did not exceed 0.5% v/v. Cells were incubated with increasing concentrations of B[a]P (0, 100, 200, 400 µM for HaCat cells and 0, 1, 10, 50 µM for HepG2 cells) or (±)-*anti*-BPDE (0, 0.1, 1, 2 µM for both cell lines) and DNA adducts were measured after 24 h or 30 min, respectively.

After treatment, the cells were rinsed twice with EDTA 0.2% or PBS for HepG2 and HaCat cells, respectively, trypsinated and harvested by centrifugation. If DNA extraction was not performed immediately after cell treatment, the cell pellets were stored frozen at -80 °C. For the determination of the kinetics of repair, the DNA adducts were measured immediately after treatment with either B[a]P (200 µM and 10 µM for HaCat and HepG2 cells, respectively) for 24 h or (±)-*anti*-BPDE (0.5 µM for both cell lines) for 1 h, or cells, washed twice with PBS, were reincubated in fresh culture medium for increasing periods of time up to 48 h. DNA was extracted using the chaotropic method described in detail elsewhere (Ravanat *et al.*, 2002) and hydrolysed as described above. The samples were then lyophilized overnight, dissolved in MeOH:H₂O (50:50 v/v) prior to HPLC-MS/MS analysis.

Results

Synthesis of BPDE and B[a]P DNA Adducts

Incubation of isolated DNA with (±)-*anti*-BPDE allowed the preparation of two stable BPDE adducts: BPDE-N2-dGuo, BPDE-N6-dAdo whose patterns of tandem mass spectrometry fragmentation have been described previously (Wang *et al.*, 2003b). The collision-induced dissociation mass spectra obtained for BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo using the MS/MS system are presented in Fig. 1. The transitions used for the detection of these two adducts were chosen among characteristic fragments: m/z 570.4 [MH]⁺ → m/z 257.2 [BPDE - H₂O - CO]⁺, m/z 454.2 [BPDE-Gua]⁺, m/z 285.2 [BPDE - H₂O]⁺, m/z 303.2 [BPDE]⁺ and m/z 554.4 [MH]⁺ → m/z 257.2 [BPDE - H₂O - CO]⁺, m/z 285.2 [BPDE - H₂O]⁺, m/z 136.2 [Ade]⁺, m/z 303.2 [BPDE]⁺ for BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo, respectively. The electrochemical synthesis of B[a]P adducts with dGuo afforded three stable B[a]P-dGuo adducts as inferred from HPLC-MS/MS analysis of the collected fractions. The collision-induced dissociation mass spectra of the different adducts indicate that the three obtained nucleosidic adducts B[a]P-dGuo ([M+H]⁺ = 518) exhibited similar patterns of fragmentation. Indeed fragments m/z 402 (B[a]P-Gua)⁺, m/z 385 (B[a]P-Gua - NH₂)⁺, m/z 360 (B[a]P-Gua - CN₂)⁺, m/z 277 (B[a]P + CN)⁺ and m/z 252 (B[a]P)⁺ were observed for all adducts but with different relative intensities. The collision-induced dissociation mass spectra features of the different B[a]P adducts are not sufficient to attribute completely the exact chemical structure of these adducts, and more precisely the site of binding between B[a]P and dGuo. However, comparison of mass spectrometric and chromatographic features of purified adducts with published data strongly suggests that the adduct C obtained in higher yield is B[a]P-C8-dGuo, and that the two other minor stable adducts are most

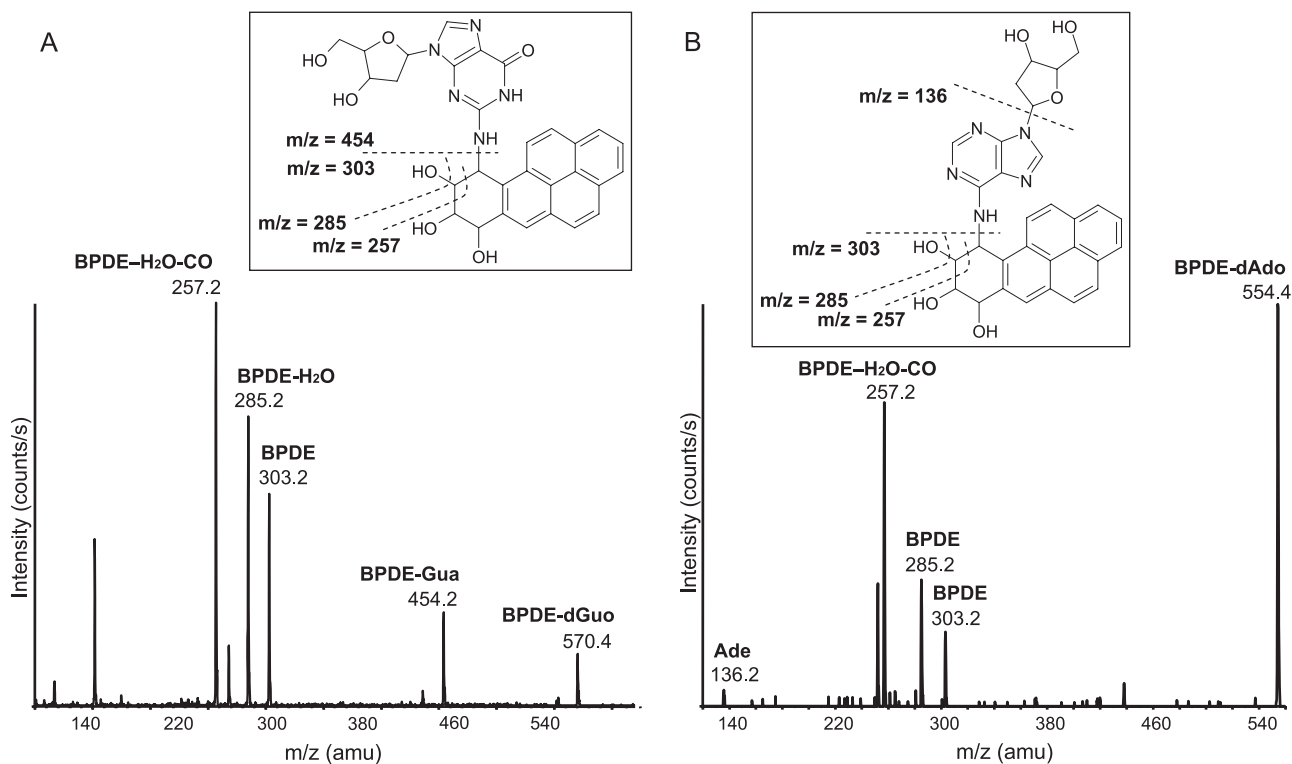


Figure 1. Collision-induced dissociation mass spectra of BPDE-N2-dGuo (panel A) and BPDE-N6-dAdo (panel B)

probably N2 and N3 dGuo adducts (Rogan *et al.*, 1988). Prior to performing additional experiments to determine the chemical structure of the adducts, efforts were first devoted to define which one, if any, was generated in cells.

