



**HAL**  
open science

# Exposition in vitro de lymphocytes T humains aux hydrocarbures aromatiques polycycliques : étude des effets immunotoxiques

Marie Liamin

► **To cite this version:**

Marie Liamin. Exposition in vitro de lymphocytes T humains aux hydrocarbures aromatiques polycycliques : étude des effets immunotoxiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B060 . tel-01969979

**HAL Id: tel-01969979**

**<https://theses.hal.science/tel-01969979>**

Submitted on 4 Jan 2019

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

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

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Biologie Santé**

présentée par

**Marie LIAMIN**

Préparée à l'unité de recherche INSERM U1085 IRSET  
Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail  
Faculté de Sciences de Rennes 1

---

**Exposition *in vitro*  
de lymphocytes T  
humains aux  
hydrocarbures  
aromatiques  
polycycliques :  
étude des effets  
immunotoxiques**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 21 Décembre 2017**

devant le jury composé de :

**Dr Nathalie GROVA**

Docteur, LIH (Luxembourg) /  
*rapporteur*

**Dr Laurence GUZYLACK-PIRIOU**

Chargé de recherche, INRA U1331 (Toulouse) /  
*rapporteur*

**Dr Erwan WATRIN**

Chargé de recherche, CNRS U6290 (Rennes 1) /  
*examineur*

**Dr Michel LAURENTIE**

Directeur de recherche, ANSES de Fougères /  
*examineur*

**Pr Benoît FOLIGNE**

Professeur, Université de Lille 2 /  
*examineur*

**Pr Lydie SPARFEL-BERLIVET**

Professeur, Université de Rennes 1 /  
*directeur de thèse*

**Dr Eric LE FERREC**

Maître de conférence, Université de Rennes 1 /  
*co-directeur de thèse*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à présenter mes remerciements aux membres du jury qui ont acceptés de juger ce travail.

- Aux Dr Nathalie Grova et Dr Laurence Guzylack-Piriou pour avoir accepté d'être rapportrices de ce travail de thèse, y avoir consacré du temps, je suis très honorée que ce travail ait été confronté à votre expertise et vous prie de croire en ma sincère gratitude.

- Aux Pr Benoît Foligné, Dr Erwan Watrin, et Dr Michel Laurentie pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse. Je vous prie de croire en mon profond respect et ma plus sincère gratitude.

Je remercie aussi l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), qui a financé ces travaux de recherche.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Lydie Sparfel. Au cours de ces trois années à tes côtés j'ai énormément appris, et je ne saurai comment te dire à quel point j'ai aimé travailler avec toi. Ton enthousiasme à toutes épreuves, ton énergie, ton amour de la science, ainsi que ta gentillesse ont représenté énormément pour moi tout au long de ma thèse. Tu es une scientifique extraordinaire, débordante d'idées et d'ingéniosité, mais aussi une personne exceptionnelle, qui donne énormément et je suis ravie de t'avoir rencontré et d'avoir eu la chance d'apprendre à tes côtés. Tu m'as donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles, tu m'as guidé et m'as fait confiance, pour tout ça m'a reconnaissance est immense. Je te souhaite de tout cœur toute la réussite et le bonheur pour la suite, et j'espère un jour pouvoir retravailler avec toi.

Je tiens aussi à remercier mon co-directeur de thèse, le Dr Eric Le Ferrec, pour son aide tout au long de ma thèse, ses conseils pour la rédaction et sa gentillesse.

Je présente ma plus sincère gratitude au Dr Dominique Lagadic-Gossmann, pour m'avoir, tout d'abord, accueilli dans son équipe pour mon stage de Master 2, puis pour ma thèse, mais également pour toute son aide et sa bienveillance durant ces quatre années dans son équipe. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Au Pr Odile Sergent, je présente mes plus sincères remerciements, pour tout ce que vous m'avez apporté, la rigueur scientifique que vous nous enseignez, mais aussi pour votre gentillesse, votre bienveillance ainsi que tous vos conseils. Je vous remercie également pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser des missions d'enseignements, ce fut une expérience enrichissante et passionnante.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement le Dr Elisa Boutet-Robinet, pour toute notre collaboration. Si j'ai pu réaliser le test des comètes à Rennes c'est grâce à ton enseignement et toute l'aide que tu as pu m'apporter, toujours avec gentillesse et bienveillance.

Je tiens également à remercier le Dr Normand Podechard. Parce que ça a toujours été un plaisir de travailler avec toi, à la paillasse ou en TP, pour ta bonne humeur et parce que mon stage de Master 2 m'a conduit où je suis aujourd'hui, je te remercie mille fois.

Je remercie aussi les autres membres de l'équipe qui m'ont beaucoup apporté ces dernières années, Martine, pour ton énergie débordante, ta gentillesse, tes conseils et ton soutien, Isabelle, pour ta

gentillesse et ta bonne humeur, Morgane, pour toute ton aide tant sur le plan technique que moral, Rémi pour ta sympathie et ta patience au bureau durant ton stage. Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

Je tiens aussi à remercier deux personnes en particulier, Brigitte, pour toute l'aide que tu m'as apporté au cours de ma thèse, pour ta gentillesse quotidienne, ta bonne humeur, ton soutien et ta générosité, ainsi que Maryline, pour toute ton aide ainsi que ta gentillesse. Merci à toutes les deux pour tout ce que vous faites.

Je remercie l'ensemble des collègues de l'IRSET avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, et particulièrement Valérie, Yu, Marc, Fred, Bertrand et Claudie, ce fut un plaisir de travailler avec vous et je vous remercie pour tous les conseils et l'aide, que vous m'avez souvent apporté au cours de ma thèse.

Je remercie les autres thésards de l'IRSET, particulièrement Sophie à qui je souhaite plein de bonheur avec sa petite famille, Mélanie pour sa gentillesse et les meilleurs gâteaux au chocolat que j'ai mangé et Bassil pour sa gentillesse et son dynamisme mais aussi pour les mois de cohabitation au bureau 402 ! Je vous souhaite à tous une belle réussite durant la thèse et après, et le meilleur dans vos vies. To Imram, I would like to thank you for your kindness and your patience with my English! I wish you the best for the end of your thesis and after!

Un grand merci à Hélène, nouvellement arrivée et passionnée de remerciements de thèse ! Merci pour tout ton soutien lors de la rédaction et de l'attente interminables des nacelles. Merci aussi pour les moments plus drôles ! J'ai beaucoup aimé travaillé avec toi et je te souhaite de réaliser tes projets de thèse !

Arnaud, je pense que je te dois quelques remerciements ! En premier, et parce que tu le voulais, je te remercie d'avoir supporté les moments où je parlais toute seule devant mon PC, ou les moments où je parlais avec les autres au bureau (en gros désolée de parler tout le temps), mais aussi pour avoir supporté mon côté légèrement pessimiste et un tantinet râleur. Je te remercie aussi et surtout pour m'avoir écouté, pour toutes nos soirées, nos débats sur tout et n'importe quoi, nos sorties aux grands gamins, les sorties avec Elo (que je remercie aussi énormément pour sa gentillesse et pour le petit-déj un samedi matin aux aurores à Paris !!), les moments où on embête Nettie et pour tout le reste.... Je ne pense pas que ces trois années de thèse auraient été les mêmes sans toi, en tout cas, c'est certain, ça aurait été plus difficile et beaucoup moins drôle. Je te souhaite le meilleur pour la suite et j'espère qu'on pourra très bientôt faire le point-virgule magique !

J'ai toujours dit que je remercierai aussi la Mayenne et par extension, son ambassadrice en Bretagne, Manuella ! Manue, pour les fous rires, les discussions sur ce beau département qu'est la Mayenne, les manuelles et tous les trucs improbables que tu nous as sorti, ainsi que ton soutien, je te remercie !! Grâce à toi je me méfie des « 53 » sur la route, et les arrêts de train à la gare de Laval prennent une autre dimension. Je remercie aussi Lisa, parce que les fous rires au sujet de la Mayenne c'était mieux à deux et parce que personne d'autre ne sait à quel point la Mayenne est importante durant la thèse !!

A Nettie et Manon, les bretonnes, du nord Finistère, pour vos improbables discussions sans queue ni tête, pour les discussions scientifiques ou non, mais aussi et surtout les filles pour votre soutien sans faille durant ces derniers mois. Je sais à quel point vous avez mis vos soucis de côtés pour me soutenir et je ne l'oublierai jamais. J'ai adoré bossé avec vous, que ce soit durant vos stages ou au début de vos thèses, vous êtes formidables, intelligentes, ingénieuses et je vous souhaite de tout mon cœur le bonheur et la réussite que vous méritez amplement, notamment Nettie, je te souhaite

de réussir tous tes Western-blot !! Ne plus vous voir quotidiennement me manquera énormément, même si cela fera des vacances aux oreilles des autres locataires du bureau !!

Je tiens aussi à remercier mes meilleures amies Maud, Mathilde et Clémence, pour leur soutien et leur patience ces derniers mois. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, je promets de vous rendre la pareille pour vos soutenances respectives !

A Jean-Louis et Martine, un grand merci pour votre gentillesse, qui m'a beaucoup apporté ces derniers mois et Martine un très grand merci pour les corrections, je sais que ça n'a pas été facile et je vous en suis extrêmement reconnaissante !! Merci aussi à Amélie et Kévin pour tous les moments importants de vos vies que vous avez partagé avec moi, votre gentillesse et votre bonne humeur communicative. Merci aussi à Paulin et Arthur, pour la bouffée d'air frais, le livre du monstre, les kaplas, les dessins d'animaux, le « proutamochère » et la course dans le jardin !

A Aurélien, je connais ta réserve, et tu sais déjà tout ce que je souhaite te dire, je te dirai donc ici seulement, avec tout mon amour merci pour tout, et encore 131 ans!

Enfin, sans ma famille je ne pourrai certainement pas écrire ces lignes, donc à mon petit frère, Baptiste, mon Papé et ma Mamée et surtout à ma Maman, la plus merveilleuse et courageuse des mamans, je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis 28 ans, pour votre soutien sans faille et tout l'amour que vous m'avez apporté ! Vos encouragements m'ont permis de réaliser cette thèse et tout ce que je suis aujourd'hui, je vous le dois, vous êtes mon inspiration et mon seul moteur c'est vous faire honneur !



## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	1
<b>Liste des figures</b> .....	5
<b>Liste des tableaux</b> .....	7
<b>Liste des abréviations</b> .....	8
<b>Avant-propos</b> .....	11
<b>I – Données bibliographiques</b> .....	13
<b>1. Généralités sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)</b> .....	14
1.1. Propriétés physico –chimiques .....	16
1.2. Sources de production des HAPs .....	16
1.3. Transport et devenir dans l’environnement .....	18
1.4. Exposition humaine .....	20
1.4.1. Exposition par voie respiratoire.....	20
1.4.2. Exposition par voie orale.....	21
1.4.3. Exposition par voie cutanée.....	22
1.5. Toxicocinétique .....	22
1.5.1. Phase de fonctionnalisation .....	24
1.5.2. Phase de conjugaison.....	28
1.5.3. Phase de transport.....	29
1.6. Mécanismes d’action des HAPS .....	30
1.6.1. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh).....	30
1.6.1.1. Définition du RAh .....	30
1.6.1.2. Domaines et structure .....	32
1.6.1.2.1. Domaines du RAh .....	32
1.6.1.2.2. Les partenaires protéiques du RAh.....	33
1.6.1.3. Activation et régulation du RAh.....	35
1.6.1.3.1. Activation du RAh.....	35
1.6.1.3.2. Régulation du RAh.....	37
1.6.1.3.2.1. Régulation par la voie du répresseur du RAh (RRAh).....	37
1.6.1.3.2.2. Régulation par la voie du protéasome .....	39
1.6.1.3.2.3. Autres mécanismes de régulation du RAh .....	40
1.6.1.4. Ligands du RAh.....	42

1.6.1.4.1.	Les ligands exogènes .....	42
1.6.1.4.2.	Les ligands endogènes .....	44
1.6.1.4.3.	Activation sans ligands .....	46
1.6.1.5.	Gènes régulés par le RAh.....	47
1.6.1.6.	Fonctions du RAh .....	48
1.6.1.6.1.	Rôle conservé du RAh .....	48
1.6.1.6.2.	Souris invalidées pour le RAh .....	49
1.6.1.6.3.	Différenciation cellulaire .....	49
1.6.1.6.4.	Migration cellulaire.....	50
1.6.1.6.5.	Adhésion cellulaire .....	51
1.6.1.6.6.	Invasion cellulaire .....	51
1.6.1.7.	Les voies non-génomiques du RAh .....	52
1.6.1.7.1.	La voie de l'EGFR.....	52
1.6.1.7.2.	La voie NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ b) .....	53
1.6.1.7.3.	La voie Nrf2.....	53
1.6.1.7.4.	La voie du récepteur aux œstrogènes (RE) .....	54
1.7.	Effets toxiques des HAPs.....	55
1.7.1.	Toxicité aiguë.....	55
1.7.2.	Toxicité chronique .....	55
1.7.2.1.	Effets systemiques .....	55
1.7.2.2.	Effets reprotoxiques et tératogènes .....	56
1.7.2.3.	Effets cancérigènes .....	57
1.8.	Surveillance des HAPs.....	59
1.8.1.	Dosage et quantification.....	59
1.8.1.1.	Dans l'environnement.....	59
1.8.1.2.	Chez l'homme .....	60
1.8.2.	Les biomarqueurs des HAPs .....	60
1.8.2.1.	Les biomarqueurs d'exposition.....	61
1.8.2.2.	Les biomarqueurs d'effet .....	63
1.8.2.2.1.	Les adduits a l'ADN .....	63
1.8.2.2.1.1.	Les adduits de type BPDE .....	64
1.8.2.2.1.2.	Les bases oxydées : la 8-oxo-guanine.....	65
1.8.2.2.2.	Les altérations cytogénétiques .....	65
1.8.2.3.	Les biomarqueurs de sensibilité.....	65

1.9.	Reglementation sur les HAPs.....	66
<b>2.</b>	<b>Le benzo(a)pyrene (B[a]P) : chef de file des HAPs.....</b>	<b>68</b>
2.1.	Exposition et bases moléculaires des effets du B[a]P.....	68
2.2.	Effets cancérigènes du B[a]P.....	72
2.2.1.	Aspects mécanistiques.....	72
2.2.1.1.	Formation d'adduits à l'ADN.....	72
2.2.1.2.	Formation de cassures de l'ADN.....	75
2.2.1.3.	Relation entre genotoxicité et caractère mutagène.....	76
2.2.1.4.	Réparation des dommages.....	78
2.2.1.4.1.	La réparation des adduits volumineux a l'ADN.....	82
2.2.1.4.2.	La réparation des dommages oxydatifs et des sites abasiques.....	84
2.2.1.4.3.	La réparation des cassures double brin de l'ADN.....	86
2.2.2.	Aspects épidémiologiques.....	87
<b>3.</b>	<b>Le système immunitaire.....</b>	<b>88</b>
3.1.	Les différents types d'immunité.....	88
3.2.	Les organes du système immunitaire.....	90
3.2.1.	Les organes primaires.....	91
3.2.1.1.	La moëlle osseuse.....	91
3.2.1.2.	Le thymus.....	91
3.2.2.	Les organes secondaires.....	94
3.3.	Les composants cellulaires du système immunitaire.....	94
3.3.1.	Les cellules de la lignée myeloïde.....	95
3.3.2.	Les cellules de la lignée lymphoïde.....	96
3.4.	Les composants moléculaires du système immunitaire.....	100
3.5.	L'immunotoxicologie.....	101
3.6.	Le RAh dans l'immunologie.....	102
3.7.	Les effets immunotoxiques des HAPs.....	105
3.7.1.	Effets immunosuppresseurs des HAPs.....	105
3.7.2.	Effets inflammatoires des HAPs.....	107
<b>II</b>	<b>Cadre et buts du travail.....</b>	<b>109</b>
<b>III</b>	<b>Travaux de recherche.....</b>	<b>112</b>
<b>III.1</b>	<b>ARTICLE 1.....</b>	<b>113</b>
III.1.1	Contexte de l'étude.....	114
III.1.2	Résultats de l'étude.....	116

III.1.2.1 Effets génotoxiques du B[a]P : étude de la formation d'adduits a l'ADN dérivés du B[a]P dans les lymphocytes T humains activés.....	116
III.1.2.2 Effets génotoxiques du B[a]P : étude des altérations primaires de l'ADN après exposition au B[a]P dans les lymphocytes T humains activés. ....	117
III.1.2.3 Réponse lymphocytaire a la genotoxicite du B[a]P : étude des voies de réponse aux dommages .....	125
III.1.3 Poursuite de l'étude.....	131
<b>III.2 ARTICLE 2</b> .....	139
III.2.1 Contexte de l'étude .....	140
III.2.2 Résultats de l'étude .....	142
III.2.2.1 Extraction des gènes signatures spécifiques .....	145
III.2.2.2 Identification des voies ou fonctions biologiques spécifiques.....	147
III.2.3 Poursuite de l'étude.....	149
<b>IV Conclusion générale</b> .....	152
<b>Bibliographie</b> .....	160

## Liste des figures

Figure 1 : Répartition des émissions de 8 HAPs en tonnes par secteurs en France. ....	17
Figure 2 : Différentes sources de production des HAPs et contamination de l'environnement par les HAPs. ....	19
Figure 3 : Schéma des 3 étapes du métabolisme des HAPs et relation avec leurs effets toxiques. ....	24
Figure 4 : Trois principales voies métaboliques de la phase 1 de fonctionnalisation des HAPs. ....	25
Figure 5 : Cycle de monooxygénation par les CYPs. ....	26
Figure 6 : Schéma représentatif des Cytochromes P450, des CYPs oxydoréductase et des cytochromes b5 lors de la phase 1 de détoxification. ....	27
Figure 7 : Les domaines des facteurs de transcription de la famille $\beta$ HLLH-PAS. ....	31
Figure 8 : Représentation schématique des différents domaines du RAh. ....	32
Figure 9 : Activation du RAh en réponse à un ligand. ....	35
Figure 10 : Modèle de recrutement potentiel de facteurs des co-activateurs au niveau du gène <i>cyp1a1</i> . ....	37
Figure 11 : Régulation négative du RAh par le RRAh. ....	39
Figure 12 : Voie du RAh faisant intervenir le protéasome 26S. ....	40
Figure 13 : Structures de différents ligands exogènes du RAh. ....	42
Figure 14 : Structures de différents ligands endogènes du RAh. ....	45
Figure 15 : Niveaux de surveillance des HAPs. ....	59
Figure 16 : Différents niveaux de mesure et d'influence des 3 grandes catégories de biomarqueurs depuis l'exposition à un contaminant jusqu'à la survenue des effets pathologiques. ....	61
Figure 17 : trois principales voies du métabolisme du B[a]P. ....	69
Figure 18 : Stéréochimie des époxydations des (+)- ou (-)-B[a]P-7,8-diol en espèces réactives ( <i>anti</i> - et <i>syn</i> -BPDE) qui peuvent lier l'ADN. ....	70
Figure 19 : Réaction d'oxydation du B[a]P et formation d'un radical cation en position C <sup>6</sup> . ....	70
Figure 20 : Cycle d'oxydo-réduction du B[a]P-7,8-quinone. ....	71
Figure 21 : Etapes de formation des adduits dérivés du BPDE en position N <sup>6</sup> de l'adénine et N <sup>2</sup> de la guanine. ....	73
Figure 22 : Formation de FAPy-guanine ou de la 8-oxo-guanine en présence d'ERO. ....	74
Figure 23 : Cascade des DDR impliquant les kinases ATM et ATR. ....	79
Figure 24: Stimuli capables d'activer p53 et réponses liées à cette activation. ....	81
Figure 25 : Mécanismes moléculaires de la réparation des dommages de types adduits volumineux par la voie NER. ....	83
Figure 26 : Mécanismes moléculaires de la réparation des dommages de types sites abasiques alkylation et bases oxydées par la voie BER. ....	85
Figure 27 : Mécanismes moléculaires de la réparation des dommages de types adduits cassures double brin par la voie HR et NHEJ. ....	86
Figure 28 : Immunité innée, immunité adaptative. ....	89

Figure 29 : Organes lymphoïdes primaires et secondaires.....	90
Figure 30 : Maturation des lymphocytes T dans le thymus.....	93
Figure 31 : Hématopoïèse.....	95
Figure 32 : Activation des lymphocytes T.....	97
Figure 33 : Différenciation des lymphocytes T CD4+.....	98
Figure 34 : Expression du RAh dans différentes cellules du système immunitaire.....	1033
Figure 35 : Dichotomie du RAh.....	104
Figure 36 : Principe du test des comètes et représentation d'une lame 20 puits (CometSlides™ Trevigen).....	119
Figure 37 : Induction de comètes après traitement des lymphocytes T humains par le MMS.....	121
Figure 38 : Acquisition après analyse par le logiciel OpenComet.....	122
Figure 39 : le B[a]P n'entraîne pas de majoration des dommages à l'ADN révélés par le test des comètes en présence de FPG.....	124
Figure 40 : la voie d'ATR n'est pas activée après 48 heures d'exposition au B[a]P dans les lymphocytes T humains.....	125
Figure 41 : Le B[a]P induit un ralentissement de la réplication des lymphocytes T humains en culture primaire, en phase G2/M.....	127
Figure 42 : Principe du test Pig-A.....	129
Figure 43 : Schéma bilan des effets génotoxiques du B[a]P dans les lymphocytes T humains activés.....	130
Figure 44 : Différents HAPs choisis pour cette étude en fonction de leur présence dans l'environnement ainsi que leurs effets cancérigènes selon le CIRC.....	132
Figure 45: Les niveaux d'adduits dG-N <sup>2</sup> -BPDE sont modulés ou non en présence d'autres HAPs.....	133
Figure 46 : Les HAPs en mélange binaire avec le B[a]P ne modulent pas les dommages à l'ADN induits par le B[a]P.....	134
Figure 47 : Activité métabolique des CYP1 en présence de différents HAPs, seuls ou en mélange binaire avec le B[a]P.....	136
Figure 48 : Expression des CYP1A1 et CYP1B1 en présence de différents HAPs, seuls en mélange binaire avec le B[a]P.....	137
Figure 49 : Méthodologie de l'exposition des lymphocytes T humains au B[a]P et de constitution des pools d'ARN pour l'hybridation sur les puces à ADN.....	143
Figure 50: Induction par le B[a]P de l'expression des CYP1A1 et CYP1B1 pour chaque pool et pour l'ensemble des 16 donneurs de l'analyse.....	144
Figure 51 : Méthodologie d'analyse des données de la puce à ADN.....	145
Figure 52 : Etapes de la migration des leucocytes et diapédèse au niveau de l'endothélium .....	149
Figure 53: Le B[a]P diminue la capacité de migration transendothéliale des lymphocyte T humains.....	151

## Liste des tableaux

Tableau 1: Hydrocarbures Aromatiques polycycliques (HAPs) classés comme prioritaires par le CIRC (international), l'EPA (USA) et l'EFSA (Europe). .....	15
Tableau 2 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souris invalidées pour le RAh.....	49
Tableau 3 : Différentes techniques de dosage des adduits à l'ADN. <i>D'après Poirier, 2016.</i> .....	63
Tableau 4: Comparaison des différents marqueurs d'ADN pour le test des comètes. ....	120
Tableau 5: Comparaison des différents logiciels d'analyse d'images pour le test des comètes .....	121
Tableau 6: Caractéristiques de la puce Clariom S d'Affymetrix.....	141

## Liste des abréviations

$\alpha$ -NF	alpha-Naphtoflavone
$\beta$ HHLH-PAS	basic-Helix-Loop-Helix-Period-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-Single-minded
$\gamma$ -H2AX	variant d'histone H2AX phosphorylé en position 139
$^1\text{O}_2$	Oxygène Singulet
1-OHP	1-hydroxy-Pyr
3-MC	3-Méthylcholanthène
3-OHB[a]P	3-hydroxy-B[a]P
53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1
8-oxo-G	8-oxo-Guanine
ADM	Adrenomedullin
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIP	AH receptor-interacting protein
AKR	Aldo-céto-Réductase
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARA9	Aryl-Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein, Immunophilin Homolog
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	AhR-Nuclear Translocator
ARNT	Translocateur Nucléaire Du Rah
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related
B[a]P	benzo(a)pyrène
B[b]F	benzo(b)fluoranthène
B[e]P	benzo(e)pyrène
BCR	B-Cell Receptor
BER	Base Excision Repair
BET	Bromure d'Ethidium
BMAL	Brain and Muscle ARNT Like protein
BPDE	benzo(a)pyrène-diol-époxyde
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1
CD	Cluster De Différenciation
CDKN1A	inhibiteur des cyclines dépendantes des kinases 1
CHK1/2	Checkpoint 1 Et 2
Chr	chrysène
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CMH	Complexes Majeurs D'histocompatibilité
CS-A et CS-B	Cockayne Syndrome A Et B
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CYP	Cytochrome P450
CYPs	cytochrome P450
DB[a,h]A	dibenz(a,h)anthracène

DDR	Réponse Aux Dommages à l'ADN
dG-N2-BPDE	déoxyguanine-N <sup>2</sup> - benzo( <i>a</i> )pyrène-diol-époxyde
DMBA	7,12-Dimethylbenz[ <i>a</i> ]Anthracène
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
E2	Œstrogène
EFSA	Etablissement Français de sécurité alimentaire
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EH	Epoxyde hydrolase
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinases
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
FAPy-désoxyguanine	2,6-Diamino-4-Oxo-5-Formamidopyrimidine
FICZ	6-Formylindolo[3,2- <i>b</i> ]Carbazole
Fla	fluoranthène
FPG	Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase
GC-MS	Chromatographie Gazeuse Couplée A Un Spectromètre De Masse
GG-NER	Global Genomic-NER
GPI	Glycosylphosphatidyl Inositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GST	Glutathion-S-Transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxyde d'hydrogène
HAHs	Hydrocarbures Aromatiques Halogénés
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HMEC-1	Human dermal microvascular endothelium cell-1
HPLC	Chromatographie Liquide Couplée Haute Performance
HR	Recombinaison Homologue
Hsp90	Heat Shock Protein 90
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN- $\gamma$	Interféron $\gamma$
Igs	Immunoglobulines
IL	Interleukine
IPA	Ingenuity Pathway analysis
KBrO <sub>3</sub>	Potassium Bromate
LBD	Domaine De Liaison Au Ligand
LC-MS/MS	Chromatographie Liquide Couplée A Deux Spectromètres De Masse En Tandem
MALT	Mucosae Associated Lymphoid Tissue
MMS	méthyl-méthane-sulfonate
MRP	Multidrug Resistance Protein
NAD(P)H	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NER	Nucleotide Excision Repair
NES	Nuclear Export Signal
NF-1	Nuclear Factor 1
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor-K B
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear Localization Signal et pour

NQO1	NADPH dehydrogenase quinone 1
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2 (NFE2)-Related Factor 2
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion Superoxyde
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OH <sup>•</sup>	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale De La Santé
PBMC	Cellules Mononuclées du Sang Périphérique
PCNA	Proliferating Cell Number Antigen
P-gp	P-glycoprotéine
PHA	Phytohémagglutinine
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinases
PKC	Protéines Kinases C
PTKs	Protéines Tyrosines Kinases
Pyr	pyrène
RAD51	RAD51 Recombinase
RAh	Récepteur aux Hydrocarbures Aromatiques
RE	Récepteur aux Œstrogènes
RPA	Replication Protein A
RAAh	Répresseur du RAh
SIM	Single-minded homolog 1
ST	Sulfo-Transferase
TAD	Domaine de Transactivation
TBP	TATA-box Binding Protein
TCDD	2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TC-NER	Transcription-Coupled-NER
TCR	T Cell Receptor
TEFs	Toxic equivalency factor
TGF- $\alpha$	Tumor Growth Factor-alpha
Th17	Lymphocytes T helper 17
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor-alpha
TP53	Tumor Suppressor P53
Treg	Lymphocytes T Régulateurs
UGT	UDP-GlucuronylTransferase
US-EPA	United-States Environmental Protection Agency
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
WST-1	Water Soluble Tetrazolium Salt-1
XAP-2	HBV X-associated protein 2
XP	Xeroderma Pygmentosum
XRE	Xénobiotic Responsive Element

# AVANT-PROPOS

L'exposition humaine aux polluants de notre environnement est largement reconnue comme facteur de risque pour de nombreuses pathologies comme les cancers et est devenue, de ce fait, une préoccupation majeure en santé publique. Parmi ces polluants, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) semblent particulièrement alarmants, du fait de leur présence abondante dans l'environnement et de leurs effets toxiques bien documentés. Le système immunitaire est impliqué dans la protection contre les agressions extérieures et face aux xénobiotiques, et son affaiblissement est aujourd'hui largement reconnu dans le développement de pathologies liées à notre environnement. Il apparaît alors tout à fait judicieux de s'intéresser aux effets immunotoxiques de contaminants environnementaux, tels que les HAPs ; ces effets pouvant directement ou indirectement contribuer à leurs effets cancérigènes. L'immunotoxicité des HAPs est cependant à l'heure actuelle peu documentée.

Ma thèse s'intéresse ainsi à l'étude des effets immunotoxiques des HAPs dans les lymphocytes T humains normaux. Elle fait partie du projet TOXLYMIX financé par le programme Environnement – Santé – Travail de l'ANSES, avec le soutien de l'ITMO cancer dans le cadre du plan cancer 2014-2019. Elle a été réalisée à l'institut IRSET UMR INSERM U1085 à Rennes en collaboration avec l'institut TOXALIM UMR INRA 1331 à Toulouse.

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur les HAPs en particulier le benzo(*a*)pyrène (B[*a*]P), chef de file de cette famille et sur le système immunitaire. Il est suivi par une deuxième partie présentant le cadre et buts du travail. Un troisième chapitre présente et discute les résultats majeurs obtenus au cours de mes travaux de thèse. Le premier article porte sur les dommages induits par l'exposition de lymphocytes T humains normaux au B[*a*]P et sur leurs conséquences en terme de mutations (Liamin *et al.*, 2017). Le second article présente la signature toxicogénomique de ces lymphocytes T après exposition au B[*a*]P permettant l'identification de nouvelles cibles moléculaires et fonctions biologiques associées aux effets immunotoxiques de ce contaminant (Liamin *et al.*, en rédaction). La quatrième et dernière partie est une conclusion sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse et est associée aux perspectives des travaux à plus long terme.

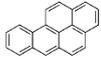
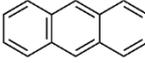
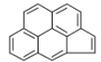
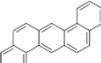
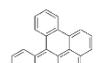
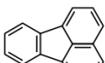
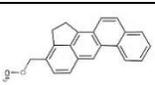
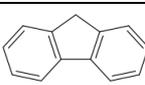
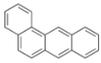
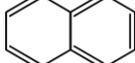
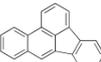
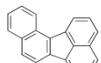
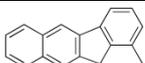
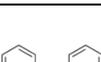
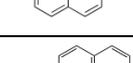
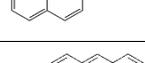
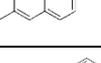
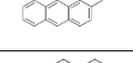
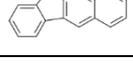
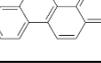
## I – DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

## 1. Généralités sur les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

Les HAPs sont des composés organiques formés de carbone et d'hydrogène et constitués d'au moins deux cycles aromatiques juxtaposés présentant des arrangements linéaires ou angulaires (Sims et Overcash, 1983). A ce jour, plus d'une centaine de molécules appartenant à la famille des HAPs sont dénombrées. Dans l'environnement, les HAPs sont présents sous forme de mélanges complexes, difficiles à caractériser et à quantifier.

Les HAPs font aujourd'hui l'objet d'une grande attention de la part de la communauté scientifique en raison de leur toxicité avérée ou suspectée et de leur forte présence dans l'environnement. Ainsi, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), l'Agence de Protection de l'Environnement aux États-Unis (US-EPA) et l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) ont classé certains HAPs comme prioritaires. Les différents HAPs classés par ces trois organismes sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**).

**Tableau 1: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) classés comme prioritaires par le CIRC (international), l'EPA (USA) et l'EFSA (Europe).**

HAP	Structure	CIRC	EPA	EFSA	HAP	Structure	CIRC	EPA	EFSA
Benzo(a)pyrène		1	x	x	Anthracène		3	x	
Cyclopenta(c,d)pyrène		2A			Acénaphène		3	x	
Dibenzo(a,h)anthracène		2A	x	x	Acénaphtylène			x	
Dibenzo(a,l)pyrène		2A		x	Fluoranthène		3	x	
Benz(j)aceanthrylène		2B			Fluorène		3	x	
Benz(a)anthracène		2B	x	x	Naphtalène			x	
Benzo(b)fluoranthène		2B	x	x	Phénanthrène		3	x	
Benzo(j)fluoranthène		2B		x	Pyrène		3	x	
Benzo(k)fluoranthène		2B	x	x					
Benzo(c)phenanthrène		2B							
Chrysène		2B	x	x					
Dibenzo(a,h)pyrène		2B		x					
Dibenzo(a,i)pyrène		2B		x					
Indéno(1,2,3,c,d)pyrène		2B	x	x					
5-méthylchrysène		2B		x					
Benzo(g,h,i)pérylène		3	x						

## 1.1. Propriétés physico –chimiques

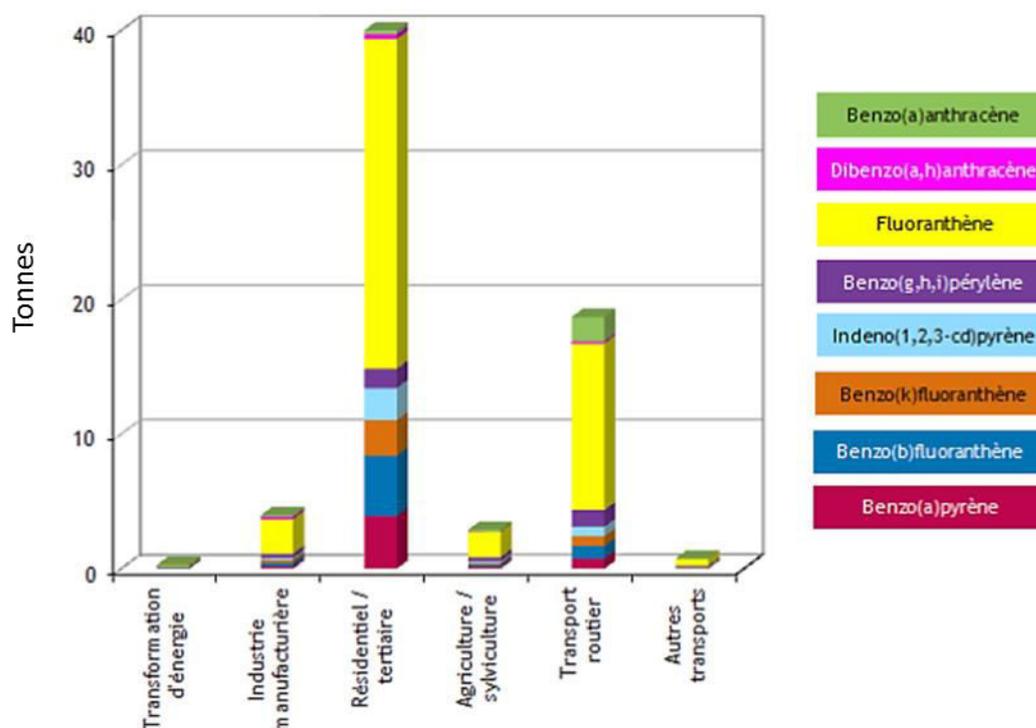
Les HAPs présentent diverses propriétés physico-chimiques découlant de leur structure et de leur poids moléculaire. A l'état pur et à température ambiante, les HAPs sont des solides colorés (allant de blanc à jaune) présents sous forme cristalline. Leurs températures de fusion sont supérieures à 100°C et leurs points d'ébullition sont supérieurs à 300°C. La volatilité des HAPs, mesurée grâce à la tension de vapeur, diminue à mesure que le nombre de cycles aromatiques augmente. Ainsi, les HAPs constitués de peu de cycles, comme le naphthalène (2 cycles), possèdent une tension de vapeur plus importante et sont donc plus volatils que les HAPs avec plus de cycles comme le B[a]P (5 cycles). De même que pour la volatilité, la solubilité des HAPs diminue avec l'augmentation du nombre de cycles. Ainsi, le naphthalène possède une solubilité de 31.7 mg/L, tandis que le B[a]P possède une solubilité de 4 µg/L. Les HAPs sont des molécules généralement lipophiles possédant un coefficient de partage octanol/eau (Kow) relativement élevé. Le caractère lipophile des HAPs permet à ces molécules de s'adsorber facilement sur les particules en suspension dans l'air ou l'eau.

## 1.2. Sources de production des HAPs

Les HAPs sont principalement issus de la combustion incomplète des matières organiques par pyrolyse (décomposition chimique d'une substance par chauffage intense - température supérieure à 500°C - en absence d'oxygène) et/ou pyrosynthèse (recombinaison de deux composés en un composé nouveau par chauffage). Il est communément reconnu deux grandes origines de production des HAPs. Une origine naturelle, résultant de la combustion des arbres et végétaux lors des feux de forêts, des processus géochimiques ou du relargage important de fumées lors des éruptions volcaniques, et une origine anthropique, due à l'activité humaine. Cette dernière est la principale source de production des HAPs. Elle comprend entre autre, l'activité industrielle, avec notamment des phénomènes pétrogéniques lors des procédés industriels de distillation de la houille et du pétrole, le trafic routier avec les émissions de fumées de moteurs, ou encore le chauffage domestique et particulièrement le chauffage au bois (Bostrom *et al.*, 2002). Les HAPs sont majoritairement produits sous forme de mélanges plus ou moins complexes dont la composition dépend de la nature de la matière organique d'origine et des procédés de combustion (quantité et type de combustible, température et

durée de la combustion, disponibilité de l'oxygène) (Jongeneelen, 1997). Ainsi, certains HAPs sont plus produits par le chauffage domestique, comme le fluoranthène (Fla), le pyrène (Pyr) ou le chrysène (Chr) et d'autres sont plus produits lors de l'incinération de déchets, comme le phénanthrène ou le benzo(e)pyrène (B[e]P) (Nikolaou *et al.*, 1984).

En 2015, la majorité des HAPs produits de façon anthropique provenaient du secteur résidentiel (**Figure 1**). Depuis les années 1990, il a été observé une nette diminution de la production d'HAPs par ce secteur, passant de 35 tonnes par an à 13 tonnes. Le secteur du transport routier, bien que moins important, n'est quant à lui passé que de 2.9 tonnes produites en 1990 contre 2.7 en 2015 (Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) / Format SECTEN - avril 2017). Les productions d'HAPs provenant de sources non anthropiques (feux de forêts, éruption volcaniques) sont très variables et sont passées de 16.4 tonnes (sur l'année 1990) à 1.3 tonnes (pour l'année 2013) (CITEPA / Format SECTEN - avril 2017). Pour l'année 2015, les HAPs les plus produits en France sont le fluoranthène (40.3 tonnes), le benzo(a)anthracène (8.3 tonnes), le benzo(b)fluoranthène (B[b]F) (6.4 tonnes pour l'année 2015) suivi par le B[a]P (5.3 tonnes pour l'année 2015) (CITEPA / Format SECTEN - avril 2017).



**Figure 1 : Répartition des émissions de 8 HAPs en tonnes par secteurs en France.**  
*Rapport Coordination de la Réalisation des Inventaires d'Emissions, CITEPA, 2012.*  
 (<https://www.citepa.org/fr/air-et-climat/polluants/polluant-organiques-persistants/hydrocarbures-aromatiques-polycycliques>)

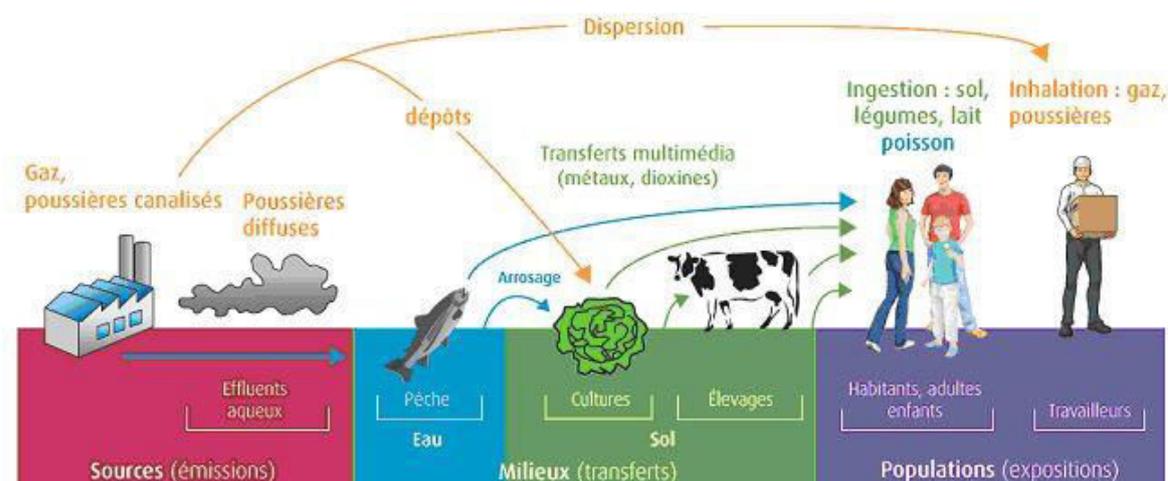
### 1.3. Transport et devenir dans l'environnement

Les HAPs sont des composés très stables qui participent fortement à la pollution de l'environnement. Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, les HAPs sont retrouvés dans tous les compartiments de l'environnement (air, eau, sol), souvent sous forme adsorbée sur des particules assurant leur transport, parfois loin des sites d'émission.