HPLC-MS/MS Analysis

Chromatographic conditions were optimized to detect the five DNA adducts, two from the BPDE pathway, i.e.

BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo, and three from the radical cation pathway, simultaneously in a single analysis. The transitions and the optimized parameters together with the limits of detection ($S/N = 3$) obtained for the different DNA adducts (assigned from A to E according to their order of elution) are reported in Table 1. According to the limit of sensitivity of the assay, that depends on the nature of the adduct, this approach enables the detection of about one lesion per 10^8 normal nucleosides using $100 \mu\text{g}$ of DNA. For each adduct, the response of the HPLC-MS/MS detection method was found to be

Table 1. HPLC-MS/MS features, including retention time (RT) and optimized MS/MS parameters for the two BPDE adducts (A–B) and the three B[a]P adducts (C–E). IS, ionization spray voltage; CE, collision energy; LOD, limit of detection. The most abundant transitions used to detect each adduct are listed and the numbers in brackets represent the relative intensities of the less intense transitions

Adduct	RT (min)	IS (V)	Transitions	CE (eV)	LOD (fmol)
BPDE-N2-dGuo A	17.3	5500	570.4→257.2	45	2
			570.4→454.2 (90)	19	
			570.4→285.2 (45)	28	
			570.4→303.2 (40)	20	
			570.4→303.2 (35)	25	
BPDE-N6-dAdo B	18.3	5000	554.4→257.2	55	20
			554.4→285.2 (55)	30	
			554.4→136.2 (35)	55	
			554.4→303.2 (35)	25	
			554.4→303.2 (35)	25	
B[a]P-dGuo C	19.9	5500	518.2→402.2	40	2
B[a]P-dGuo E	20.2		518.2→252.2 (45)	65	
			518.2→277.2 (20)	90	
B[a]P-dGuo D	20.2	5500	518.2→402.2	40	3
			518.2→277.2 (40)	70	
			518.2→252.2 (10)	60	
			518.2→385.2 (10)	50	

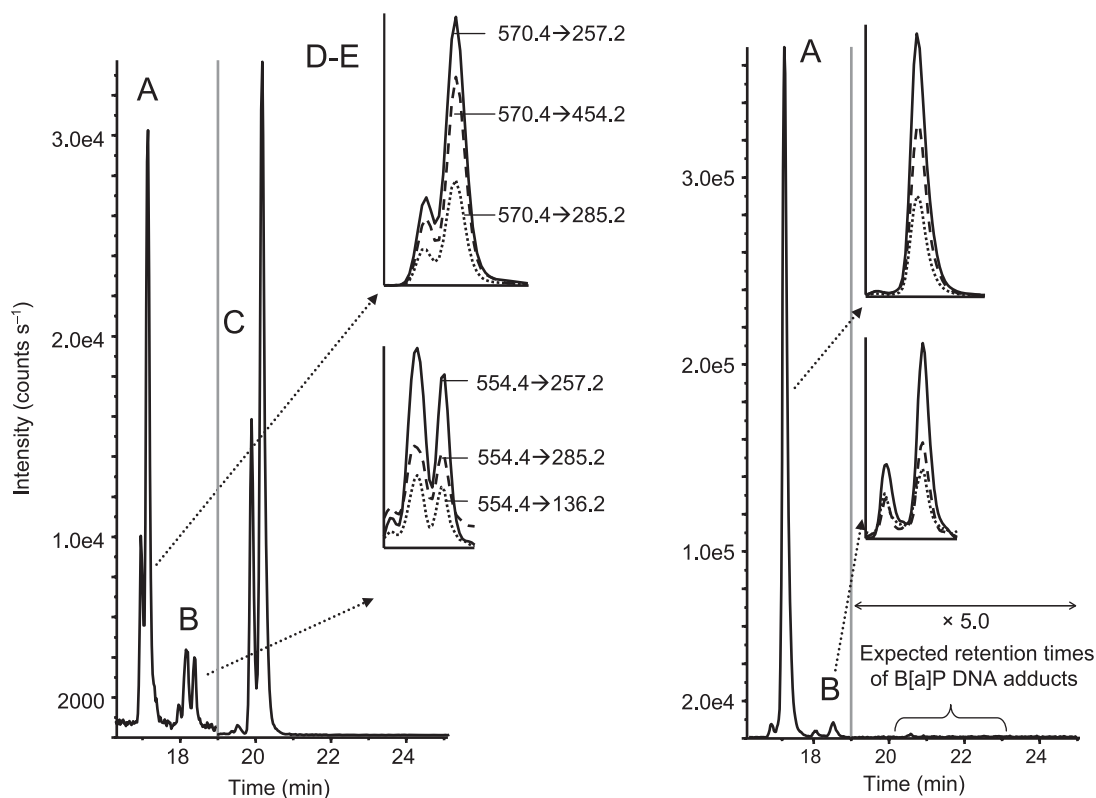


Figure 2. Left panel: total ion current HPLC-MS/MS chromatogram obtained for the analysis of 500 fmol of the adducts A–E. Right panel: total ion current HPLC-MS/MS chromatogram of a hydrolysed DNA sample obtained from HepG2 cells treated with 50 μM of B[a]P. The relative intensities of the different transitions used for the detection of BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo are presented in both panels

linear over at least three orders of magnitude. To improve the specificity of detection, efforts were made to use at least three transitions per adduct. A typical chromatogram representing the analysis of a mixture of 500 fmol of each DNA adduct is represented in Fig. 2, left panel. The transitions used for the detection of BPDE-N2-dGuo (A) and BPDE-N6-dAdo (B) were monitored simultaneously between 0 and 19 min. Then, the system was used to detect B[a]P-dGuo adducts (C to E). It should be noticed that under the chromatographic conditions used adducts D and E could not be resolved. For both BPDE-N2-dGuo (A) and BPDE-N6-dAdo (B) adducts two major peaks were detected (with a similar relative intensity for the different transitions) likely corresponding to the different possible existing diastereoisomers (Ruan *et al.*, 2006).

Cytotoxicity Assays

The LD₅₀ for B[a]P was determined, using the MTT assay, to be around 50 μM and 1000 μM for HepG2 and HaCat cells, respectively. Concerning (\pm)-anti-BPDE, the LD₅₀ was around 5 μM and 2 μM for HepG2 and HaCat cells, respectively, indicating that the two cell lines have a similar sensitivity to (\pm)-anti-BPDE, in contrast to that observed for B[a]P.

DNA Adducts Formation in Cells incubated with (\pm)-anti-BPDE

The levels of the different BPDE DNA adducts in HaCat and HepG2 cells incubated with (\pm)-anti-BPDE were determined using the developed HPLC-MS/MS approach subsequently to DNA extraction and digestion. Preliminary experiments (data not shown) indicated that the maximum adduct formation was obtained after incubation of the cells for about 45–60 min, and that after 10 min half of the maximum adduct level was reached. The analysis of DNA extracted from HaCat and HepG2 cells incubated with increasing concentrations of (\pm)-anti-BPDE for 30 min revealed a dose-dependent formation of the two stable adducts BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo (Fig. 3). BPDE-N2-dGuo was found to be the major adduct, produced in about three times larger yield than BPDE-N6-dAdo in both HepG2 and HaCat cells.

Kinetics of Repair of BPDE-N2-dGuo Adducts in Cells Treated with (\pm)-anti-BPDE

The kinetics of repair of BPDE-N2-dGuo determined in both cell lines over 48 h post-treatment is presented in Fig. 4. The kinetics of elimination of BPDE-N2-dGuo

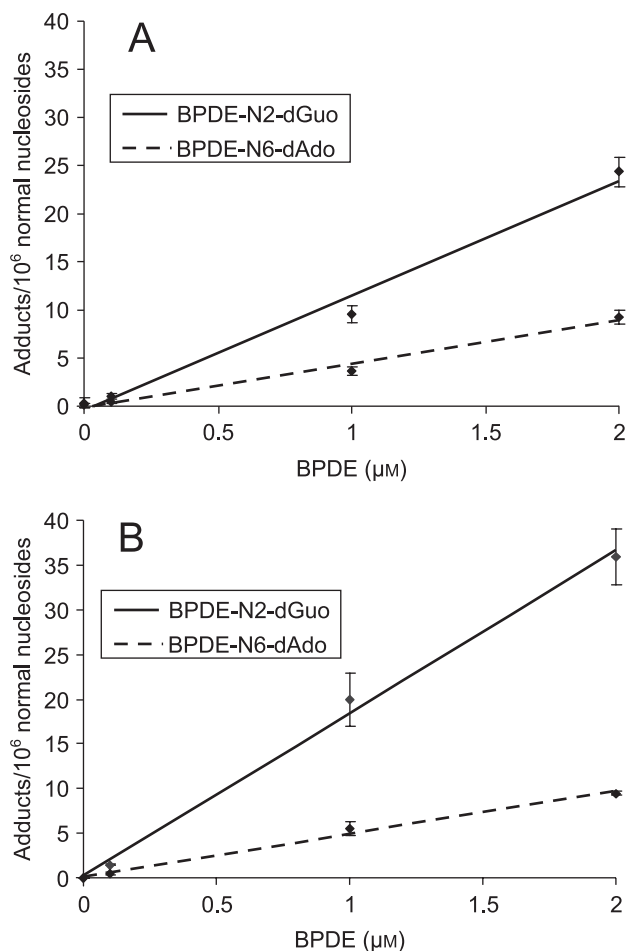


Figure 3. Levels of DNA adducts determined in HaCat (A) and HepG2 (B) cells incubated with increasing concentrations of (\pm)-anti-BPDE

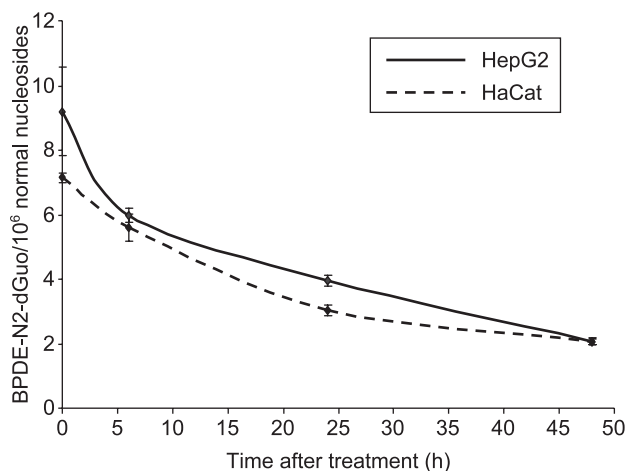


Figure 4. Kinetics of elimination of BPDE-N2-dGuo adduct in HepG2 (black line) and HaCat (dashed line) cells treated with (\pm)-anti-BPDE ($0.5 \mu\text{M}$)

was similar for both cell lines. About 60% and 75% of BPDE-N2-dGuo (and BPDE-N6-dAdo, data not shown) were eliminated 24 h and 48 h after the end of the treatment, respectively, in both HepG2 and HaCat cells.