Les principales sources de production des HAPs (échappement des véhicules, fumées industrielles, fumées issues du chauffage domestique) entraînent leur relargage dans l'atmosphère, où ils se répartissent entre la phase gazeuse et la phase particulaire. Ce sont essentiellement les HAPs de haut poids moléculaire (plus de 4 cycles), qui se retrouvent dans la phase particulaire, adsorbés à des particules fines, tandis que les HAPs de faible poids moléculaire (de 2 à 3 cycles) se retrouvent plus dans la phase gazeuse. Les HAPs de poids moléculaire intermédiaire, comme le Fla ou le Pyr, sont retrouvés dans les deux phases (Sheu *et al.*, 1997 ; Rehwagen *et al.*, 2005). Les HAPs sont des molécules sensibles à la lumière qui peuvent subir des processus de photolyse, et dans l'air, le devenir des HAPs dépend de la taille et de la nature des particules sur lesquelles ils sont adsorbés. Ainsi, le B[a]P et l'anthracène sont moins sensibles aux processus de photolyse lorsqu'ils sont adsorbés sur des particules de cendres volantes de charbon que lorsqu'ils sont adsorbés sur des particules d'alumine activées (Korfmacher *et al.*, 1980). Dans l'ensemble, la demi-vie des HAPs dans l'air reste relativement courte, comme par exemple celle du B[a]P qui est de 7 jours lorsqu'il est adsorbé à une particule de suie exposée à la lumière (Butler *et al.*, 1993).

Les HAPs peuvent contaminer les sols et les eaux par déversement accidentel d'usine, par retombées de poussières atmosphériques contaminées (après condensation des particules ou au cours de précipitations), suite à l'enfouissement des déchets ou *via* les marées noires. Une fois dans les sols ou dans les rivières, la mobilité des HAPs dépend de la mobilité des particules sur lesquelles ils sont fixés (poussières, particules, végétaux...). Ils peuvent être soumis à de nombreux phénomènes participant à leur devenir dans l'environnement (la volatilisation, la photooxydation, la photodégradation, l'oxydation chimique, l'adsorption sur les particules, la sédimentation, ou l'infiltration). La contamination des sols et des eaux participe à la contamination des animaux d'élevage (*via* une eau et une alimentation contaminée (herbes, foins, céréales)), des organismes aquatiques ainsi que des produits de l'agriculture. Un schéma récapitulant le parcours des HAPs dans l'environnement est présenté ci-dessous (**Figure 2**). Les HAPs, et

particulièrement les HAPs de haut poids moléculaire, présentent une forte stabilité dans les sols et du fait de l'absence de lumière, ils ne subissent pas de photolyse, leur demi-vie est donc longue (en moyenne 8,2 ans pour le B[a]P) (Wild *et al.*, 1991), d'où leur importance dans la pollution environnementale.



**Figure 2 : Différentes sources de production et contamination de l'environnement par les HAPs.** Les HAPs principalement produits par l'activité humaine, sont retrouvés dans l'eau, l'air et les sols où ils peuvent contaminer les animaux et végétaux. L'Homme peut alors être exposé aux HAPs via l'air, la consommation d'animaux ou de végétaux contaminés.

Dans les sols et les sédiments, les HAPs sont principalement dégradés par biorémédiation (dégradation microbienne). La biorémédiation est un processus réalisé par certaines bactéries, champignons ou algues. Ces espèces capables de biodégrader les HAPs ont été isolées à partir de milieux contaminés aux HAPs et appartiennent entre autres aux genres *Spongomonas*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Rhizobium*, *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperellum*, *Fusarium* (Kanaly et Harayama, 2010 ; Maeda *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2010 ; Zafra *et al.*, 2015). Récemment, l'espèce *Raoultella planticola*, a été impliquée dans la biorémédiation du B[a]P (Ping *et al.*, 2017). De nombreux facteurs peuvent influencer le devenir de la biorémédiation des HAPs, tels que les propriétés des sols (pH, température, composition en minéraux et matière organique, accessibilité des nutriments), les profils des composés (nature des HAPs, poids, concentration initiale) (Xu *et al.*, 2016), les populations microbiennes présentes ou encore les conditions climatiques (temps, humidité, aération) (Johnsen *et al.*, 2005).

## 1.4. Exposition humaine

La multiplicité des sources de production des HAPs, ainsi que leur présence ubiquitaire dans l'environnement, expliquent l'exposition humaine récurrente à ces substances. Cette exposition peut être professionnelle ou domestique, *via* l'alimentation et la pollution extérieure ou intérieure. Les principales voies d'exposition aux HAPs sont les voies respiratoire, orale (*via* l'alimentation principalement) et cutanée.

### 1.4.1. Exposition par voie respiratoire

L'exposition par voie respiratoire est une source d'exposition majeure pour les professionnels. Ainsi, les personnes travaillant dans l'entretien des voiries, dans l'étanchéité des toitures et terrasses ou dans la construction, sont exposées aux fumées de bitumes riches en HAPs, particulièrement en présence de bitumes chauffés (Rapport de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), 2013). Les niveaux les plus élevés de B[a]P ont été mesurés dans des fonderies d'aluminium avec des valeurs pouvant atteindre  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  sachant que la réglementation européenne limite ces niveaux à une moyenne annuelle de  $1 \text{ ng}/\text{m}^3$ , et que les concentrations moyennes retrouvées dans l'air ambiant sont de 1 à  $30 \text{ ng}/\text{m}^3$  (CIRC, 2010, 2012 ; directive 2004/107/CE).

Les HAPs absorbés par inhalation proviennent aussi des gaz d'échappement émis par les voitures (particulièrement des véhicules diesels). Dans une moindre mesure, les gaines de câblage et l'abrasion des pneus sur les routes peuvent être à l'origine de l'émission de faibles quantités d'HAPs. En zone rurale, la charge en HAPs est en moyenne de  $0,2 \text{ ng}/\text{m}^3$ , tandis que dans les zones urbaines ou péri-urbaines, les concentrations en HAPs varient de 1 à  $10 \text{ ng}/\text{m}^3$ . Les quantités d'HAPs absorbées quotidiennement par inhalation de l'air extérieur s'élèvent en moyenne à 20 ng de HAPs, ce qui représente une faible exposition comparée à l'alimentation (*cf* paragraphe sur l'exposition par voie orale).

Dans l'air intérieur, les composés les plus fréquemment détectés sont le phénanthrène, le fluoranthène, le Pyr et le Chr. Les poêles et systèmes de chauffage au fioul dysfonctionnels ont tendance à augmenter le taux de HAPs d'une pièce. Par ailleurs, la fumée de cigarette contient environ 10 HAPs (CIRC, 2004). Selon l'EFSA (2008), la consommation de 20 cigarettes par jour correspond à l'absorption de 2 à  $5 \mu\text{g}$  de HAPs

dont 105 ng de B[a]P, tandis qu'un non-fumeur exposé pendant 5 heures à la fumée de cigarette absorbe 40 ng de B[a]P (EFSA, 2008).

#### 1.4.2. Exposition par voie orale

L'ingestion quotidienne de produits contaminés par les HAPs est la principale source d'exposition aux HAPs dans la population générale des pays développés (Phillips *et al.*, 1999). Chez les sujets non-fumeurs, l'alimentation représente ainsi de 88% à 98% des expositions totales en HAPs (Plaza-Bolanos *et al.*, 2010 ; Silva *et al.*, 2012). C'est notamment *via* la consommation de viandes et de poissons grillés ou fumés que l'exposition aux HAPs est la plus forte. En effet, les procédés de cuisson des aliments influent particulièrement sur les quantités de HAPs retrouvés dans ceux-ci. Ainsi, les aliments grillés, ou ayant subi des processus de fumage, sont très riches en HAPs. Par exemple, la nourriture grillée au barbecue peut atteindre jusqu'à 160 µg/kg de HAPs (Phillips *et al.*, 1999), tandis que dans les aliments fumés, il peut être retrouvé jusqu'à 200 µg/kg de HAPs (Omwukeme *et al.*, 2015). L'exposition se fait aussi *via* la consommation de produits contaminés par les HAPs, comme les légumineuses ou les céréales. La présence de HAPs dans les huiles et graisses végétales, ainsi que dans le thé et le café (suite aux procédés de torréfaction), a également été rapportée (Houessou *et al.*, 2008). Enfin, la consommation de certains crustacés ou mollusques peut être source d'exposition aux HAPs, ces organismes étant peu capables de métaboliser ces molécules, ils apparaissent comme de bons bioaccumulateurs de ces substances. En Europe, malgré leur concentration en HAPs modérée, les produits de la mer et les céréales représentent la principale source d'exposition quotidienne par l'alimentation du fait des importantes quantités qui sont consommées. Le CIRC, en 2012, estimait l'ingestion quotidienne de HAPs à 235 ng/jour de B[a]P, cette valeur pouvant être multipliée par deux pour des personnes consommant de très grandes quantités de céréales et de poissons. Du fait du caractère hydrophobe des HAPs, l'exposition *via* l'eau de boisson est très faible. D'après une étude de l'ANSES en 2006, les HAPs majoritaires dans l'eau de boisson sont le phénanthrène, le Fla et le fluorène, adsorbés aux particules en suspension.

### 1.4.3. Exposition par voie cutanée

L'exposition par voie cutanée est principalement retrouvée dans les cas d'expositions professionnelles, notamment chez les travailleurs de l'asphalte. Ce genre d'exposition est particulièrement retrouvé lors de contact cutané avec des objets souillés aux HAPs comme des chaussures en caoutchouc ou des outils, mais peut aussi survenir *via* un dépôt cutané lorsque l'atmosphère est chargée en HAPs. (CIRC 2010, 2012).

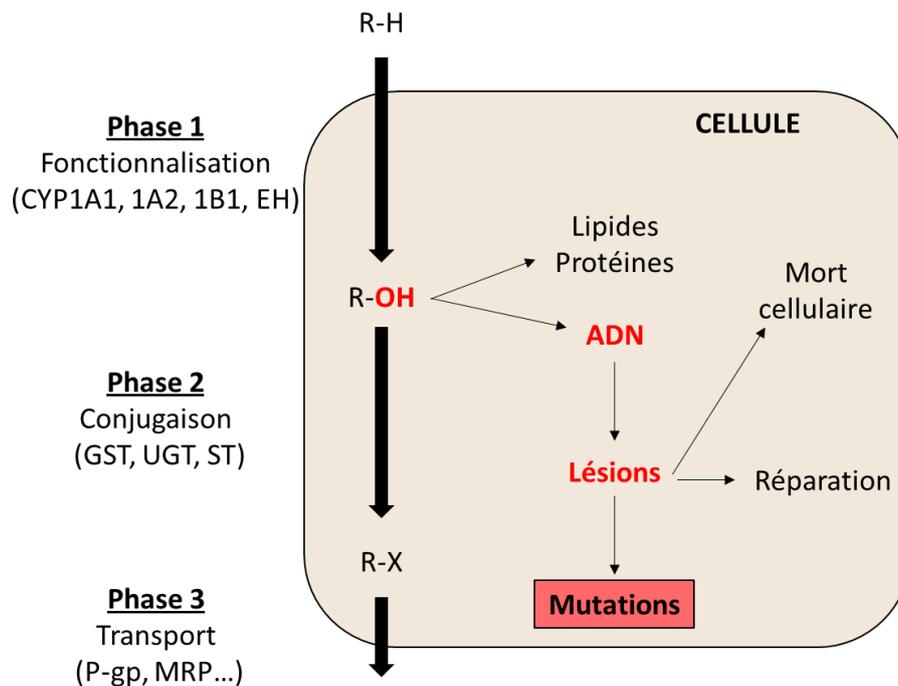
### 1.5. Toxicocinétique

La toxicocinétique prend en compte les phénomènes d'ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excretion) des xénobiotiques.

Chez l'homme, l'absorption des HAPs se fait principalement au niveau du poumon, de l'intestin et de la peau. A ces niveaux, les HAPs diffusent aisément à travers les membranes plasmiques du fait de leur caractère lipophile (Yu *et al.*, 2005). Les HAPs volatils, de faible poids moléculaire sont absorbés rapidement à tous les niveaux du tractus respiratoire (Gerde *et al.*, 1998), tandis que les HAPs de haut poids moléculaire, peu volatils et adsorbés à des particules, sont absorbés rapidement au niveau de l'épithélium alvéolaire (Gerde *et al.*, 1993) et lentement au niveau du reste du tractus respiratoire (Gerde *et al.*, 1997). La clairance muco-ciliaire au niveau de l'arbre respiratoire fait remonter une partie des particules contaminées aux HAPs les faisant entrer dans l'organisme par la voie digestive. L'absorption digestive des HAPs est rapide. Leur absorption gastro-intestinale est bien documentée par des expérimentations animales qui ont montré que plusieurs facteurs pouvaient faciliter cette absorption : le poids moléculaire des HAPs, et leur lipophilie, la présence de bile dans le tractus digestif, la dose ingérée ainsi que la concentration en lipides de la nourriture contaminée (Marques *et al.*, 2011). Ainsi, des rats exposés *via* l'alimentation au B[a]P radiomarqué avaient un marquage radioactif interne plus important lorsque l'alimentation était plus riche en graisse (Purcaro *et al.*, 2014). Lors d'un contact cutané prolongé, il a été montré *in vitro* que 1 à 3% de la dose d'HAPs appliquée sur la peau était absorbée (Moody, 1995).

Après absorption, les HAPs sont rapidement distribués dans l'organisme. Par exemple chez le rat, immédiatement après inhalation de B[a]P radiomarqué, de la radioactivité est détectée au niveau du foie et des reins (Mitchell, 1982). Leur distribution dans les différents organes dépend alors de nombreux facteurs intrinsèques aux HAPs (structure, lipophilie) et extrinsèques (mode d'administration, solvant d'administration, capacité métabolique des tissus). Ils sont distribués dans tout l'organisme et particulièrement dans les tissus riches en lipides (Marques *et al.*, 2011). Ils sont notamment retrouvés au niveau du foie et du tissu adipeux, mais aussi, dans une moindre mesure, dans les poumons, la moelle osseuse et le tractus intestinal (Helleberg *et al.*, 2001). Des études ont montré la capacité des hydrocarbures aromatiques à franchir la barrière hémato-placentaire chez le singe marmouset (Hagenmeier *et al.*, 1990) ou chez le rongeur (Nau et Bass, 1981). Chez la femme, il a été observé une accumulation des HAPs dans le lait, ainsi que dans le sang du cordon ombilical, suite à une exposition aux HAPs (Madhavan et Naidu, 1995, Pulkrabova *et al.*, 2016).

Les réactions de biotransformation des xénobiotiques catalysées par les différentes enzymes du métabolisme s'inscrivent dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme. Le métabolisme des HAPs vise à augmenter leur polarité et leur solubilité et ainsi faciliter leur excrétion de la cellule. Ces biotransformations conduisent ainsi à la formation de métabolites plus ou moins réactifs dont la quantité dépend de l'espèce et du tissu considéré. Le métabolisme des HAPs s'effectue en trois étapes (**Figure 3**).



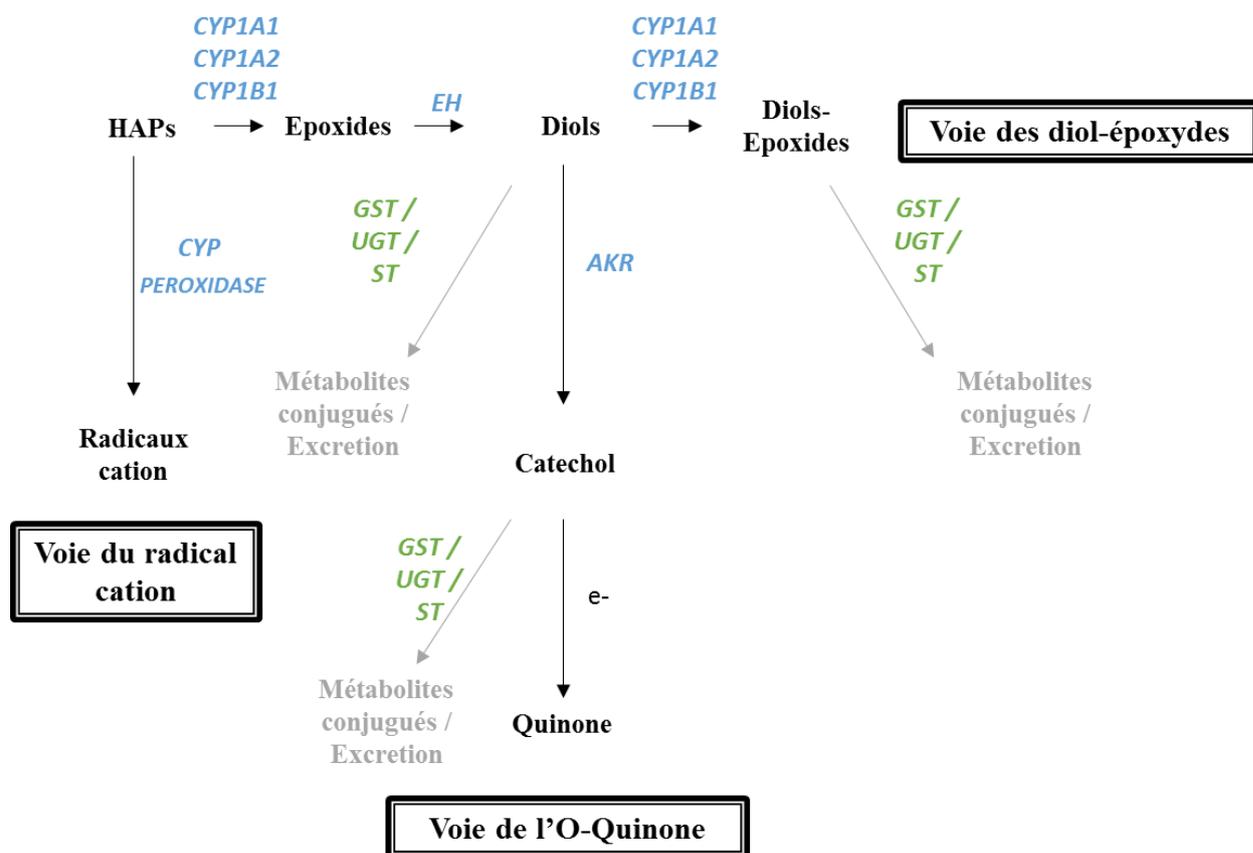
**Figure 3 : Schéma des 3 étapes du métabolisme des HAPs et relation avec leurs effets toxiques.** CYP (Cytochrome P450), GST (Glutathion-S-Transferase), UGT (UDP-GlucuronylTransferase), ST (SulfoTransferase), P-gp (P-glycoprotéine), MRP (Multidrug Resistance Protein), R-H (composé à détoxifier), R-OH (métabolites hydroxylés), R-X (métabolites conjugués aux molécules endogènes). D'après Habdous et al., 2003.

La phase de fonctionnalisation ou phase 1, permet à la cellule de rendre plus polaire la molécule prise en charge, augmentant ainsi son hydrophilie et son excrétion de la cellule. Pour les HAPs, l'étape de fonctionnalisation peut se diviser en trois grandes voies métaboliques, présentées ci-après. La phase de conjugaison ou phase 2, permet de coupler les métabolites formés lors de la phase de fonctionnalisation, ou le composé d'origine, avec des composés d'origine endogène augmentant encore l'hydrophilie de la molécule. Enfin, la phase d'export ou phase 3, permet l'excrétion du ou des métabolites formés au cours des deux premières phases, ou directement du composé d'origine, *via* des transporteurs membranaires d'efflux.

### 1.5.1. Phase de fonctionnalisation

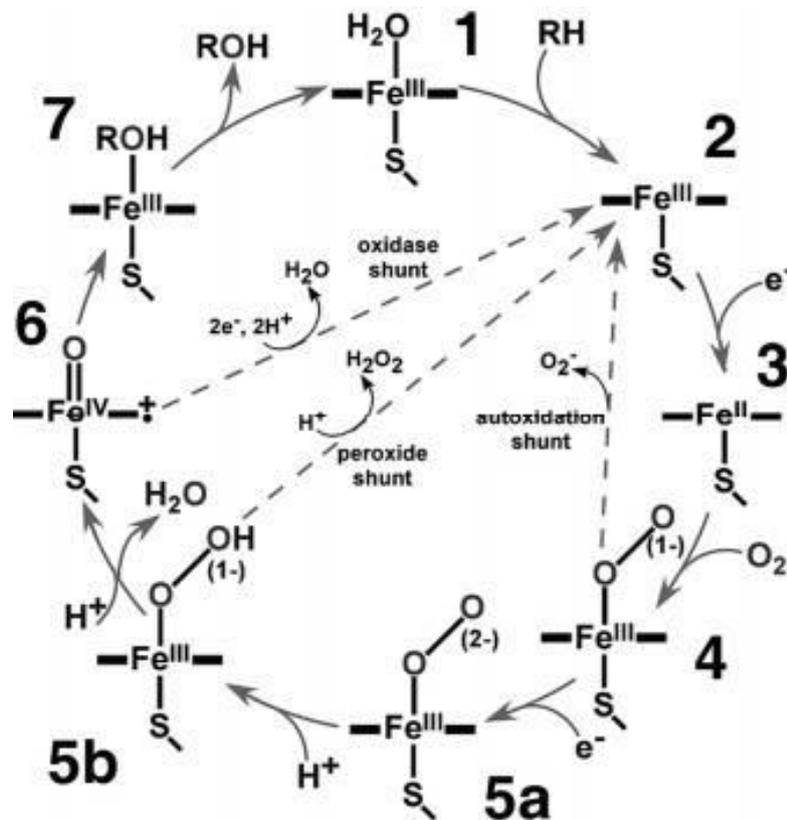
Pour la phase de fonctionnalisation, trois voies métaboliques ont été décrites pour les HAPs (**Figure 4**) (Xue et Warshawsky, 2005). La voie la plus importante est celle des diol-époxydes, faisant intervenir les Cytochromes P450 (CYPs) et l'époxyde hydrolase (EH). Cette voie est largement admise comme mécanisme prédominant de cancérogenèse chimique des HAPs (Hall *et al.*, 1988 ; Harvey *et al.*, 1988). La seconde voie repose sur la formation d'un radical cation par oxydation d'un électron et fait intervenir des CYPs à

activité peroxydase (Cavalieri *et al.*, 1992 ; Cavalieri *et al.*, 1995). Enfin, une troisième voie d'activation des HAPs met en jeu la formation d'O-quinone catalysée par la dihydrodiol déshydrogénase (Penning *et al.*, 1996 ; Penning *et al.*, 1999) (**Figure 4**).



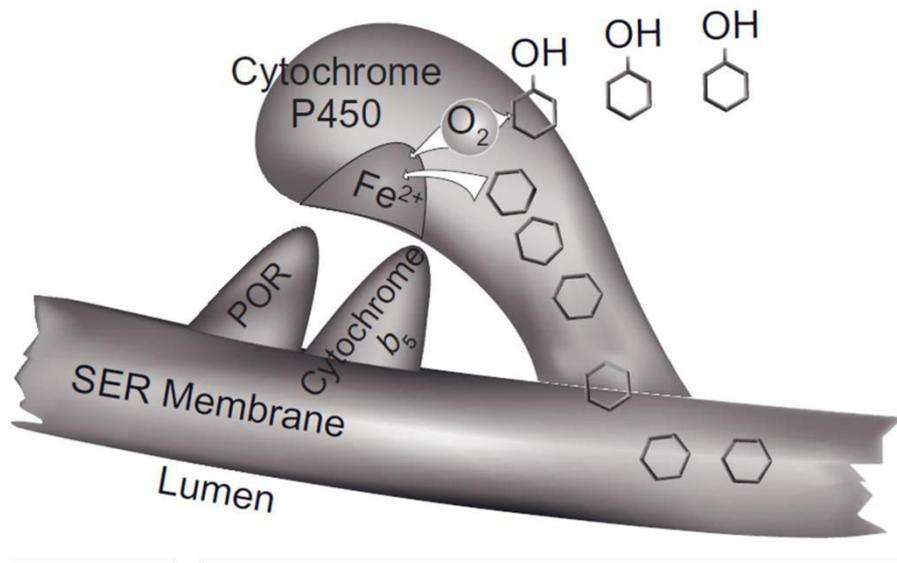
**Figure 4 : Trois principales voies métaboliques de la phase 1 de fonctionnalisation des HAPs.** Les enzymes notées en bleu correspondent aux enzymes de la phase 1 (CYP (Cytochrome P450), EH (Epoxyde Hydrolase), AKR (Aldo-céto-Réductase)), les enzymes notées en vert correspondent aux enzymes de la phase 2 (GST (Glutathion-S-Transferase), UGT (UDP-Glucuronyl-Transferase), ST (Sulfo-Transferase)). D'après Harvey *et al.*, 2005.

La voie des diol-époxydes fait intervenir trois réactions catalytiques. Dans un premier temps, une réaction de monoxydation au niveau d'une double liaison d'un des cycles est réalisée par les CYPs, puis une EH conduit à l'hydrolyse du cycle oxydé en dihydrodiol (Kiyohara *et al.*, 2002), et enfin, un second CYP catalyse l'oxydation d'une seconde liaison adjacente à la fonction diol pour générer un diol-époxyde. (Nerbet *et al.*, 2004). Les CYPs sont des hémoprotéines capables de catalyser des réactions de mono-oxygénation faisant intervenir le groupement fer de l'enzyme (**Figure 5**).



**Figure 5 : Cycle de monooxygénation par les CYPs.** Denisov *et al.*, 2005. Le substrat se fixe au niveau du site actif de l'enzyme, à proximité du groupement Fer sous forme ferrique ( $Fe^{3+}$ ) (1), la fixation du substrat entraîne un changement de conformation du site actif et entraîne le déplacement d'une molécule d'eau (2). Le  $Fe^{3+}$  est alors réduit en Fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) par un électron provenant d'un partenaire d'oxydo-réduction (NAD(P)H) (3). Du dioxygène ( $O_2$ ) vient se fixer entre le substrat et le  $Fe^{2+}$ , cette fixation entraîne la formation d'un complexe  $Fe^{2+}O_2$  (4). Ce complexe peut parfois se dissocier et former du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) interrompant le cycle catalytique. Un second électron entraîne la formation d'un complexe intermédiaire peroxy-ferrique (5a). S'en suit une protonation de cet intermédiaire, formant un complexe hydroperoxy-ferrique (5b). Cet intermédiaire est à nouveau protoné au niveau de l'atome d'oxygène distal qui entraîne une hétérolyse de la liaison O-O et le relargage d'une molécule d'eau avec formation d'un groupement très réactif (6). Le substrat est ensuite hydroxylé et relargué dans le cytoplasme (7).

Lors de la réaction de monooxygénation catalysée par les CYPs il y a transfert d'un électron depuis un donneur d'électron. Les CYPs peuvent utiliser directement des NAD(P)H (Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)) comme donneur d'électrons selon l'équation suivante :  $RH + O_2 + NAD(P)H + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NAD(P)^+$ , mais peuvent aussi récupérer les électrons *via* un transfert opéré par des P450 oxydoréductases et les cytochromes b5 (Sevrioukova *et al.*, 1999) (Figure 6).



**Figure 6 : Schéma représentatif des Cytochromes P450, des CYPs oxydoréductase et des cytochromes b5 lors de la phase 1 de détoxification.** D'après Coleman et al., 2010. Les CYPs oxydoréductases (POR) et les cytochromes b5, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (SER) permettent de transférer des électrons au cytochromes P450 localisés à proximité, lorsque ces derniers catalysent des réactions de mono-oxygénation.

Avec 17000 séquences identifiées chez différentes espèces, les CYPs représentent une des plus grandes superfamilles d'enzymes. Parmi les 17 familles que comptent les CYPs, 4 sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (CYP1, CYP2, CYP3 et CYP4). Ces familles présentent au moins 44% d'homologie de séquence en acides aminés. Ces quatre familles sont classées en sous-famille (CYP1A, CYP2D, etc.) dont chaque membre possède au moins 55% d'homologie de séquence en acides aminés avec les autres membres. Enfin, au sein d'une sous-famille les isoenzymes sont également distinguées (CYP3A4, CYP2D6, etc.). Les HAPs sont pris en charge par les CYPs de la famille 1, et plus particulièrement les CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 (Shiizaki, 2017). Les HAPs sont capables d'induire l'expression de ces CYPs et participent ainsi à l'activation de leur propre métabolisme (Nerbert *et al.*, 2004 ; Shimada *et al.*, 2006). Si les CYPs participent au mécanisme de détoxification, certains composés peuvent toutefois subir une activation métabolique (bioactivation) par les CYPs pour former des composés plus réactifs vis-à-vis des macromolécules comme l'ADN (Rendic et Guengerich, 2012). Ainsi, il a été mis en évidence que les CYP1A1 et CYP1B1 étaient

responsables de l'activation d'une grande partie des HAPs cancérigènes (Conney, 1982 ; Guengerich et Shimada, 1991, Shimada *et al.*, 1997).

Dans la voie du radical cation, les HAPs peuvent être pris en charge par des CYPs (Cavalieri et Rogan, 1992) conduisant au retrait d'un électron qui entraîne la formation d'un radical cation très instable et réactif.

Dans la voie de l'O-quinone, les composés dihydrodiols formés par les CYPs et l'EH peuvent être pris en charge par une dihydrodiol déshydrogénase, de la famille des aldo-céto réductases (AKR). Les diols sont d'abord oxydés en cétoles en présence de NADP<sup>+</sup> (Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate) (Penning *et al.*, 1999), puis sont ensuite transformés spontanément en catéchols en présence d'oxygène. Des mécanismes d'oxydation non enzymatique permettent la transformation de ces catéchols en HAP-*ortho*-quinones, capables de former des adduits à l'ADN. Lors de ce processus métabolique des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générées. Ainsi, le catéchol formé subit deux oxydations, une première qui produit un anion O-semiquinone et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), suivi d'une seconde oxydation qui donne de la O-quinone et un anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Xue et Warskowsky, 2005). L'O-quinone formée peut subir une réduction dépendante de la NADPH, par l'enzyme NADPH dehydrogenase quinone 1 (NQO1) pour reformer le catéchol pouvant entraîner des cycles redox supplémentaires qui amplifient la production d'ERO (Penning *et al.*, 1996). En présence de métaux, tels que le fer (Fe<sup>2+</sup>), selon la réaction d'Haber-Weiss, O<sub>2</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent produire un radical hydroxyle (OH<sup>·</sup>) (Chen et Schopfer, 1999). Ces ERO peuvent conduire à la formation de dommages oxydatifs à l'ADN (Penning, 1999).

### 1.5.2. Phase de conjugaison

La seconde phase du métabolisme, ou phase de conjugaison, fait appel à diverses enzymes de conjugaison, les Glutathion-S-transférase (GST), les UDP-Glucuronyltransférases (UGT) ou encore les Sulfotransférases (ST). Ces enzymes permettent la conjugaison des produits formés lors de la phase de fonctionnalisation avec des groupements polaires endogènes comme le glutathion (conjugué grâce à la GST), l'acide glucuronique (conjugué grâce à l'UGT) ou à l'acide sulfurique (conjugué grâce à la ST). La conjugaison de ces groupements aux métabolites formés permet d'augmenter

la solubilité des métabolites, favorisant leur excrétion. Comme pour les CYPs, les HAPs sont capables d'induire l'expression de certaines enzymes de la phase 2, comme les UGT et les GST (Bock *et al.*, 1998 ; Sugatani *et al.*, 2005).

### 1.5.3. Phase de transport

Le transport des HAPs ou de leurs métabolites dans le milieu extracellulaire est assuré par des transporteurs membranaires de la famille des ATP-Binding Cassette (ABC) tel que la P-glycoprotéine (P-gp) (Yeh *et al.*, 1992 ; Phang *et al.*, 1993). La P-gp est un transporteur d'efflux impliqué dans les résistances à certains anticancéreux (Ambudkar *et al.*, 1999), dont l'expression peut être induite par les HAPs comme par le B[a]P, qui par exemple, augmente les niveaux d'expression de la P-gp dans une lignée cellulaire d'hépatome de souris (Mathier *et al.*, 2001). Dans des cellules humaines intestinales Caco-2, l'efflux d'un métabolite conjugué du Pyr, l'hydroxy-Pyr (1-OHP), est assuré par un autre membre de la famille des transporteurs ABC, ABCG2, dont l'expression est également induite en présence de B[a]P (Hessel *et al.*, 2013 ; Ebert *et al.* 2005).

L'élimination des HAPs est variable en fonction des voies d'absorption : principalement dans les fèces, via l'excrétion biliaire après ingestion (80 - 90 %) ou dans les urines (15 à 20 %) après absorption cutanée et/ou digestive. Par exemple une faible fraction du B[a]P (< 1 %) est éliminée sous forme de 3-hydroxy-B[a]P (3-OHB[a]P). Après une administration orale de B[a]P à des rats, 4 à 12% de la dose de B[a]P sont retrouvés dans les urines après 72 heures tandis que 70 à 75% sont retrouvés dans les fèces (Yamazaki *et al.*, 1989). Plus récemment, la toxicocinétique du B[a]P et celle du 3-OHB[a]P, a été étudiée chez des rats après injection intraveineuse de B[a]P. Après 72 heures d'exposition, 0.21% de la dose est excrétée dans les urines et 12.9% dans les fèces, sous forme 3-OHB[a]P (Marie *et al.*, 2010).

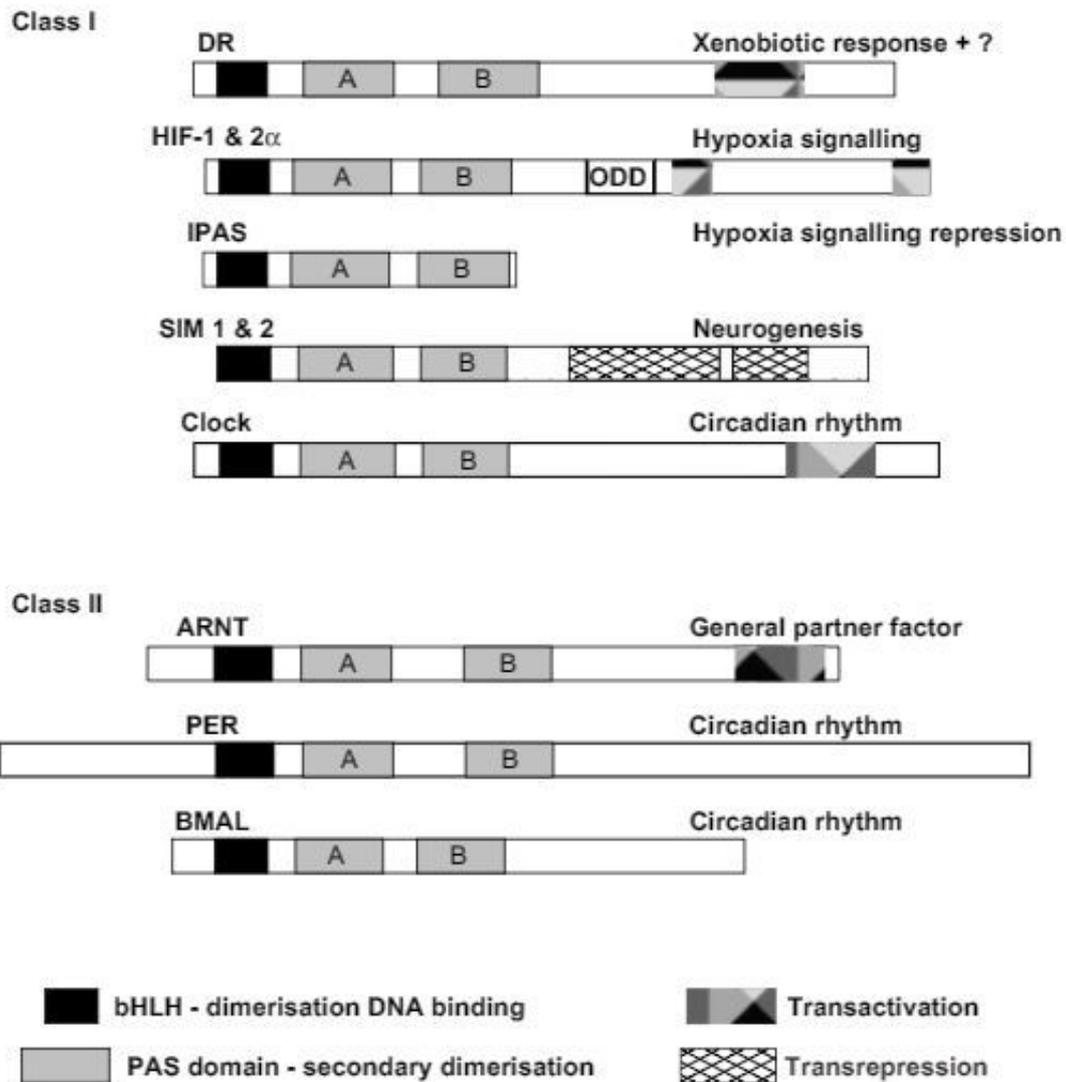
## 1.6. Mécanismes d'action des HAPs

Les effets des HAPs sont principalement liés à leur capacité à activer un facteur de transcription, le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh). Ce récepteur, cytoplasmique lorsqu'il est inactif, peut être activé et se transloquer dans le noyau après exposition à un ligand et réguler l'expression de nombreux gènes, dont les gènes codant pour les enzymes de phase 1 et phase 2.

### 1.6.1. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh)

#### 1.6.1.1. Définition du RAh

Il y a 40 ans, Alan Poland et ses collaborateurs montraient l'implication d'un récepteur cytosolique dans la réponse cellulaire aux composés de type hydrocarbures aromatiques ; l'activation de ce récepteur permettait la régulation de l'activité des CYPs (Poland *et al.*, 1976 ; Poland et Glover, 1974). Ce récepteur fut nommé récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh). Le RAh est une protéine cytosolique de 95 à 125 kDa selon les espèces (Poland et Glover, 1987). Chez l'homme, le gène codant pour le RAh (Dolwick *et al.*, 1993) est localisé sur le chromosome 7 (Le Beau *et al.*, 1994) et est constitué de 11 exons (Bennett *et al.*, 1996). Le RAh appartient à la superfamille des facteurs de transcription  $\beta$ HHLH-PAS (basic-Helix-Loop-Helix-Period-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-Single-minded). Les protéines de la famille  $\beta$ HHLH-PAS sont des facteurs de transcription qui possèdent en région N-terminale un domaine  $\beta$ HHLH suivi de deux domaines PAS et enfin, dans la partie C-terminale un domaine de transactivation. Il existe deux classes de facteurs de transcription  $\beta$ HHLH-PAS, la classe I et la classe II répertoriées en fonction de leur potentiel de dimérisation. Les membres de la classe I, comme le RAh, les protéines HIF (Hypoxia Inducible Factor), SIM (Single-minded homolog 1) et Clock, ne peuvent former des hétérodimères qu'avec les membres de la classe II, comme le translocateur nucléaire du RAh (ARNT), la protéine Per ou encore BMAL (Brain and Muscle ARNT Like protein), tandis que les membres de la classe II peuvent soit s'homodimériser soit s'hétérodimériser avec des membres de la classe I (**Figure 7**).