Adduct Formation in Cells Treated with B[a]P

The levels of DNA adducts in HaCat and HepG2 cells incubated with B[a]P for 24 h are presented in Fig. 5. As a striking result, even using high B[a]P concentrations no stable B[a]P-dGuo adducts arising from the radical cation pathway were detected in the two cell lines. According to the limits of the HPLC-MS/MS technique, and the amounts of extracted DNA, it could be estimated that DNA adducts arising from the radical cation pathway represent less than 0.5% and 20% of BPDE DNA adducts in HepG2 and HaCat cells, respectively (Table 2). In both hepatocyte and keratinocyte cells, adducts arising

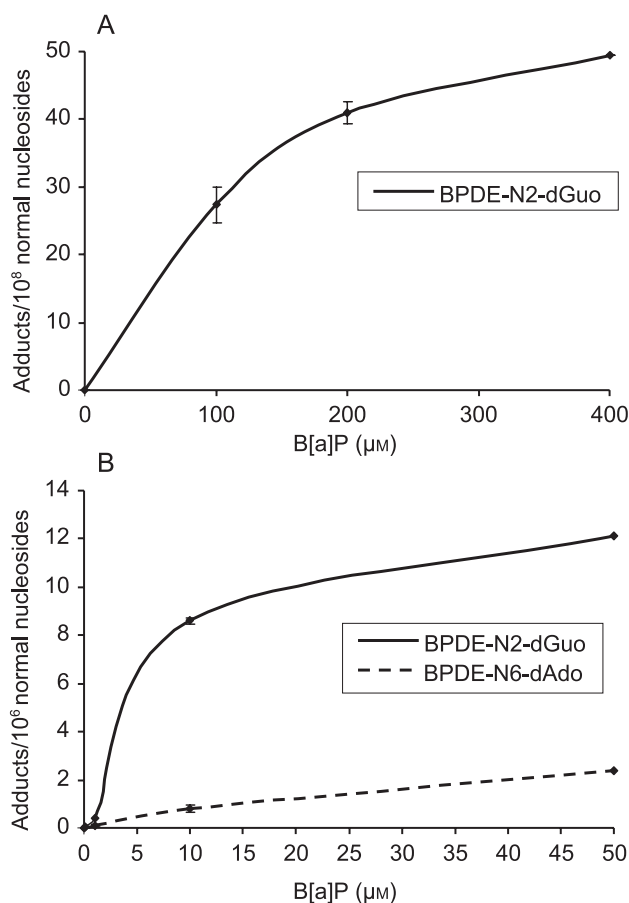


Figure 5. Measured levels of BPDE-N2-dGuo (black line) and BPDE-N6-dAdo (dashed line) in HaCat (A) and HepG2 (B) cells incubated in the presence of increasing concentrations of B[a]P. Results representing the average and standard deviation of two independent determinations, are given in number of lesions per 10^8 and 10^6 normal nucleosides for HaCat and HepG2 cells, respectively

Table 2. Adduct levels measured in either HaCat cells treated with 100 μM of B[a]P or in HepG2 cells treated with 10 μM of B[a]P. When DNA adducts were not detected, the reported values were estimated according to the limit of sensitivity of the assay

	Cells B[a]P (μM)	HepG2 10	HaCat 100
Adducts/ 10^8 normal nucleosides	BPDE-N2-dGuo	860	27
	BPDE-N6-dAdo	80	<40
	B[a]P-dGuo	<5	<5

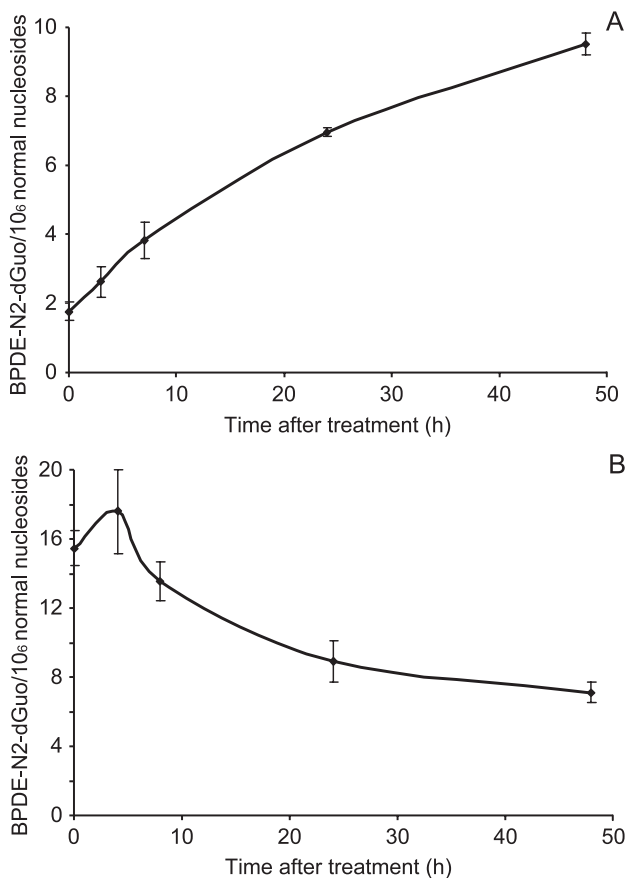


Figure 6. Kinetics of evolution of BPDE-N2-dGuo in HaCat (A) and HepG2 (B) cells upon 24 h incubation with 200 μM and 10 μM of B[a]P, respectively

from the BPDE metabolism pathway were detected. In HaCat cells, high concentrations (100–400 μM) of B[a]P were required to generate sufficient amounts of BPDE-N2-dGuo to allow its detection. In contrast, micromolar concentrations of B[a]P were sufficient in HepG2 cells to generate detectable levels of both BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo. As observed in (\pm)-anti-BPDE-treated cells, BPDE-N6-dAdo was produced in lower amounts, representing 20% of those of BPDE-N2-dGuo. According to these results, it could be estimated that the level of DNA adducts generated in the HepG2 cells upon B[a]P treatment was two orders of magnitude higher than that

measured in the HaCat cells. The chromatogram obtained for the analysis of the DNA extracted from HepG2 cells incubated with 50 μM of B[a]P is presented in Fig. 2, right panel. It should be mentioned that only one major peak for BPDE-N2-dGuo (A) was observed in B[a]P-treated cells, in comparison with the two peaks obtained upon (\pm)-anti-BPDE-treated isolated DNA. This could be attributed to the formation of a different relative ratio of the possible diastereoisomers upon treatment with B[a]P or (\pm)-anti-BPDE (*vide infra*). A similar observation was made for BPDE-N6-dAdo (B).