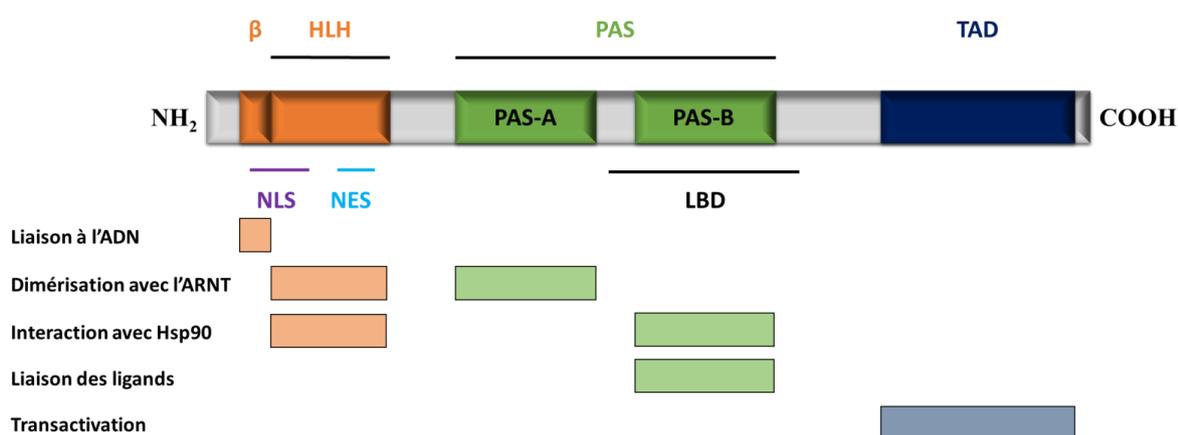
**Figure 7 : Les domaines des facteurs de transcription de la famille  $\beta$ HLH-PAS.** *Furness et al., 2007. Les facteurs de transcription de la famille  $\beta$ HLH-PAS sont classés en deux catégories, la classe I et la classe II. Ces facteurs de transcription, fonctionnels sous forme de dimères, peuvent former des hétérodimères (Classe I – Classe II) ou des homodimères (Classe II – Classe II).*

Les membres de la famille  $\beta$ HLH-PAS participent chez certaines espèces à des mécanismes physiologiques et développementaux essentiels. Par exemple, la protéine SIM participe à la neurogénèse et les protéines Per et Clock sont impliquées dans l'établissement des rythmes circadiens (Massari et Murre., 2000). Le RAh présente la particularité d'être le seul récepteur de la famille  $\beta$ HLH-PAS activable par un ligand exogène (Bersten *et al.*, 2013). Il possède un domaine de liaison au ligand LBD (Ligand Binding Domain) dans son domaine PAS (**Figure 8**).

## 1.6.1.2. Domaines et structure

### 1.6.1.2.1. Domaines du RAh

Le domaine  $\beta$ HLH est un domaine commun à plusieurs facteurs de transcription, comme Myc/Max ou MyoD/E2A, USF, E47. Ce domaine se compose de 4 hélices  $\alpha$ , dont les régions basiques ( $\beta$ ) présentent une très forte affinité pour l'ADN (Dong *et al.*, 1996). La partie HLH quant à elle, intervient dans l'hétérodimérisation du RAh avec son partenaire, l'ARNT. Au niveau cytoplasmique, le domaine HLH est occupé par des protéines chaperonnes, les Heat Shock Protein 90 (Hsp90) (**Figure 8**) (Reisz-Porszasz *et al.*, 1994). Le domaine  $\beta$ HLH contient deux autres domaines, un NLS et un NES (**Figure 8**) (pour Nuclear Localization Signal et pour Nuclear Export Signal respectivement). Ces domaines sont impliqués dans la localisation cellulaire du RAh (Ikuta *et al.*, 2000).



**Figure 8 : Représentation schématique des différents domaines du RAh.**

Le domaine PAS est un domaine structurel retrouvé chez un grand nombre d'êtres vivants, des bactéries à l'homme. C'est un domaine qui fonctionne comme un détecteur de signal et est retrouvé dans de nombreuses protéines de signalisation intervenant dans la détection et l'adaptation à des changements environnementaux. PAS est un acronyme provenant des noms des trois premières protéines de cette famille découverte, la protéine PER (Forster *et al.*, 2004), la protéine ARNT (Hoffman *et al.*, 1991) et la protéine SIM (Shi *et al.*, 2010). Aujourd'hui, plus d'une trentaine de protéines ont été classées dans la famille PAS. Le domaine PAS est défini comme deux séquences proches composées de 70 acides aminés imparfaitement répétées appelées PAS-A et PAS-B (**Figure 8**). Le domaine PAS-A est impliqué dans l'hétérodimérisation du RAh avec l'ARNT. Le

domaine PAS-B sert surtout à la liaison des ligands du RAh. Le domaine PAS-B joue aussi un rôle dans la liaison avec les protéines chaperonnes. Le domaine PAS est enfin impliqué dans la spécificité du partenaire d'hétérodimérisation, le domaine isolé  $\beta$ HLH est capable de s'homodimériser tandis que la liaison spécifique avec ARNT ne se fait qu'en présence du domaine PAS-A (Pongratz *et al.*, 1998).

Le domaine TAD est un domaine variable présentant peu d'homologie de séquence entre les espèces (60%). Ce domaine est localisé dans la partie C-terminale du récepteur et est composé de trois segments. Le segment allant des acides aminés 500 à 600 est le domaine acide du TAD et est suivi d'un segment protéique riche en glutamine (Q) allant des acides aminés 600 à 713, et d'un domaine riche en proline, sérine et thréonine (P/S/T) allant des acides aminés 713 à 848 (Jain *et al.*, 1994). Le domaine TAD du RAh facilite le recrutement et la fixation de facteurs de transcription TBP (TATA-box Binding Protein) et NF-1 (Nuclear Factor 1) (Hankinson, 2005). Le domaine Q est impliqué dans le recrutement de co-activateurs et dans la transactivation des gènes cibles du RAh. Chez l'Homme, le polymorphisme du RAh est globalement localisé dans ce domaine, notamment au niveau des codons 517, 554 et 570.

#### 1.6.1.2.2. Les partenaires protéiques du RAh

Au niveau du cytoplasme, le RAh est complexé à des protéines chaperonnes. Deux Hsp90 (Heat Shock Protein 90) sont localisées au niveau du domaine  $\beta$ HLH et PAS-B des sites de fixation de l'ADN, du ligand, et du partenaire ARNT (AhR-Nuclear Translocator) (**Figure 8**). Elles sont impliquées dans la protection du RAh vis-à-vis de la dégradation du récepteur au niveau cytoplasmique. L'utilisation de geldanamycine, une benzoquinone bloquant l'assemblage du complexe Hsp90-pp60src/RAh, entraîne une diminution de 80% des niveaux protéiques de RAh après une exposition à un ligand fort du RAh (Whitesell *et al.*, 1994). Enfin, ces protéines chaperonnes ont aussi été impliquées dans le maintien du repliement du récepteur permettant une configuration optimale en vue de la fixation d'un ligand sur le RAh (Pongratz *et al.*, 1992).

La protéine chaperonne, AH receptor-interacting protein (AIP) / aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein, immunophilin homolog (ARA9) / HBV X-associated protein 2 (XAP-2) a surtout été impliquée dans la stabilité du complexe RAh-Hsp90 et sa localisation cytoplasmique. La présence de XAP-2 et Hsp90 permettait la fixation du complexe au niveau du cytosquelette d'actine empêchant sa translocation au niveau nucléaire (Traber *et al.*, 2012). De plus, en favorisant le maintien du complexe Hsp90-RAh, XAP-2 limite la dégradation du RAh par le protéasome (Meyer et Perdrew, 1999).

La protéine p23 n'est pas liée au RAh, elle est considérée comme une co-chaperonne. Elle est localisée au niveau C-terminal des protéines Hsp90 et participe à leur dissociation du RAh après la fixation d'un ligand sur le récepteur (Kekatpure *et al.*, 2009).

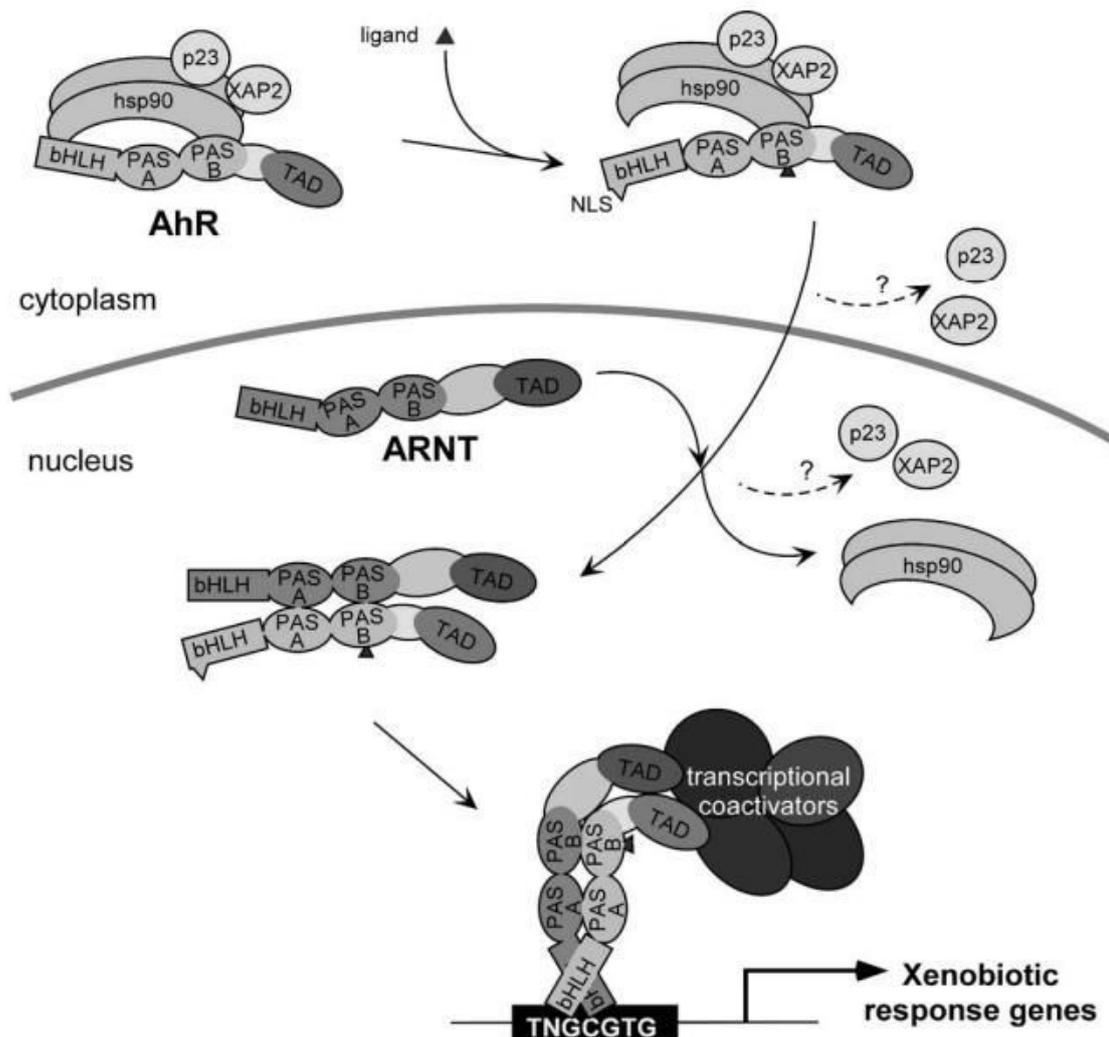
La protéine pp60src appartient à la famille des protéines kinases. C'est une kinase inactive quand elle est complexée à une protéine Hsp90 (Whitesell *et al.*, 1994). Une exposition à la 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), un fort ligand du RAh, entraîne une augmentation rapide des activités tyrosine-kinases, de façon RAh dépendante mais sans nécessiter l'activité transcriptionnelle du RAh (Enan *et al.*, 1994). En présence d'un ligand, comme la TCDD, la protéine pp60src se dissocie du complexe cytoplasmique du RAh et son activité kinase est activée (Enan et Matsumura, 1996 ; Köhl *et al.*, 1999).

L'ARNT est la protéine partenaire du RAh. Elle fait aussi partie de la famille  $\beta$ HLLH-PAS (**Figure 7**). La protéine ARNT est composée d'un domaine  $\beta$ HLLH, de deux domaines PAS (A et B), d'un signal de localisation nucléaire en partie N-terminale de la protéine, et d'un domaine TAD en partie C-terminale (Kobayashi *et al.*, 1997).

### 1.6.1.3. Activation et régulation du récepteur Ah

#### 1.6.1.3.1. Activation du RAh

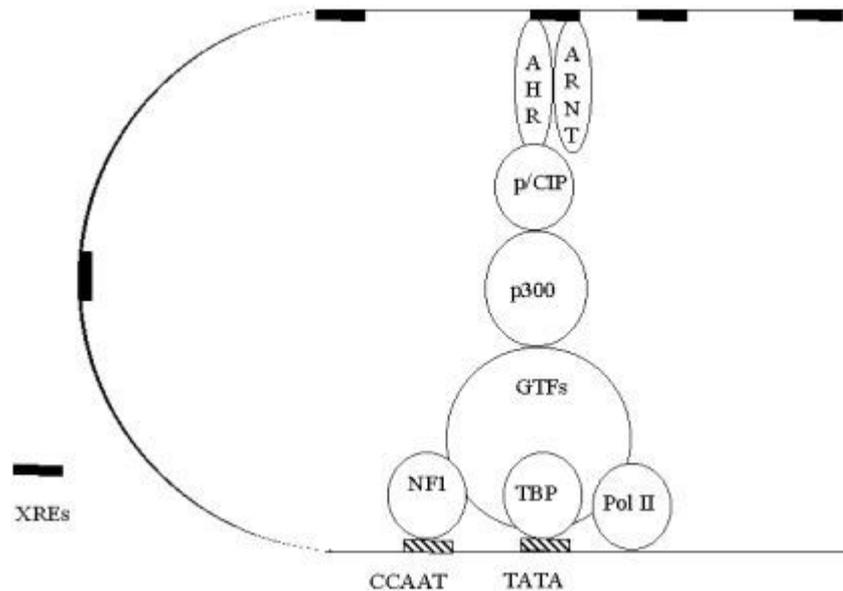
En absence de ligand, le RAh, inactif, est localisé dans le compartiment cytoplasmique, lié au complexe de protéines chaperonnes (**Figure 9**).



**Figure 9 : Activation du RAh en réponse à un ligand.** Kewley et al., 2004. Le RAh localisé au niveau du cytoplasme est complexé aux protéines chaperonnes Hsp90-XAP2 et aux co-chaperonnes p53 et pp60src. La fixation d'un ligand sur le domaine de fixation du ligand dans la partie PAS-B favorise la dissociation des protéines chaperonnes et la révélation du domaine de signal de translocation nucléaire (NLS). Au niveau nucléaire, le RAh forme, avec l'ARNT, un hétérodimère fonctionnel capable de se lier sur des séquences consensus (XRE : TNGCGTG) dans les promoteurs de gènes cibles. Le complexe RAh-ARNT recrute ensuite des co-activateurs de la transcription via les domaines de transactivation (TAD).

La fixation d'un ligand au niveau du LBD du RAh favorise la translocation du complexe protéique vers le noyau. Dans un premier temps, les protéines p23, XAP-2/AIP/ARA9 et pp60src se dissocient du RAh au niveau du cytoplasme. Le récepteur passe alors au niveau nucléaire où il s'hétérodimérise avec son co-partenaire nucléaire, l'ARNT (Flaveny *et al.*, 2009). Cette fixation favorise alors la dissociation des protéines Hsp90. Cette hétérodimérisation permet la formation d'un facteur de transcription fonctionnel. L'hétérodimère RAh-ARNT est alors capable de reconnaître des séquences consensus, appelées séquences XRE (xenobiotic responsive element), dans les promoteurs de gènes cibles du RAh.

La transactivation génique des gènes cibles du complexe RAh-ARNT fait intervenir des co-activateurs. La transcription génique est régulée par le remodelage de la chromatine. Sous forme compactée, la chromatine est complexée aux histones, dont les résidus lysines et arginines sont globalement méthylés et déacétylés. La transcription est favorisée lorsque ces résidus sont acétylés ou déméthylés et lors de l'ubiquitination des arginines. Le recrutement d'histones acétyltransférases ou d'histones déméthylases, favorise la transcription des gènes cibles. Parmi les co-activateurs recrutés par le complexe RAh-ARNT, sont retrouvés des modificateurs d'histones, comme des histones acétyltransférases, et notamment le complexe p/CIP présentant une activité histones acétyltransférases (Kobayashi *et al.*, 1997 ; Beischlag *et al.*, 2002) (**Figure 10**). Ces co-activateurs participent aussi au recrutement des facteurs généraux de transcription, tels que Nuclear factor 1, liée à une séquence CCAAT à 50 paire de bases (pb) de la séquence initiatrice de la transcription, ainsi qu'une TBP (TATA binding protein) liée à une TATA box localisée à 25 pb de la séquence initiatrice (Okino *et al.*, 1995 ; Ko *et al.*, 1997), ceux-ci sont nécessaires à l'induction de l'expression des gènes cibles comme celle du CYP1A1 (**Figure 10**).



**Figure 10 : Modèle de recrutement de facteurs co-activateurs au niveau du promoteur du gène CYP1A1.** *Hankinson, 2005.*

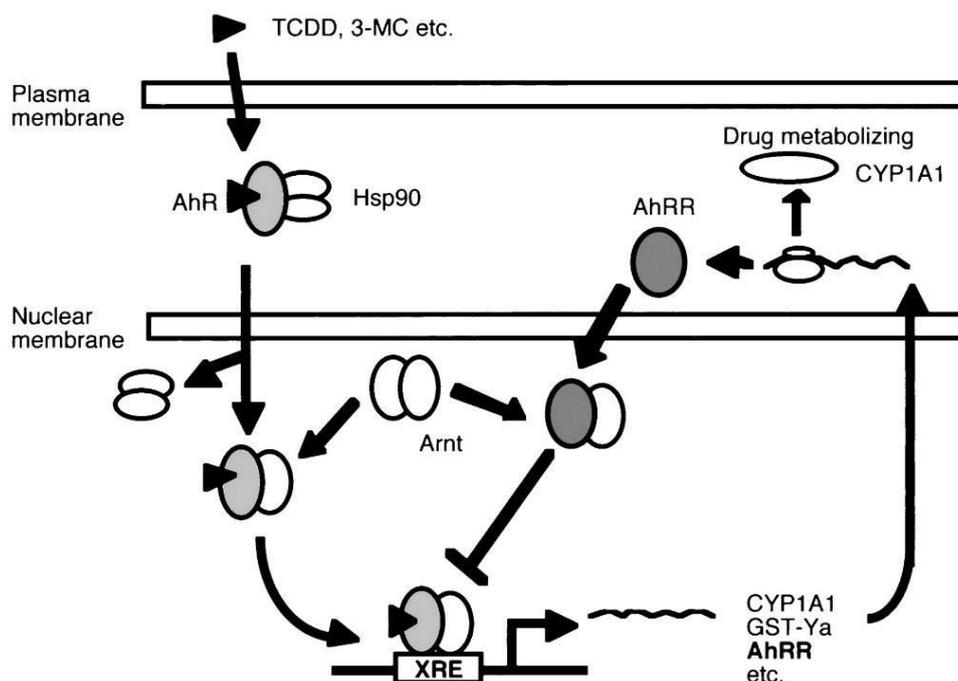
#### 1.6.1.3.2. Régulation du RAh

L'activité du RAh peut être régulée à trois niveaux différents : (1) au niveau de son activité, grâce à un répresseur du RAh (RRAh), appartenant à la classe I des facteurs  $\beta$ H LH/PAS, (2) au niveau protéique, *via* la dégradation de la protéine par le protéasome, (3) par autorégulation *via* l'induction d'enzymes dégradant les ligands du RAh.

##### 1.6.1.3.2.1. Régulation par la voie du répresseur du RAh (RRAh)

La régulation du RAh n'implique pas la régulation de ses niveaux d'expression génique (Giannone *et al.*, 1998). Il a été montré, d'une part, que la diminution des niveaux protéiques du RAh était dose-dépendante de ses ligands agonistes et que l' $EC_{50}$  de cette diminution suivait celle de l'induction génique du CYP1A1, et d'autre part, que l'affinité et la dégradation du ligand du RAh faisait varier les niveaux du RAh (Pollenz *et al.*, 1996). Une protéine dont l'expression génique est régulée par le complexe RAh-ARNT et dont la structure est similaire à celle des protéines de la famille  $\beta$ H LH-PAS a été identifiée et caractérisée comme étant un répresseur du RAh (Mimura *et al.*, 1999 ;

Baba *et al.*, 2001), impliqué dans une boucle d'autorégulation négative. Le promoteur du gène codant pour RRAh contient trois séquences XRE (Baba *et al.*, 2001), et l'étude de la séquence de l'ADNc révèle que le RRAh partage le domaine  $\beta$ HLH et le domaine PAS-A du RAh. En revanche, sa séquence C-terminale diffère considérablement de celle du RAh. En effet, le RRAh ne possède pas le domaine PAS-B impliqué dans la fixation des ligands et l'interaction avec les protéines chaperonnes Hsp90. Il ne possède pas non plus de domaine de transactivation génique du RAh impliqué dans le recrutement des co-activateurs de la transcription des gènes cibles (Sogawa *et al.*, 1995). Le RRAh est localisé spontanément dans le noyau. L'augmentation des niveaux de ce répresseur est corrélée à la diminution de l'expression du CYP1A1 induite par un ligand du RAh (Mimura *et al.*, 1999). Son activité de répresseur s'effectue par dimérisation spontanée, non ligand dépendante, avec l'ARNT. La formation de ce complexe ne présente pas de capacité transcriptionnelle. Cependant, le dimère RRAh-ARNT, *via* les domaines  $\beta$ HLH fonctionnels, est capable de se fixer sur les séquences XRE. Ainsi, le RRAh peut s'opposer à l'activité du RAh de deux façons : (1) en rentrant en compétition avec le RAh pour le recrutement de l'ARNT, et (2) en rentrant en compétition avec le complexe RAh-ARNT au niveau des séquences XRE des gènes cibles du RAh (Baba *et al.*, 2001; Mimura *et al.*, 1999) (**Figure 11**). Chez la souris, les niveaux d'expression du RRAh, suite à une induction par le 3-méthylcholanthrène (3-MC), sont augmentés de façon plus importante dans le cœur et le poumon par rapport au foie, thymus, intestin et rein, et le thymus et le foie sont particulièrement sensibles aux effets délétères de certains hydrocarbures aromatiques, comme la TCDD.

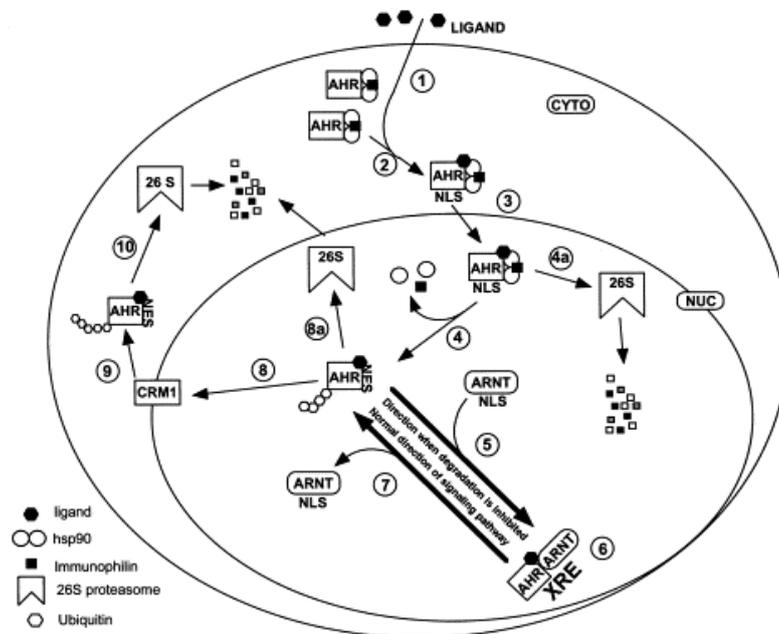


**Figure 11 : Régulation négative du RAh par la voie du RRAh.** *Mimura et al., 1999.* Les ligands du RAh, comme la TCDD ou le 3-MC, activent le RAh et favorise l'expression de gènes cibles dont le répresseur du RAh (RRAh). Le RRAh est localisé au niveau nucléaire sans intervention d'un ligand. A ce niveau, il est capable de s'hétérodimériser avec l'ARNT. Cet hétérodimère non fonctionnel peut prendre la place du complexe RAh-ARNT au niveau des sites XRE dans les promoteurs de gènes cibles, empêchant leur transcription. Ainsi le RRAh entre en compétition avec le RAh au niveau de l'ARNT et des sites XRE.

#### 1.6.1.3.2.2. Régulation par la voie du protéasome

L'implication du protéasome dans la dégradation de facteurs de transcription de la famille  $\beta$ HLLH-PAS a déjà été mise en évidence notamment pour HIF-1 (Huang *et al.*, 1998). Il a été rapporté, dans des lignées cellulaires provenant de tissus et d'espèces différentes, une dégradation du RAh, après la fixation d'un ligand. Ainsi, suite à une exposition à la TCDD le taux protéique du RAh diminue dans des lignées cellulaires de rats et de souris provenant de muscle squelettique, ou de foie, et dans des cellules humaines de colon, ou de tumeurs du sein. Cette dégradation du RAh est inhibée par le MG-132, un inhibiteur du protéasome, ou la leptomycin B, un inhibiteur de l'export nucléaire du RAh, démontrant ainsi l'implication du protéasome cytosolique (Davarinos et Pollenz, 1999). Des études supplémentaires, utilisant des inhibiteurs chimiques de

différentes protéases ont montré l'implication du protéasome 26S dans la dégradation du RAh (Davarinos et Pollenz, 1999; Ma et Baldwin, 2000) (**Figure 12**).



**Figure 12 : Voie du RAh faisant intervenir la voie du protéasome 26S.** Pollenz, 2002.

#### 1.6.1.3.2.3. Autres mécanismes de régulation du RAh

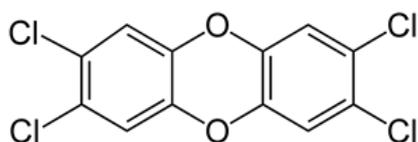
L'activité du RAh peut être modulée par certaines phosphorylations. Ainsi, plusieurs protéines à activité kinase sont capables d'altérer la transcription du gène du CYP1A1 dépendante du RAh. Par exemple, dans des cellules Hepa-1 traitées à la TCDD, le 2-aminopurine (inhibiteur des protéines kinases), inhibe l'induction de l'expression du CYP1A1, ainsi que les niveaux de RAh complexé à des séquences XRE (Carrier *et al.*, 1992). Les protéines kinases C (PKC) ainsi que les protéines tyrosines kinases (PTKs) ont été impliquées dans ces régulations du RAh. L'utilisation de staurosporine (inhibiteur des PKC) diminue l'induction des CYP1A1, ainsi que leur activité dans des cellules Hepa-1 (Carrier *et al.*, 1992). Dans des kératinocytes humains traités à la TCDD, le TPA (inhibiteur des PKC) diminue la capacité du complexe RAh-ARNT à se lier aux séquences XRE (Berghard *et al.*, 1993). Des études ont montré l'implication possible des phosphorylations par les PKC dans les étapes de transactivation suivant la fixation des séquences XRE, impactant à la fois l'interaction du complexe RAh-ARNT et le

recrutement et l'activité des co-activateurs (Chen *et al.*, 1996 ; Long *et al.*, 1998 ; Long et Perdew, 1999). Le résidu tyrosine 9 a été impliqué dans la reconnaissance des résidus sérines/thréonine par des protéines kinases de la famille des PKC. La présence de ce résidu favorise la phosphorylation du récepteur par les PKC ainsi que sa capacité à lier les séquences XRE (Minsavage *et al.*, 2004). Une étude réalisée avec des protéines tyrosines phosphatases (SH-PTP1 et PTP-1B), a montrée l'importance de la phosphorylation des résidus tyrosines du RAh, par des PTKs, dans sa capacité à lier les séquences XRE (Park *et al.*, 2000). Des kératinocytes humains, exposés à la TCDD et à de la génistéine (inhibiteur sélectif des PTKs) présentent une diminution de l'induction par la TCDD de l'activité gène rapporteur du CYP1A1, ainsi que de la capacité du RAh à fixer les séquences XRE, sans pour autant observer de diminution dans la quantité de RAh dans la cellule (Gradin *et al.*, 1994). De plus, dans des cellules issus d'hépatome, l'activation du RAh par la TCDD ou l'oméprazole, est atténuée par l'inhibition de la protéine kinase *c-src* (appartenant à la famille des PTKs), soit *via* l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, soit par l'expression d'un dominant négatif de *c-src*. Enfin, l'activation du RAh par l'oméprazole, et non par la TCDD, est inhibée par une mutation du résidu Tyrosine → Phénylalanine en position 320 suggérant des mécanismes de régulation par phosphorylation différents en fonction de l'affinité des ligands du RAh (Backlund et Ingelman-Sundberg, 2005). L'activité kinase de ERK (Extracellular signal-regulated kinases), appartenant à la famille des MAPK, participerait à la phosphorylation de résidus dans la région C-terminale du RAh favorisant la dégradation du RAh par le protéasome (Chen *et al.*, 2005). L'implication de la voie p38, une kinase appartenant aussi à la famille des MAPK, dans l'activation du RAh a été mise en évidence grâce à des inhibiteurs de p38 (SB203580 et SB202190) (Shibazaki *et al.*, 2004). La localisation cellulaire du RAh est modifiée par l'ajout de SB203580, le RAh passe du noyau au cytoplasme suggérant un rôle de p38 dans la localisation du RAh. Des auteurs ont montré que la sérine en position 68 localisée dans le NES était phosphorylée, et suggèrent l'implication de p38 dans cette phosphorylation (Ikuta *et al.*, 2004). Enfin, des processus de SUMOylation ont aussi été impliqués dans la stabilité du RAh au niveau du cytoplasme (Xing *et al.*, 2012). Des sites de SUMMOylation, mis en évidence dans les domaines  $\beta$ HLLH et TAD, inhibent son ubiquitinylation et diminuent sa transactivation.

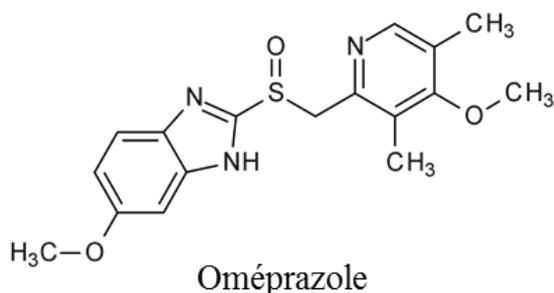
#### 1.6.1.4. Ligands du RAh

##### 1.6.1.4.1. Les ligands exogènes

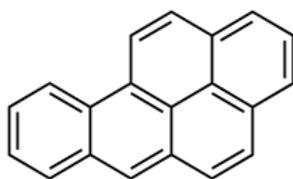
Les ligands exogènes du RAh sont d'origine et de nature chimique multiples. Cependant, ils présentent tous une structure, ou une partie de leur structure plane, et possèdent des cycles aromatiques (**Figure 13**). Ces molécules peuvent être des agonistes ou des antagonistes du récepteur et être retrouvées parmi les contaminants environnementaux, les médicaments ou dans certains aliments.



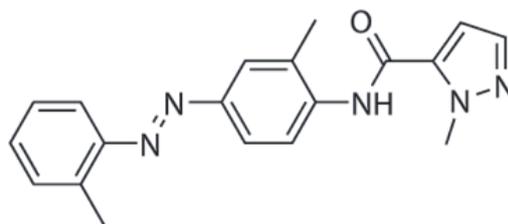
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin  
(TCDD)



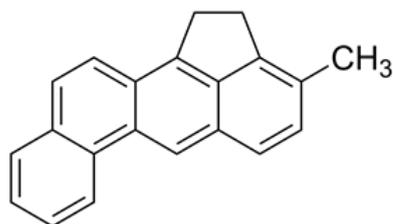
Oméprazole



Benzo(*a*)pyrène  
(B[*a*]P)



2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-  
methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide  
(CH-223191)



3-méthylcholanthrène  
(3-MC)

**Figure 13 : Structures de différents ligands exogènes du RAh.**

Parmi les contaminants environnementaux, les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs) ou polycycliques sont des ligands bien connus du RAh. Ainsi, la TCDD un HAH aussi connu sous le nom de dioxine de Seveso en raison de la catastrophe qui s'est produite lors de l'explosion d'une usine de pesticides en Italie à Seveso en 1976. Cette TCDD qui a permis la découverte du RAh, est à l'heure actuelle encore considérée comme le plus fort ligand de type exogène connu pour le RAh (Bohonowych et Denison 2007). Chez la souris C57BL/6J, la TCDD est capable d'induire l'expression des CYPs avec une  $EC_{50}$  de  $1.10^{-9}$  mol/kg, cet effet est 1000 fois plus fort qu'avec d'autres ligands du RAh comme le 3-MC ou le benz(a)anthracène (Niwa *et al.*, 1975 ; Poland et Knutson, 1982). Par ailleurs, les souris invalidées pour le RAh ne sont pas sensibles aux effets toxiques de la TCDD (Peters *et al.*, 1999). Les HAPs présentent également une affinité forte, bien que moins importante que les HAHs, pour le RAh. En effet, les HAHs ont des constantes d'affinité de l'ordre du pM au nM pour le RAh, tandis que les HAPs ont des constantes d'affinité plutôt comprises entre le nM et le  $\mu$ M. D'autres contaminants environnementaux, tels que les diphenyl sulfides polychlorés (PCDPSs), retrouvés dans les sédiments des rivières, ou le 2,2'-aminophenyl indole (2AI), un ligand synthétique impliqué dans la protection de cellules de la rétine vis-à-vis d'une peroxydation lipidique ont été rapportés comme ligands du RAh (Zhang *et al.*, 2017 ; Gutierrez *et al.*, 2016).

Parmi les xénobiotiques, certains médicaments sont aussi connus comme ligands du RAh. L'oméprazole, un inhibiteur des pompes à protons, est capable d'induire l'expression des CYP1A1 dans une lignée d'hépatome humain *via* une activation du RAh (Quattrochi et Tukey, 1993). L'administration d'oméprazole chez l'homme entraîne une augmentation des niveaux d'ARN messenger (ARNm) du CYP1A1 dans le tractus digestif (McDonnell *et al.*, 1992). Le léflunomide, un médicament utilisé contre la polyarthrite rhumatoïde, est un agoniste du RAh (O'Donnell *et al.*, 2010).

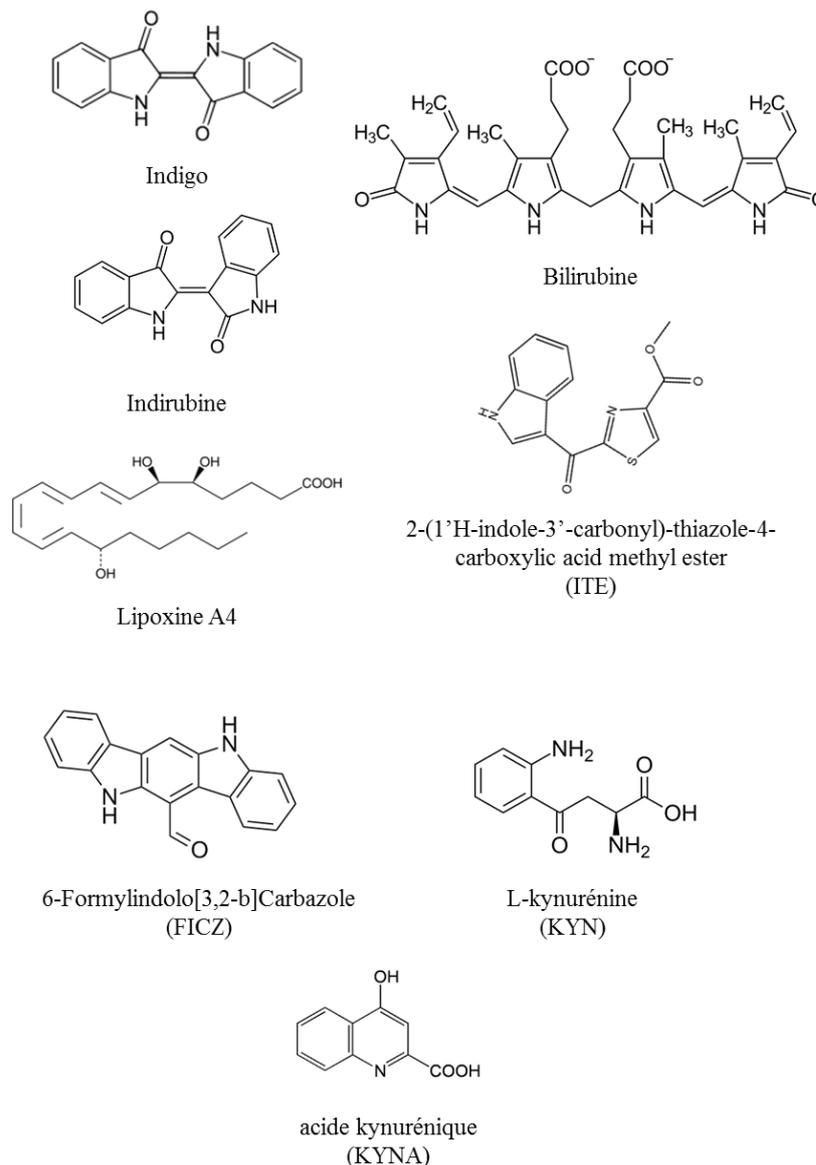
D'autres ligands exogènes du RAh sont naturellement retrouvés dans l'alimentation ou chez certaines plantes. Comme par exemple l'indénol-3-carbinol (I3C) retrouvé dans les légumes de la famille des crucifères (choux, brocolis, navets...) (Gillner *et al.*, 1993). Au niveau du tractus digestif, le I3C peut être converti, par condensation acide, en métabolite présentant un plus fort potentiel de liaison au RAh, l'indolo[3,2-*b*]carbazole (ICZ). ICZ est capable de lier le RAh avec une forte affinité, de l'ordre de 0,2 à 3,6 nM et peut induire l'expression des CYPs dans des cultures cellulaires (Perdrew *et al.*, 1991). Parmi les ligands du RAh de l'alimentation se trouvent aussi les flavonoïdes (Zhang *et al.*, 2003). Les flavonoïdes sont des composés retrouvés dans de nombreux

végétaux (le thym, la ciboule, la mûre, la tomate, le raisin...) et dont la quantité ingérée quotidiennement est de l'ordre du gramme. La concentration sanguine en flavonoïdes retrouvée chez l'homme est de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , suffisante pour activer ou inhiber la voie du RAh (De Vries *et al.*, 1998). Certains flavonoïdes ont été caractérisés comme des agonistes du RAh, tel que la quercétine (Mohammadi-Bardbori *et al.*, 2012), la diosmine (Ciolino *et al.*, 1998) et la tamarixétine (Li *et al.*, 2009). Parmi les flavonoïdes, une grande partie des composés capables de lier le RAh présentent des effets d'antagonistes, comme l' $\alpha$ -Naphthoflavone ( $\alpha$ -NF) capable d'inhiber l'expression des CYPs induite par la TCDD dans des microsomes de foie (Coombs *et al.*, 1981). D'autres composés retrouvés dans l'alimentation, comme le curcumin (Ciolino *et al.*, 1998), ou encore les caroténoïdes (Gradelet *et al.*, 1996) ont montré une capacité à lier et activer le RAh

Enfin, le 2-méthyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) est un ligand synthétique isolé, à partir d'une banque de structure chimique, identifié comme antagoniste potentiel du RAh capable d'inhiber *in vitro* la transactivation du RAh induite par la TCDD (Kim *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que le CH-223191 est capable d'inhiber la transactivation induites par les HAHs mais pas par les autres ligands du RAh (Zhao *et al.*, 2010).

#### 1.6.1.4.2. Les ligands endogènes

La voie du RAh peut être active sans la présence d'un ligand exogène (Hubbard *et al.*, 2015), suggérant la possible implication d'un ligand endogène. La caractérisation d'un ligand, présent naturellement dans l'organisme, capable d'activer le RAh à des concentrations biologiquement pertinentes, fait encore l'objet de recherches. Plusieurs molécules, présentant des affinités plus ou moins importantes pour le RAh, ont été décrites comme ligands potentiels de ce récepteur (**Figure 14**).



**Figure 14 : Structures de différents ligands potentiels endogènes du RAh.**

Parmi les candidats potentiels, l'indigo et l'indirubine sont des composés mis en évidence chez certaines plantes utilisées dans l'industrie textile pour la coloration des tissus. Ces deux composés ont été isolés dans des urines humaines et du sérum de bovins, suggérant la présence de ces composés chez les mammifères (Adachi *et al.*, 2001). L'indigo et de l'indirubine apparaissent 100 fois moins affins pour le RAh que la TCDD (Guengerich *et al.*, 2004). Le 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) initialement isolé à partir de poumon de porc (Henry *et al.*, 2006), est lui aussi 100 fois moins affiné pour le RAh que la TCDD (Henry *et al.*, 2006).