Time Course Formation and Repair of DNA Adducts in Cells Treated with B[a]P

The time course of formation and repair of DNA adducts could not be assessed in both cell lines under similar conditions since important differences in terms of adduct formation were observed between HaCat and HepG2 upon incubation with B[a]P. Thus, two concentrations were chosen, 200 μM and 10 μM for HaCat and HepG2 cells, respectively, in order to allow DNA adduct detection under mild cytotoxic conditions. In the hepatocytes, the level of BPDE-N2-dGuo adduct (and also BPDE-N6-dAdo adduct, data not shown) was found to reach a maximum soon after the end of the 24 h treatment, and then decreased, indicating that the cells were able to eliminate the generated DNA lesions (Fig. 6). About 50% and 60% of BPDE-N2-dGuo were eliminated after 24 h and 48 h, respectively, post-incubation of the cells in the culture medium. Such a kinetic of elimination of the DNA adduct is similar to that determined upon incubation of the cells with (\pm)-anti-BPDE (*vide supra*). Interestingly, in the HaCat cells, the kinetics of formation and elimination of the DNA adduct were totally different since the level of the BPDE-N2-dGuo adduct was still increasing even when the cells were washed and reincubated in fresh culture medium. Such a result indicates that after 24 h of treatment, HaCat cells have not completely metabolized the B[a]P that is still present in sufficient concentration to generate significant levels of DNA adducts. Such a formation is so great that it overcomes the DNA repair capacities of the HaCat cells.

Discussion

One of the aims of the present study was to identify the most frequent stable B[a]P-induced DNA adducts in human cells among the wide number of lesions identified in the past two decades. For that purpose, a sensitive and specific HPLC-MS/MS method was used, allowing the simultaneous detection of several stable DNA adducts produced either by addition of the metabolite BPDE or through the radical cation chemistry.

The synthesis of BPDE adducts performed upon incubation of isolated DNA in the presence of (\pm)-*anti*-BPDE afforded, subsequently to enzymatic digestion of DNA, two major stable adducts, BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo. As observed previously (Wang *et al.*, 2003a), the corresponding dCyd adduct was obtained in a minor proportion and was not therefore monitored in this study. The other investigated pathway for the genotoxicity of B[a]P was the formation of DNA adducts through the transient formation of the radical cation of this carcinogen. An electrochemical synthesis strategy was adopted to prepare the corresponding adducts of dGuo. Using such an approach three B[a]P-dGuo adducts were obtained.

In order to obtain specific and accurate quantitative information on the frequency of formation of these lesions, an HPLC-MS/MS method was optimized that allowed us the simultaneous detection of the different DNA adducts with limits of detection ranging from 2 to 20 fmol injected (Table 1). The best sensitivity was obtained for BPDE-N2-dGuo, corresponding to the detection of about 1 BPDE-N2-dGuo adduct per 10^8 normal nucleosides using 100 μ g of DNA. Such a limit of detection is one order of magnitude lower than that already reported using HPLC-MS/MS (Ruan *et al.*, 2006), but still higher than the limits of detection reported using the 32 P-postlabeling assay (de Kok *et al.*, 2002). However, the postlabeling approach is far less specific.

Incubation of HaCat and HepG2 cells with (\pm)-*anti*-BPDE afforded the two stable adducts, BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo, in a dose-dependent manner. When the cells were treated with (\pm)-*anti*-BPDE under identical conditions, the levels of the generated adducts were similar for the two cell lines. BPDE-N2-dGuo was produced in a higher yield, and BPDE-N6-dAdo represented about 30% of BPDE-N2-dGuo, in both HaCat and HepG2 cells. The relative formation of BPDE-N6-dAdo was found to be higher in isolated DNA, upon exposure to (\pm)-*anti*-BPDE, representing 60% of BPDE-N2-dGuo (not shown). Although these percentages were higher than the 0.4% and 2.5% determined by Ruan and coworkers in cells and isolated DNA, respectively (Ruan *et al.*, 2006), they were of the same trend, exhibiting a lower formation of BPDE-N6-dAdo in cells than in isolated DNA. The results are, in contrast, lower than the 82% found in lung tissue of asphalt fume-exposed mice (Wang *et al.*, 2003a). Such differences concerning the relative formation of

BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo adducts are difficult to address, but methodological considerations may partly explain such apparent discrepancies. Another hypothesis could be a different relative accessibility of (\pm)-*anti*-BPDE to guanine and adenine moieties depending whether double-stranded DNA is free in solution or surrounded by histones and compacted in the cellular nucleus.

BPDE-N2-dGuo was also detected as the major DNA lesion within keratinocytes and hepatocytes exposed to B[a]P. However, under similar conditions of treatment, the level of BPDE-N2-dGuo generated in HepG2 cells incubated with B[a]P was about two orders of magnitude higher than that measured in HaCat cells. The adducts BPDE-N6-dAdo were detected only in HepG2 cells, in almost the same proportion relative to BPDE-N2-dGuo as that determined in BPDE-treated cells. As already reported in human bronchoalveolar adenocarcinoma H358 cells treated with (\pm)-*anti*-BPDE (Ruan *et al.*, 2006), the HPLC elution profiles of BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo obtained in DNA extracted from HepG2 cells and in isolated DNA were slightly different (Fig. 2). Indeed, the treatment of isolated DNA with (\pm)-*anti*-BPDE allowed the formation of four potential diastereoisomers for both BPDE-N2-dGuo and BPDE-N6-dAdo, corresponding to the *cis* and *trans* isomers generated from the two enantiomers of *anti*-BPDE. Under these HPLC conditions, the four diastereoisomers were resolved in two major peaks for both adducts (Fig. 2). An improved HPLC separation was reported to allow the complete separation of the different diastereoisomers (Ruan *et al.*, 2006). In B[a]P-treated cells, only one major peak was observed for BPDE-N2-dGuo, and the relative abundance of the two major peaks of BPDE-N6-dAdo was inverted. This could be attributed to the stereoselectivity of the cytochrome P450 metabolizing enzymes that generate preferentially the (+)-*anti*-BPDE enantiomer (Xue and Warshawsky, 2005) that gives rise to one pair of diastereomeric BPDE DNA adducts for both purines. The difference observed between the two cell lines in terms of the levels of BPDE-N2-dGuo generated could be attributed to a different ability to metabolize B[a]P. The liver being the detoxifying organ, hepatocytes have the required capacity to efficiently metabolize PAHs, whereas keratinocytes are less potent. Moreover, in HepG2 cells, B[a]P has been found to induce significantly the expression of cytochromes P4501A1, 1A2 and 1B1 (Misaki *et al.*, 2007) that could increase the formation of DNA adducts. The lower metabolism rate of B[a]P in HaCat cells could explain their greater resistance compared with HepG2 cells, since B[a]P itself is less toxic, being less reactive than its metabolites. Interestingly, the cytotoxicity of B[a]P correlated well with the level of generated DNA adducts. The DL_{50} for HaCat cells was two orders of magnitude greater than that determined for HepG2 cells, the ratio being similar between the levels of DNA adducts generated in the hepatocytes compared with the