L'acide arachidonique et ses métabolites, parmi lesquels la lipoxine A4 (Figure), ont aussi été rapportés comme ligands potentiels du RAh. La lipoxine A4 est capable

d'activer le RAh à des doses de l'ordre du nM (physiologiquement pertinentes), de rentrer en compétition avec la TCDD au niveau du RAh, d'induire l'expression des gènes cibles du RAh dont les CYP1A1 et 1A2 (Schaldach *et al.*, 1999). Les métabolites de l'hème, notamment la bilirubine et son précurseur la biliverdine, également capables d'induire l'expression des CYP1A par la voie du RAh *in vitro* et *in vivo* (Phelan *et al.*, 1998b), ont aussi été suggérés comme ligands endogènes. Les métabolites issus du tryptophane sont aussi apparus capables d'activer le RAh. Chez les mammifères, le tryptophane peut être dégradé en L-kynurénine qui, à son tour, peut être transaminé de façon irréversible en acide kynurénique (Ball *et al.*, 2007 ; Kincses *et al.*, 2010). Ces deux composés ont été caractérisés comme des agonistes endogènes du RAh. La dégradation du tryptophane par photo-oxydation conduit à la formation de 6-Formylindolo[3,2-b]Carbazole (FICZ), apparaissant également comme un agoniste de forte affinité pour le RAh. Des études de mesure d'affinité du FICZ pour le RAh ont montré que ce composé était capable de déplacer la TCDD de son site de fixation sur le récepteur avec un coefficient de dissociation de 0,07 nM (Rannug *et al.*, 1987), l'identifiant, à ce jour, comme le ligand endogène présentant le plus d'affinité pour le RAh.

#### 1.6.1.4.3. Activation sans ligands

Récemment, une activation du RAh en l'absence de ligand a été mise en évidence. Une translocation nucléaire du RAh, ainsi qu'une augmentation, non activée par des ligands, de l'expression de gènes cibles dans des cultures cellulaires non confluentes ont été rapportées (Ikuta *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a aussi été mis en évidence dans une lignée d'hépatocytes de souris Hepa 1c1, après remise en suspension, une translocation nucléaire du RAh en absence de ligand exogène (Sadek et Allen-Hoffmann, 1994). De façon similaire, une rupture des contacts cellulaires entre des fibroblastes en culture entraîne une augmentation de l'expression de gènes possédant une séquence XRE dans leur promoteur (Cho *et al.*, 2004). Certaines modifications post-traductionnelles ont été impliquées dans l'activation du RAh en absence de ligand. Ainsi, des phosphorylations au niveau de la partie C-terminale du RAh, ont été mises en évidence et impliquées dans l'activation du RAh et parmi ces résidus, cinq sont hautement phosphorylés *in vivo* : Tyr-372, Tyr-408, Tyr-462, and Tyr-532 et Tyr-698, suggérant un rôle de certaines enzymes à activité kinase dans l'activation du RAh indépendamment de la fixation d'un ligand.

### 1.6.1.5. Gènes régulés par le RAh

L'activation du RAh conduit à la transcription de nombreux gènes cibles possédant des éléments de réponses aux xénobiotiques (XRE) dans leur promoteur. De nombreuses études transcriptomiques ont permis d'identifier des gènes régulés par le RAh. Des variations dans les réponses sont observées en fonction des espèces, des ligands et des tissus étudiés. Parmi les gènes recensés aujourd'hui comme cibles du RAh sont retrouvés des gènes dont la régulation génique a été démontrée et des gènes possédant des séquences XRE dans leurs promoteurs. Ainsi, la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques a été mise en évidence. Les HAPs sont capables *via* l'activation du RAh d'induire l'expression des enzymes de phase I et II (Shimada 2006), telles que les CYPs, dont les CYP1A1, 1A2 et 1B1 (Nebert *et al.*, 2000), les aldo-cétone réductases comme l'AKR1C1 (Hockley *et al.*, 2007), les catéchol-O-méthyltransférases, les époxyde hydrolases, les peroxydases, les glutathion-S-transférases, les N-acétyltransférases, les Sulfotransférases (Williams et Phillips 2000). De plus, des séquences XRE ont été mises à jour dans des gènes régulant l'expression de nombreuses cytokines telles que l'IL-2, l'IL-3, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, le TGF $\beta$ 1 et l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Il a aussi été montré la présence de ces séquences XRE dans des promoteurs de gènes codant pour des effecteurs ou des facteurs de transcription des lymphocytes T helper 17 (Th17) (Apetoh *et al.*, 2010 ; Veldhoen *et al.*, 2008).

Les HAPs sont aussi capables de réguler l'expression de gènes impliqués dans l'immunité comme l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (John *et al.*, 2009), le Tumor Growth Factor-alpha (TGF- $\alpha$ ) et le TGF- $\beta$ 2, ou la chemokine CCL1 (N'Diaye *et al.*, 2006), l'IL-8 (Podechard *et al.*, 2008), le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Lecureur *et al.*, 2005), ou encore la protéine Neutrophil Cytosolic Factor -1 (Pinel-Marie *et al.*, 2009).

Enfin, les HAPs peuvent aussi réguler l'expression de gènes impliqués dans des mécanismes d'apoptose ou du cycle cellulaire, comme la protéine de réponse immédiate (IER3) (Hockley *et al.*, 2006), la protéine anti-apoptotique Bcl2 ou encore PPAR $\gamma$  (Hewitt *et al.*, 2007), la protéine de réponse aux dommages à l'ADN (DDB2), l'inhibiteur des cyclines dépendantes des kinases 1 (CDKN1A aussi appelé p21) (Hockley *et al.*, 2007), la cycline D1 (CCND1) (Hockley *et al.*, 2007) et la cycline dépendante des kinases CDK6 (Lu *et al.*, 2009). Les HAPs ont aussi été impliqués dans la régulation de l'expression génique de l'inhibiteur 2 de l'activateur du plasminogène (Keshava *et al.*, 2005) et de l'intégrine  $\beta$ 7 (Monteiro *et al.*, 2007).

#### 1.6.1.6. Fonctions du RAh

Le RAh est une protéine exprimée de façon constitutive dans de nombreux tissus et types cellulaires chez l'homme. L'expression du RAh diffère significativement entre les différents tissus. Il n'est pas, ou très peu, exprimé dans les tissus musculaires, les testicules, les reins ainsi que le cerveau (Dolwick *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1994 ; Yamamoto *et al.*, 2004 ; Frericks *et al.*, 2007 ; Veldhoen *et al.*, 2008). En revanche, son expression est importante dans le foie et les tissus constituant les barrières de l'organisme comme la peau, l'intestin, ou poumons. La plupart des connaissances sur le RAh proviennent des études de toxicologie et pharmacologie qui se sont intéressées à son rôle dans la réponse aux xénobiotiques (Hankinson, 1995). Ainsi, le RAh, activé par des xénobiotiques comme par exemple les HAPs, permet l'induction de l'expression génique des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, comme par exemple les CYPs, et favorise ainsi leur détoxification et/ou leur bioactivation. La toxicité de composés comme certains HAHs ou HAPs, a alors été liée à leur affinité relative pour le RAh (Kerkvliet *et al.*, 1990 ; Mason *et al.*, 1986). Cependant, le fait que le RAh possède un haut degré de conservation dans l'évolution chez les vertébrés (Hahn, 2002), le fait qu'il soit constitutivement exprimé durant le développement et dans certains tissus adultes (Abott *et al.*, 1995) et surtout l'étude des phénotypes de souris invalidées pour le RAh (Schmidt *et al.*, 1996 ; Mimura *et al.*, 1997 ; Fernandez-Salguero *et al.*, 1997) suggèrent d'autres rôles du RAh que celui qu'il joue dans le métabolisme des xénobiotiques. Ainsi, le RAh a aussi été impliqué dans des mécanismes de différenciation (Qin et Powell-Coffman, 2004), de migration et d'adhésion cellulaire (Weiss *et al.*, 2007).

##### 1.6.1.6.1. Rôle conservé du RAh

Chez des invertébrés, *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, les orthologues du RAh, Spineless (ss) et AHR-1 respectivement, ne requièrent pas d'activation par un ligand comme classiquement rapporté chez les mammifères (Qin et Powell-Coffman, 2004 ; Emmons *et al.*, 1999), et participent au développement neuronal (Wernet *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2004 ; Qin et Powell-Coffman, 2004). Ces observations renforcent l'idée d'un rôle physiologique du RAh.

### 1.6.1.6.2. Souris invalidées pour le RAh

Caractérisées parallèlement par trois équipes (Gonzales et Fernando-Salguero, 1998 ; Mimura *et al.*, 1997 ; Smidt *et al.*, 1996), les souris invalidées pour le RAh ont largement permis de mettre en évidence des fonctions physiologiques impliquant le RAh, autres que les fonctions de réponse aux xénobiotiques (**Tableau 2**). Ces souris ont été générées par déplétion des exons 1 ou 2 du gène du RAh, et présentent une résistance à l'intoxication à la TCDD accompagnée d'une absence d'induction des CYP1A1 et 1A2 et des UDPGT6 (Gonzales et Fernandez-Salguero, 1998).

**Tableau 2 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souris invalidées pour le RAh**

<b>Effets phénotypiques des souris invalidées pour le RAh</b>	<b>Références</b>
Réduction de l'expression basale du CYP1A1 et des UDPGT6 Réduction du nombre de lymphocytes T et B dans la rate Sensibilité à une infection à <i>Helicobacter pylori</i> Fibroses et hypertrophies cardiaques Hyperplaie sévère de l'épiderme avec hyperkératose Hyperplasie du pylore et polypes Fibroses et calcifications massives de l'utérus Hyperprolifération des vaisseaux sanguins dans la veine porte Adénocarcinomes dans le foie et les poumons	Gonzales et Fernandez-Salguero 1998
Atrophie et fibrose du foie	Schmidt <i>et al.</i> , 1996
Augmentation du taux d'acide rétinolique dans le foie	Andreola <i>et al.</i> , 1997
Augmentation du TGF- $\beta$ et de l'apoptose dans le foie	Zaher <i>et al.</i> , 1998
Défaut du système circulatoire fœtal <i>Ductus Venosus</i>	Lahvis <i>et al.</i> , 1998

### 1.6.1.6.3. Différenciation cellulaire

Des études récentes ont montré un rôle du RAh dans la différenciation cellulaire. Une exposition de souris gestantes à la TCDD entraîne une altération des cellules souches

hématopoïétiques (Laiosa *et al.*, 2016). De plus, une activation très précoce du RAh dans les cellules souches embryonnaires est associée à une altération de la formation du mésoderme cardiaque, ainsi que des fonctions des cardiomyocytes (Wang *et al.*, 2016). Les fonctions du RAh dans la différenciation cellulaire ont été très étudiées dans les modèles de lymphocytes T. En effet il a été montré, chez la souris que le RAh était un régulateur de la différenciation des lymphocytes T régulateur (Treg) et des lymphocytes Th17 et que cette différenciation était dépendante du ligand. Ainsi, une activation du RAh par un ligand exogène comme la TCDD induit une différenciation préférentielle des lymphocytes T en lymphocytes Treg alors qu'une activation par un ligand endogène comme le FICZ interfère avec la différenciation des lymphocytes Treg et en facilite la différenciation des lymphocytes Th17 (Quintana *et al.*, 2008). De plus, des cellules T naïves, isolées de souris invalidées pour le RAh, sont incapables de générer des lymphocytes Treg ou lymphocytes Th17 *in vitro*, suggérant l'implication du RAh dans l'orientation de la différenciation des lymphocytes T (Kimura *et al.*, 2008). Dans des lymphocytes T humains en culture primaire, en absence de ligand, les lymphocytes T activés par une présentation d'antigène présentent une augmentation marquée des niveaux d'expression génique et protéique du RAh régulant à son tour les niveaux d'expression de l'IL-22 (Prigent *et al.*, 2014) suggérant un rôle du RAh dans la physiologie des lymphocytes T.

#### 1.6.1.6.4. Migration cellulaire

En 2006, il a été montré que le RAh était impliqué dans la migration cellulaire, en participant à l'expression génique d'un régulateur de la transition épithélio-mésenchymateuse, la protéine Slug, dans une lignée de kératinocytes (Ikuta et Kawajiri, 2006). La protéine Slug est un facteur de transcription de la famille Snail/Slug inhibant l'expression des cadhérines et l'induction de l'expression des protéines jouant un rôle dans la migration (Naber *et al.*, 2013). L'implication du RAh dans la migration cellulaire a aussi été étudiée au niveau du système immunitaire. En effet, *in vitro*, une activation du RAh par des ligands exogènes entraîne une émigration préférentielle des lymphocytes T CD4-/CD8-, à partir du thymus (Esser *et al.*, 2004) et *in vivo*, une activation du RAh par des ligands exogènes entraîne une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4-/CD8- au niveau périphérique ainsi qu'une accumulation au niveau de la rate (Temchura

*et al.*, 2005). De plus, il a été montré dans des fibroblastes immortalisés de souris invalidées pour le RAh, une diminution de la capacité de migration de ces cellules (Mulero-Navarro *et al.*, 2005).

#### 1.6.1.6.5. Adhésion cellulaire

Le RAh a aussi été impliqué dans des fonctions liées à l'adhésion cellulaire, des études menées *in vitro* ont montré une activation du RAh lors du changement de statut d'adhésion des cellules en l'absence de ligand exogène, suggérant un rôle du RAh dans des mécanismes d'adhésion cellulaire. En effet, lorsque des kératinocytes adhérents sont remis en suspension, il a été observé une augmentation des niveaux d'expression du CYP1A1, cible génique du RAh (Sadek et Allen-Hoffmann, 1994). Enfin, des études ont montré la présence du RAh inactif dans le cytosol dans des cellules à confluence et la présence du RAh actif dans le noyau dans des cultures cellulaires moins denses (Cho *et al.*, 2003) soulignant une activation du RAh dans les cellules non confluentes.

#### 1.6.1.6.6. Invasion cellulaire

Enfin, le RAh semble avoir d'autres rôles comme celui rapporté dans l'invasion tumorale. Une expression et l'activation constitutive du RAh a été observée dans des lignées cellulaires humaines issues de leucémies à lymphocytes T (Hayashibara *et al.*, 2003). De plus, dans certains types de leucémies, l'expression du RAh est modifiée, par changement du profil de méthylation dans son promoteur. La fréquence de méthylation du promoteur du RAh dans les leucémies lymphoblastiques est similaire aux niveaux de méthylation retrouvés dans certains gènes comme p53 (Agirre *et al.*, 2003), dans ces mêmes cellules. Récemment, il a été montré l'implication du RAh dans l'inhibition de l'invasion tumorale de cellules cancéreuses pulmonaires. Ainsi, des cellules exprimant fortement le RAh (A549) présentent une plus faible capacité d'invasion que les cellules présentant de faibles niveaux d'expression pour ce récepteur (H1299). Ces résultats ont été expliqués par la capacité du RAh à lier des protéines de la voie du TGF- $\beta$  impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Lee *et al.*, 2016). En fonction du type cellulaire et du phénotype tumoral, le RAh peut participer à l'augmentation ou la diminution de la prolifération cellulaire et de l'invasion tumorale et donc peut être considéré à la fois comme un oncogène et comme un suppresseur de tumeur (Barouki *et al.*, 2007).

### 1.6.1.7. Les voies non-génomiques du RAh

Il a été récemment mis en évidence que certains effets des ligands du RAh n'étaient pas forcément liés à la régulation de l'expression de gènes cibles. Ainsi, des voies non-génomiques du RAh peuvent participer aux effets de certains de ses ligands. Ces effets non génomiques sont médiés par des interactions entre la voie du RAh et d'autres voies de signalisation comme celles des facteurs epithelial growth factor receptor (EGFR), nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) ou nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (Nrf2), ainsi que la voie du récepteur aux œstrogènes (RE).

#### 1.6.1.7.1. La voie de l'EGFR

L'activation de la voie de l'EGFR, récepteur membranaire activé par de nombreux facteurs de croissance tels que l'EGF, par les ligands du RAh implique des kinases capables de phosphoryler les résidus tyrosines intracellulaires de l'EGFR, indépendamment de la fixation d'un ligand sur l'EGFR. Ainsi, il a été rapporté, en présence de TCDD dans des hépatocytes murins, une augmentation de l'activité kinase, associée à une diminution des niveaux membranaires de l'EGFR, empêchant l'EGF de se lier à son récepteur (Madhukar *et al.*, 1984). Par la suite, il a été montré que la TCDD était capable de mobiliser la protéine kinase pp60src, localisée dans le complexe cytoplasmique du RAh, capable quant à elle d'activer l'EGFR (Enan *et al.*, 1996 ; Biscardi *et al.*, 1999). Ces résultats ont été confirmés dans des kératinocytes humains exposés à des UV. La formation endogène de FICZ, résultant de la photolyse du tryptophane, permet l'activation du RAh et l'augmentation du CYP1A1, mais aussi le déplacement de la protéine pp60src et l'activation de la voie de l'EGFR, impliquant les protéines ERK1/2 et conduisant à l'expression de la cyclooxygénase 2 (Fritsche *et al.*, 2007). Des observations similaires ont été faites dans une lignée monocyttaire THP-1, exposée à la TCDD où l'activation de la voie EGFR-ERK1/2 conduit à l'expression de TGF- $\alpha$  (Cheon *et al.*, 2007). Ces résultats ont été confirmés dans des modèles de souris invalidées pour le RAh et pp60src où l'expression de la cyclooxygénase 2 ou de TGF- $\alpha$  est diminuée en présence d'un ligand du RAh par rapport à des souris sauvages (Fritsche *et al.*, 2007 ; Vogel et Matsumura., 2003). Un autre mécanisme d'activation de la voie de l'EGFR dépendante de la voie du RAh a été proposé en impliquant l'adénosine monophosphate cyclique. Par exemple, la voie de la PKA médiée par l'adénosine

monophosphate cyclique a été impliquée dans l'expression de l'amphiréguline dans des cellules épithéliales orales humaines exposées à la fumée de cigarette (Du *et al.*, 2005).

#### 1.6.1.7.2. La voie NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)

Il existe un lien entre la voie de signalisation du RAh et les membres de la famille des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (Tian *et al.*, 2002 ; Vogel *et al.*, 2011). Dans des cellules pulmonaires cancéreuses, exposées à la TCDD, il a été constaté une augmentation de l'activité NF- $\kappa$ B, associée à une augmentation de l'expression d'IL-6 sous contrôle du RAh et de la sous-unité RelA du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2016). La TCDD a aussi été montrée comme capable d'induire l'expression de gènes cibles des facteurs NF- $\kappa$ B, *via* leur activation médiée par le RAh, c'est le cas des IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL8 (Kobayashi *et al.*, 2008). Une voie alternative impliquant une dimérisation, du RAh avec la sous-unité RelB, induite par la TCDD, ainsi que la fixation de ce dimère sur des séquences (RelBAhRE) dans le promoteur du gène de l'IL-8, dont l'expression est augmentée dans une lignée de cellules issues de cancers du sein, a été décrite dans ce sens (Vogel *et al.*, 2011).

#### 1.6.1.7.3. La voie Nrf2

Il existe aussi de nombreuses preuves d'une communication entre les voies du RAh et celle du facteur de transcription Nrf2. Le promoteur du gène Nrf2 possède une séquence XRE fonctionnelle et la TCDD est capable d'augmenter les niveaux d'expression génique et protéique de Nrf2 dans une lignée d'hépatocytes murins Hepa1c1c7 (Miao *et al.*, 2005). De même, le B[a]P est capable d'augmenter l'expression génique de Nrf2 au niveau du poumon après administration intraveineuse chez des rats (Moreau *et al.*, 2015). Le promoteur du RAh contient plusieurs séquences ARE auxquelles se lie le facteur Nrf2 (Shin *et al.*, 2007). Il a aussi été émis l'hypothèse d'une interaction physique entre le RAh et Nrf2 suite à une stimulation par la TCDD. Dans des cellules Hepa 1c1c1c7, une augmentation de complexes nucléaires liant les séquences ARE, et la formation de ces complexes a ainsi été inhibée par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le RAh (Vasiliou *et al.*, 1995). Cette association entre RAh et Nrf2 permettrait d'augmenter l'activité du facteur de transcription Nrf2 (Ohtake *et al.*, 2009).

#### 1.6.1.7.4. La voie du récepteur aux œstrogènes (RE)

Les récepteurs aux œstrogènes (RE), au nombre de deux RE $\alpha$  et RE $\beta$ , sont des facteurs de transcription activés par la fixation d'un ligand qui permet le positionnement d'un dimères RE-RE sur des séquences consensus, oestrogen responsive element (ERE), dans des promoteurs de gènes cibles. Les principaux ligands des REs sont les hormones telles que l'œstrogène (E2), mais d'autres composés comme les HAPs sont capables de lier ces récepteurs. Ainsi, certains HAPs, comme le 3-MC, ont été rapportés comme composés œstrogéniques en absence de RAh, capables de lier directement le RE $\alpha$  (Pearce *et al.*, 2004 ; Shipley et Waxman, 2005 ; Abdelrahim *et al.*, 2006). Les REs sont capables d'induire l'expression de gènes cibles du RAh. Ainsi, l'inhibition du RE par des siRNA diminue l'induction de l'expression des CYP1A1 par la TCDD (Matthews *et al.*, 2005). Ce mécanisme participerait à un rétrocontrôle de l'activation du RE, les CYP1A1 et 1B1 étant impliqués dans la dégradation du E2 (Lee *et al.*, 2003). Il a aussi été montré qu'une exposition au B[a]P par voie orale, de souris gestantes, entraînait une diminution des niveaux protéiques du recpeteur RE $\alpha$  (Li *et al.*, 2017) De plus, le RE est un modulateur de la transcription dépendante du RAh. Des études ont montré que le RE $\alpha$  était parfois retrouvé en amont des gènes cibles du RAh (Abdelrahim *et al.*, 2006), et que la transfection du RE dans des cellules mammaires cancéreuses, dont le RAh n'est plus exprimé, permet de restaurer la voie du RAh et l'induction de l'expression des CYP1A1 (Thomsen *et al.*, 1994). Le RAh est aussi capable d'inhiber la voie des REs par interaction directe, lui permettant de rediriger les REs vers des séquences XRE (Matthews *et al.*, 2005) diminuant ainsi la transcription des gènes cibles des REs et augmentant celles des cibles du RAh. Enfin, il a été rapporté que la fixation d'un ligand, comme la TCDD, sur le RAh conduisait à la dégradation des REs par le protéasome (Wormke *et al.*, 2003 ; Ohtake et al., 2009).

## 1.7.Effets toxiques des HAPs

Une exposition aux HAPs a été associée au développement de nombreux effets toxiques.

### 1.7.1. Toxicité aiguë

Chez des rats exposés de façon aiguë au B[a]P ou au Fla, présentent une diminution du nombre de globules blancs et une augmentation de la taille du foie pouvant aller jusqu'à 30% après l'exposition au B[a]P, suggérant une toxicité hépatique du B[a]P et une diminution significative des globules blancs après exposition au Fla, suggérant un effet sur les paramètres hématologiques du Fla (Knuckles *et al.*, 2001 ; Knuckles *et al.*, 2004).

Peu de données existent concernant les effets des expositions aiguës aux HAPs chez l'Homme. Ces données proviennent essentiellement d'intoxication au naphthalène, contenu dans les antimites. Ces intoxications ont principalement lieu par ingestion et sont à l'origine de troubles digestifs (vomissements, diarrhées, nausées), ainsi que de confusions ou d'irritation, en cas d'exposition cutanée ou oculaire (Gerarde, 1960). Pour les plus fortes doses, ces ingestions peuvent conduire à des anémies hémolytiques, des affections hépatiques, des cataractes bilatérales et des comas convulsifs. La dose létale a été estimée entre 5000 et 15 000 mg pour un adulte et 2000 mg pour un enfant (Gerarde, 1962).

### 1.7.2. Toxicité chronique

#### 1.7.2.1. Effets systémiques

Chez l'animal, de nombreux effets systémiques ont été rapportés après exposition aux HAPs. Ainsi, des rats exposés quotidiennement au B[a]P ou au Fla pendant 90 jours à des doses subchroniques présentent une diminution de leur poids, ainsi qu'une diminution du nombre d'hématies après exposition au B[a]P suggérant des effets toxiques hématologiques, et une diminution des globules blancs et rouge, ainsi qu'une augmentation de l'azote uréique sanguine suite à une exposition au Fla, suggérant une atteinte de la fonction rénale (Knuckles *et al.*, 2001 ; Knuckles *et al.*, 2004). Des loutres

exposées à des HAPs, suite à la marée noire causée par l'Exxon Valdez dans la baie du prince William en Alaska, présentent des emphysèmes pulmonaires interstitiels, des hémorragies et des érosions gastriques, des nécroses hépatiques centro-lobulaires, des accumulations de lipides autour de la veine porte ou dans la totalité du foie et des accumulations de lipides dans les tubulaires rénaux (Lipscomb *et al.*, 1993).

Chez l'Homme, un certain nombre de ces effets systémiques ont aussi été mis en évidence.

#### 1.7.2.2. Effets reprotoxiques et tératogènes

Chez l'animal, les HAPs peuvent altérer le système reproducteur. Ainsi, des adduits à l'ADN dérivés du B[a]P-diol-époxyde (BPDE), un métabolite réactif du B[a]P, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose, ont été mis en évidence dans les spermatozoïdes des rats exposés au B[a]P (Revel *et al.*, 2001). L'exposition au B[a]P par inhalation chez des rats mâles adultes pendant 60 jours entraîne une diminution de la taille des testicules, une diminution des taux plasmatiques de testostérone et une diminution de la motilité des spermatozoïdes (Ramesh *et al.*, 2008).

Chez l'Homme, l'exposition *in utero* à des mélanges d'HAPs, a été associée à la survenue de pathologies dès la naissance et plus tard à l'âge adulte. Ainsi, une exposition *in utero* aux HAPs augmente le risque de malformation cardiaque, diminue le poids de naissance et augmente les risques de prématurité (Kristensen *et al.*, 1995 ; Padula *et al.*, 2014). Elle est également associée à une augmentation des niveaux de dommages à l'ADN dans les cellules du sang ombilical (Jedrychowski *et al.*, 2013) et du risque de développement de certains cancers, comme les neuroblastomes (Parodi *et al.*, 2014). Enfin, la survenue à l'âge adulte d'une réduction de la qualité du sperme, et de la taille des testicules, a été corrélée à cette exposition *in utero* aux HAPs (Jensen *et al.*, 2005). Lors d'expositions professionnelles, les travailleurs d'une cokerie exposés aux HAPs, présentent des niveaux d'adduits volumineux dans l'ADN spermatique plus importants que les niveaux d'adduits des personnels non-exposés. A ces adduits s'ajoute, dans le groupe exposé, un plus faible pourcentage de spermatozoïdes présentant une morphologie normale, et un taux fort de spermatozoïdes présentant un défaut de mobilité (Jeng *et al.*, 2013). Par ailleurs, les niveaux d'adduits à l'ADN spermatique apparaissent augmentés chez les hommes atteints de stérilité par rapport aux hommes fertiles (Gaspari *et al.*,

2003). Chez la femme, diverses études ont suivi les effets d'une exposition aux HAPs sur la physiologie du placenta, de l'utérus, des ovaires, sur la survenue de grossesse, ainsi que sur le développement de certains cancers (cancer du sein ou des organes reproducteur) (Bolden *et al.*, 2017). La prévalence de dysplasie cervicale est augmentée chez les femmes dont l'air intérieur est plus chargé en HAPs suggérant qu'une exposition à ces contaminants peut augmenter l'incidence de cette affection (Scheurer *et al.*, 2014).

### 1.7.2.3. Effets cancérigènes

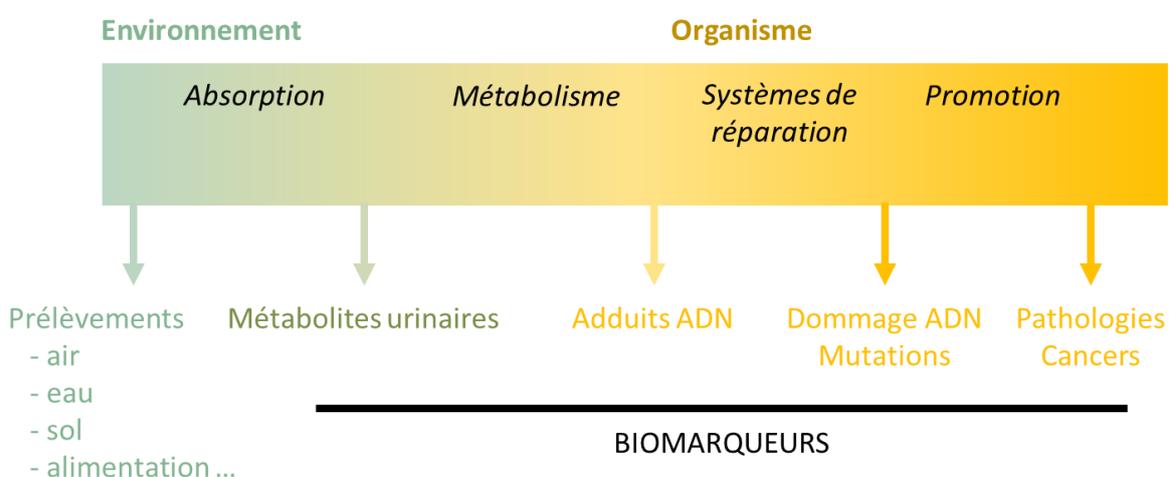
Chez l'animal, de nombreuses études ont été réalisées sur les effets cancérigènes de différents HAPs. Ainsi, une exposition chronique à de faibles doses d'HAPs tels que le B[a]P et Fla, a été identifiée comme facteur favorisant la survenue de cancers du côlon chez la souris (Diggs *et al.*, 2012). De plus l'administration orale de B[a]P *via* l'alimentation entraîne la formation de carcinomes intestinaux (Chen *et al.*, 2008). Une exposition au B[b]F entraîne une augmentation dose-dépendante de l'incidence d'adénomes pulmonaires, de carcinome et de sarcome pulmonaires chez la souris (Nesnow *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1995; Mass *et al.*, 1996; Nesnow *et al.*, 1998 ; Deutsch-Wenzel *et al.*, 1983). Le Chr après exposition intrapulmonaire, augmente l'incidence de carcinomes pulmonaires chez le rat (Wenzel-Hartung *et al.*, 1990). Le DB[a,h]A, induit des adénomes au niveau des poumons (Wenzel-Hartung *et al.*, 1990), et des tumeurs pulmonaires après inhalation chez la souris (Shimkin et Stoner, 1975). Une exposition au Fla entraîne une augmentation de l'incidence de tumeurs au niveau pulmonaire et une augmentation des adénomes hépatique après injection intrapéritonéale chez la souris (Wang et Busby, 1993 ; LaVoie *et al.* 1994). Le B[a]P, quant à lui, présente des effets cancérigènes chez l'animal, après différents modes d'exposition (voie orale, inhalation, application locale), au niveau de différents organes (tube digestif, foie poumon, peau et système lympho-réticulaire) (Weyand et Wu, 1995 ; Culp *et al.*, 1998).

Chez l'Homme, il est aujourd'hui reconnu que l'exposition aux HAPs augmente le risque de cancer de la peau, des poumons (Bach *et al.*, 2003), de la vessie (Rønneberg *et al.*, 1999). En France, deux tableaux des maladies professionnelles reconnaissent ces trois cancers en relation avec l'exposition aux HAPs. L'exposition à la fumée de cigarettes (Tsay *et al.*, 2013) ou à celle issue de la combustion du bois et du charbon, augmente le

risque de cancer du poumon (Reid *et al.*, 2012). La quantification des HAPs présents dans les tissus pulmonaires de personnes atteintes de ce cancer a montré la présence accrue de 15 HAPs, dont les plus abondants étaient le benz[*a*]anthracène, l'anthracène, le Fla, le B[*a*]P, le B[*b*]F et le benzo[*k*]fluoranthène (Cioroiu *et al.*, 2013). Le lien entre le cancer du poumon et l'exposition aux HAPs n'a été établi que lors d'expositions par inhalation, une exposition par l'alimentation n'y ont été mise en cause que dans une étude (Cai *et al.*, 2012). Des cancers de l'œsophage ont été liés à des expositions à l'air pollué en Iran (Kamangar *et al.*, 2005) et à la pollution de l'air intérieur et à l'alimentation en Chine (Van Gijssel *et al.*, 2004). L'exposition à des émissions de gaz de véhicules diesels a été liée à l'augmentation du risque de cancer de la vessie lorsque les individus sont exposés à de fortes concentrations (Latifovic *et al.*, 2015). Enfin, il a été montré un lien entre le tabagisme important et la survenue de cancers de la vessie (Clavel *et al.*, 1994). Des données épidémiologiques semblent aussi faire le lien entre une exposition aux HAPs et le développement de certains cancers du sein. Des quantifications d'adduits aromatiques à l'ADN ont été mesurés dans des prélèvements tissulaires de seins provenant, soit de mastectomies de patientes atteintes d'un cancer du sein, soit de déchets de mammoplasties. Les résultats montrent une quantité d'adduits significativement plus importante dans les tissus des femmes atteintes d'un cancer (Li *et al.*, 1996). Dans les années 1990 une étude a été menée dans la région de New-York afin de tenter d'expliquer l'incidence des cancers du sein dans cette région. En 2016, Mordukhovich *et al.*, ont repris les données de cette étude et les ont couplées à une simulation des niveaux de HAPs résultant du trafic routier de l'époque. Les résultats indiquent une association positive entre les niveaux d'exposition au B[*a*]P *via* le trafic routier et l'incidence de cancers du sein chez les femmes exposées à de hautes concentrations sur de longues périodes (Mordukhovich *et al.*, 2016).

## 1.8. Surveillance des HAPs

Le fait que les HAPs présentent de nombreux effets toxiques, et qu'ils soient relativement ubiquitaires dans l'environnement a conduit les instances internationales à les classer comme contaminants prioritaires. Ainsi, différentes méthodes ont été développées en vue de surveiller les niveaux d'HAPs dans l'environnement et l'exposition des individus à ces contaminants. Leur surveillance se fait donc au niveau de l'environnement par quantification de leurs concentrations et au niveau de l'organisme humain, par mise en évidence de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet (**Figure 15**).



**Figure 15 : Niveaux de surveillance des HAPs.** La surveillance des HAPs se fait au niveau de l'environnement par dosage dans l'air, l'eau, les sols ou l'alimentation, et au niveau de l'organisme par détection de la présence de biomarqueurs.

### 1.8.1. Dosage et quantification

#### 1.8.1.1. Dans l'environnement

La récolte d'échantillons en vue du dosage et de la quantification des HAPs est classiquement réalisée dans des flacons en verre à l'abri de la lumière pour éviter les dégradations par photolyse des échantillons récoltés. Les échantillons de sols et d'eau sont directement prélevés dans le milieu. Dans l'air, le dosage des HAPs est difficile, cependant certaines mesures sont réalisées grâce à l'utilisation de filtres permettant de piéger les HAPs présents dans la phase particulaire tandis que l'utilisation de résines, placée en série des filtres, permet de capturer les HAPs présents dans la phase gazeuse.

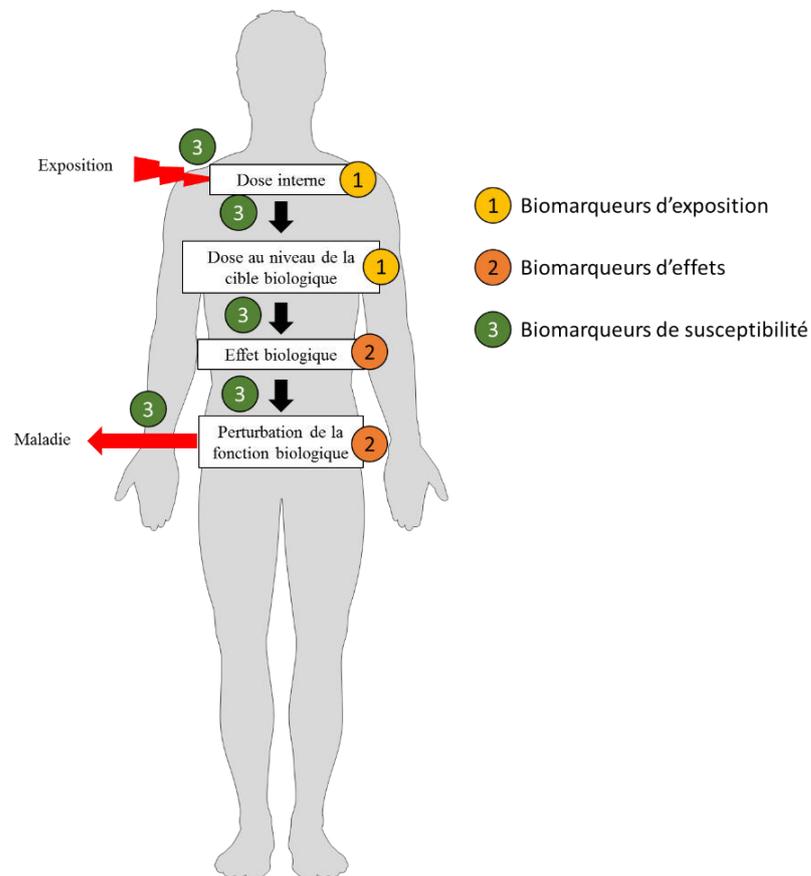
### 1.8.1.2. Chez l'Homme

La récolte d'échantillons chez l'Homme consiste en un prélèvement d'urine. Le prélèvement est aussi réalisé dans des contenants opaques ne laissant pas passer la lumière afin de préserver les échantillons. Les analyses réalisées en vue du dosage et de la quantification des HAPs sont principalement réalisées par des techniques de chromatographie couplées à des spectromètres de masse. Des études récentes ont mis en évidence l'utilité des cheveux/poils comme matrice de biomonitoring. En effet, il est possible d'évaluer l'exposition aux HAPs par un dosage, par GC-MS/MS, des tétrols dans les poils de rats exposés aux HAPs (Grova *et al.*, 2017a).

### 1.8.2. Les biomarqueurs des HAPs

Pour l'évaluation de l'exposition humaine, la recherche de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet aux HAPs est une préoccupation très actuelle. La notion de biomarqueurs est apparue dans les années 1960. Depuis, elle est appliquée à divers domaines parmi lesquels la santé humaine. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les biomarqueurs comme : « toute substance structure ou processus pouvant être mesuré dans le corps humain ou les matrices biologiques susceptibles d'influencer ou prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie ». L'OMS classe les biomarqueurs en trois grandes catégories (**Figure 16**) :

- les biomarqueurs d'exposition
- les biomarqueurs d'effet
- les biomarqueurs de susceptibilité



**Figure 16 : Différents niveaux de mesure et d'influence des 3 grandes catégories de biomarqueurs depuis l'exposition à un contaminant jusqu'à la survenue des effets pathologiques.**

### 1.8.2.1. Les biomarqueurs d'exposition

Le dosage des métabolites urinaires en vue de la mise en évidence d'une exposition aux HAPs est une méthode largement utilisée. En effet, les urines représentent une matrice biologique facile à collecter et dont la récupération n'est pas invasive. Trois types de métabolites urinaires des HAPs sont couramment dosés dans les urines.

Les niveaux de pyrène dans les mélanges d'HAPs étant la plupart du temps importants (2 à 10% des HAPs totaux) et relativement constants (Kim *et al.*, 2013), le dosage du 1-hydroxypyrene (1-OHP), un métabolite du pyrène utilisé depuis une vingtaine d'années, reste le plus souvent recherché en vue d'une évaluation de l'exposition des personnes travaillant en contact avec les HAPs. De plus, le 1-OHP est le métabolite urinaire provenant des HAPs le plus présent dans les urines. Son dosage est principalement réalisé par HPLC-Fluo (Chromatographie Liquide Couplée Haute performance (HPLC) couplée à un détecteur de fluorescence (Fluo)) ou par HPLC-UV (HPLC couplée à un détecteur UV). Ainsi, il a été montré que les fumeurs possèdent des

niveaux urinaires de 1-OHP environ deux fois plus importants que des non-fumeurs (Nerurkar *et al.*, 2000). Cependant, bien que le 1-OHP reflète une exposition à des mélanges d'HAPs il ne permet pas de déterminer le risque cancérigène de ces mélanges, le pyrène et le 1-OHP ne présentant pas de caractère cancérigène et les niveaux de pyrène et de B[a]P ne corrélant pas dans tous les mélanges d'HAPs (Srogi, 2007). Par ailleurs, le 1-OHP ne permet pas de discriminer la source d'exposition puisque, le pyrène est un HAP retrouvé dans de nombreux mélanges (Masclat *et al.*, 1984).

Ainsi, il a été mis au point le dosage du 3-OHB[a]P, le métabolite du B[a]P le plus retrouvé au niveau urinaire et qui apparaît le plus adapté pour faire le lien entre une exposition aux HAPs et un risque cancérigène (Bouchard et Viau, 1996 ; Wang *et al.*, 2003). La détection du 3-OHB[a]P nécessite des appareils plus sensibles que pour les dosages urinaires du 1-OHP (Barbeau *et al.*, 2011), comme des LC-MS/MS (Chromatographie Liquide (LC) couplée à deux spectromètres de masse en tandem (MS/MS)). En effet, le 3-OHB[a]P est moins concentré dans les urines que le 1-OHP. Probablement du fait de la faible concentration de ce métabolite dans les urines, il n'existe que deux études épidémiologiques montrant une corrélation positive entre exposition au B[a]P et taux urinaire de 3-OHB[a]P (Lafontaine *et al.*, 2004 ; Förster *et al.*, 2008).

Le dosage des naphhtols, dérivés du naphhtalène, est aussi utilisé (Lopez *et al.*, 2017). Ces métabolites sont présents en quantité élevée dans les urines, et le dosage des naphhtols rend compte d'une intoxication en milieu professionnel, domestique (antimite) ou *via* le tabagisme (Sams, 2017 ; Lopez *et al.*, 2017). Plus récemment, il a aussi été proposé le dosage des dihydronaphhtalènes qui apparaît un peu plus sensible que celui des naphhtols. L'hydroxyphénantrène a aussi été proposé comme métabolite urinaire des HAPs. Son taux est peu influencé par le tabagisme et est soumis à de grandes variations individuelles et ne corrèle pas avec les niveaux de B[a]P (Hecht, 2002).

Le dosage des tétrols, produits issus de l'hydrolyse des adduits à l'ADN formés par les métabolites de certains HAPs est aussi de plus en plus utilisé comme biomarqueur d'exposition ou d'effets aux HAPs (Moreau et Bouchard, 2015).

Enfin, le dosage simultanée de mélanges d'OH-HAPs dans les urines ou dans les cheveux est de plus en plus utilisé en biomonitoring (Grova *et al.*, 2017b ; Mororikyn *et al.*, 2015), permettant ainsi une meilleure évaluation de l'exposition à des mélanges d'HAPs, ainsi que des risques associés à ces expositions (Lotz *et al.*, 2016).

## 1.8.2.2. Les biomarqueurs d'effet

### 1.8.2.2.1. Les adduits à l'ADN

Les niveaux d'adduits à l'ADN sont considérés comme des biomarqueurs d'exposition et quand il est montré la capacité des adduits à participer à des phénomènes de cancérogenèse, ils sont reconnus comme biomarqueurs d'effets. Les adduits les plus dosés comme biomarqueurs d'effets sont le B[a]P diol époxyde (BPDE), issu du métabolisme du B[a]P, et la 8-oxo-Guanine (8-oxo-G), un métabolite issu du stress oxydant.

Le marquage radioactif des métabolites avec le phosphore-32 (technique de post-marquage) a longtemps été utilisé pour le dosage des adduits stables de type BPDE. Cette technique présente une limite de détection assez élevée (1 adduit/ $10^9$  nucléotides), mais une faible spécificité (**Tableau 3**). Des techniques utilisant des anticorps dirigés contre les adduits sont aussi souvent utilisées. Ces techniques, qui comprennent les ELISA ainsi que les marquages d'immunohistochimie, présentent-elles aussi des limites de détection assez élevées. La principale contrainte de ces techniques vient de la spécificité de l'anticorps utilisé (**Tableau 3**). Enfin, depuis quelques années ont été développées les techniques de spectrométrie de masse qui possèdent une faible limite de détection (0,3 adduits/ $10^8$  nucléotides) et surtout une affinité absolue pour l'adduit étudié (**Tableau 3**).

**Tableau 3: Différentes techniques de dosage des adduits à l'ADN dérivés des HAPs.**  
*D'après Poirier, 2016.*

Méthodes de dosage	Limite de détection	Quantité d'ADN requise	Spécificité
Marquage P <sup>32</sup>	1 adduits/ $10^9$ nucléotides	1 à 5µg	Faible : détection de plusieurs adduits simultanément
ELISA	3 adduits/ $10^9$ nucléotides	3 à 25µg	Modérée à précise : détecte des adduits isolées ou des groupement d'adduits
Immunohistochimie	1 adduits/ $10^8$ nucléotides	Cellules fixées	Modérée à précise : détecte des adduits isolées ou des groupement d'adduits
Spectrométrie de masse	0,3 adduits/ $10^8$ nucléotides	5 à 100µg	Absolue : spécificité structurale de l'adduit

#### 1.8.2.2.1.1. Les adduits de type BPDE

Aujourd'hui, le dosage des adduits à l'ADN de type BPDE est principalement réalisé grâce à des techniques de LC-MS/MS. Cette technique permet l'analyse simultanée de différents types d'adduits à l'ADN. De plus la préparation des échantillons n'entraîne pas de modifications des niveaux de lésions. Chez l'Homme, de nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées à la corrélation entre niveau d'exposition aux HAPs, adduits à l'ADN et survenue de pathologies. Les liens entre présence d'adduits HAPs-ADN et survenue de pathologies sont bien décrits dans la littérature, ainsi, il a été montré qu'une augmentation des niveaux d'adduits retrouvés dans certains tissus, et notamment dans des leucocytes circulants, été corrélée avec l'augmentation du risque de certains cancers (Tang *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Gammon *et al.*, 2002 ; Gunter *et al.*, 2007). De plus, les niveaux d'adduits à l'ADN de sperme humain, dérivés des HAPs ont été proposés comme marqueur d'infertilité et associés à une fragmentation de l'ADN spermatique chez des hommes présentant une infertilité (Gaspari *et al.*, 2003 ; Ji *et al.*, 2010). Cependant, le lien entre exposition aux HAPs et niveau d'adduits à l'ADN n'est pas linéaire. Ainsi, s'il a été montré que les niveaux d'adduits dans les leucocytes circulants étaient similaires entre des personnes exposées aux HAPs et des personnes non exposées (Godschalk *et al.*, 2003), des études ont aussi montré un lien entre exposition aux HAPs et augmentation des niveaux d'adduits dérivés des HAPs dans les cellules sanguine (Perera *et al.*, 2005). Enfin, il a été constaté une grande variation des taux d'adduits mesurés chez l'Homme, pouvant s'expliquer par l'influence de nombreux facteurs comme le tabagisme, le régime alimentaire, le cadre de vie ou encore le polymorphisme génétique. Ces variations entraînent des difficultés à mettre en place des protocoles de mesure des adduits à l'ADN en routine. De plus, ces techniques sensibles de dosages des adduits à l'ADN sont onéreuses et nécessitent des appareillages spécifiques.

Les formes réactives issus du métabolisme des HAPs peuvent former des adduits avec d'autres macromolécules que l'ADN, et notamment avec les protéines. Ainsi les diol-époxydes sont capables de former des adduits avec l'hémoglobine et l'albumine sérique. La présence de ces adduits a été corrélée à une exposition professionnelle aux HAPs (Bostrom *et al.*, 2002). La quantification de ces adduits aux protéines est cependant compliquée par le caractère hydrolysable de ces composés et leur concentration ne reflète pas l'exposition réelle.

#### 1.8.2.2.1.2. Les bases oxydées : la 8-oxo-Guanine

Aujourd'hui le dosage des bases oxydées de l'ADN comme la 8-oxo-G est réalisé principalement par immunoaffinité et spectrométrie de masse. La présence de ces bases peut être détectée par immunoaffinité grâce à des anticorps dirigés contre elles (Tripathi *et al.*, 2017). La difficulté de cette mesure réside dans le fait qu'il faille trouver un anticorps avec une spécificité suffisante. Le dosage de la 8-oxo-G peut se faire aussi par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) (Jaruga *et al.*, 2000). Cette technique est utilisée depuis les années 1980. Elle est relativement sensible (**Tableau 3**) et ne nécessite pas d'anticorps, cependant, la dérivation des échantillons afin de les rendre volatils et stables pour l'analyse entraîne des oxydations artéfactuelles entraînant une surestimation des niveaux d'oxydation des bases.

#### 1.8.2.2.2. Les altérations cytogénétiques

Certaines altérations cytogénétiques, comme l'échange de chromatides sœurs, les aberrations chromosomiques, la présence de micronoyaux, les cassures à l'ADN, peuvent être aussi considérées comme des biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet. Des études épidémiologiques ont montré une forte fréquence d'aberrations chromosomiques mais pas d'échange de chromatides sœurs, ni de micronoyaux dans les lymphocytes périphériques de personnes exposées aux HAPs (Bonassi *et al.*, 2011 ; Smerhovsky *et al.*, 2001). Cependant, une étude a montré, dans les leucocytes circulants de travailleurs de la voirie exposés aux fumées de bitume, une augmentation de l'induction de micronoyaux et une augmentation des dommages à l'ADN révélées par le test des comètes par rapport au personnel non exposé (Sellappa *et al.*, 2011).

#### 1.8.2.3. Les biomarqueurs de sensibilité

Le polymorphisme génétique est en grande partie à l'origine des variations de réponse inter-individuelle observées après une exposition aux HAPs. Il se traduit par l'existence de plusieurs allèles pour un même gène. Un gène est considéré comme polymorphe lorsqu'il possède au moins deux allèles dont la fréquence est supérieure ou égale à 1%. Le polymorphisme de plusieurs gènes a été impliqué dans la survenue de pathologies après une exposition aux HAPs, notamment dans les gènes des CYP1A1, CYP1B1 et GSTM1. Une analyse réalisée sur des tumeurs de vessie a montré une

association significative entre certains SNPs dans les gènes du métabolisme des HAPs, AKR1C3, ARNT, CYP1A1, CYP1B1 et SULT1A2 et le risque de développer un cancer de la vessie (Figuerola *et al.*, 2008). Une étude menée sur des travailleurs exposés aux goudrons a montré une association entre certains variants du gène CYP1A1 et les dommages à l'ADN révélés par le test des comètes et le test des micronoyaux (Giri *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que le polymorphisme du gène CYP1A1 peut participer à la modulation des effets cancérigènes des HAPs. De plus, la présence seule d'un polymorphisme du gène du CYP1A1 n'explique pas l'incidence de certains cancers. Le polymorphisme du CYP1A1 joue seulement un rôle de subordonné dans la susceptibilité au cancer du poumon (Houlston, 2000 ; Nair et Bartsch, 2001). En effet, la combinaison de certains variants du CYP1A1 avec un génotype null de la GST de la classe «  $\mu$  » GSTM1 prédispose les porteurs de ces combinaisons à des effets génotoxiques plus importants après une exposition à la pollution atmosphérique (Ichiba *et al.*, 1994 ; Brescia *et al.*, 1999) et à une augmentation de l'incidence du cancer du poumon (Nair et Bartsch, 2001). D'autres polymorphismes génétiques sont capables de moduler la susceptibilité au cancer, notamment le gène de la NAD(P)H quinone déshydrogénase (NQO1) (Shimada *et al.*, 2006 ; Schultz *et al.*, 2007).

### 1.9. Règlementation sur les HAPs

La difficulté dans l'établissement d'une réglementation sur les doses d'expositions tolérables aux HAPs vient principalement de la complexité des mélanges d'HAPs auxquels l'Homme est exposé. Les HAPs sont présents dans l'environnement sous forme de mélanges complexes dont la composition et la concentration varient en fonction des sources d'exposition. De plus, les HAPs ne sont pas souvent seuls dans les mélanges mais, associés à des composés pouvant agir comme co-cancérigènes tels que certains métaux. Diverses recommandations ont été mises en place afin de limiter l'exposition à ces mélanges au minimum possible.

La commission européenne a adopté en 2004 une directive (2004/107/CE) concernant entre autres les niveaux de HAPs dans l'air ambiant. Cette directive fixe les niveaux de B[a]P à une valeur moyenne annuelle limite de  $1 \text{ ng/m}^3$  et un objectif à long terme de  $0,1 \text{ ng/m}^3$ . En ce qui concerne le trafic routier, l'union européenne limite les émissions polluantes des véhicules légers (règlement CE n° 715/2007). Il n'y a pas de

réglementation pour les émissions d'HAP dans le cas des incinérateurs d'ordures ménagères. Pour les HAPs dans l'alimentation, seules les denrées alimentaires ayant subi un traitement avec des arômes de fumées font l'objet de valeurs réglementaires. L'arrêté du 11 juillet 1991 limite la quantité de B[a]P dans ces denrées et boissons à 0,03 µg/kg. Les fruits de mer et les poissons sont très consommés en Europe et en France et sont responsables de la plus grande partie des HAPs absorbés par l'alimentation, leur taux de HAPs est donc limité à :

Pour six HAPs correspondant au Fla, benzo(*b*)fluoranthène, benzo(*k*)fluoranthène, B[a]P, benzo(*g,h,i*)pérylène et l'indénol(*1,2,3-cd*)pyrène:

- 0,2 mg/kg de matière sèche pour les mollusques bivalves et céphalopodes et les crustacés.

- 0,02 mg/kg de matière sèche pour les poissons.

Pour seize HAPs classés par l'EPA :

- 0,5 mg/kg de matière sèche pour les mollusques bivalves et céphalopodes et les crustacés :

- 0,05 mg/kg de matière sèche pour les poissons.

L'ANSES recommande pour les produits fumés à froid une concentration de 0.5 µg/kg de matière fraîche de B[a]P, et pour les huiles une valeur de 1 µg/kg de B[a]P.

Dans les milieux professionnels, la France a proposé de maintenir la teneur en B[a]P inférieure à 150 ng/m<sup>3</sup> (Caisse Nationale d'Assurance Maladie). L'Europe a limité l'exposition moyenne aux fumées de bitume à 5 mg/m<sup>3</sup>. De plus des mesures d'hygiène ont été prises, comme le port de gants ou de masques, afin d'éviter les risques de contamination (décret n° 2001-97 du 1<sup>er</sup> janvier 2001 paru dans le journal officiel du 3 février 2001).

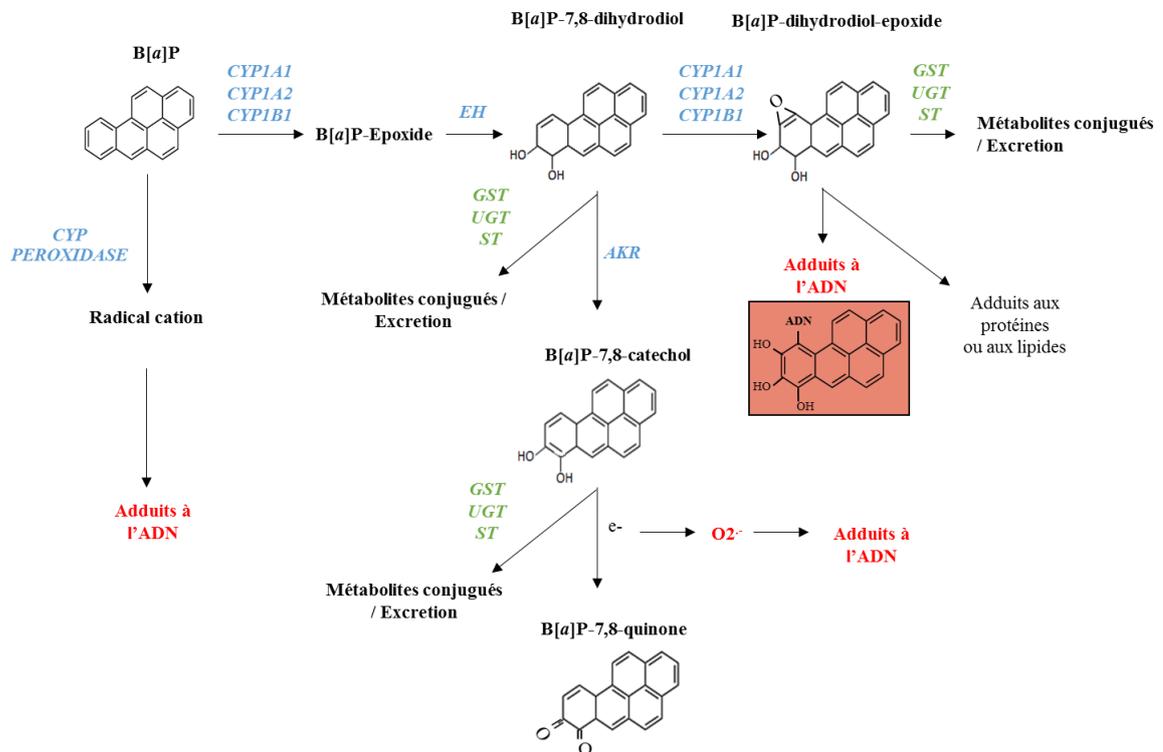
## 2. Le benzo(a)pyrène (B[a]P) : chef de file des HAPs

Le B[a]P est considéré comme le HAP de référence du fait de sa présence dans de nombreux mélanges d'HAPs, de sa concentration relativement constante au sein de ces mélanges et de ses effets toxiques documentés par de nombreuses études. Le B[a]P est le seul HAP à avoir été classé comme cancérigène avéré (Classe 1) par le CIRC dès 1973. Les produits contenant du B[a]P, tels que la fumée de cigarettes, la fumée issue de la combustion de charbon, ou de bois, la fumée des véhicules diesels, ont eux aussi été classés comme substances cancérigènes avérées par le CIRC (CIRC, 2010).

### 2.1. Exposition et bases moléculaires des effets du B[a]P.

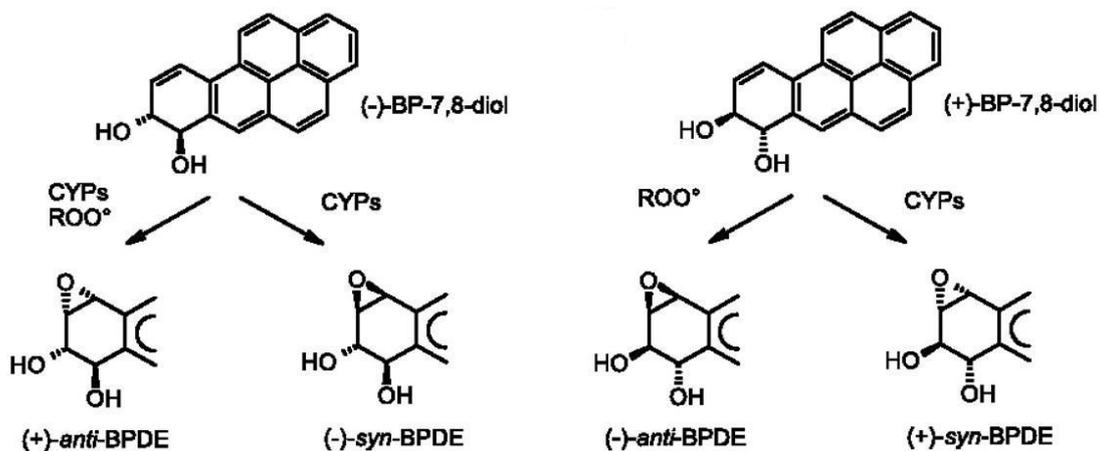
Comme pour les autres HAPs, l'exposition au B[a]P se fait par les voies orale, respiratoire et cutanée. L'absorption du B[a]P par l'alimentation représente la principale source d'exposition, notamment *via* l'absorption d'aliments fumés ou grillés qui contiennent en moyenne 100 ng/kg de B[a]P. L'exposition par la voie respiratoire concerne d'une part les fumeurs (la fumée d'une cigarette contenant en moyenne 25 ng de B[a]P), et d'autre part les populations exposées à l'air pollué (contenant en moyenne 100 ng/m<sup>3</sup> de B[a]P), ainsi l'exposition par l'air ambiant a été estimée à 0,0009 µg/Kg/jour (Yanagisawa *et al.*, 2016). L'exposition par voie cutanée survient principalement lors d'expositions professionnelles. Il a été rapporté qu'une exposition à 0,03 µg/m<sup>3</sup> de B[a]P par l'air ambiant correspondait à une exposition cutanée de 2,5 ng/cm<sup>2</sup> au niveau de la peau des travailleurs de l'asphalte (Costa *et al.*, 2010). Ainsi, l'absorption quotidienne moyenne de B[a]P est approximativement de 2,2 µg/ jour (Hattemer-Frey et Travis, 1991). Après exposition, le B[a]P entre dans la circulation sanguine et se lie à des lipoprotéines (Busbee *et al.*, 1990) et est distribué dans tout l'organisme (Marie *et al.*, 2010), notamment dans les tissus gras comme la moelle osseuse (Vauhkonen *et al.*, 1980). Il a été montré, après une administration par voie intratrachéale chez des rats, que 21% du B[a]P administré étaient retrouvés dans le foie après 10 min et de fortes quantités étaient présentes dans le foie, les reins, le tractus gastro-intestinal, l'œsophage, le petit intestin, le sang et les os après 30 min (Weyand et Bevan, 1986). Après une administration orale, le B[a]P est aussi retrouvé au niveau du foie des reins et de la vessie (Yamazaki *et al.*, 1987).

Au niveau cellulaire, le B[a]P est métabolisé par différentes enzymes *via* les trois voies principales présentées ci-dessous (**Figure 17**).



**Figure 17 : Principales voies du métabolisme du B[a]P.**

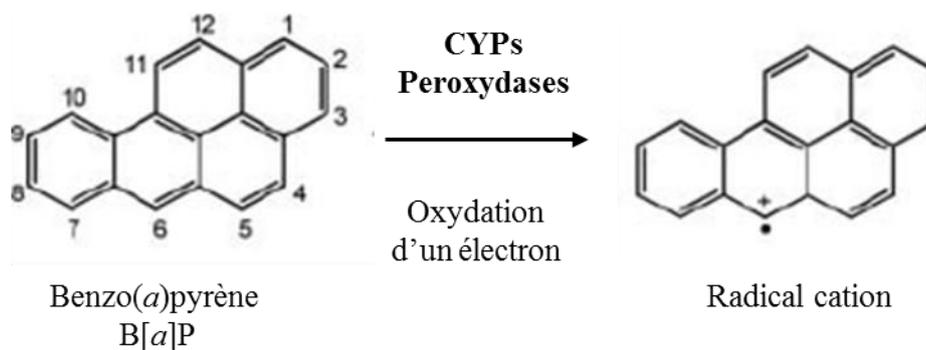
Dans un premier temps, une monooxydation de la double liaison en C<sup>7</sup> et C<sup>8</sup> du B[a]P est réalisée par les CYPs 1A1 et 1B1 essentiellement (Xue et Warshawsky, 2005). L'intervention d'une EH induit ensuite une hydrolyse du cycle oxydé en dihydrodiol, qui subit une nouvelle oxydation de la double liaison en C<sup>9</sup> et C<sup>10</sup> et génère un dérivé diol-époxyde, le BPDE (Allan *et al.*, 2006). La création de carbones chiraux durant le métabolisme entraîne la production de plusieurs formes stéréochimiques pour chaque métabolite. Quatre formes stéréochimiques sont possibles pour le BPDE, les formes (+)- et (-)-*anti*, (+)- et (-)-*syn* (Thakker *et al.*, 1977) (**Figure 18**).



**Figure 18 : Stéréochimie des époxydations des (+)- ou (-)-B[a]P-7,8-diol en espèces réactives (*anti*- et *syn*-BPDE) qui peuvent lier l'ADN.** Alexandrov *et al.*, 2006.

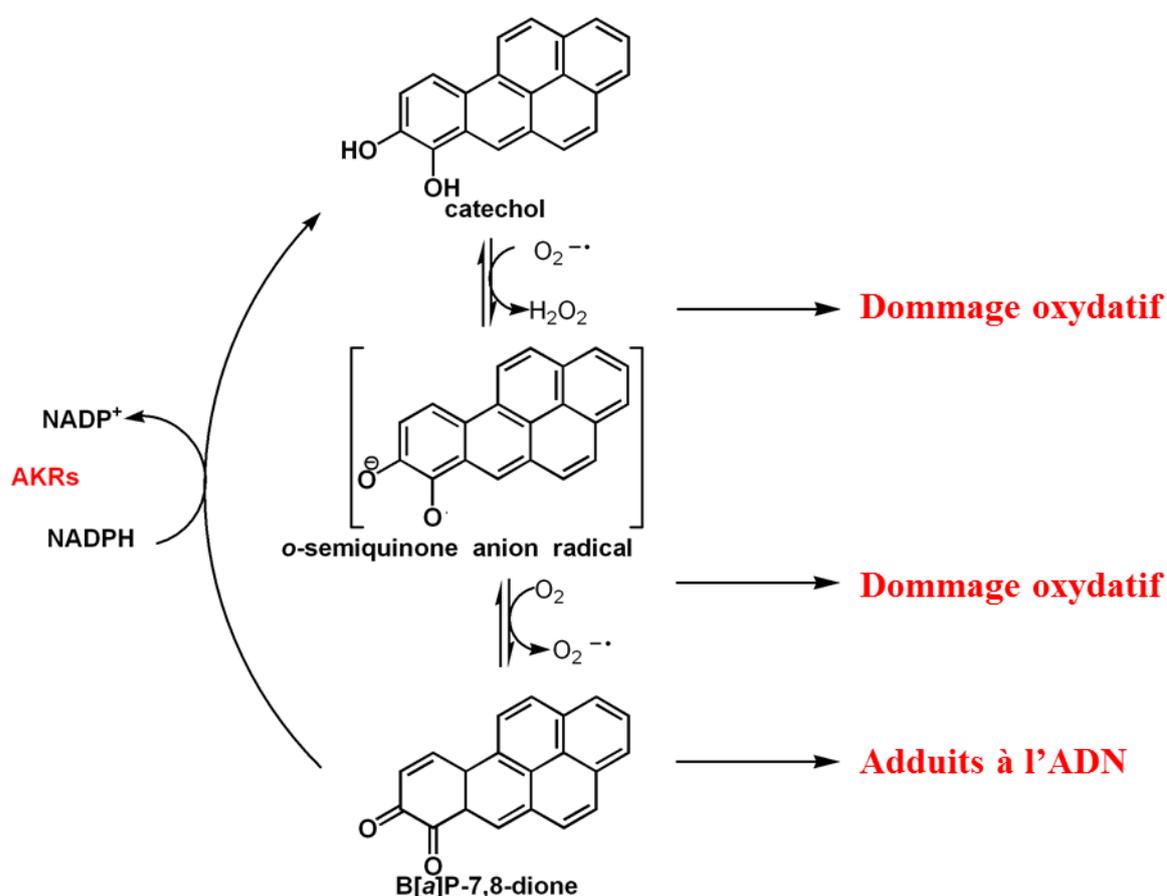
Un traitement au 3-MC chez des rats induit par exemple une oxydation du B[a]P presque exclusivement en isomère 7R,8S-oxydé (Yang *et al.*, 1988) et subi préférentiellement une hydrolyse en B[a]P-7R,8S-diol (Leui *et al.*, 1980). Ces réactions produisent majoritairement l'isomère diol-époxyde 7R,8S,9S,10R, c'est-à-dire l'isomère (+)-*anti*-BPDE.

La voie de formation du radical cation, impliquant les CYPs et les peroxydases, conduit à la formation d'un radical cation localisé en C<sup>6</sup> conduisant à la modification de la configuration géométrique de la molécule et la rendant instable (**Figure 19**).



**Figure 19 : Réaction d'oxydation du B[a]P et formation d'un radical cation en position C<sup>6</sup>.**

La voie de l'*ortho*-quinone, conduisant à la formation de catéchols par les dihydrodiol déshydrogénases (Mangal *et al.*, 2009), peut conduire à la formation de B[a]P-7,8-quinones. La B[a]P-7,8-quinone est capable de rentrer dans un cycle d'oxydo-réduction dans lequel, sa réduction dépendante de la voie du NADPH (Penning *et al.*, 1999), permet la formation de composés catéchol ou de radicaux B[a]P semi-quinones. Comme décrit dans la partie sur la fonctionnalisation des HAPs, les cycles d'oxydation peuvent conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, telles que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Moorthy *et al.*, 2015) (**Figure 20**).



**Figure 20 : Cycle d'oxydo-réduction de la B[a]P-7,8-quinone.** D'après Penning, 2014. Le B[a]P-7,8-quinone est réduit par des enzymes AKRs (Aldo-céto-réductases) de façon dépendante du NADPH et forme un composé catéchol. La formation de ce composé favorise la production d'ERO comme le  $O_2^{\cdot-}$  ou le  $H_2O_2$ , qui participent à la formation de dommages oxydatifs au niveau de l'ADN.

A ce niveau, les métabolites produits seront soit, conjugués par les enzymes de la phase 2, soit, capables d'entraîner des effets délétères directement sur les macromolécules cellulaires.

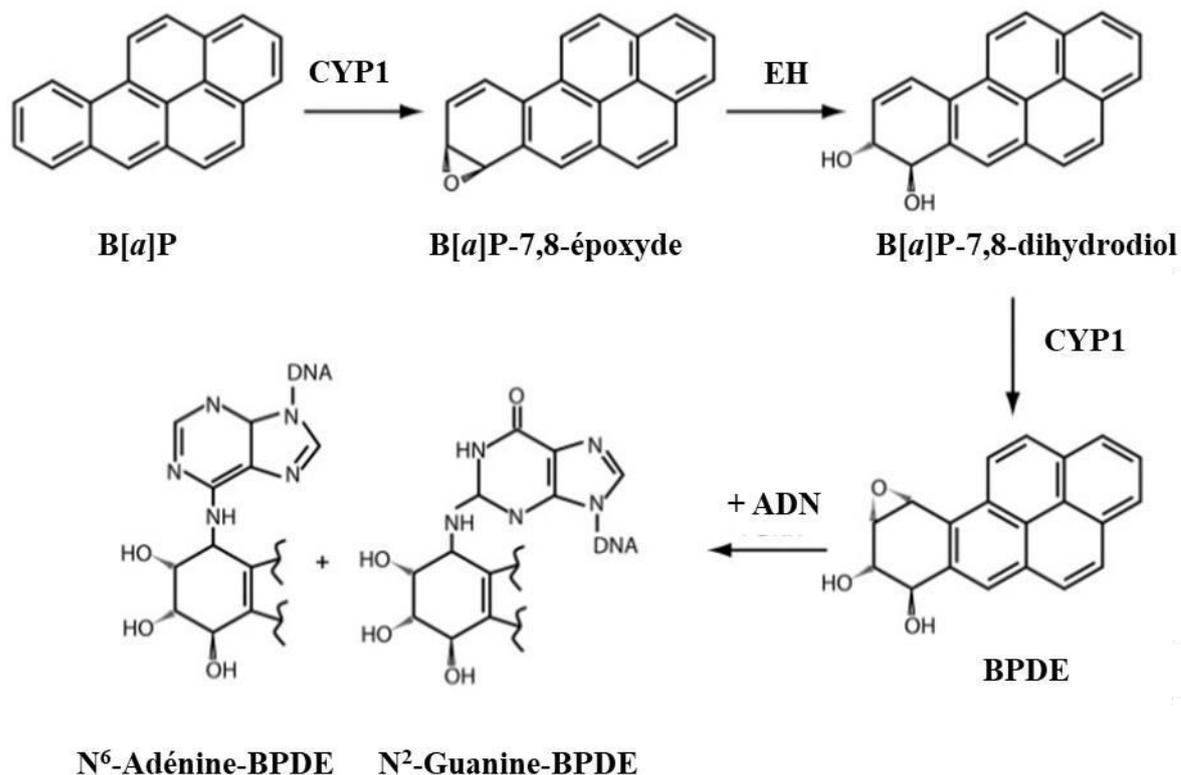
Le B[a]P ainsi que ses métabolites sont ensuite éliminés principalement dans les fèces (70 à 75%) (Yamazaki et Kakiuchi, 1989). Au niveau de l'intestin, les concentrations en B[a]P augmentent avec le temps suggérant une excrétion du B[a]P par la bile et la recirculation entérohépatique (Weyand *et al.*, 1986).

## 2.2.Effets cancérigènes du B[a]P

### 2.2.1. Aspects mécanistiques

#### 2.2.1.1. Formation d'adduits à l'ADN

Les effets cancérigènes du B[a]P sont principalement associés à la formation d'adduits résultant d'une attaque électrophile par des intermédiaires métaboliques du B[a]P (Piberger *et al.*, 2017). Comme nous venons de le voir, l'oxydation des HAPs par les CYPs produit des espèces électrophiles, biochimiquement réactives, capables d'interagir avec les macromolécules cellulaires, en particulier avec les acides nucléiques pour former des adduits à l'ADN. La voie la plus largement admise comme mécanisme prédominant de cancérogénèse chimique du B[a]P, est celle du diol-époxyde (Hall *et al.*, 1990 ; Geacintov *et al.*, 1991). Plus précisément, l'isomère R,S,S,R du BPDE a été rapporté comme ayant la plus grande capacité de fixation sur l'ADN (Reardon *et al.*, 1987). Les métabolites BPDE réagissent préférentiellement avec les résidus déoxyguanosine (dGua) et deoxyadénosine (dAde), et particulièrement avec les résidu N<sup>2</sup> de la guanine, formant l'adduit déoxyguanine-N<sup>2</sup>-BPDE (dG-N<sup>2</sup>-BPDE) et les résidus N<sup>6</sup> de l'adénine (Dipple., 1983) (**Figure 21**). La présence de dG-N<sup>2</sup>-BPDE a été constatée dans la peau et les poumons de souris exposées au B[a]P (Mass *et al.*, 1993 ; Melendez-Colon *et al.*, 1999).

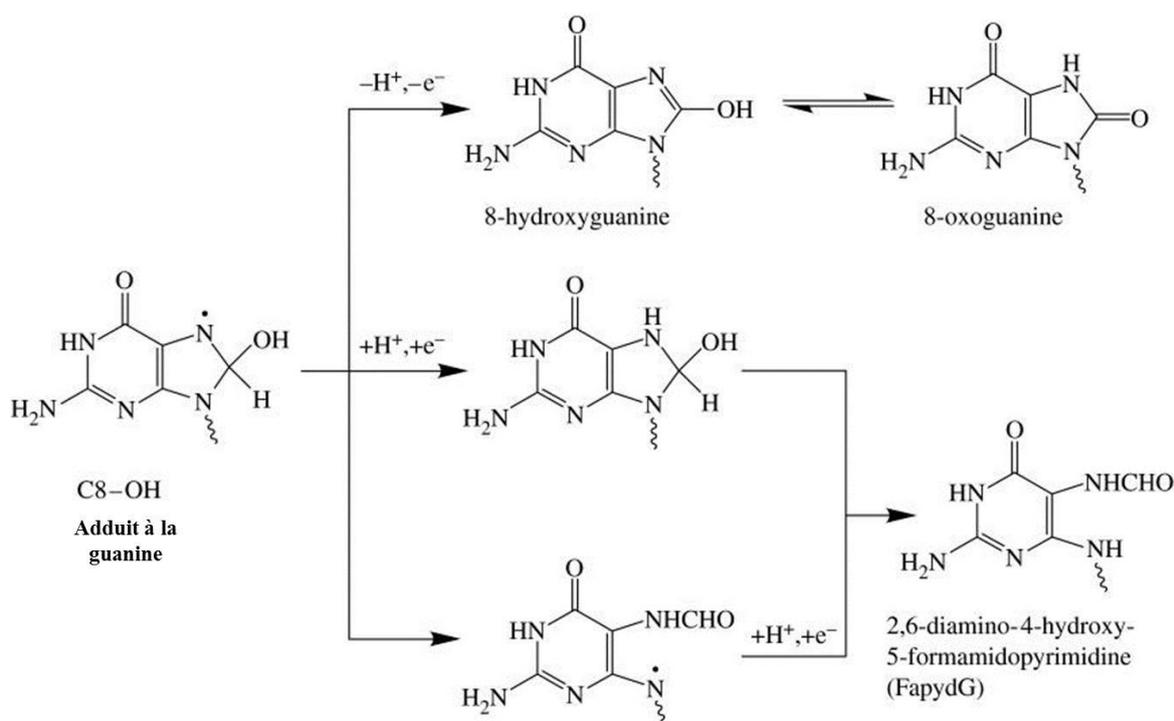


**Figure 21 : Etapes de formation des adduits dérivés du BPDE en position N<sup>6</sup> de l'adénine et N<sup>2</sup> de la guanine.** D'après Moserova *et al.*, 2009. Le B[a]P pris en charge par les CYPs de la famille 1 (CYP1) est oxydé en B[a]P-7,8-époxyde qui peut être pris en charge par une époxyde hydrolase (EH) pour former un composé B[a]P-7,8-dihydrodiol capable d'être à nouveau oxydé par les CYPs en B[a]P-diol-époxyde (BPDE). Une attaque électrophile de ce composé au niveau des résidus N<sup>2</sup> de la guanine ou N<sup>6</sup> de l'adénine entraîne la formation d'adduits N<sup>2</sup>-Guanine-BPDE ou N<sup>6</sup>-Adénine-BPDE.

La voie du radical cation est elle aussi capable d'entraîner la formation d'adduits à l'ADN. A cause de la très forte réactivité et l'instabilité de ce radical, la formation des adduits par cette voie se fait sur les résidus C<sup>8</sup> et N<sup>7</sup> des guanines et les résidus N<sup>7</sup> des adénines (Cavaliere et Rogan, 1995) et conduit spontanément, par clivage de la liaison N-glycosidique, à la formation de sites abasiques, en position N<sup>7</sup> de la guanine et N<sup>3</sup> de l'adénine (Henkler *et al.*, 2012). Ainsi, des adduits en position C<sup>8</sup> et N<sup>7</sup> de la guanine et en position N<sup>7</sup> de l'adénine, ainsi que des sites apuriques ont été observés dans l'épiderme de souris exposées au B[a]P par voie cutanée (Melendez-Colon *et al.*, 1999).

Enfin, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) peut être aussi à l'origine de la formation d'adduits de types dommages oxydatifs. Toutes les ERO n'ont cependant pas le même degré d'induction des lésions oxydatives. Ainsi, l'oxygène

singulet ( $^1\text{O}_2$ ), est à l'origine de l'oxydation de la guanine en position  $\text{C}^8$  (Kawaniski *et al.*, 2001), le  $\text{OH}^\cdot$  forme des adduits sur les sites à forte densité d'électrons (Dizdaroglu *et al.*, 1991), l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  n'est pas assez réactif pour induire des modifications de l'ADN. Du fait de son faible potentiel d'ionisation, la base oxydée la plus fréquente est la guanine en position  $\text{C}^8$  (Cadet *et al.*, 2003). Cet adduit est formé par une déprotonation du radical cation guanine suite à l'oxydation par l'oxygène singulet. Cette déprotonation est suivie une oxydation par l' $\text{OH}^\cdot$  et la formation d'un intermédiaire radicalaire, la 8-hydroxy-7,8-dihydro-2-désoxyguanine. La réduction de cet intermédiaire conduit à la formation de FAPy-désoxyguanine (2,6-Diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidine) tandis que son oxydation conduit à la formation de 8-oxo-G (**Figure 22**).



**Figure 22 : Formation de FAPy-guanine ou de la 8-oxo-Guanine en présence d'ERO.** D'après Jiranusornkul et Laughton, 2008. L'oxydation en position  $\text{C}^8$  de la guanine, par des ERO comme le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ) entraîne la formation d'une base instable qui peut être réduite et former la 8-oxo-Guanine, ou bien peut être oxydée et subir une ouverture de cycle entre la position  $\text{C}^8$  et  $\text{N}^1$  de la guanine pour former un composé FAPy-guanine.

### 2.2.1.2. Formation de cassures de l'ADN

Les effets cancérigènes du B[a]P sont aussi associés à la formation de cassures de l'ADN. Les cassures de l'ADN résultent de la rupture de la liaison phosphodiester du squelette sucre-phosphate de l'ADN. Il existe deux types de cassures, les cassures simple brin et les cassures double brin.

Les cassures simple brin, correspondent à la rupture de la liaison phosphodiester localisée sur un seul brin de la double hélice d'ADN. Lors d'exposition au B[a]P, les cassures simple brin ont plutôt été associées à la survenue de dommages oxydatifs. Ainsi, l'augmentation des cassures de types simple brin, dans différents modèles cellulaires exposés au B[a]P, corrèle avec la formation de quinones et la production d'ERO associée (Hiramoto *et al.*, 1998 ; Kikugawa *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2009).

Les cassures double brin, résultent quant à elles, de ruptures de liaisons phosphodiester localisées sur les deux brins d'ADN et proches l'une de l'autre. C'est le type de dommages à l'ADN le plus délétère pour la cellule, puisque ces cassures peuvent entraîner la perte d'un fragment de chromosome, et du fait de l'absence de brin intact pour la réparation, des difficultés de prise en charge. Ces cassures entraînent des problèmes de viabilité et de stabilité cellulaire. Le B[a]P a déjà été impliqué dans la survenue de telles lésions de l'ADN (Tung *et al.*, 2014).

Parallèlement, lors de processus de réplication de l'ADN, les polymérases peuvent se retrouver bloquées par les dommages de types adduits ou cassures simple brin et conduire à la formation de cassures double brin (Vasianovich *et al.*, 2014).