keratinocytes. However, it cannot be excluded that the higher resistance of HaCat cells could also be attributed to their p53^{-/-} mutated genotype. Another key observation in this experiment was the lack of detection of the B[a]P-dGuo adducts that would be produced through the radical cation pathway. Other potential B[a]P radical cation DNA adducts (i.e. on other DNA bases) were not investigated but it has been shown that the B[a]P radical cation reacts mainly with dGuo (Chen *et al.*, 1996). Stable DNA adducts formed upon exposure to B[a]P seem therefore to be mainly from the BPDE pathway rather than the radical cation pathway. The absence of a stable B[a]P-dGuo adduct in DNA could be related to the fact that these adducts arising from the B[a]P radical cation are known to be mostly depurinating adducts (Chen *et al.*, 1996).

The first conclusion of this work is thus that BPDE adducts are major stable DNA lesions generated upon treatment of HaCat and HepG2 cells by either B[a]P or its (±)-*anti*-BPDE metabolite. The fact that both cell lines exhibit the same formation rate of DNA adducts upon treatment with (±)-*anti*-BPDE could indicate that HaCat and HepG2 cells have a similar efficacy of phase II enzymes such as glutathione *S*-transferases responsible for the detoxification of such a metabolite. This could also be attributed to the amounts of (±)-*anti*-BPDE used that overcome these capacities and therefore the obtained results could reflect a high reactivity of (±)-*anti*-BPDE towards DNA. It was estimated that in isolated DNA treated with (±)-*anti*-BPDE about 10% of the (±)-*anti*-BPDE molecules lead to the formation of BPDE DNA adducts indicating that an important proportion of (±)-*anti*-BPDE is decomposed, probably by water hydrolysis before reacting with DNA. When the cells were treated with (±)-*anti*-BPDE, the fraction of BPDE giving rise to DNA adducts was two orders of magnitude lower than that determined in isolated DNA. This could be explained, at least partly, by the possibility of (±)-*anti*-BPDE reacting with other cellular constituents, including proteins, and also by the protection afforded by phase II detoxification processes. Strikingly, when HepG2 cells were treated with B[a]P, BPDE-N2-dGuo was produced in a yield that was two more orders of magnitude lower than the yield obtained in (±)-*anti*-BPDE-treated cells, indicating that about 100 000 B[a]P molecules are required to generate one DNA adduct. Taking into account the efficacy for (±)-*anti*-BPDE to generate adducts, this would indicate that approximately 1% of B[a]P is converted into (±)-*anti*-BPDE during the 24 h metabolism process in HepG2 cells, and therefore only 0.01% in HaCat cells. However, such estimations do not take into account the probable difference in efficacy for (±)-*anti*-BPDE to generate DNA adducts when (±)-*anti*-BPDE is generated inside the cells by the detoxification enzymes or when directly incubated with the cells.

The results discussed above show that the BPDE DNA adducts, and in particular the dGuo adduct, are probably

more relevant biomarkers of exposure than DNA adducts resulting from the radical cation of B[a]P, when stable lesions are investigated in DNA. However, formation of a lesion is not enough in order to propose it as a biomarker. Indeed, it has to be persistent for long enough periods of time to allow biological sampling and therefore the acquisition of reliable data. It was thus of importance to study the fate of BPDE adducts in cells, especially with respect to DNA repair. For this purpose, DNA adducts were measured in the two cell lines directly after incubation with (±)-*anti*-BPDE over a 48 h period after treatment, under conditions in which cell mortality is reduced. The results showed that the kinetics of elimination of the adduct BPDE-N2-dGuo were similar in HaCat and HepG2 cells. The kinetics of repair was similar for BPDE-N6-dAdo (not shown). These results are in agreement with previous data indicating that after 24 h 67% of BPDE adducts were eliminated in human fibroblasts treated with 1.5 μM of BPDE (Kaneko and Cerutti, 1982). However, a faster kinetic of elimination, representing 75% of adduct removal in 6 h has been reported in A549 lung carcinoma epithelial cells (Dreij *et al.*, 2005). The data are compatible with the involvement of the nucleotide excision repair (NER) pathway involved in the repair of bulky DNA adducts (Dreij *et al.*, 2005). Interestingly, the DNA adducts arising from 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, a carcinogenic heterocyclic amine formed in cooked meat, known to be repaired by the NER pathway were found to be eliminated in HepG2 cells at a similar rate to that determined in our study for BPDE adducts (Bacon *et al.*, 2003).