### 2.2.1.3. Relation entre génotoxicité et caractère mutagène

Suite à la formation de dommages au niveau de l'ADN, il peut survenir des mutations, qui correspondent à des modifications définitives de l'information génétique dans une cellule, transmises aux cellules filles. En présence de B[a]P, les principales mutations observées sont les transversions G → T, ces mutations étant associées d'une part aux adduits à l'ADN dérivés du BPDE, des catéchols et des quinones (Zhan *et al.*, 1996), mais aussi à la formation de bases oxydées lors de la production d'ERO, comme la 8-oxo-G (Nakabeppu *et al.*, 2006). Les conséquences des mutations dépendent du caractère de cette mutation. Ainsi, les mutations peuvent être silencieuses ou invisibles si elles surviennent dans un intron ou qu'elles entraînent un changement de base sans changement d'acides aminées ou un changement d'acide aminé sans variation des propriétés de la protéine. Ces mutations peuvent aussi avoir des effets sur le fonctionnement cellulaire, ou être à l'origine de l'initiation de processus cancérogènes.

Le lien entre formation d'adduits à l'ADN issus du métabolisme du B[a]P et la survenue de mutations est bien documentée. De nombreuses études ont rapportés la survenue de mutations suite à une exposition au B[a]P. Dans une étude réalisée chez des levures, le benzo[a]pyrene-7,8-quinone est capable *via* un cycle d'oxydo-réduction de produire des ERO formant des 8-oxo-G, à l'origine de transversions G→T dans le gène p53 (Shen *et al.*, 2006). *In vitro*, dans une lignée de cellules humaines (HeLa), l'adduit benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-époxyde formé sur les résidus guanine des codons 157, 248 et 273 du gène p53 est associé à l'identification de ces positions comme « hot spots » de mutations dans les cancers du poumon chez l'Homme (Denissenko *et al.*, 1996). Parallèlement, les tumeurs induites par le B[a]P présentent des transversions G→T et G→A situées dans le proto-oncogène K-Ras, au niveau du codon 12 (Mass *et al.*, 1993). *In vivo*, des études chez la souris ont montré la présence de transversions G→T dans le codon 13, et de transversions A→T dans le codon 61 du gène H-Ras dans des tumeurs cutanées ou pré-néoplasiques après une exposition cutanée au B[a]P (Chakravarti *et al.*, 2008), ainsi que des transversions G→T dans le gène p53 pour les tumeurs cutanées induites par le B[a]P (Ruggeri *et al.*, 1993). Les HAPs sont aussi capables d'induire une transversion G→T préférentiellement au niveau des îlots CpG méthylés de certains gènes, tels que p53. Le gène p53 est un suppresseur de tumeur, dont les niveaux de mutation

chez l'homme sont corrélés avec certains cancers. Des transversions G→T ont été observées dans le gène p53 de tumeurs pulmonaires chez l'Homme. La prévalence de cette transversion est augmentée chez les fumeurs (40%) comparé aux non-fumeurs (10%) (Cuzick *et al.*, 1990), suggérant l'implication des HAPs dans la survenue de cette transversion (Hainaut et Pfeifer, 2001).

Parallèlement à ces effets initiateurs de tumeurs, le B[a]P s'est révélé capable d'exercer des effets sur la prolifération cellulaire, laissant supposer un rôle dans la promotion tumorale. Ces effets sont toutefois moins bien documentés que les effets génotoxiques. La prolifération cellulaire joue un rôle important dans les processus de cancérogenèse. Le B[a]P est capable d'augmenter la capacité de prolifération des cellules. Ainsi, des marqueurs de prolifération de cellules tumorales, tels que PCNA (Proliferating cell number antigen), sont augmentés dans des tumeurs induites par le B[a]P chez l'animal (Bodduluru *et al.*, 2016). Parmi les voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération, les voies dépendantes du calcium intracellulaire sont des cibles du B[a]P. Par exemple, le B[a]P est capable d'augmenter les niveaux de calcium intracellulaire, favorisant la prolifération cellulaire (Tannheimer *et al.*, 1997). De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire en présence de B[a]P corrèle avec les propriétés immunosuppressives de ce dernier (Krieger *et al.*, 1994) et inflammatoires (N'Diaye *et al.*, 2006), pouvant contribuer à leur action cancérogène. En effet, l'inflammation joue un rôle important dans la progression tumorale. Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 participent à cette progression (Balkwill et Joffroy, 2010), notamment en favorisant la progression dans le cycle cellulaire et en inhibant l'apoptose (Anandakumar *et al.*, 2012 ; Kay *et al.*, 2005). Ainsi, des niveaux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires ont été observés dans des cancers pulmonaires induits par le B[a]P chez l'animal, et des inhibiteurs de la production de ces cytokines favorisent la diminution de la progression tumorale induite par le B[a]P (Chen *et al.*, 2016 ; Bodduluru *et al.*, 2016).

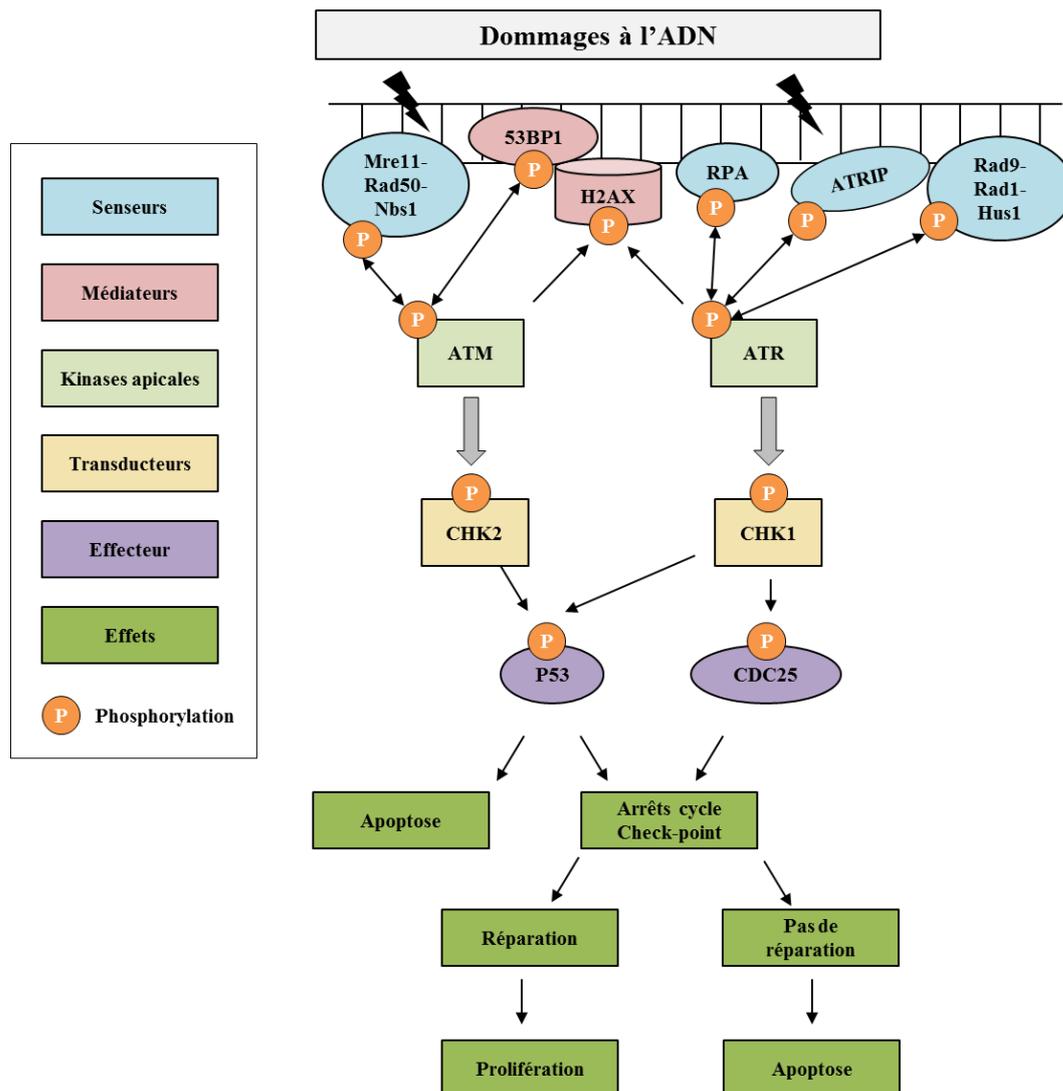
Le caractère cancérogène du B[a]P peut être aussi lié à des processus épigénétiques. Ainsi le B[a]P est capable d'altérer les profils de méthylation ou d'acétylation de l'ADN permettant l'augmentation ou la diminution de l'expression de certains gènes. Les profils de méthylation de l'ADN sont importants dans la régulation de l'expression des gènes, et une augmentation de la concentration en cytosine-DNA méthyltransférase-1 a été associée à une hyper-méthylation des promoteurs des gènes codant entre autre pour les cadhérines, lors d'une exposition au BPDE, dans des cellules

d'épithélium bronchique immortalisées (Damini *et al.*, 2008). La méthylation des promoteurs de gènes étant impliquée dans la régulation négative de l'expression des cadhérines, le BPDE peut favoriser des phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse, impliqués dans la promotion tumorale.

#### 2.2.1.4. Réparation des dommages

La génération de dommages à l'ADN est considérée comme une composante nécessaire de la cancérogenèse mais n'est pas suffisante pour l'induction de tumeurs (Poirier, 2016), car les adduits peuvent être reconnus et pris en charge par des systèmes de réparation. La mauvaise réparation des adduits peut initier des mutations, considérées comme l'étape initiatrice de tumeurs.

En fonction du type de dommages, différentes voies de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) sont activées et différents mécanismes de réparation seront mis en place. Ces mécanismes permettent de vérifier l'intégrité du génome, afin d'éviter toute dérive qui pourrait conduire la cellule au développement d'un processus cancérigène. Lorsqu'une lésion à l'ADN est détectée, certaines protéines participent à sa reconnaissance, ce sont des protéines senseurs des dommages qui permettent l'activation de transducteurs qui vont activer des médiateurs et des effecteurs de la réponse cellulaire aux dommages, conduisant à l'arrêt de la progression au travers des différentes phases du cycle cellulaire, nécessaire à la prise en charge du dommage par les enzymes ou à l'induction de l'apoptose (**Figure 23**).



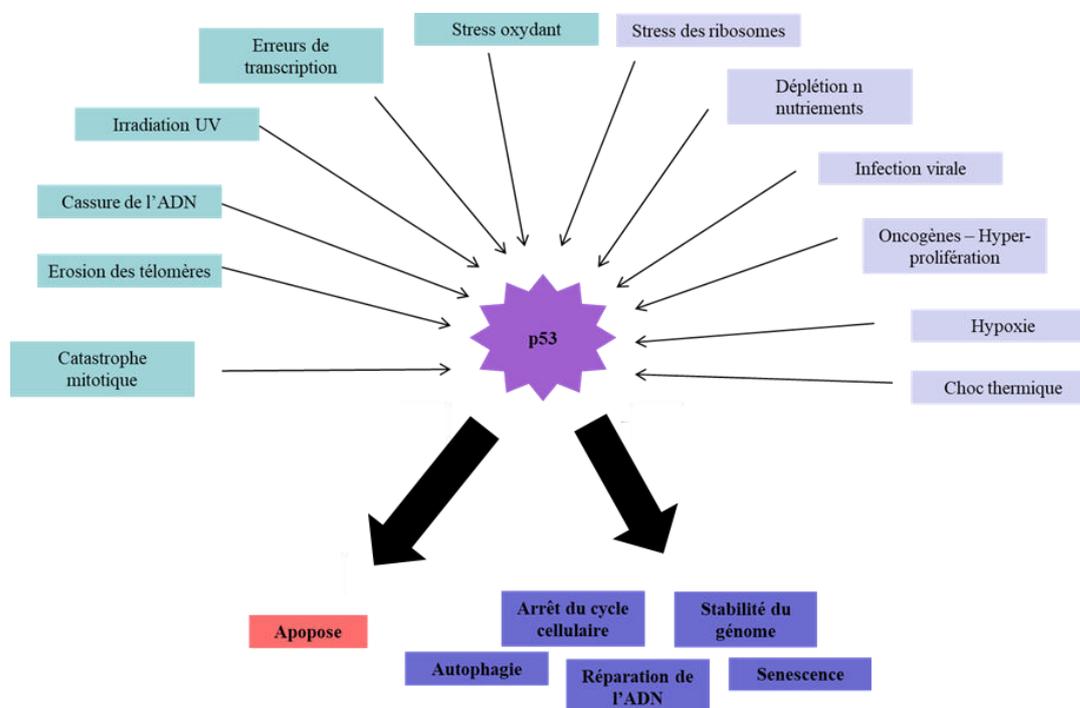
**Figure 23 : Cascade des DDR.** La survenue de dommages au niveau de l'ADN entraîne le recrutement de protéines senseurs des dommages au niveau des sites de lésions de l'ADN. En fonction des types de dommages (cassures simple brin ou double brin), les protéines senseurs ne sont pas les mêmes et activent des kinases apicales et des médiateurs différents. Ainsi la voie de la kinase ATM est activée plutôt lors de cassures double brin, tandis que la kinase ATR est activée lors de cassures simple brin. Ces kinases peuvent activer par phosphorylation des transducteurs (CHK1, CHK2) capables à leur tour d'activer par phosphorylation des effecteurs tels que la protéine p53 ou les CDC25. Ainsi, l'activation de ces voies de réponse aux dommages peut conduire à l'activation de l'apoptose, ou un arrêt du cycle cellulaire favorisant la réparation des dommages. D'après Sulli et al., 2012.

Ainsi, des protéines senseurs sont recrutées au niveau des dommages à l'ADN. Le complexe, contenant les protéines Mre11, Rad50 et Nbs1, est impliqué dans la reconnaissance des cassures double brin (Lee et Paull, 2005), tandis que d'autres protéines participent à la reconnaissance des cassures simple brin. C'est le cas de la

protéine RPA (Replication Protein A), qui s'accumule sur les fragments d'ADN simple brin (Chen et Wold, 2014). Les protéines senseurs vont permettre le recrutement de kinases apicales jouant un rôle de transducteurs du signal. Les protéines, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) et DNA-PK, faisant partie des PI-3-Kinases (PI3K) (Durocher et Jackson, 2001 ; Shiloh, 2003) sont des transducteurs apicaux des dommages. Ces protéines présentent une activité sérine/thréonine kinase avec une préférence pour les séquences d'acides aminés contenant la séquence SQ/TQ, correspondant à 3 motifs de sérine ou thréonine suivi d'une glutamine dans une séquence de 100 acides aminés (Traven et Heierhorst, 2005). La kinase ATM est impliquée dans la reconnaissance des cassures double brin de l'ADN (Bakkenist et Kastan, 2003), tandis que la protéine ATR est plutôt impliquée dans la détection des fourches de réplication bloquées et des cassures simple brin (Nam et Cortez, 2011; Paulsen et Cimprich, 2007). L'activation de ces protéines conduit à l'activation de médiateurs. Ainsi, l'activation d'ATM conduit à l'activation de médiateurs comme BRCA1, MDC1,  $\gamma$ H2AX ou 53BP1 (Misteli et Soutoglou, 2009 ; Lou *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2002 ; Goldberg *et al.*, 2003). Ces médiateurs vont faire le lien entre les transducteurs ATM ou ATR et les protéines effectrices CHK1 et CHK2 (Checkpoint 1 et 2), tout en augmentant l'induction du signal en favorisant l'activation par phosphorylation d'ATM et ATR, (Pichierri et Rosselli, 2004 ; Chaturvedi *et al.*, 1999). CHEK1/2 font, elles aussi, partie de la famille des protéines sérine/thréonine kinases. L'activation de ces deux effecteurs permet l'activation par phosphorylation des effecteurs terminaux que sont p53 et les phosphatases de la famille CDC25, qui jouent un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Des études ont montré qu'une exposition au B[a]P dans différents modèles cellulaires entraînait une activation des PI3K dont les kinases ATM et ATR (Yan *et al.*, 2011), et que l'activation de ces kinases était impliquée dans l'activation de la voie p53 par le B[a]P. Ainsi, une augmentation de l'activation de la voie p53, *via* la voie ATM/ATR/Chk1 a été constatée dans des cellules de carcinome pulmonaire (H358) et bronchique (BEAS-2B) (Caino *et al.*, 2007). De plus, la phosphorylation du résidu sérine-15 de p53, rendant compte de son activation, induite par le B[a]P, est inhibée par des inhibiteurs des PI3K dans des cellules HepG2 (Lin *et al.*, 2008).

Une protéine particulière semble jouer un rôle fondamental sur ces points de contrôle, il s'agit de la protéine p53. Cette protéine agit principalement comme un facteur de transcription (Beckerman et Prives, 2010) et a la capacité de réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la division, la survie, la

mort cellulaire ou encore la réparation des dommages (Tanaka *et al.*, 2000). Dans des conditions normales, la protéine p53 possède une demi-vie courte et son niveau protéique est très régulé (Hu *et al.*, 2012). Lorsque la cellule est soumise à différents stress, la protéine p53 peut être activée (**Figure 24**).



**Figure 24: Stimuli capables d'activer p53 et réponses liées à cette activation.** D'après Meek, 2015. Différents stimuli peuvent activer la protéine p53, parmi lesquels les dommages à l'ADN, le stress oxydant et les infections virales. Lors d'activation par des stimuli « externes » l'induction de la protéine p53 participe à la régulation du cycle cellulaire, l'autophagie, la réparation de l'ADN, les processus de senescence cellulaire et le maintien de la stabilité du génome. Lorsque les stimuli sont trop délétères pour la cellule, p53 favorise les processus d'apoptose.

Ainsi, lors d'expositions au B[a]P, il y a une phosphorylation de p53. Son activation est ensuite impliquée dans un arrêt du cycle cellulaire, et/ou dans l'induction de l'apoptose. Dans une lignée d'hépatome de souris, une exposition au B[a]P augmente les niveaux de p53 et de sa forme phosphorylée, conduisant à une augmentation de l'activité des caspases-3 et -9 impliquées dans l'apoptose (Kim *et al.*, 2005). Dans des cellules humaines de chorio-carcinome, le B[a]P active la voie p53, et entraîne une augmentation des niveaux de la protéine p21, une cible génique de p53 impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, favorisant un arrêt en phase G2-M du cycle cellulaire. (Druktenis *et al.*, 2005). De plus, dans un modèle de souris déficientes en p53, une exposition au B[a]P n'entraîne pas d'augmentation de l'apoptose, mais une augmentation

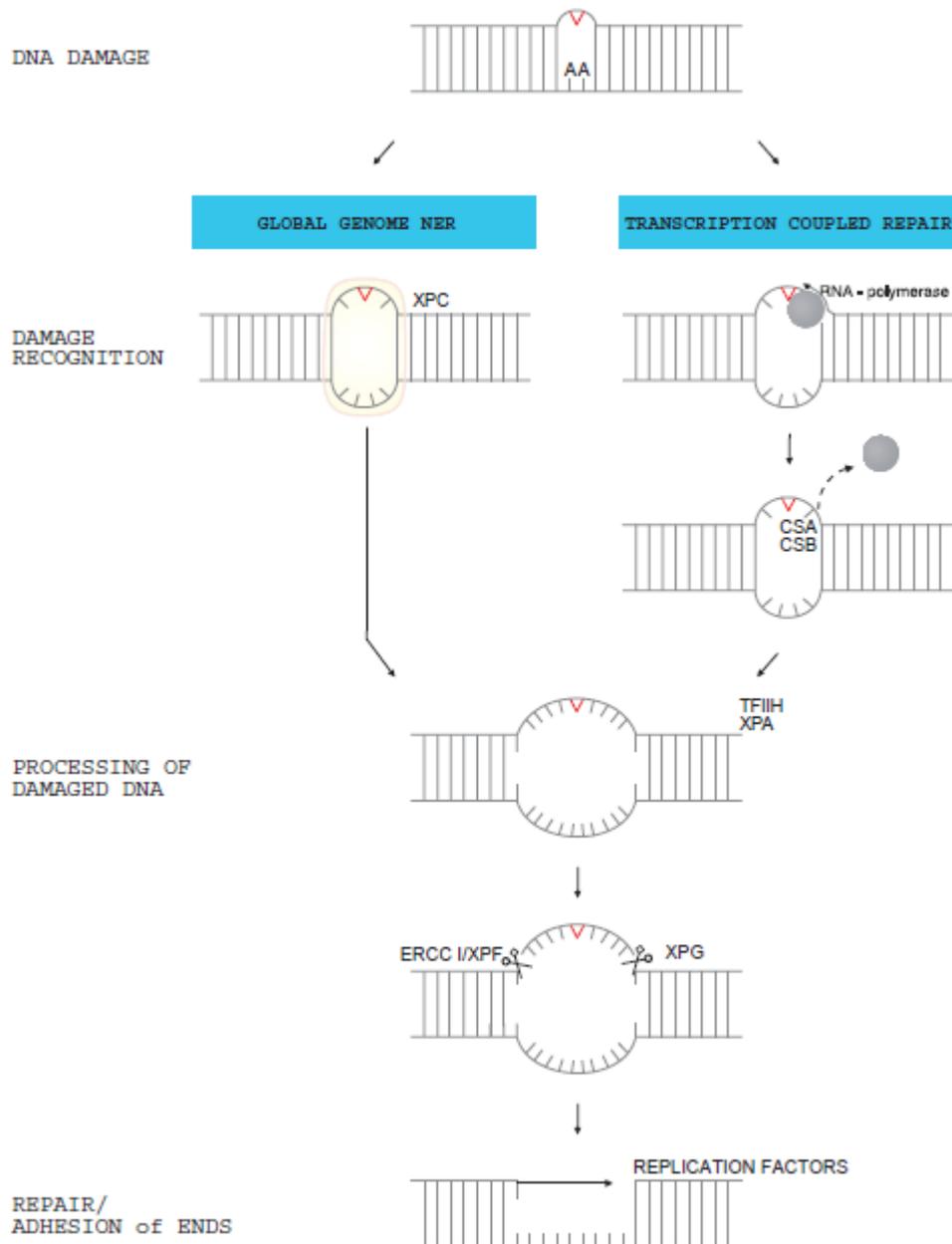
de la prolifération cellulaire (Miller *et al.*, 1996) soulignant le rôle de p53 dans l'activation de l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire.

Lors des arrêts du cycle cellulaire, il peut y avoir une mobilisation des enzymes de réparation de l'ADN. Les mécanismes les plus souvent activés après une exposition au B[a]P sont le système de réparation par excision de nucléotides (NER), le système de réparation par excision de bases (BER), la réparation par recombinaison, comprenant la recombinaison homologue (HR) et la NHEJ (Non-homologous end joining).

#### 2.2.1.4.1. La réparation des adduits volumineux à l'ADN

La réparation des adduits volumineux causés par le B[a]P fait principalement intervenir le système de réparation NER (Braithwaite *et al.*, 1998). Cette voie de réparation de l'ADN a été documentée à partir d'une pathologie humaine le *Xeroderma pigmentosum* (XP), dans laquelle les sujets ne réparent pas les photoproduits de l'ADN. Le système NER se divise en deux sous voies, la voie GG-NER (global genomic-NER) et la voie TC-NER (transcription-coupled-NER) dont les mécanismes d'action diffèrent à l'étape de reconnaissance du dommage (**Figure 25**). La voie GG-NER surveille les séquences d'ADN et reconnaît les dommages à l'ADN *via* la protéine XPC (Xeroderma pigmentosum C). La voie TC-NER est mise en place lors de l'arrêt des ARN-polymérase II le long du brin d'ADN durant la transcription, et favorise la réparation de l'ADN activement transcrit. Dans la voie TC-NER la polymérase arrêtée doit être déplacée afin d'accéder au dommage, pour cela la cellule recrute les protéines CS-A et CS-B (cockayne syndrome A et B). Après les étapes de reconnaissances du dommage, les voies GG-NER et TC-NER sont identiques (**Figure 25**). Le complexe TFIIH prend le relais. Ce complexe est composé de deux hélicases XPB et XPD qui ouvrent et déroulent la double hélice depuis le site du dommage. La protéine RPA (Replication protein A) est impliquée dans la formation d'un complexe de reconnaissance du dommage plus stable et le dommage est clivé par XPG à l'extrémité 3' du dommage tandis que le complexe XPF/ERCC1 clive à l'extrémité 5'. Le fragment résultant contient le dommage et fait entre 24 et 23 nucléotides. Une ADN-polymérase  $\delta/\epsilon$  permet la synthèse d'un nouveau brin d'ADN, et une ligase permet la ligation de ce nouveau brin. L'administration par voie orale de 13 mg/kg de B[a]P chez des souris déficientes en XPA (XPA<sup>-/-</sup>), une enzyme impliquée dans la NER, entraîne une augmentation de la proportion de lymphomes, comparés aux souris hétérozygotes XPA<sup>+/-</sup> ou aux homozygotes XPA<sup>+/+</sup> (De Vries *et al.*, 1998). De

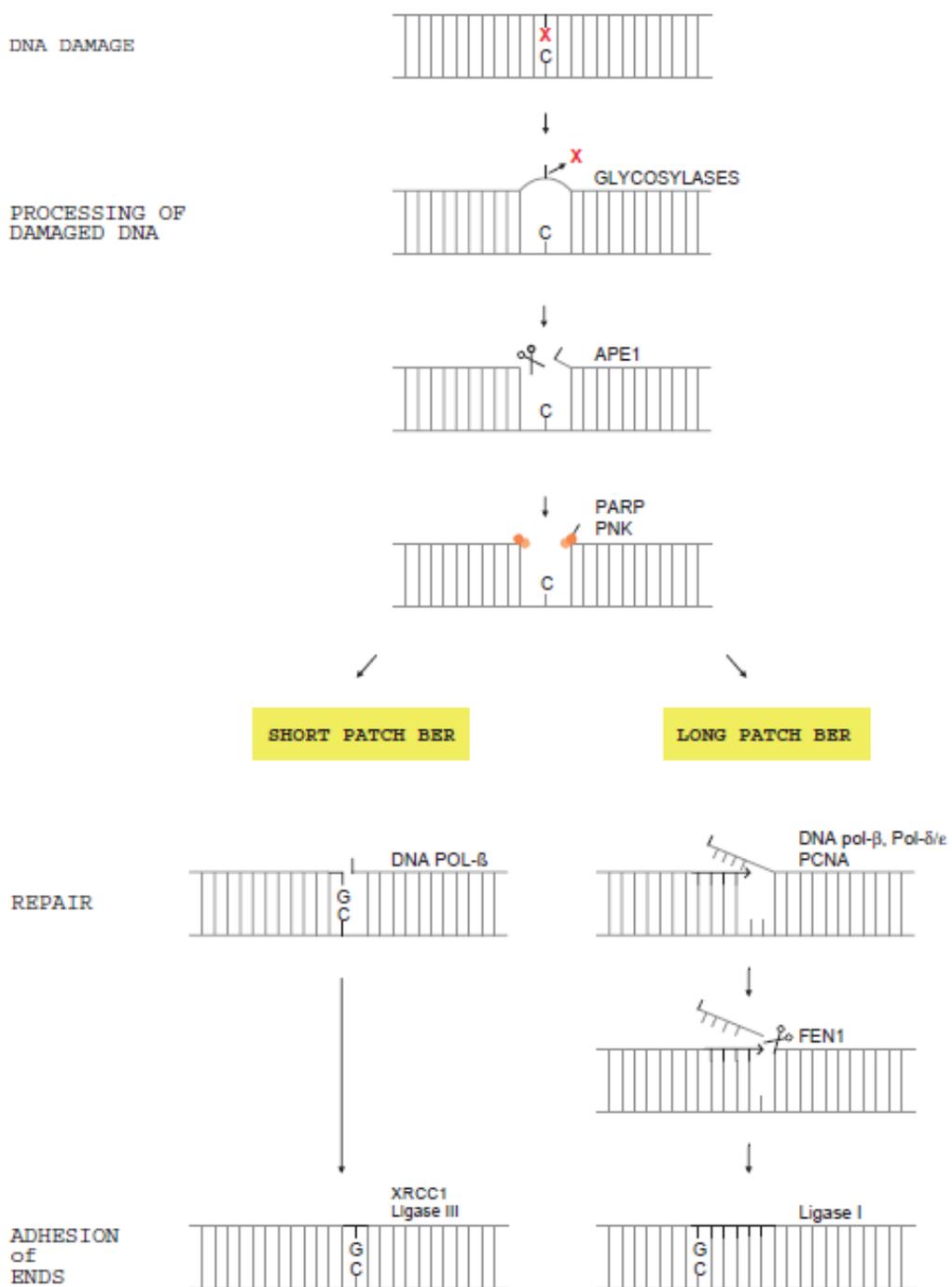
plus, une administration intratrachéale de 0,1 mg de B[a]P une fois par semaine pendant 4 semaines chez ces souris entraîne une augmentation significative de l'incidence de tumeurs pulmonaires après 16 mois (Ide *et al.*, 2000). Ces résultats soulignent l'implication de la réparation par excision de nucléotides dans la protection des cellules vis à vis des dommages génotoxiques et cancérigènes du B[a]P.



**Figure 25 : Mécanismes moléculaires de la réparation des dommages de types adduits volumineux par la voie NER. Houtgraaf *et al.*, 2006.**

#### 2.2.1.4.2. La réparation des dommages oxydatifs et des sites abasiques

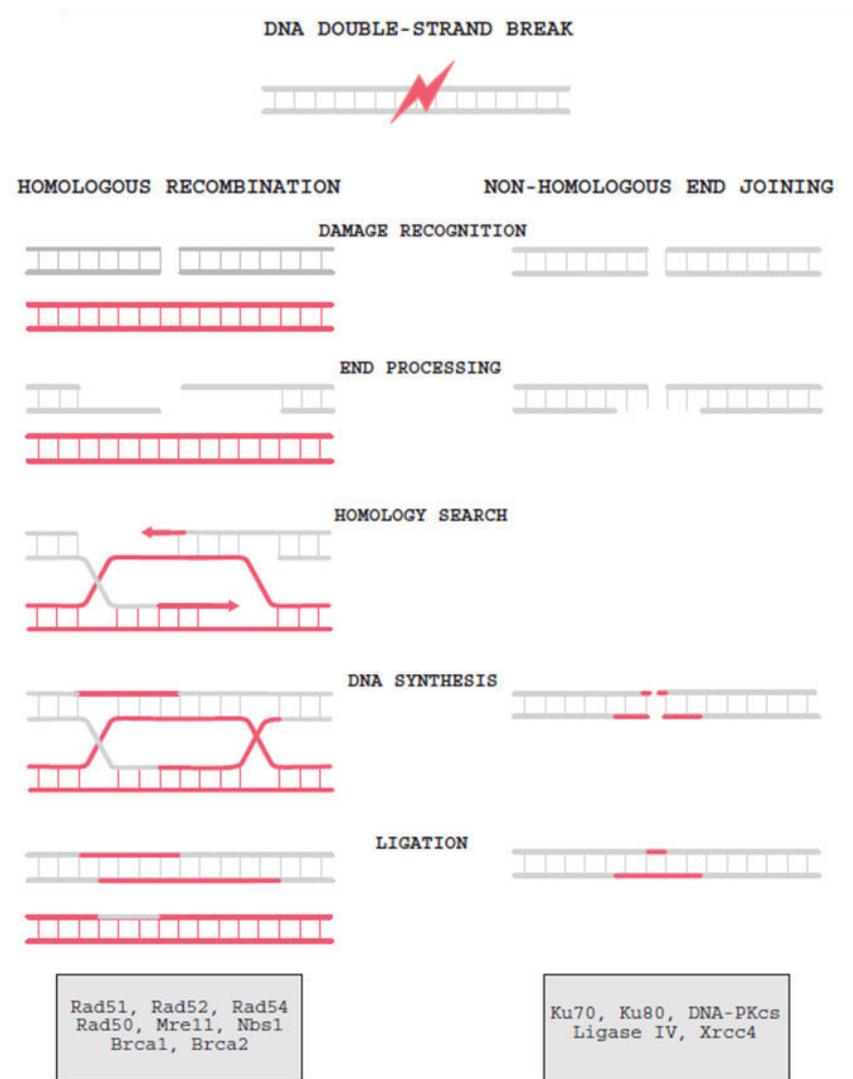
Les dommages de type sites abasiques, alkylation ou oxydation médiée par les EAO sont principalement éliminés par le système BER (Sancar *et al.* 2004). Ce mécanisme de réparation s'intéresse ainsi aux dommages à l'ADN de plus petite taille et retire les bases endommagées de la double hélice. L'ADN est ensuite resynthétisé, selon les étapes identiques au mécanisme NER. Dans ce système de réparation, les bases endommagées sont éliminées grâce à des ADN glycosylases plus ou moins spécifiques des dommages, telles que les uracil-DNA glycosylase, ou encore la formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG), résultant en la formation d'un site abasique dont les deux extrémités sont clivées par des endonucléases afin de faciliter la réparation. Soit le système réalise un « long-patch repair » correspondant à une correction du dommage sur plusieurs nucléotides en amont et en aval du dommage, soit il réalise un « short-patch repair » ciblant uniquement le nucléotide porteur du dommage. Pour le « short-patch repair », la séquence d'ADN manquante (correspondant à un nucléotide) est resynthétisée à partir du brin non endommagé par une polymérase  $\beta$  et la ligation des brins néo-synthétisés et de l'ancien brin est assurée par la ligase 3. Le « long-patch repair » implique l'ADN-polymérase  $\beta$ , l'ADN-polymérase  $\delta/\epsilon$  et la protéine PCNA. Une endonucléase permet le retrait d'un morceau du brin endommagé (plusieurs nucléotides) et la liaison de l'ADN nouvellement synthétisée est assurée par la ligase 1 (**Figure 26**).



**Figure 26 : Mécanismes moléculaires de la réparation des dommages de types sites abasiques alkylation et bases oxydées par la voie BER.** *Houtgraaf et al., 2006.*

### 2.2.1.4.3. La réparation des cassures double brin de l'ADN

Les cassures double brin de l'ADN sont des dommages particulièrement délétères pour la cellule. Du fait de la cassure des deux brins, il peut survenir des fragmentations de chromosomes, des translocations ou des délétions. Les dommages à l'ADN de type cassures double brin peuvent survenir durant la réplication de l'ADN sur une cassure simple brin déjà existante. Deux mécanismes distincts peuvent prendre en charge la réparation des cassures double brin, la recombinaison homologue (RH) et la « non-homologous end-joining » (NHEJ) (**Figure 27**).



**Figure 27 : Mécanismes moléculaires de la réparation des dommages de types adduits cassures double brin par la voie RH et NHEJ** *Houtgraaf et al., 2006.*

La réparation par RH nécessite la présence d'une séquence homologue, retrouvée sur la chromatide sœur, pour pouvoir être mise en place. La RH est médiée par des protéines de la famille Rad parmi lesquelles Rad51 jouant un rôle central. Après induction de la cassure double brin, Rad51 participe à la recherche d'une séquence homologue intacte afin d'engager la réparation. Cette réparation évite la perte d'information génétique. La nécessité d'une séquence homologue retrouvée sur une chromatide sœur, uniquement produite à partir de la phase S du cycle cellulaire (**Figure 28**). La RH n'est activée que dans les cellules en division lors des phases S et G2 du cycle cellulaire.

La réparation par NHEJ à l'inverse de la RH ne nécessite pas de séquence homologue, les deux brins d'ADN clivés sont reliés grâce au complexe protéique constitué de l'ADN ligase IV et XRCC4. La NHEJ est un mécanisme de réparation capable d'entraîner des délétions dans les séquences d'ADN. Cependant, en absence de chromatide sœur (Phase G0, G1 ou en fin de réplication), ce mécanisme est utilisé pour la réparation des cassures double brin.

### 2.2.2. Aspects épidémiologiques

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs études ont montré une association entre exposition professionnelles aux HAPs et augmentation des risques de cancers de la peau, du poumon, et de la vessie (Bosetti *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008 ; Gaertner et Thériault, 2002 ; Mastrangelo *et al.*, 1996). En revanche peu d'études relatent une association entre l'exposition alimentaire aux HAPs et une augmentation de l'incidence de cancers. A ce niveau, il est très complexe d'attribuer ces cancers à la présence du B[a]P en particulier, car les expositions concernent des HAPs en mélanges et les études disponibles ne concluent par à l'heure actuelle au caractère cancérigène du B[a]P à lui seul chez l'Homme.

### 3. Le système immunitaire

Le système immunitaire est un réseau de cellules, de tissus et d'organes interagissant de façon élaborée et dynamique entre eux dans le but de défendre l'organisme contre les attaques des agents extérieurs, comme les bactéries, les virus ou encore les xénobiotiques. La perturbation de ce système peut conduire à l'apparition de pathologies, et notamment de cancers, dont l'une des caractéristiques est la résistance au système immunitaire. Le système immunitaire peut être considéré comme un système à plusieurs niveaux comprenant trois mécanismes de défense : (1) l'anté-immunité, (2) l'immunité innée et (3) l'immunité spécifique (Sparfel, 2016).

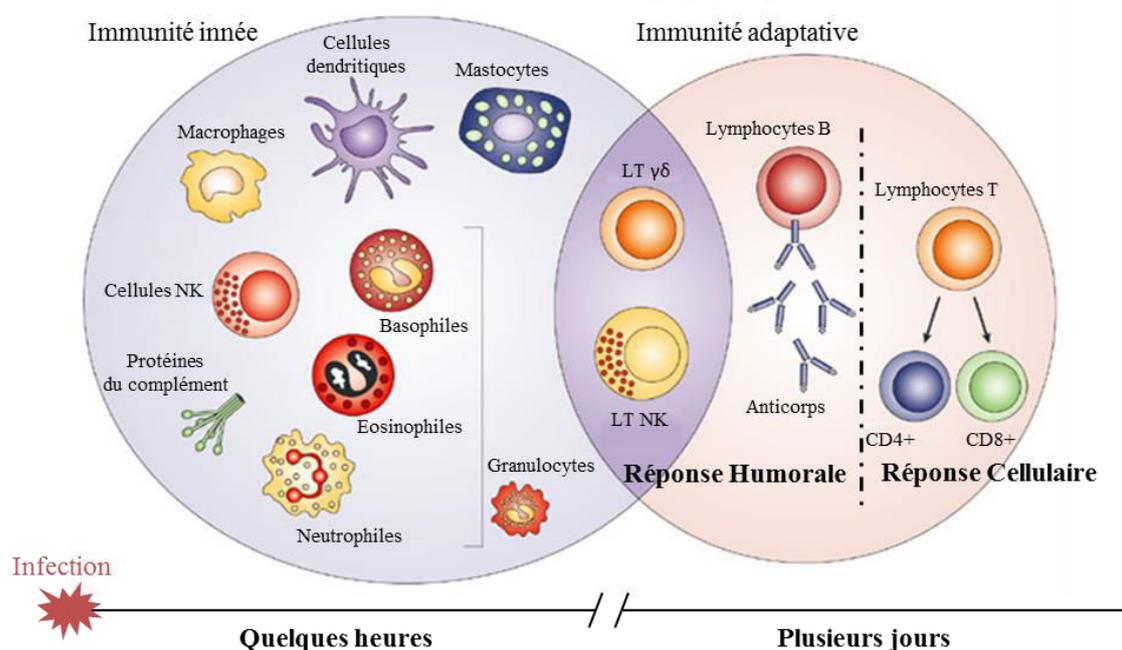
#### 3.1. Les différents types d'immunité

L'anté-immunité constitue la première barrière de défense de l'organisme, cette immunité est assurée par les barrières physiques que constituent la peau, les muqueuses, les barrières chimiques telle que l'acidité du tractus gastro-intestinal ou encore les barrières microbiologiques représentées par les nombreux microorganismes qui tapissent notre peau ou notre paroi intestinale. Elle met en route une réponse immédiate pour éviter que le système immunitaire ne soit mis à contribution.

L'immunité innée est la seconde ligne de défense de l'organisme. Cette immunité survient lors d'un contact entre un corps étranger et les fluides corporels contenant des cellules de l'immunité (sang, lymphe, liquide interstitiel...). L'immunité innée fait intervenir diverses cellules d'origine hématopoïétique, comprenant des cellules résidentes des tissus, comme les macrophages et les cellules dendritiques, et des cellules circulantes, comme les neutrophiles, les éosinophiles et les monocytes, qui surveillent l'organisme *via* la circulation sanguine et lymphatique (Yatim et Lakkis, 2015). Ces cellules peuvent être rapidement recrutées au niveau d'un site infectieux afin de déclencher une défense immédiate contre le corps étranger. Cette réponse immune innée peut faire intervenir une réponse cellulaire, impliquant des cellules capables de phagocytose (macrophages, neutrophiles), des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages) et les cellules « natural killer » (NK) impliquées dans la destruction des cellules présentant des altérations (cellules infectées, cellules tumorales), ou une réponse

humorale, impliquant des cytokines, des anticorps ou des molécules du complément (Dranoff *et al.*, 2008). Cette immunité est associée à une inflammation (**Figure 28**).