The evolution of the level of BPDE-N2-dGuo in HaCat cells treated with B[a]P was somehow different from the previous observation made upon (±)-*anti*-BPDE treatment. Indeed, the level of BPDE-N2-dGuo adducts was found to still increase after treatment, as already reported in human embryonic lung diploid fibroblasts A549 (Binkova and Sram, 2004). This could be explained by a slow B[a]P metabolism rate that is not sufficient to metabolize completely B[a]P during the treatment step. Such an observation could be correlated to the low levels of BPDE-N2-dGuo generated after 24 h of treatment, even using high doses of B[a]P, indicating that only a small proportion of B[a]P has been metabolized. Indirectly, the result indicates that if the metabolism efficacy of cells is low, upon contamination with B[a]P the formation of DNA adducts is rather slow but formation could continue even days after the cells were contaminated. Moreover, this confirms that the cells do not have the capacity to eliminate B[a]P, except through its metabolism that may require several days. On the contrary, in HepG2 cells, the kinetic of repair of BPDE-N2-dGuo determined upon incubation of the cells with B[a]P was similar to that determined subsequently with (±)-*anti*-BPDE treatment, indicating that B[a]P has been completely metabolized during the treatment. It should be mentioned

that such a difference between the two cell lines is reinforced by the necessity to use a higher dose of B[a]P in HaCat cells than in HepG2 cells in order to be able to detect significant levels of adducts after a 24 h treatment.

The low metabolizing capacity of keratinocytes demonstrated in this study is in agreement with the low excretion rate of urinary B[a]P metabolites, such as 3-hydroxybenzo[a]pyrene, found in rats exposed to a single cutaneous dose of B[a]P, in comparison to single intravenous and oral doses (Bouchard and Viam, 1997). This is also consistent with the 12 h delay of 1-hydroxypyrene urinary excretion after dermal exposure to PAHs, in contrast to respiratory exposure in humans. Keratinocytes are therefore low metabolizing cells, resulting not only in a slow detoxification of PAHs through the excretion of urinary metabolites, but also in a slow formation of DNA adducts. These findings are of major importance for biomonitoring studies since the levels of measured DNA adducts depend not only on the environmental exposure but also on the capacity of metabolism of the target organs.

The data obtained in the present study firmly establish that BPDE-N2-dGuo adduct appears as a suitable biomarker of exposure to B[a]P in human cells. Work is in progress now to develop analytical tools to measure potential depurinating DNA adducts, mainly BPDE-N7-Gua. Indeed, depurinating DNA adducts present the advantage of being recovered in urine when blood samples are not available for biomonitoring studies.

Acknowledgements—The authors would like to acknowledge Martial Billon for his technical assistance with the electrochemical synthesis. Caroline Marie was supported by ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie) and CEA (Commissariat à l'Énergie Atomique).

References

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**(5739): 615–616.
- Bacon JR, Williamson G, Garner RC, Lappin G, Langouet S, Bao Y. 2003. Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis* **24**: 1903–1911.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* **45**: 106–114.
- Balu N, Padgett WT, Lambert GR, Swank AE, Richard AM, Nesnow S. 2004. Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo[a]pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH. *Chem. Res. Toxicol.* **17**: 827–838.
- Banasiewicz M, Nelson G, Swank A, Grubor N, Ross J, Nesnow S, Kofeler H, Small GJ, Jankowiak R. 2004. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts formed at low addition level in mice lung tissue. *Anal. Biochem.* **334**: 390–400.
- Barry JP, Norwood C, Vouros P. 1996. Detection and identification of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to DNA utilizing capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **68**: 1432–1438.
- Binkova B, Sram RJ. 2004. The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat. Res.* **547**: 109–121.
- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. 1997. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* **8**: 444–472.
- Bouchard M, 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.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* **106**: 761–771.
- Boysen G, Hecht SS. 2003. Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat. Res.* **543**: 17–30.
- Briede JJ, Godschalk RW, Emans MT, De Kok TM, Van Agen E, Van Maanen J, Van Schooten FJ, Kleinjans JC. 2004. *In vitro* and *in vivo* studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radic. Res.* **38**: 995–1002.
- Buening MK, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Thakker DR, Akagi H, Koreeda M, Jerina DM, Conney AH. 1978. Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **75**: 5358–5361.
- Chen L, Devanesan PD, Higginbotham S, Ariese F, Jankowiak R, Small GJ, Rogan EG, Cavalieri EL. 1996. Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed *in vitro* and in mouse skin: their significance in tumor initiation. *Chem. Res. Toxicol.* **9**: 897–903.
- de Kok TM, Moonen HJ, van Delft J, van Schooten FJ. 2002. Methodologies for bulky DNA adduct analysis and biomonitoring of environmental and occupational exposures. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **778**: 345–355.
- Dreij K, Seidel A, Jernstrom B. 2005. Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene in human cells. *Chem. Res. Toxicol.* **18**: 655–664.
- Farmer PB. 2004. DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* **149**: 3–9.
- Godschalk RW, Moonen EJ, Schilderman PA, Broekmans WM, Kleinjans JC, Van Schooten FJ. 2000. Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* **21**: 87–92.
- Guertens G, De Boeck G, Highley MS, Wood M, Maes RA, Eggermont AA, Hanauske A, de Bruijn EA, Tjaden UR. 2002. Hyphenated techniques in anticancer drug monitoring. II. Liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **976**: 239–247.
- Kaneko M, Cerutti PA. 1982. Excision of benzo[a]pyrene diol epoxide I adducts from nucleosomal DNA of confluent normal human fibroblasts. *Chem. Biol. Interact.* **38**: 261–274.
- Kapitulnik J, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Jerina DM, Conney AH. 1978. Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo(a)pyrene which indicate that (+/-)-trans-7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. *Cancer Res.* **38**: 354–358.
- Knasmuller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, Mersch-Sundermann V, Williamson G, Hietsch G, Langer T, Darroudi F, Natarajan AT. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat. Res.* **402**: 185–202.
- Koc H, Swenberg JA. 2002. Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **778**: 323–343.
- Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect.* **104**: 1166–1170.
- McCoull KD, Rindgen D, Blair IA, Penning TM. 1999. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 237–246.
- Misaki K, Matsui S, Matsuda T. 2007. Metabolic enzyme induction by HepG2 cells exposed to oxygenated and nonoxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* **20**: 277–283.
- Osborne MR, Harvey RG, Brookes P. 1978. The reaction of trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA involves attack at the N7-position of guanine moieties. *Chem. Biol. Interact.* **20**: 123–130.