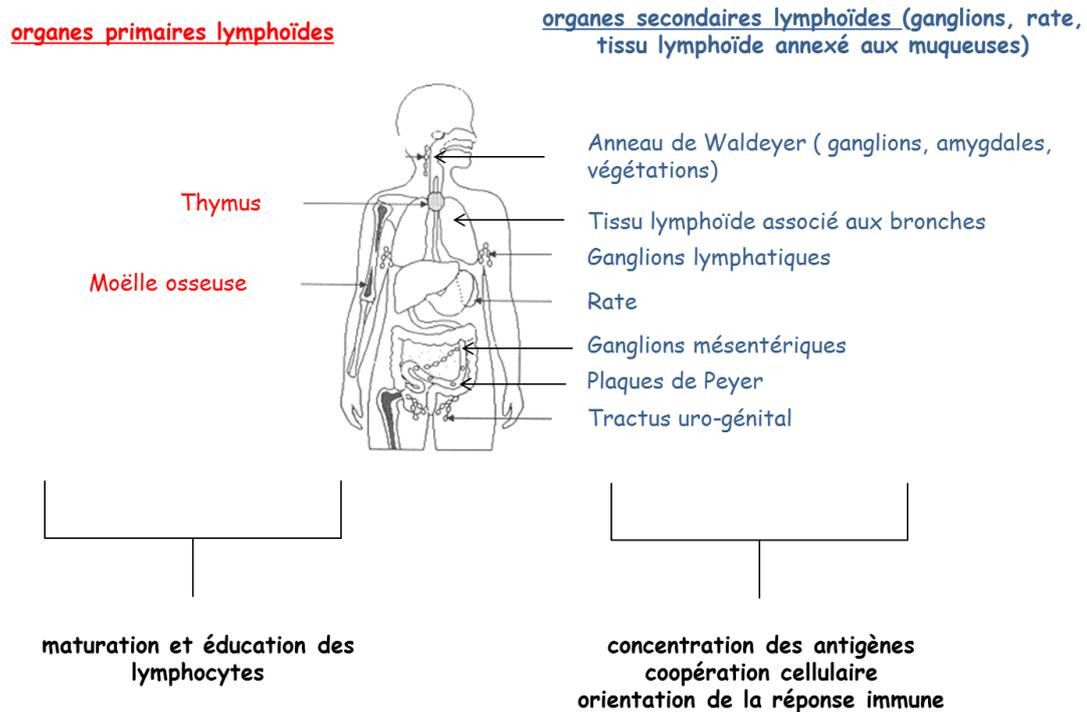
L'immunité spécifique ou adaptative, est acquise suite à une exposition à un antigène spécifique. Contrairement aux deux autres types d'immunité, elle se base sur la mémoire immunologique des cellules qui la composent (lymphocytes T et lymphocytes B). Cette immunité n'est activée qu'après une seconde exposition à l'agent pathogène. Elle est basée sur l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes, et met en jeu une réponse humorale (par production d'anticorps) ou cellulaire (par régulation ou cytotoxicité) (**Figure 28**).



**Figure 28 : Immunité innée et adaptative.** Lors d'une infection, le système immunitaire inné représente une première ligne de défense rapide, qui agit en quelques heures., Ce système est composé de facteurs solubles comme les protéines du complément et de composants cellulaires, comme les cellules Natural Killer (NK) les cellules dendritiques les macrophages ou encore les granulocytes (Basophiles, Eosinophiles et Neutrophiles). La réponse immunitaire adaptative met plus de temps à se mettre en place (quelques jours) mais est plus spécifique de l'antigène et peut mettre en place une mémoire de l'infection, facilitant la réponse immunitaire lors d'une seconde infection similaire. Ce système peut se décomposer en deux réponse immunitaire, la réponse humorale, médiée par les lymphocytes B et les anticorps produits par les plasmocytes dérivés des lymphocytes B activés, et la réponse cellulaire, médiée par les lymphocytes T CD4+ ou lymphocytes T CD8+ activés par la présentation d'un antigène par les complexe majeur d'histocompatibilité des cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages ou les cellules dendritiques. A l'interface de ces deux mécanismes immunitaire, sont retrouvées certaines cellules présentant des effets cytotoxiques, les lymphocytes T NK (LT NK) et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (LT  $\gamma\delta$ ). D'après Dranoff *et al.*, 2008.

### 3.2. Les organes du système immunitaire

Les organes et tissus lymphoïdes sont le lieu de maturation et résidence des lymphocytes et d'autres cellules du système immunitaire. Ces organes peuvent se diviser en deux catégories, (1) les organes primaires, (2) les organes secondaires (**Figure 29**).



**Figure 29 : Organes lymphoïdes primaires et secondaires.** Les organes lymphoïdes primaires (Rouge) sont le lieu de maturation et d'éducation de l'ensemble des cellules du système immunitaire. Ils sont au nombre de deux, moëlle osseuse et thymus. Les organes lymphoïdes secondaires (Bleu) sont répartis dans l'ensemble de l'organisme et ont pour rôles de concentrer les antigènes afin de favoriser leur reconnaissance par les cellules de l'immunité, la coopération cellulaire ainsi que l'orientation de la réponse immune.

### 3.2.1. Les organes primaires

Il existe deux organes lymphoïdes primaires, la moelle osseuse et le thymus. Ce sont les lieux de production et/ou de prolifération, maturation et d'éducation des lymphocytes. Les lymphocytes y acquièrent des clusters de différenciation spécifiques, comme par exemple de CD19 pour les lymphocytes B et le CD3 pour les lymphocytes T.

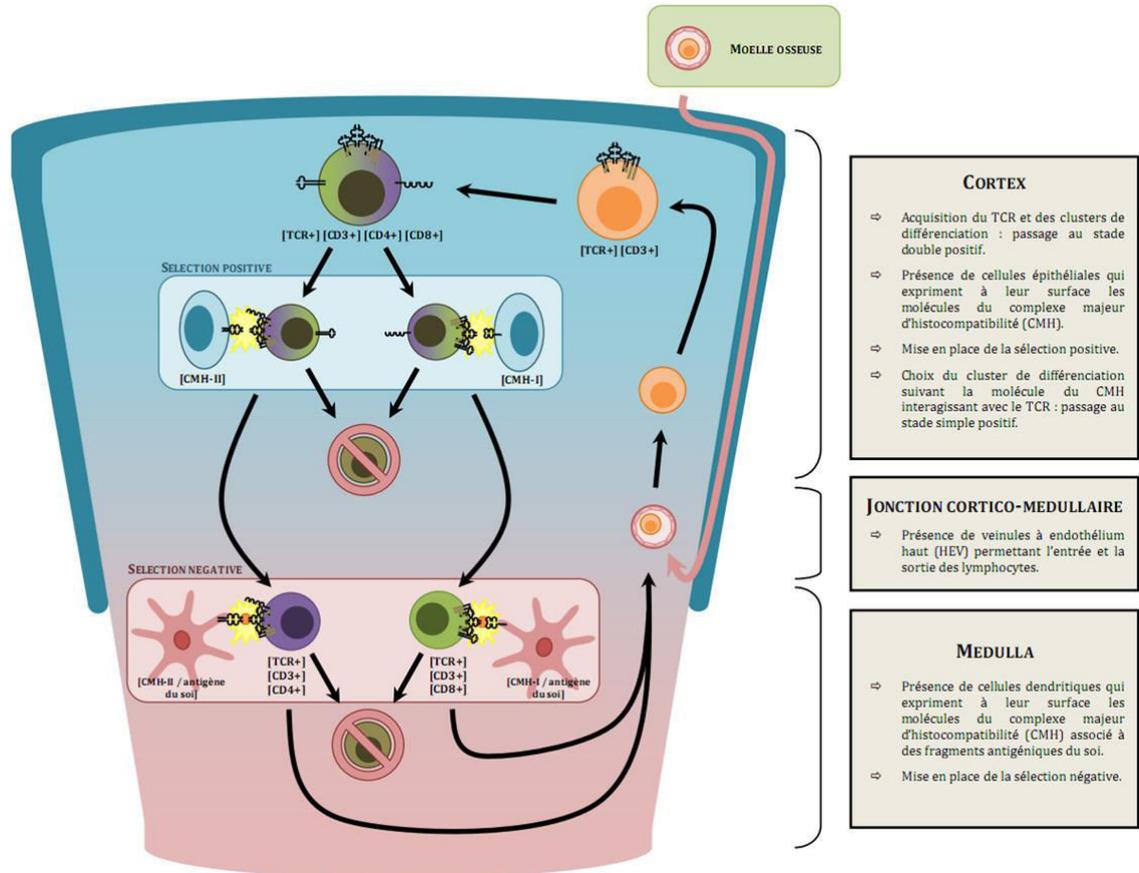
#### 3.2.1.1. La moelle osseuse

L'intégralité des cellules hématopoïétiques prennent naissance dans la moelle osseuse, localisée dans les os longs ou plats, à partir d'un précurseur commun la cellule souche hématopoïétique (CSH). C'est dans la moelle osseuse que l'intégralité de la maturation des lymphocytes B est réalisée. Si l'intégralité de la maturation des lymphocytes B et de cellules natural killer (NK) se passe dans la moelle osseuse, la différenciation des lymphocytes T se fait au niveau du thymus (Yatim et Lakkis, 2015).

#### 3.2.1.2. Le thymus

Le thymus situé dans le thorax en avant du cœur est un organe lympho-épithélial. Il est le site de maturation et d'éducation des lymphocytes T (Zhang et Bhandoola, 2014). Les progéniteurs lymphoïdes entrent dans le thymus lorsqu'ils sont au stade double négatif, c'est-à-dire qu'ils n'expriment ni CD3, ni CD4, ni CD8, ni T cell receptor (TCR). Dans un premier temps, un réarrangement de gènes permet l'expression en surface de lymphocytes T des différents CD et du TCR. Parmi les précurseurs, 60 % vont donner, après réarrangement, des lymphocytes CD3+, CD4+, CD8+ et TCR-complet (chaines  $\alpha$  et  $\beta$ ), et seuls ces lymphocytes vont poursuivre leur maturation à travers le thymus. Les TCR ainsi formés peuvent reconnaître des peptides (du soi et du non-soi), présentés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes CD3+ sont sélectionnés vis-à-vis du CMH, par sélection positive dans un premier temps, au niveau du cortex (**Figure 30**). Cette sélection est assurée par les cellules épithéliales du thymus qui possèdent la capacité de présenter des peptides du soi. Les lymphocytes T répondant de manière excessive à cette présentation, où les lymphocytes T ne reconnaissant pas le CMH sont éliminés par apoptose. Ainsi, seul les lymphocytes T présentant une faible affinité pour le CMH présentant un peptide du soi reçoivent un signal de survie et peuvent poursuivre leur sélection dans le thymus.

A ce stade, les lymphocytes T sont double positifs, ils présentent un CD4 et un CD8. Par la suite, la sélection d'un seul cluster est réalisée. Si le lymphocyte se lie à une CMH de classe 1, il diminuera l'expression du CD4 et augmentera l'expression de son CD8. Le processus inverse est observé lorsque les lymphocytes T se lient à des CMH de classe 2. Les lymphocytes T, alors simples positifs, migrent vers la médulla du thymus au niveau de laquelle ils continuent leur maturation et seront sélectionnés de façon négative (Zhang et Bhandoola, 2014). Cette sélection permet de filtrer les lymphocytes réagissant trop à la présentation d'un peptide du soi correspondant à d'autres tissus que le thymus. Ainsi, si les lymphocytes reconnaissent avec trop d'affinité les CMH présentant ces peptides, ils reçoivent un signal de mort. Les lymphocytes n'interagissant pas sont eux aussi éliminés. Seuls restent les lymphocytes capables de reconnaître le peptide présenté par le CMH avec une faible affinité. Après sélection, il ne reste que 1% des précurseurs.



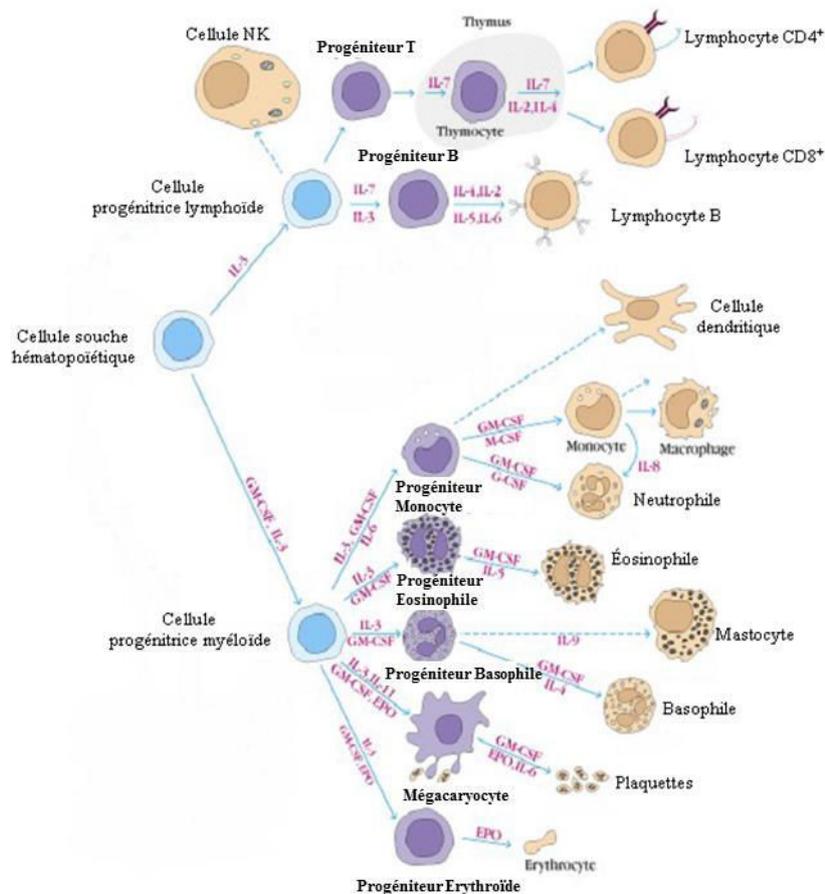
**Figure 30 : Maturation des lymphocytes T dans le thymus.** Les progéniteurs lymphoïdes entrent dans le thymus et favorisent un réarrangement de gènes permettant l'expression des CD4, CD8, CD3 et du TCR. Ces lymphocytes sont sélectionnés de façon négative, par présentation de peptide du soi via les CMH (complexes majeurs d'histocompatibilité) présents sur les cellules épithéliales du thymus. La non reconnaissance de ces CMH ou la reconnaissance excessive des peptides du soi conduit à la mort par absence de signal de survie. Les lymphocytes résultant se différencient en CD4 ou CD8 et sont sélectionnés à nouveau grâce à la présentation de peptides du soi, différents de ceux du thymus, par ces cellules présentatrices d'antigène au niveau de la médulla. Ainsi, les lymphocytes répondant de manière excessive ou ne répondant pas du tout, sont éliminés par apoptose en recevant un signal de mort. <http://www.cours-pharmacie.com>

### 3.2.2. Les organes secondaires

Après cette étape de maturation initiale, les lymphocytes B et T quittent les organes lymphoïdes primaires sous forme de lymphocytes B naïfs ou T naïfs, pour aller à la rencontre de l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires. Les organes lymphoïdes secondaires sont les lieux d'activation des lymphocytes dans le but de les différencier en cellules effectrices de l'immunité adaptative ou en cellules mémoires. Parmi ces organes secondaires, se trouvent les ganglions lymphatiques et mésentériques, la rate, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, comprenant les amygdales et les plaques de Peyer (Yatim et Lakkis, 2015). La rate est en relation avec la circulation sanguine. Très vascularisée elle assure l'immunosurveillance des antigènes qui ont réussi à parvenir dans le sang. Les ganglions forment anatomiquement des chaînes ganglionnaires et sont reliés par les vaisseaux lymphatiques, dispersés dans tout l'organisme pour permettre la surveillance de l'ensemble de l'organisme. La lymphe émanant du liquide interstitiel qui baigne tous les tissus est drainée par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions qui jouent un rôle de filtres et favorisent la rencontre entre les lymphocytes et les antigènes présent dans l'organisme. Les ganglions sont riches en lymphocytes B et T. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou MALT (Mucosae Associated Lymphoid Tissue), sont des entités organiques nombreuses et variées représentant 80% de la masse de tissu lymphoïde présent dans l'organisme. Tous ces organes permettent donc une concentration des antigènes, une coopération cellulaire et une orientation de la réponse immune.

### 3.3. Les composants cellulaires du système immunitaire

Comme décrit précédemment, tous les éléments cellulaires sanguins dérivent d'un précurseur commun, la cellule souche hématopoïétique (CSH), marquée du cluster de différenciation 34 (CD34) et localisée au niveau de la moelle osseuse. Les CSH, autorépliquatives et pluripotentes, sont donc capables de se renouveler et de se différencier en cellules progénitrices lymphoïdes ou myéloïdes. Le progéniteur lymphoïde est à l'origine de la production des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules NK. Après différenciation le précurseur myéloïde donne les granulocytes, les monocytes (qui donneront dans les tissus les macrophages et les cellules dendritiques), les plaquettes et les hématies (**Figure 31**) (Yatim et Lakkis, 2015).



**Figure 31 : Hématopoïèse.** Différenciations cellulaires conduisant de la cellule souche hématopoïétique (CSH) aux différents types cellulaires du système immunitaire sous l'effet de différentes cytokines et facteurs de croissance (rouge). Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellule progénitrice myéloïde ou lymphoïde qui donneront les cellules de la lignée myéloïde et lymphoïde respectivement. Goldsby et al., 2000.

### 3.3.1. Les cellules de la lignée myéloïde.

Les polynucléaires sont des cellules issues de la lignée myéloïde dont le noyau est polylobé et le cytoplasme contient des granulations. Ils représentent la plus grande partie des cellules mononucléées du sang périphérique et comprennent les neutrophiles, qui phagocytent les corps étrangers extracellulaires, les éosinophiles, qui participent à la destruction des parasites intracellulaires et régulent la dégranulation des mastocytes, et les basophiles, qui sont les précurseurs sanguins des mastocytes tissulaires qui sont impliqués dans la sécrétion de facteurs allergiques et inflammatoires comme les histamines, les prostaglandines et les leucotriènes (Yatim et Lakkis, 2015).

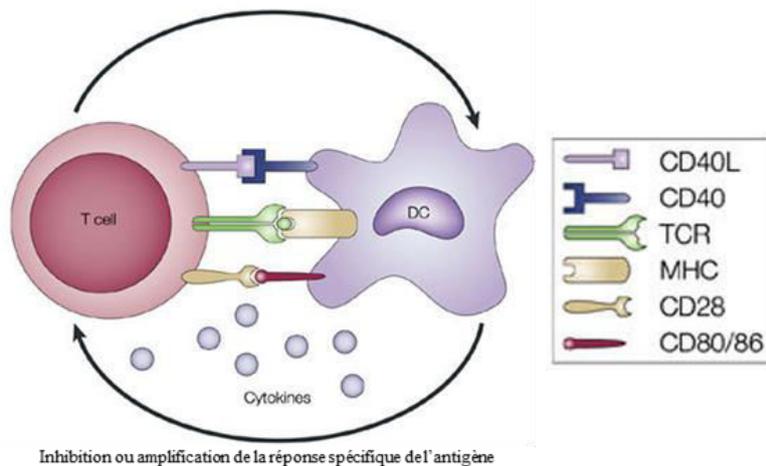
Les monocytes sont issus de la lignée myéloïde. Les monocytes peuvent être recrutés sur les lieux d'infection, passer les tissus par diapédèse et se différencier, *via* l'action de différentes cytokines et facteurs de croissance (**Figure 31**) en macrophages ou cellules dendritiques. Les macrophages sont des cellules mononucléées qui participent à différentes fonctions du système immunitaire comme la phagocytose, la présentation des antigènes et l'activation de l'immunité adaptative, notamment *via* leur interaction avec des lymphocytes T. Les cellules dendritiques quant à elles, jouent aussi un rôle important dans la présentation des antigènes (Yatim et Lakkis, 2015).

### 3.3.2. Les cellules de la lignée lymphoïde.

Les lymphocytes sont issus de la lignée lymphoïde. Comme nous venons de le voir, les précurseurs lymphoïdes peuvent soit se différencier en lymphocytes B ou NK au niveau de la moelle osseuse, soit migrer au niveau du thymus où différentes étapes permettent la maturation et la sélection des lymphocytes T. Ces cellules passent ensuite dans la circulation sanguine et rejoignent les tissus périphériques.

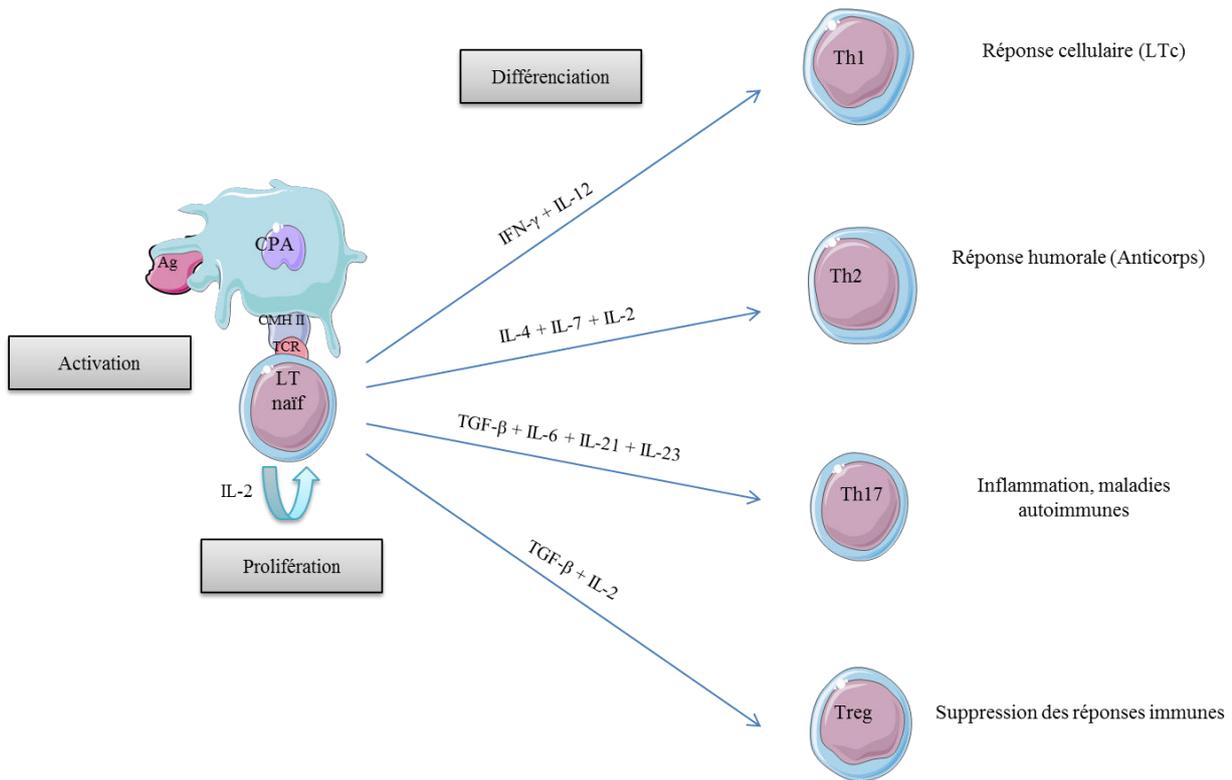
Les lymphocytes B, caractérisés par la présence d'un B-Cell Receptor (BCR), peuvent être activés directement par les antigènes. Leur activation entraîne une différenciation en plasmocytes capables de produire des immunoglobulines (Igs) de surfaces ou sécrétés. Les lymphocytes B après activation peuvent aussi se différencier en lymphocytes B mémoires permettant une réponse rapide lors d'une seconde exposition à l'agent pathogène. Les lymphocytes B participent à la réponse humorale de l'immunité adaptative.

Les lymphocytes T sont caractérisés par la présence à leur surface d'un TCR. Leur activation nécessite la présentation d'un antigène *via* les CMH par une cellule présentatrice d'antigène telles que la cellule dendritique, le macrophage ou encore certains lymphocytes B (O'Hagan et Valiante, 2003) (**Figure 32**).



**Figure 32 : Activation des lymphocytes T.** les lymphocytes T sont activés par présentation d'un antigène, via les complexe majeurs d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques (CD), au récepteur TCR des lymphocytes T. Ce signal n'est pas suffisant pour l'activation des lymphocytes, des signaux de costimulation médiés par l'intération des CD40, CD80/86 des cellules présentatrices d'antigènes avec les CD40L et CD28 respectivement, des lymphocytes T sont nécessaires à l'activation. D'après O'Hagan et Valiante, 2003.

Cette activation entraîne une réponse cellulaire caractérisée par une cytotoxicité induite par les LT possédant le marqueur CD8+ appelés lymphocytes T cytotoxiques ou une régulation assurée par les LT possédant le marqueur CD4+ appelés lymphocytes T auxiliaires ou helper (lymphocytes Th). Selon le contexte antigénique et cytokinique, les LTh se divisent plusieurs en sous-populations, Th1, Th2, Th17 et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Chaque sous-population intervient dans un type d'agression donnée et présente un profil de sécrétion cytokinique particulier (Luckheerman *et al.*, 2012) (**Figure 33**).



**Figure 33 : Différenciation des lymphocytes T CD4+.** Après présentation d'un antigène via les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe II, les lymphocytes T CD4+ naïfs sont activés. Ils sécrètent alors d'IL-2 et expriment à leur surface les récepteurs à l'IL-2 permettant le maintien de leur état activé, ainsi que leur expansion clonale. La différenciation des lymphocytes CD4+ dépend de la présence de certaines cytokines dans l'environnement du lymphocyte. Ainsi, la présence d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 permet une différenciation en lymphocyte T helper (Th) 1 (Th1). Les lymphocytes de la lignée CD4+, ainsi différenciés présentent des fonctions différentes. Ainsi les Th1 participent à la réponse cellulaire cytotoxique des lymphocytes T CD8 et sont impliqués dans la réponse aux agents infectieux intracellulaire. Les Th2 participent plutôt à la réponse humorale et la réponse à la présence d'agent pathogènes extracellulaire. Les Th17 sont impliqués dans des mécanismes d'inflammation, leur maintien favorise le développement de maladies auto-immunes. Enfin, les T régulateurs (Treg) régulent la réponse immunitaire en inhibant l'action des autres lymphocytes T. D'après Luckheerman et al., 2012.

Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire et plus particulièrement dans la réponse antivirale et antibactérienne. Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-2 et à activer différentes cellules cytotoxiques comme les lymphocytes T CD8+, les cellules NK ou les macrophages. Dans des cas d'infections chroniques, les lymphocytes Th1 peuvent être à l'origine de lésions immunopathologiques tissulaires. Ils peuvent aussi participer à des réactions d'auto-immunité (Luckheerman *et al.*, 2012).

Les lymphocytes Th2 sont impliqués dans la réponse humorale et notamment dans la réponse à une infection aux parasites extracellulaires *via* la production d'IL-5, favorisant l'activation des lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps IgE. Les lymphocytes Th2 sécrètent également de l'IL-4, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 et sont souvent associés à une réponse allergique (Luckheerman *et al.*, 2012). Il existe une balance entre l'orientation des lymphocytes Th1 et des lymphocytes Th2. En effet, l'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes Th1 inhibe la production de l'IL-4 par les lymphocytes Th2 et réciproquement.

Les lymphocytes Th17 de découverte plus récente, sont caractérisés par la sécrétion d'IL-17, une cytokine fortement pro-inflammatoire, d'IL21 et d'IL-22. Ce sous-type de lymphocytes Th, a été impliqué dans la réponse aux infections bactériennes extracellulaires et aux infections fongiques. Ils sont présents entre autre au niveau des barrières de l'organisme comme la peau, les poumons et le tractus intestinal (Weaver *et al.*, 2013). Ils permettent le recrutement et l'activation de polynucléaires neutrophiles. Comme les lymphocytes Th2, les lymphocytes Th17 sont associés à des maladies de types auto-immunes et inflammatoires.

Les lymphocytes Treg sont caractérisés par un cluster de différenciation CD25 et l'expression de *Foxp3*. Ils sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et la régulation de l'auto-tolérance en prévenant les réactions d'auto-immunité et d'allergie (Kim *et al.*, 2007). Ils participent entre autre à la régulation négative des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes NK notamment *via* la production d'IL-10, une cytokine immunosuppressive.

### 3.4. Les composants moléculaires du système immunitaire

Les cellules immunitaires en sécrétant de nombreuses molécules peuvent exercer leurs fonctions. Parmi ces molécules, les Igs, synthétisées par les plasmocytes se fixent de façon spécifique sur un antigène cible pour former un complexe immun éliminé par phagocytose. Les Igs sont des glycoprotéines composées de deux chaînes polypeptidiques lourdes et deux chaînes légères reliées entre elles par des ponts disulfures. Ces glycoprotéines sont caractérisées par un fragment constant au niveau des chaînes lourdes et de deux fragments variables. Il existe différents types d'Igs, classées selon la séquence de leur domaine constant en Igs G, A, M, E ou D. Les fonctions principales des Igs sont la neutralisation des agents pathogènes et l'activation du complément. Les protéines du complément sont capables de se fixer sur l'antigène et par chimiotactisme et opsonisation d'induire sa phagocytose. A côté des Igs, les cytokines permettent une communication entre les cellules du système immunitaire. Ce sont des glycoprotéines synthétisées par différents types cellulaires, afin de recruter les cellules adéquates au niveau des foyers inflammatoires, afin d'éliminer les agents pathogènes ou corps étrangers responsables de l'inflammation. Les cytokines présentes des propriétés de pléiotropie et de redondance, permettant ainsi d'exercer des effets variés et plusieurs fonctions dans différents types cellulaires. Les molécules du complément, faisant partie de l'immunité innée, permettent la reconnaissance et l'opsonisation des pathogènes par les cellules phagocytaires. Enfin, parmi les composants moléculaires du système immunitaire se trouvent les molécules d'adhésion de types sélécines et intégrines, participant aux mécanismes de migration des leucocytes à travers les endothéliums vasculaires, permettant ainsi le recrutement des cellules immunitaires au niveau des foyers inflammatoires (Yatim et Lakkis, 2015).

Les barrières de l'organisme comme la peau, les poumons, l'intestin, les muqueuses orale et génitale et les yeux sont des zones critiques au maintien de l'intégrité de l'hôte. Ces barrières doivent perpétuellement discriminer les agents du « soi » et du « non soi » comme les agents biologiques ou les agents physiques ou chimiques, comme les contaminants environnementaux.

### 3.5. L'immunotoxicologie

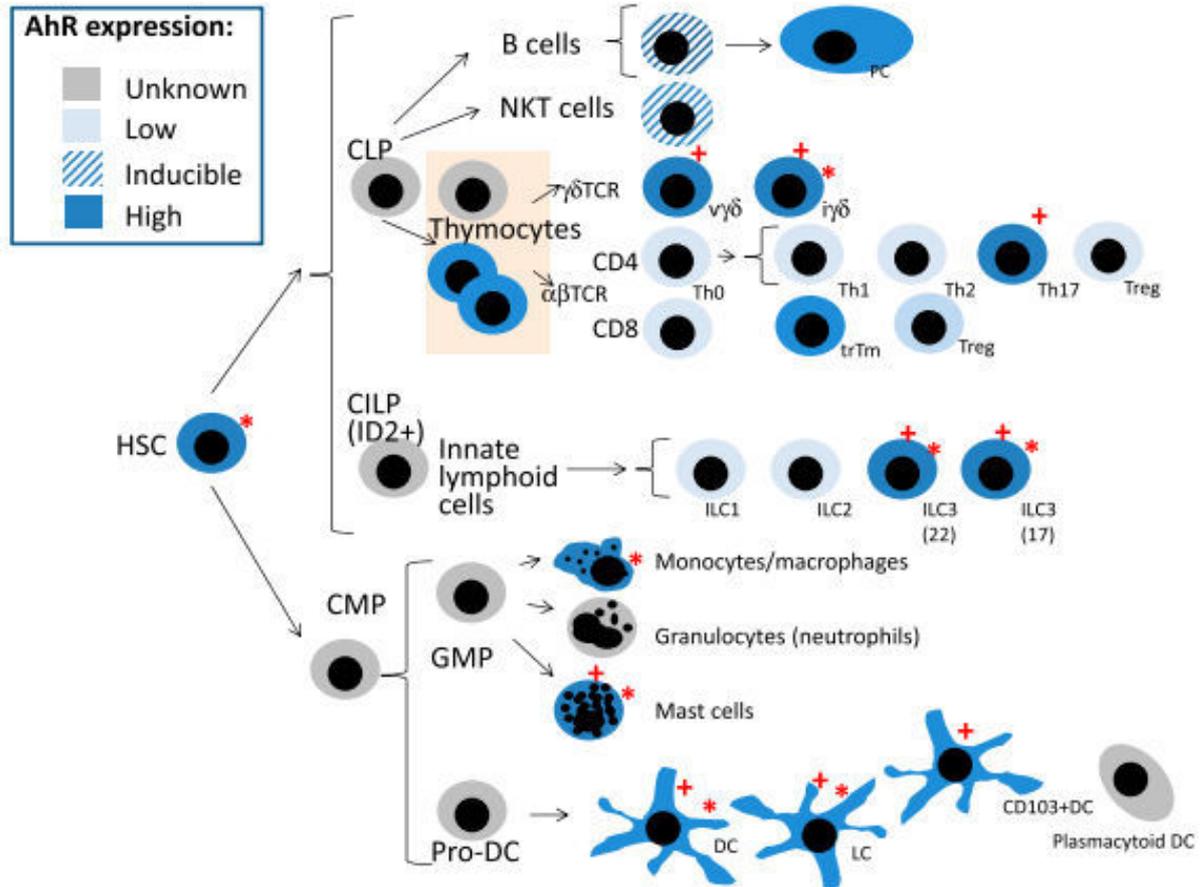
L'immunotoxicologie étudie les interférences entre les xénobiotiques et le système immunitaire, ainsi que leurs conséquences. En immunotoxicologie, se trouvent quatre réactions distinctes : l'immunosuppression, l'immunostimulation, l'hypersensibilité, ainsi que l'auto-immunité (Sparfel, 2016).

L'immunosuppression est définie par une inhibition du système immunitaire. Les conséquences cliniques d'une immunosuppression suite à l'exposition à des xénobiotiques sont une diminution de la résistance vis-à-vis des infections, observée notamment quand le déficit immunitaire touche l'immunité adaptative, et l'augmentation de lymphomes et cancers induits par des virus. L'augmentation de lymphomes est une conséquence classique de l'immunosuppression (Vial et Descotes, 2003), et des augmentations de lymphomes ont été constatées dans des populations vivant en zones rurales exposées à des pesticides (Vial *et al.*, 1996). L'immunostimulation est définie par une augmentation de la réponse immune, notamment par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, ou le TNF- $\alpha$ . Les conséquences cliniques de ces immunomodulation sont principalement des réactions pseudo-grippales associées à la sécrétion de facteurs pyrogènes, comme la prostaglandine E2, suite à un syndrome aigu de relargage des cytokines. Une augmentation de la fréquence des maladies auto-immunes peut aussi être observée. Elle a par exemple été décrite dans des populations exposées à des xénobiotiques comme les métaux lourds (Powell *et al.*, 1999). L'hypersensibilité est définie comme une réaction immunitaire exacerbée et inappropriée, lors l'exposition à des substances étrangères. Il existe quatre classes d'hypersensibilité : immédiate, cytotoxique, semi-retardée et retardée. Les conséquences cliniques de ces réactions peuvent alors être l'anaphylaxie ou encore diverses manifestations au niveau cutanée (urticaires, eczéma de contact...), hématologique (anémie hémolytique, agranulocytose...), respiratoire (asthme...), hépatique (hépatites immuno-allergiques...) ou rénale (glomérulonéphrites, néphrites immuno-allergiques...). L'auto-immunité se définit comme une réponse immunitaire contre les composants normaux du « soi », principalement due à une rupture de la tolérance du « soi » ou une modification d'auto-antigènes par fixation de métabolites réactifs, conduisant à l'activation des lymphocytes B et T reconnaissant les constituants du « soi » et responsables de lésions cellulaires et tissulaires. Les conséquences cliniques sont des réactions généralisées à tout l'organisme ou spécifique d'un organe.

### 3.6. Le RAh dans l'immunologie

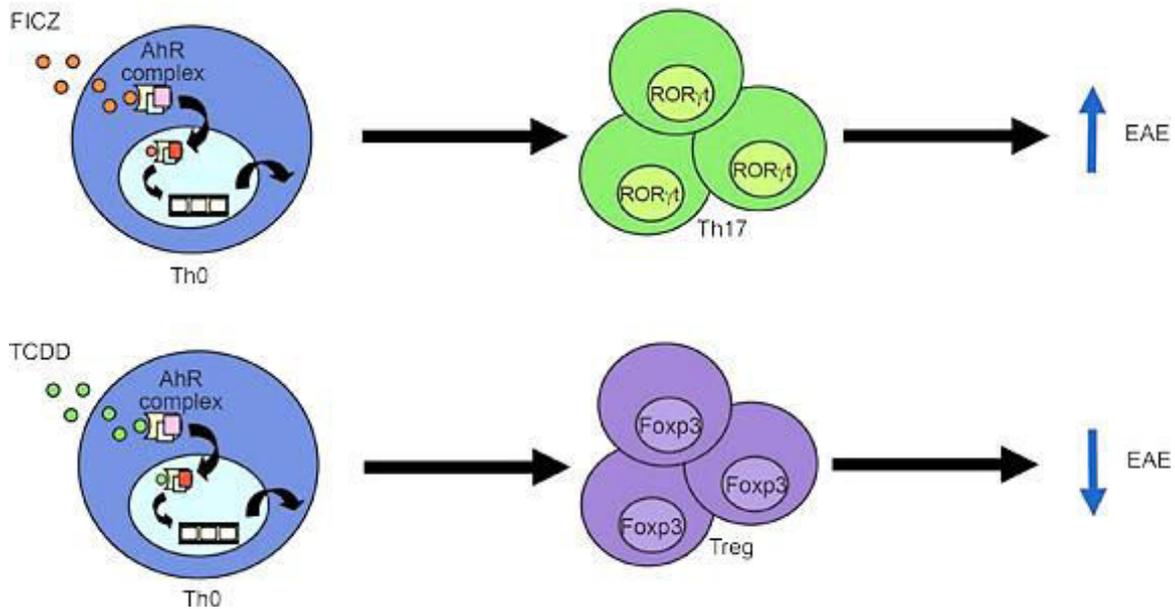
Les récepteurs de la famille  $\beta$ HHLH-PAS dont fait partie le RAh sont connus pour réguler les communications entre l'hôte et l'environnement afin de promouvoir une réponse permettant l'adaptation à l'environnement (Kewley *et al.*, 2004 ; Gu *et al.*, 2000). Le RAh est exprimé de façon différentielle dans les différents tissus de l'organisme. Ainsi, chez la souris et chez l'homme, le RAh n'est peu ou pas exprimé dans des tissus comme les muscles, les testicules, les reins, et le cerveau. À l'inverse, une forte expression constitutive du RAh est retrouvée dans le foie et les tissus formant les barrières de l'organisme comme la peau, les poumons, l'intestin, et les épithéliums constituant les muqueuses, ainsi que le placenta (Esser et Rannug, 2015). L'absence de RAh ou sa dérégulation par des xénobiotiques ont des effets importants sur le développement et les fonctions des cellules constituant les barrières de l'organisme. La peau représente une des premières barrières de l'organisme et est soumise à de nombreux stress comme la déshydratation, les UV, les agressions chimiques ou physiques ainsi que les infections. L'activation constitutive du RAh dans des kératinocytes de souris entraîne une inflammation de la peau (Tauchi *et al.*, 2005). De plus, une exposition cutanée à des ligands du RAh entraîne une dégranulation et la production de cytokines par les mastocytes résidents (Sibilano *et al.*, 2012).

Au niveau des cellules du système immunitaire il existe de grandes variations quant aux niveaux d'expression du RAh. Ainsi, les niveaux d'expression sont élevés dans les lymphocytes Th17, et à l'inverse les niveaux d'expression sont faibles dans les lymphocytes T naïfs, les lymphocytes T helpers Th1 et Th2, ainsi que dans les lymphocytes T régulateurs (Veldhoen *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2009). Les cellules NK expriment le RAh de façon modérée, et l'activation du RAh dans des NK de souris infectée par *Toxoplasma gondii*, entraîne une stimulation de l'activité anti-tumorale des NK, ainsi qu'une résistance aux infections (Wagage *et al.*, 2014). Les niveaux du RAh dans différentes cellules du système immunitaire sont présentés dans la **figure 34**. Chez des souris invalidées pour le RAh, la maturation des cellules de Langerhans, ainsi que leur capacité à présenter des antigènes aux lymphocytes T sont altérées, suggérant l'importance du RAh dans ces fonctions immunitaires (Jux *et al.*, 2009).