- Park JH, Troxel AB, Harvey RG, Penning TM. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* **19**: 719–728.
- Perera FP, Weinstein IB. 2000. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* **21**: 517–524.
- RamaKrishna NV, Gao F, Padmavathi NS, Cavalieri EL, Rogan EG, Cerny RL, Gross ML. 1992. Model adducts of benzo[a]pyrene and nucleosides formed from its radical cation and diol epoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**: 293–302.
- Ravanat JL, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, Lasserre L, Saint-Pierre C, Favier A, Cadet J. 2002. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* **23**: 1911–1918.
- Rogan EG, Cavalieri EL, Tibbels SR, Cremonesi P, Warner CD, Nagel DL, Tomer KB, Cerny RL, Gross ML. 1988. Synthesis and identification of benzo[a]pyrene-guanine nucleoside adducts formed by electrochemical oxidation and by horseradish peroxidase catalysed reaction of benzo[a]pyrene with DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 4023–4029.
- Ruan Q, Kim HY, Jiang H, Penning TM, Harvey RG, Blair IA. 2006. Quantification of benzo[a]pyrene diol epoxide DNA-adducts by stable isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**: 1369–1380.
- Sayer J, Chadha A, Agarwal S, Yeh H, Yagi H, Jerina D. 1990. Covalent nucleoside adducts of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxides: structural reinvestigation and characterization of a novel adenosine adduct on the ribose moiety. *J. Org. Chem.* **56**: 20–29.
- Shen YM, Troxel AB, Vedantam S, Penning TM, Field J. 2006. Comparison of p53 mutations induced by PAH o-quinones with those caused by anti-benzo[a]pyrene diol epoxide *in vitro*: role of reactive oxygen and biological selection. *Chem. Res. Toxicol.* **19**: 1441–1450.
- Singh R, Farmer PB. 2006. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* **27**: 178–196.
- Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. 2005. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncol.* **6**: 931–932.
- Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S, Tsai W, Ma J, Cole KJ, Ni Shé M, Perera FP. 2001. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res.* **61**: 6708–6712.
- Veglia F, Matullo G, Vineis P. 2003. Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**: 157–160.
- Wang JJ, Marshall WD, Frazer DG, Law B, Lewis DM. 2003a. Characterization of DNA adducts from lung tissue of asphalt fume-exposed mice by nanoflow liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **322**: 79–88.
- Wang JJ, Marshall WD, Law B, Lewis DM. 2003b. Fragmentation patterns of DNA-benzo(a)pyrene diol epoxide adducts characterized by nanoflow LC/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **230**: 45–55.
- Xue W, Warshawsky D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **206**: 73–93.
- Yang SC, Jenq SN, Kang ZC, Lee H. 2000. Identification of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-deoxyguanosine in human lung adenocarcinoma cells exposed to cooking oil fumes from frying fish under domestic conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 1046–1050.

Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme.

Les HAP sont des polluants ubiquitaires de l'environnement. Certains d'entre eux, comme le benzo[a]pyrène (B[a]P) sont cancérigènes pour l'homme. Il est donc primordial d'évaluer l'exposition des individus au B[a]P. Pour cela, la mesure des adduits de l'ADN est d'un intérêt majeur puisqu'elle permet de quantifier la dose génotoxique. Deux voies métaboliques du B[a]P conduisent à la formation de divers adduits de l'ADN. Afin de définir de nouveaux biomarqueurs d'exposition, nous avons cherché à identifier la nature chimique des adduits majoritairement formés dans des modèles cellulaires de kératinocytes et d'hépatocytes humains exposés au B[a]P. Pour cela, une méthode analytique par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem a été mise au point pour permettre le dosage spécifique de sept adduits, avec une limite de détection de l'ordre de 1 adduit/10⁸ nucléosides normaux. Les adduits majoritaires sont les adduits stables du diol-époxyde du B[a]P (BPDE), et les cinétiques de formation et de réparation sont différentes entre les deux types cellulaires. Chez l'homme, la méthode analytique développée ne nous a pas permis de mettre en évidence ces adduits que ce soit dans l'urine de sujets exposés professionnellement aux HAP ou dans l'ADN lymphocytaire de sujets fumeurs. De plus les nucléosides oxydés dans l'urine s'avèrent ne pas être de bons biomarqueurs d'effet des HAP. Les adduits stables du BPDE apparaissent donc comme des biomarqueurs pertinents de l'exposition au B[a]P, mais il est nécessaire d'améliorer la limite de détection de notre méthode pour permettre leur dosage chez l'homme.

Mots clés : Benzo[a]pyrène, métabolisme, adduit de l'ADN, réparation de l'ADN, kératinocyte, hépatocyte, spectrométrie de masse, surveillance biologique, biomarqueur.

Search for new biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) through the study of DNA damage in humans.

PAH are ubiquitous environmental pollutants. Some of them, including benzo[a]pyrene (B[a]P) are carcinogenic to humans. It is therefore important to evaluate individual B[a]P exposure. For that purpose, the measurement of DNA adducts is of major interest since it allows the evaluation the genotoxic dose. Two metabolic pathways of B[a]P lead to the formation of several DNA adducts. In order to define new biomarkers of B[a]P exposure, we have aimed to determine the chemical nature of major adducts generated in human cells including keratinocytes and hepatocytes exposed to B[a]P. For such a purpose, an analytical method involving high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was set up allowing a specific detection of seven DNA adducts, with a limit of detection in the order of 1 adduct/10⁸ normal nucleosides. Using such an approach, we have shown that the stable adducts of B[a]P diol-epoxyde (BPDE) are the major adducts generated in cellular DNA upon B[a]P exposure. Important differences in terms of kinetics of adducts formation and elimination were found between the two cell types. Attempts to measure the BPDE adducts in the urine of PAH occupationally exposed workers or in the DNA of lymphocytes of smokers were unsuccessful. Moreover, oxidative nucleosides when measured in human urine are not good biomarkers of effect to PAH. Stable BPDE adducts appear as pertinent biomarkers of exposure to B[a]P but the limit of detection of our assay needs to be improved to allow the measurement of adducts in humans.

Key words: benzo[a]pyrene, metabolism, DNA adduct, DNA repair, keratinocyte, hepatocyte, mass spectrometry, biological monitoring, biomarker.