**Figure 34 : Expression du RAh dans différentes cellules du système immunitaire.**  
*Esser et Rannug, 2015.*

Le RAh joue un rôle dans la réponse immune. Les souris invalidées pour le RAh présentent une diminution de la résistance à certains agents infectieux comme *Helicobacter hepaticus*, mais aussi une diminution du nombre de lymphocytes T au niveau de la rate (Fernandez-Salguero *et al.*, 1997). De plus, l'orientation de la différenciation des lymphocytes Th0 vers une forme Th17 ou Treg est apparue dépendante des ligands du RAh. Ainsi, l'exposition de lymphocytes Th0 au ligand endogène fort, FICZ, favorise la différenciation vers une forme Th17, tandis qu'une exposition à la TCDD, un ligand exogène fort, favorise plutôt la différenciation de la forme Treg (**Figure 35**) (Veldhoen *et al.*, 2008 ; Quintana *et al.*, 2008; Stockinger *et al.*, 2009 ; Esser *et al.*, 2009).



**Figure 35 : Dichotomie du RAh.** L'exposition de lymphocytes Th0 non différencié à du FICZ, un ligand endogène du RAh, permet l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t favorisant la différenciation de ces lymphocytes en lymphocytes T helper 17 (Th17). Ces lymphocytes ainsi différenciés accentuent, chez l'animal, l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). A l'inverse, l'exposition de lymphocytes Th0 à de la TCDD un ligand exogène fort du RAh favorise la différenciation vers une forme lymphocyte T régulateur (Treg), caractérisé par une augmentation du marqueur FOXP3 (forkhead box P3). Ces lymphocytes ainsi différenciés diminuent la EAE. Ho et Steinman, 2008.

## 3.7. Les effets immunotoxiques des HAPs

### 3.7.1. Effets immunosuppresseurs des HAPs

De nombreuses études rapportent les effets immunosuppresseurs observés après exposition à des HAPs. Ces effets immunosuppresseurs peuvent survenir à différents niveaux de l'immunité.

Au niveau de l'immunité innée, il a été rapporté une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages *in vivo* chez la souris exposée au 3-MC à faible dose (Tewari *et al.*, 1979). *In vivo*, Le 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracène (DMBA) donnée par voie orale à des souris B6C3F1 entraîne une immunosuppression *via* une suppression de l'immunité innée (Ward *et al.*, 1984 ; Dean et Thurmond, 1987). Le B[*a*]P est capable de diminuer la capacité de présentation de l'antigène des macrophages (Myers *et al.*, 1987), ainsi que l'interaction entre les macrophages et les LT accentuant l'incapacité des macrophages à activer les LT (Myers *et al.*, 1988). *In vitro* il a été montré une inhibition par le B[*a*]P, de la différenciation des monocytes humain issus du sang périphérique, en cellules dendritiques ou en macrophages (Laupeze *et al.*, 2002 ; Van Grevenynghe *et al.*, 2003).

Au niveau de l'immunité adaptative humorale, le DMBA et le 3-MC sont capables d'inhiber la synthèse d'anticorps en réponse à des antigènes (Davila *et al.*, 1995). De plus, il a été rapporté une diminution des taux sériques d'IgG et d'IgA chez des travailleurs exposés à des mélanges d'HAPs contenant du B[*a*]P (Szczeklik *et al.*, 1994). En revanche, le B[*e*]P, un HAP non cancérigène, n'inhibe pas la production d'anticorps *in vitro* dans les splénocytes de souris (White et Holsapple, 1984). De plus, il a été rapporté une destruction par apoptose, induite par le DMBA et médiée par le RAh, des cellules pré-B de la moelle osseuse de souris (Yamaguchi *et al.*, 1997). Au niveau de l'immunité adaptative cellulaire, certains HAPs comme le DMBA ou le benzo(*k*)fluoranthène (B[*k*]F), sont capables de conduire à une atrophie thymique conduisant à une déplétion en lymphocytes T chez des souris exposées à ces HAPs. De plus il a été montré une diminution de la capacité de prolifération des LT après une exposition au benzo[*k*]fluoranthène (Jeon *et al.*, 2005). Au niveau de l'immunité adaptative humorale, le B[*a*]P est capable d'inhiber la production de certains anticorps *in vivo* et *in vitro* dans

des modèles de souris (Ladics *et al.*, 1992 ; White *et al.*, 1984). Il a été rapporté une induction de l'apoptose de cellules pré-B de la moelle osseuse de souris en présence d'HAP (Mann *et al.*, 1999).

D'autres voies semblent impliquées dans les effets immunosuppresseurs des HAPs, notamment celle du calcium intracellulaire ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Les HAPs capables d'induire une réponse immunosuppressive forte, comme le B[a]P ou le DMBA, sont aussi capables d'entraîner une augmentation rapide et persistante des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Krieger *et al.*, 1994). A l'inverse, le B[e]P, possédant un effet immunosuppresseur moins important, n'entraîne une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire que transitoire (Krieger *et al.*, 1994). Ces effets peuvent s'expliquer par l'activation de la protéine tyrosine kinase src qui conduit à l'activation de la voie PLC/IP3 et au relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans la cellule (Archuleta *et al.*, 1993), ou par l'inhibition des protéines sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases impliquées dans la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire au niveau des compartiments de stockage du calcium (Krieger *et al.*, 1995).

De façon intéressante, il existe un lien entre le caractère cancérigène d'un HAP, ainsi que sa capacité à activer le RAh, et sa toxicité vis-à-vis du système immunitaire. Ainsi, les principaux HAPs immunosuppresseurs, comme le B[a]P et le 3-MC, présentant une forte capacité d'activation du RAh sont associés à un fort potentiel cancérigène. De façon opposé, les HAPs présentant le moins de caractère cancérigène, comme le B[e]P, présente moins d'effets immunosuppresseurs et une faible affinité pour le RAh (Blanton *et al.*, 1986). De plus, l' $\alpha$ -naphthoflavone, un antagoniste du RAh, est capable d'inhiber les effets immunotoxiques induits par le B[a]P (Van Grevenynghe *et al.*, 2003). La mise en place de tests d'immunosuppression pour rendre compte des variations des effets génotoxiques de HAPs en mélange a d'ailleurs été suggérée (Zaccaria et McClure, 2013).

Enfin, il a été constaté une corrélation entre une diminution de la résistance aux agents infectieux ainsi qu'aux cellules tumorales transplantées dans des modèles animaux avec l'immunosuppression induite par le B[a]P (Ward *et al.*, 1984 ; Dean *et al.*, 1986). Ces effets immunosuppresseurs peuvent participer indirectement au caractère cancérigène des HAPs en inhibant le système immunitaire, et notamment les cellules lymphocytes T

cytotoxiques et des lymphocytes T NK impliqués dans la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses et en facilitant l'échappement tumoral.

### 3.7.2. Effets inflammatoires des HAPs

Les HAPs ont largement été impliqués dans la survenue de processus inflammatoires dans différents tissus.

*In vitro*, dans des macrophages humains, il a été montré qu'une exposition au B[a]P entraînait la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Podechard *et al.*, 2008). De même, une étude réalisée sur des kératinocytes humains a montré qu'une exposition au B[a]P entraînait la production d'IL-8 (Tsuji *et al.*, 2011). De plus, une étude réalisée chez des souris, exposées à de faibles doses de B[a]P pendant 6 semaines par voie intratrachéale, a montré une aggravation de l'inflammation due à une allergie au niveau des voies respiratoires caractérisée par une augmentation de la différenciation des LT en LTh2 (Yanagisawa *et al.*, 2016). En parallèle le B[a]P est capable d'inhiber la sécrétion de cytokine immunosuppressive induite par le lipopolysaccharide comme l'IL-10, favorisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoire comme l'IL-1 $\beta$  (Pacheco *et al.*, 2001).

*In vivo*, chez le rat, une étude a montré que la fumée de cigarettes était capable d'induire une inflammation pulmonaire (Friedrich *et al.*, 2006). Chez l'homme une exposition à la fumée de cigarette a été associée à l'augmentation du risque de développer des maladies inflammatoires pulmonaires comme l'asthme, l'emphysème ou une bronchopneumopathie chronique obstructive (He *et al.*, 2012 ; Oberg *et al.*, 2011). Une étude réalisée dans un espace de travail fermé montre que la fumée de cigarette augmente les niveaux de HAPs dans l'air et les niveaux de protéines inflammatoires dans le sang des non-fumeurs (Pacheco *et al.*, 2013).

Plusieurs voies, dont celle du RAh, du calcium intracellulaire, des MAPK semblent impliquées dans les effets pro inflammatoires des HAPs. En effet, l'inhibition de la voie du RAh par des inhibiteurs chimiques ou des siRNA permet d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires (N'Diaye *et al.*, 2006 ; Podechard *et al.*, 2008, Pacheco *et al.*, 2001) de même, l'inhibition de la voie du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire par un chélateur du calcium (Bapta) inhibe l'induction de cytokines pro-inflammatoires dans des macrophages humains (N'Diaye *et al.*, 2006). La voie ERK peut aussi participer à l'induction de l'inflammation due aux HAPs. Il a été montré dans des macrophages

humains exposés à de la TCDD ou du B[a]P que l'expression induite de TNF- $\alpha$  était due à la voie ERK, *via* l'activation de ERK1/2 (Lecureur *et al.*, 2005). La voie p38 MAP Kinase semble impliqué dans la réponse inflammatoire causée par les HAPs et a été suggérée comme cible médicamenteuse dans le traitement de la bronchopneumopathie chronique obstructive (Chung, 2011). De plus, son inhibition conduit à une diminution des niveaux de Cox-2 et d'IL-6 connus pour être des médiateurs inflammatoires, ainsi qu'à la diminution des métalloprotéinases matricielles (Osgood *et al.*, 2017).

Ces effets immunosuppresseurs des HAPs varient toutefois entre les modèles d'études, ainsi une différence dans l'immunotoxicité du B[a]P a été constatée entre des culture primaire humaines de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), et des splénocytes murins, avec une plus grande immunotoxicité dans les cellules humaines (Mudzinski, 1993 ; Davila *et al.*, 1996).

## II – Cadre et buts du travail

Les HAPs représentent une classe majeure de contaminants retrouvés de façon ubiquitaire dans l'environnement. Une exposition à ces polluants a été associée au développement d'effets toxiques sur la santé humaine, parmi lesquels, des effets cancérigènes, des effets immunosuppresseurs et/ou des effets inflammatoires. Selon le contexte, ces effets peuvent contribuer au développement de nombreuses pathologies telles que des cancers ou des maladies respiratoires (asthme, emphysème, broncho-pneumopathie chronique obstructive). Cette toxicité a été en grande partie liée à l'activation du RAh par les HAPs. Au laboratoire, des travaux antérieurs à mon arrivée ont montré qu'une activation des lymphocytes T humains en culture primaire, par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 mimant la présentation d'un antigène, augmentait les niveaux d'expression génique et protéique du RAh (Prigent *et al.*, 2014), suggérant la capacité accrue de ce modèle à répondre à une exposition aux HAPs. Les lymphocytes T sont des cellules immunitaires représentant la majorité des cellules mononucléées du sang périphérique. Elles ont l'avantage d'être accessibles par simple ponction sanguine et sont présentes au niveau des barrières de l'organisme (peau, intestin, poumons), qui sont des points d'entrée, tant pour les agents biologiques capables d'entraîner leur activation, que pour les agents chimiques comme les HAPs. Les lymphocytes T représentent ainsi des cibles privilégiées pour l'étude des effets toxiques de ces polluants (1) du fait qu'ils expriment le RAh et les CYPs nécessaires à la bioactivation des HAPs, (2) de par leur répartition dans l'organisme et leurs fonctions clés dans la défense de l'hôte et (3) car ils contribuent à l'exacerbation de pathologies liées à l'exposition aux HAPs, telles que l'asthme. Par exemple, dans cette dernière pathologie, l'exposition des lymphocytes T a été associée au développement d'effets inflammatoires, caractérisés d'une part, par l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et d'autre part, par l'orientation des lymphocytes Th vers une forme lymphocytes Th2 favorisant les maladies allergiques (Yanagisawa *et al.*, 2016). L'exposition des lymphocytes T aux HAPs a surtout été associée au développement d'effets immunosuppresseurs tels qu'une déplétion lymphocytaire conduisant à l'atrophie thymique (Jeon *et al.*, 2005), qu'une diminution de leur activation (Myers *et al.*, 1987), et de leur prolifération (Wojdani et Alfred, 1984), ou encore une inhibition de la formation de lymphocytes T cytotoxiques (Selgrade *et al.*, 1988). Tous ces effets ont été documentés chez le rongeur et proposés comme facilitant le développement de tumeurs chez les animaux exposés (Dean *et al.*, 1993). Chez l'Homme, les effets de l'exposition aux HAPs et leurs conséquences lymphocytaires sont relativement peu documentés, seules deux études récentes rapportent

un lien entre une exposition à la fumée de cigarette (Morton *et al.*, 2014) ou aux HAPs provenant de poussières domestiques (DellaValle *et al.*, 2016), et la survenue de lymphomes à cellules T. Cependant, les mécanismes à l'origine de ces effets ne sont pas identifiés.

Compte tenu du fait, que le lymphocyte T humain en culture primaire et activé, représente un modèle approprié pour l'étude des effets toxiques des HAPs, les objectifs de mon travail de thèse ont été : (1) d'y caractériser les effets génotoxiques et mutagènes du chef de file, le B[a]P, (2) d'y étudier la modulation de ses effets en présence d'un autre HAPs (3) et d'y analyser la réponse génique à cet HAP, grâce à une approche transcriptomique pangénomique sans *a priori*. Ces différents points nous permettront d'identifier les cibles moléculaires lymphocytaires des HAPs et d'améliorer les connaissances sur leurs effets chez l'Homme dans ces cellules de l'immunité.

Notre première étude a eu pour but d'évaluer dans des lymphocytes T humains en culture primaire et activés, la génotoxicité et le caractère mutagène du B[a]P, cancérigène avéré (CIRC, 2010), seul ou en mélange binaire avec d'autres HAPs, classés par divers organismes de santé publique comme prioritaires du fait de leur toxicité ou de leur présence relative dans l'environnement. Les résultats de cette étude sont présentés dans la première partie et décrivent les effets génotoxiques du B[a]P, les voies de signalisation de réponse aux dommages activées et la capacité de cet HAP à induire des mutations dans ce modèle (Article 1). Cette première partie présente également les effets de mélanges binaires d'HAPs, toujours en présence de B[a]P, sur les effets génotoxiques préalablement décrits.

Notre seconde étude a cherché à analyser la signature génique d'une exposition au B[a]P dans notre modèle des lymphocytes T humains par la technique des puces à ADN pangénomiques. Les résultats de cette étude sont présentés dans la seconde partie (Article en rédaction) et décrivent les effets globaux du B[a]P sur le profil d'expression génique des lymphocytes T humains en culture primaire. Ils mettent en évidence les voies de signalisation et les fonctions biologiques régulées après exposition à ce contaminant.

### III – TRAVAUX DE RECHERCHE

**Benzo[*a*]pyrene-induced DNA damage  
associated with mutagenesis  
in primary human activated T lymphocytes**

Marie LIAMIN; Elisa BOUTET-ROBINET; Emilien JAMIN; Morgane FERNIER; Laure KHOURY; Benjamin KOPP; Eric LE FERREC; Julien VIGNARD; Marc AUDEBERT; Lydie SPARFEL

**Biochem Pharmacol. 2017 Aug 1;137:113-124. doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.025.**



# Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes



Marie Liamin<sup>a,b</sup>, Elisa Boutet-Robinet<sup>c</sup>, Emilien L. Jamin<sup>c</sup>, Morgane Fernier<sup>a,b</sup>, Laure Khoury<sup>c</sup>, Benjamin Kopp<sup>c</sup>, Eric Le Ferrec<sup>a,b</sup>, Julien Vignard<sup>c</sup>, Marc Audebert<sup>c</sup>, Lydie Sparfel<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET – INSERM UMR 1085), 35000 Rennes, France

<sup>b</sup> Université de Rennes 1, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, structure fédérative de recherche, Biosit UMS CNRS 3480/US INSERM 018, 35043 Rennes, France

<sup>c</sup> Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 March 2017

Accepted 24 April 2017

Available online 29 April 2017

### Chemical compounds studied in this article:

Benzo[a]pyrene (PubChem CID: 2336)

Alpha-naphthoflavone (PubChem CID: 11790)

2-Morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one (KU-55933) (PubChem CID: 5278396)

Dimethyl sulfoxide (PubChem CID: 679)

Potassium bromate (PubChem CID: 23673461)

23673461)

### Keywords:

Activated human T lymphocytes

Benzo[a]pyrene

DNA damage response

## ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as benzo[a]pyrene (B[a]P), are widely distributed environmental contaminants exerting toxic effects such as genotoxicity and carcinogenicity, mainly associated with aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation and the subsequent induction of cytochromes P-450 (CYP) 1-metabolizing enzymes. We previously reported an up-regulation of AhR expression and activity in primary cultures of human T lymphocyte by a physiological activation. Despite the suggested link between exposure to PAHs and the risk of lymphoma, the potential of activated human T lymphocytes to metabolize AhR exogenous ligands such as B[a]P and produce DNA damage has not been investigated. In the present study, we characterized the genotoxic response of primary activated T lymphocytes to B[a]P. We demonstrated that, following T lymphocyte activation, B[a]P treatment triggers a marked increase in CYP1 expression and activity generating, upon metabolic activation, DNA adducts and double-strand breaks (DSBs) after a 48-h treatment. At this time point, B[a]P also induces a DNA damage response with ataxia telangiectasia mutated kinase activation, thus producing a p53-dependent response and T lymphocyte survival. B[a]P activates DSB repair by mobilizing homologous recombination machinery but also induces gene mutations in activated human T lymphocytes which could consequently drive a cancer process. In conclusion, primary cultures of activated human T lymphocytes represent a good model for studying genotoxic effects of environmental contaminants such as PAHs, and predicting human health issues.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a major class of environmental contaminants to which humans are commonly exposed. They are formed by incomplete combustion of organic materials and are notably found in large amounts in diet, air pollution, cigarette smoke and some occupational atmospheres

[1]. PAHs exert various toxic effects towards human health, including carcinogenic and immunosuppressive effects, and contribute to smoking-related diseases [2]. Most of these effects have been linked to the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and subsequent transcription of AhR-regulated genes. Among PAHs, benzo[a]pyrene (B[a]P) is the most widely used model compound for studying the effects of carcinogenic PAHs. B[a]P is not only agonist for AhR, but also substrate for the induced xenobiotic metabolizing enzymes from the cytochromes P-450 (CYPs) 1 family [3]. CYP1 isoforms, metabolize B[a]P to epoxide derivatives that can covalently bind DNA to form DNA adducts; the predominant form results from addition of B[a]P diol epoxide (BPDE) to the N<sup>2</sup> exocyclic amino group of guanine to form a dG-N<sup>2</sup>-BPDE adduct [4]. DNA damage has been regarded as an important factor in chemical carcinogenesis, and DNA adducts derived from B[a]P are believed to be a critical event in tumour formation by producing

**Abbreviations:** AhR, aryl hydrocarbon receptor; AMC, 7-amino-4-methylcoumarin;  $\alpha$ -NF, alpha-naphthoflavone; ATM, ataxia telangiectasia mutated; B[a]P, benzo[a]pyrene; BPDE, B[a]P diol epoxide; CYPs, cytochromes P-450; DMSO, dimethyl sulfoxide; DDR, DNA damage response; DSBs, double-strand breaks; EROD, ethoxresorufin deethylase; FPG, formamido pyrimidine glycosylase; HR, homologous recombination; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons.

\* Corresponding author at: IRSET – INSERM UMR 1085, Université de Rennes 1, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France.

E-mail address: [lydie.sparfel@univ-rennes1.fr](mailto:lydie.sparfel@univ-rennes1.fr) (L. Sparfel).

mutations in critical genes such as the tumour suppressor p53 [5]. Thus, emphasis has been placed on the DNA-damaging properties of B[a]P, the only one PAH classified as carcinogenic to humans for lung, skin and bladder tumours by the International Agency of Research on Cancer [6]. In addition, B[a]P induces cancer development in lymphoid tissue and hematopoietic compartment in animals [7], and some epidemiological studies have suggested a potential role of B[a]P in the development of lymphomas in humans [8].

Human blood peripheral lymphocytes, in particular T lymphocytes, have been reported to possess CYP1A1 and 1B1-metabolizing systems [9], suggesting thus that it could be a useful model for studying the potential of PAHs such as B[a]P to be metabolized, bind DNA, and form different types of DNA adducts linked to the susceptibility seen in the induction of human cancers [10]. Whereas a significant association has been found between the level of BPDE-induced DNA adducts in T lymphocyte-enriched peripheral blood mononuclear cell cultures and risk for cancer [11], studies on the relationship between B[a]P metabolism and its DNA-damaging potential linked to cancer risk have provided equivocal results in these T lymphocytes-enriched cultures [12]. This is in part due to the observation that such cultured T lymphocytes are poor metabolizers of PAHs such as B[a]P, exhibiting significant CYP1-mediated activity only upon activation by mitogenic lectins such as phytohemagglutinin [13]. As compared with phytohemagglutinin promoting polyclonal T cell proliferation, T lymphocyte activation by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies represents a more physiologically relevant T cell stimulation [14], and we have recently reported that AhR is present and functional only in CD3/CD28-activated T lymphocytes and not in resting counterparts [15]. Altogether, these data suggest an increased ability of the activated T lymphocytes to metabolize AhR exogenous ligands such as B[a]P and then to produce DNA damage. The present study was designed to explore the genotoxic response to B[a]P in these primary CD3/CD28-activated human T lymphocytes, a relevant model to human health issues. We report that B[a]P, upon metabolic activation, generates dG-N<sup>2</sup>-BPDE adducts and DNA double-strand breaks (DSBs). In human T lymphocytes, this elicits a DNA damage response (DDR) via an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent pathway, supporting DNA repair and cell survival to B[a]P treatment but leading to gene mutations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

B[a]P, alpha-naphthoflavone ( $\alpha$ -NF), 2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one (KU-55933), dimethyl sulfoxide (DMSO), potassium bromate, DAPI, ethoxyresorufin, Asp-Glu-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (AMC), and agarose were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). SYBR Gold nucleic acid stain and carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE) were provided by Thermofischer Scientific (Braunschweig, Germany), whereas [<sup>3</sup>H]-methyl-thymidine was purchased from Amersham Biosciences (Buck, UK). Antibodies against CYP1B1, p21, RAD51 and Hsc70, and against CYP1A1 were supplied from Abcam (Paris, France), and Santa Cruz Technology (Heidelberg, Germany), respectively. Antibodies against p53, phospho-p53 (Ser15), phospho-CHK1 (Ser317) and phospho-CHK2 (Thr68) were obtained from Cell Signalling Technology (Saint Quentin, France), while anti-phospho-ATM (Ser1981) and anti-phospho-Histone H2AX (Ser139) were from Merck Millipore (Molsheim, France). The 53BP1 antibody was purchased from Novus Biological (Abingdon, UK).

### 2.2. Cell culture and treatment

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from blood donor buffy coats (written consent for the use of blood samples for the research protocol obtained according to the regulation for blood transfusion of the French blood organization Etablissement Français du Sang, Rennes (France)) by Ficoll (Thermofischer Scientific) gradient centrifugation. After separation of monocytes by a 1-h adhesion step, T lymphocytes were purified from nonadherent cells by negative selection using Dynabeads<sup>®</sup> Untouched<sup>™</sup> Human T Cells Kit (Thermofischer Scientific). T lymphocytes were cultured in RPMI medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 20 IU/mL penicillin, 20  $\mu$ g/mL streptomycin, and 10% deplemented fetal calf serum (Thermofischer Scientific), and stimulated with Dynabeads<sup>®</sup> T-Expander beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Thermofischer Scientific) as previously reported [15]. Chemicals were used as stock solutions in DMSO. The final concentration of DMSO in culture medium was always <0.2% v/v and control cultures received vehicle containing the same dose of DMSO as treated cultures.

### 2.3. RT-qPCR

Total RNA was isolated from T lymphocytes using the TRIzol method (Thermofischer Scientific) and then reverse-transcribed into cDNA using the RT Applied Biosystems kit (Foster City, CA, USA). qPCR assays were performed using gene-specific primers from Qiagen for CYP1A1, CYP1B1 and growth arrest and DNA damage inducible, alpha (gadd45A) (Courtaboeuf, France) or Eurogentec for the others (Seraing, Belgium) (Table 1). The amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to a 18S mRNA endogenous reference as previously described [15].

### 2.4. RT<sup>2</sup> profiler<sup>™</sup> PCR arrays

The Human DNA Repair RT2 Profiler<sup>™</sup> PCR Array was used to profile the expression of 84 key genes encoding the enzymes that repair damaged DNA according to the manufacturer's instructions (SABiosciences, Qiagen). For each condition, we pooled equal amounts of RNAs isolated from DMSO or B[a]P-treated cultures of T lymphocytes established from 9 blood donors. Pooling small samples of cells for array analysis is considered advantageous in situations where the level of biological variation could be high compared to technical variation on the array [16,17]. The amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software as reported for RT-qPCR. The expression levels of target genes were normalized relative to the expression of  $\beta$ 2 microglobulin as housekeeping gene and were given as fold change compared with control with vehicle.

**Table 1**  
Primer sequences for RT-qPCR.

Gene Symbol	Forward Sequence	Reverse Sequence
mdm2	GCACTGAATCTACAGGGACGC	ATCCTGATCCAACCAATCACC
CDKN1A	GGCAGACCAGCATGACAGATT	GGCGGCCAGGGTATGTA
BBC3	GACCTCAACGCACAGTACGA	GAGATTGTACAGGACCTCCA
PMAIP1	GGAGATGCCTGGGAAGAAG	CCTGAGTTGAGTAGCACACTCG
18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TTGGCAAATGCTTTCGCTC

### 2.5. Western blotting

Total cellular protein extracts were prepared by lysis of T lymphocytes as previously described [15]. Proteins were separated on a polyacrylamide gel and electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes (Merck Millipore). After blocking, membranes were incubated with antibodies and immunolabeled proteins were visualized by chemiluminescence using the LAS-3000 analyzer (Fujifilm). For protein loading evaluation, primary antibody against Hsc70 was used. Image processing was performed using MultiGauge software (Fujifilm).

### 2.6. CYP activities

Ethoxyresorufin deethylase (EROD) activity was used as a measurement of CYP1 activities [18]. Briefly, T lymphocytes were incubated in phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 5  $\mu$ M ethoxyresorufin and 1.5 mM salicyclamide and resorufin formation was monitored using a FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Excitation and emission wavelengths were 544 and 590 nm, and reaction rates were determined under linear conditions.

### 2.7. DNA adducts quantification

DNA was extracted from T lymphocytes, digested to deoxynucleosides and then dissolved in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 1/1 (v/v) prior to HPLC-MS/MS injection according to a protocol previously described [19].

### 2.8. Comet assays

The alkaline comet assay was used to detect strand breaks and alkali-labile sites as previously described [20]. T lymphocytes were embedded in 0.7% low melting point agarose and laid on CometAssay<sup>®</sup> HT Slide (Trevigen, Montlucon, France). Slides were then lysed (pH 10) for at least 1 h at 4 °C. A parallel digestion with formamido pyrimidine glycosylase (FPG), allowing the detection of oxidative damage, was performed as already described [21]. Electrophoresis was processed for 24 min at a pH > 13. Fifty cells per deposit and two deposits per sample were analyzed. After staining with SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain, slides were observed at 20x magnification using a LEICA DMIRB video microscope. Images were acquired with a CoolSnapHQ Princeton instrument camera and analyzed with the ImageJ open source software using the OpenComet plugin ([www.opencomet.org](http://www.opencomet.org)). The extent of DNA damage was evaluated for each cell through the measurement of intensity of all tail pixels divided by the total intensity of all pixels in head and tail of comet. The median from these 100 values was calculated, and named % tail DNA.

### 2.9. Caspase 3 activity measurement

Caspase 3 activity was measured using its fluorogenic peptide substrate Asp-Glu-Asp--AMC. Briefly, proteins (50  $\mu$ g) from T lymphocytes lysates were incubated with 80  $\mu$ M substrate in buffer assay (20 mM Pipes, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 10% sucrose, and 10 mM dithiothreitol). Caspase-mediated release of AMC was then monitored continuously over a 1-h period using an EnSpire Multimode 2300 Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA). Excitation and emission wavelengths were 380 and 460 nm.

### 2.10. Proliferation assay

T-cell proliferation was measured by [<sup>3</sup>H]-methyl-thymidine incorporation as previously described [15].

### 2.11. Cell division assay by flow cytometry

To determine cell division, T lymphocytes were labeled with 0.25  $\mu$ M CFSE and then treated with B[a]P. Cell division was next determined by analyzing CFSE dilution using a BD LSR Fortessa flow cytometer. Data are collected using FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA) and replicative index was calculated as the sum of the cells in all generations divided by the calculated number of original parent cells.

### 2.12. Immunofluorescence

T lymphocytes fixed on Polysine<sup>™</sup> slides (ThermoFisher Scientific) with 4% paraformaldehyde were stained with primary antibodies for 2 h and then incubated with secondary antibodies for 1 h as previously described [15]. For  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 and RAD51 staining, a triton-extraction step was performed before fixation. Nuclei were counterstained with 0.5  $\mu$ g/mL DAPI for 5 min. Slides were viewed using an automated microscope Leica DMRXA2. Images were analyzed with the ImageJ open source software ([www.imagej.nih.gov](http://www.imagej.nih.gov)). For phospho-ATM staining, each value represents the median fluorescence intensity of at least 50 nuclei evaluated. For  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 and RAD51 staining, cells were scored positive for foci formation when >5 foci/nuclei were detected for at least 100 cells evaluated.

### 2.13. Mutagenesis frequency determination by the Pig A assay

Ten days after treatment, T lymphocytes are stained on ice with an allophycocyanin-anti CD59 antibody (clone OV9A2, ThermoFisher Scientific), combined with an inactive variant of the fluorescent proaerolysin protein (Tebu-Bio France, Le Perray-en-Yvelines, France) [22]. These two biomarkers are specific for the glycosylphosphatidylinositol-linked proteins. To determine the Pig A mutant frequency, T lymphocytes were analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by DAPI staining, and cells doublets were discriminated and excluded by comparing Area and Height signals of Forward Scatter Parameters. Mutant frequencies were determined using a Miltenyi MACSQuant Analyzer flow cytometer (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and calculated as the number of glycosylphosphatidylinositol-negative cells divided by the number of total live cells analyzed.

### 2.14. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of the differences was assessed using GraphPad InStat (GraphPad software, INC., La Jolla, CA, USA) by paired Student's *t*-test, or analysis of variance followed by Dunnett or Student-Newman-Keuls post hoc tests. The criterion of significance was  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. B[a]P up-regulates CYP1 expression and activity in activated T lymphocytes

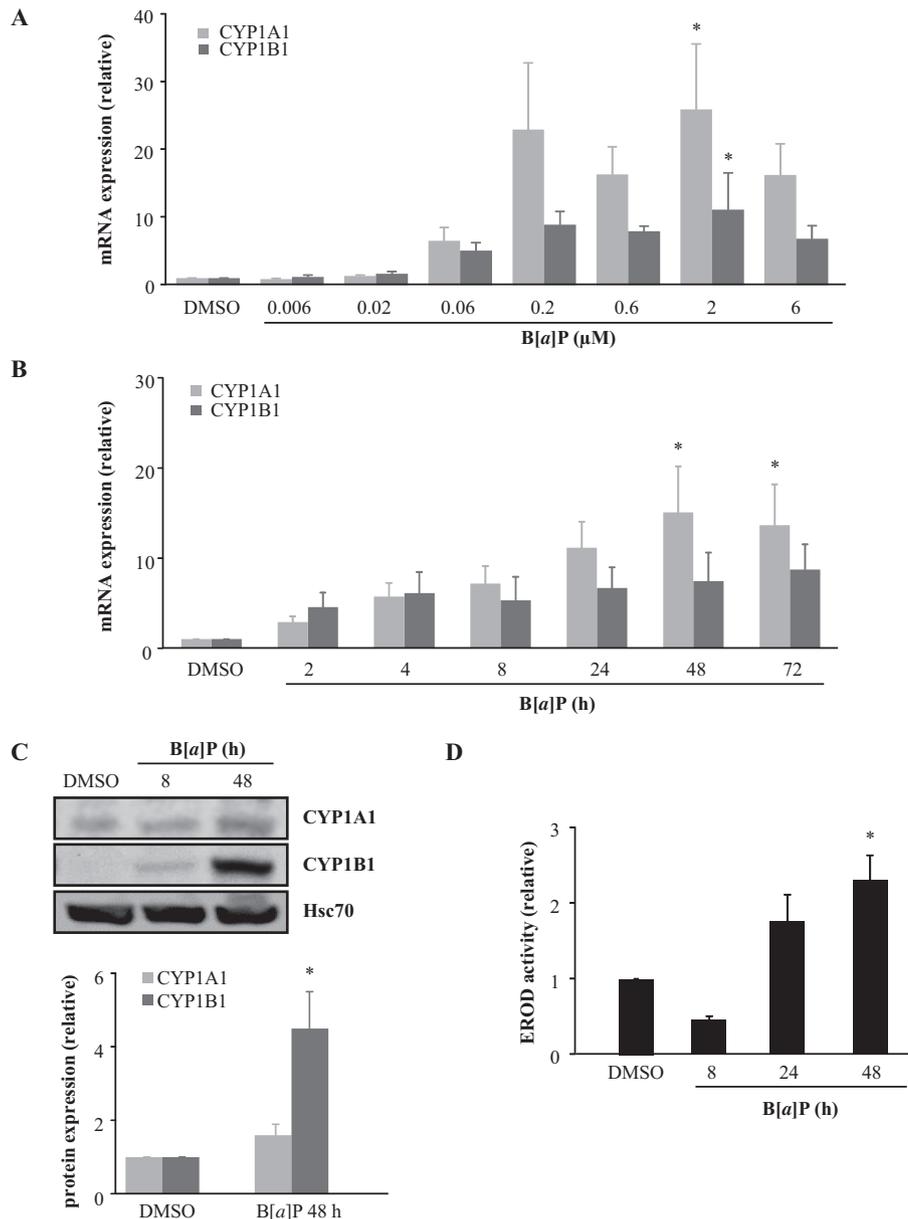
Many of the biological effects of PAHs are mediated through activation of AhR and the subsequent induction of CYP1-metabolizing enzymes [3]. We previously reported an early and functional up-regulation of the AhR by human T lymphocyte

activation [15]. In the present study, we assayed the response to B[a]P treatment in these T lymphocytes activated for 72 h. mRNA expression of two AhR target genes, CYP1A1 and 1B1, was first studied using RT-qPCR. As indicated in Fig. 1A and B, CYP1A1 and 1B1 mRNA levels were markedly increased in B[a]P-treated T lymphocytes when compared with their DMSO counterparts; a significant effect was detected for a treatment with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 48 h of culture (Fig. 1A). Such a 48-h treatment with 2  $\mu$ M B[a]P was also demonstrated to significantly over-express CYP1B1 protein as assessed by Western blotting; a more modest up-regulation of CYP1A1 was observed when compared with their DMSO counterparts (Fig. 1C). Next, to determine whether B[a]P had an effect on catalytic activities of CYP1-enzymes, CYP1-

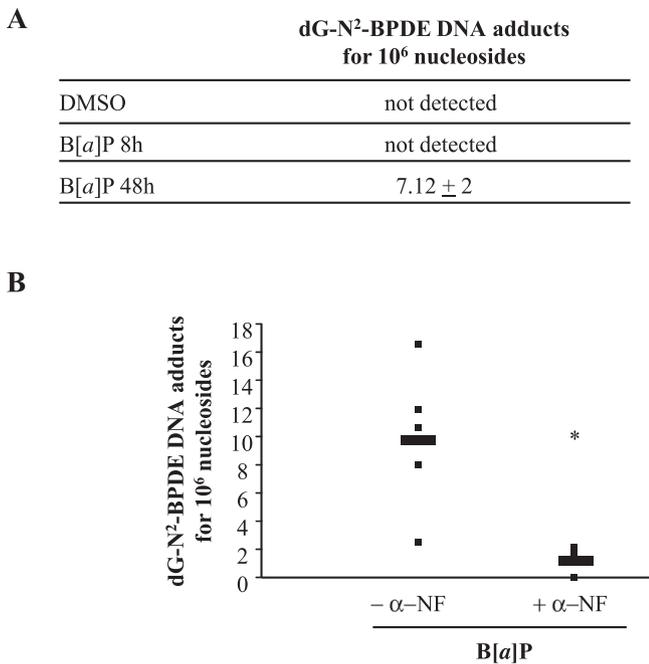
related EROD activity was quantified in T lymphocytes treated with 2  $\mu$ M B[a]P for 8, 24 and 48 h of culture. As indicated in Fig. 1D, B[a]P significantly increased CYP1-related EROD activity after a 48 h-treatment with 2  $\mu$ M B[a]P.

### 3.2. B[a]P forms dG-N<sup>2</sup>-BPDE adducts and DNA DSBs in activated T lymphocytes

To determine whether the induction of CYP1 enzyme activity resulted in an increased bioactivation of B[a]P to reactive metabolites, we quantified the level of dG-N<sup>2</sup>-BPDE using HPLC-MS/MS approach subsequently to DNA extraction and digestion. As illustrated in Fig. 2A, the formation of dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts only



**Fig. 1.** Induction of CYP1 expression and activity in response to B[a]P treatment in activated human T lymphocytes. T lymphocytes activated for 72 h were treated with vehicle (DMSO) or with various increasing B[a]P concentrations for the last 48 h of culture (A) and with 2  $\mu$ M B[a]P for various lengths of time (B, C, D). (A, B) CYP1A1 and CYP1B1 mRNA expression was analyzed using RT-qPCR. (C) CYP1A1 and CYP1B1 protein expression was analyzed by Western blotting. A representative blot is displayed on the upper panel. (D) Catalytic activity of CYP1 enzymes was evaluated by EROD assay. (A, B, C, D) Data are expressed relative to mRNA expression level (A, B), protein expression level (C) and EROD activity (D) in DMSO-treated T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of four (D), five (A, C) and six (B) independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors with triplicate per experiment (A, B, D). \*  $p < 0.05$  when compared with DMSO-treated T lymphocytes (analysis of variance followed by Dunnett's multirange test (A, B, D) and paired Student's *t* test (C)).



**Fig. 2.** Formation of dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts in response to B[a]P treatment in activated human T lymphocytes. T lymphocytes activated for 72 h were treated with vehicle (DMSO) or with 2 μM B[a]P for the last 8 and 48 h of culture (A) and pre-treated or not with 2 μM α-naphthoflavone (α-NF) before B[a]P treatment for the last 48 h of culture (B). dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts were quantified using HPLC/MS-MS approach. Data are expressed as dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts for 10<sup>6</sup> nucleosides, and are shown as mean ± SEM of eight (A) and five (B) independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors. *p* < 0.05 when compared with α-NF-untreated T lymphocytes (paired Student's *t* test).

occurred in T lymphocytes treated with 2 μM B[a]P for 48 h, corresponding to the significant induction of CYP1-related EROD activity (Fig. 1D). In addition, the CYP1 inhibitor α-NF which markedly decreased B[a]P-induced EROD activity (data not shown), significantly reduced the formation of dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts occurring in response to B[a]P (Fig. 2B). This indicated that such a treatment allowed not only the expression of functional CYP1 activity but also the formation of dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts. We then evaluated whether such a B[a]P activation was associated with DNA damage by using alkaline comet assays [23]. As shown in Fig. 3A, a 48 h-treatment of T lymphocytes with 2 μM of B[a]P significantly increased the % of tail DNA, indicating the presence of DNA damage. Interestingly, such effects were not due to apoptotic DNA fragmentation since treatment with 2 μM B[a]P for 48 h was not accompanied by any detectable increase in apoptosis as tested by an activated caspase-3 assay (Fig. 3B). Additionally, when the comet assay was combined with FPG enzyme, which allows the detection of oxidative damage [21], no increasing effect of B[a]P treatment was observed (Fig. 3C), whereas a significant increase in oxidative damage was detected after treatment with potassium bromate (Fig. 3D), as previously reported [24]. As for the dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts, α-NF significantly reduced the induction of DNA damage due to B[a]P (data not shown). Taken together, these results demonstrate that, once metabolized in T lymphocytes, B[a]P generates BPDE-DNA adducts and subsequently DNA damage without inducing apoptosis.

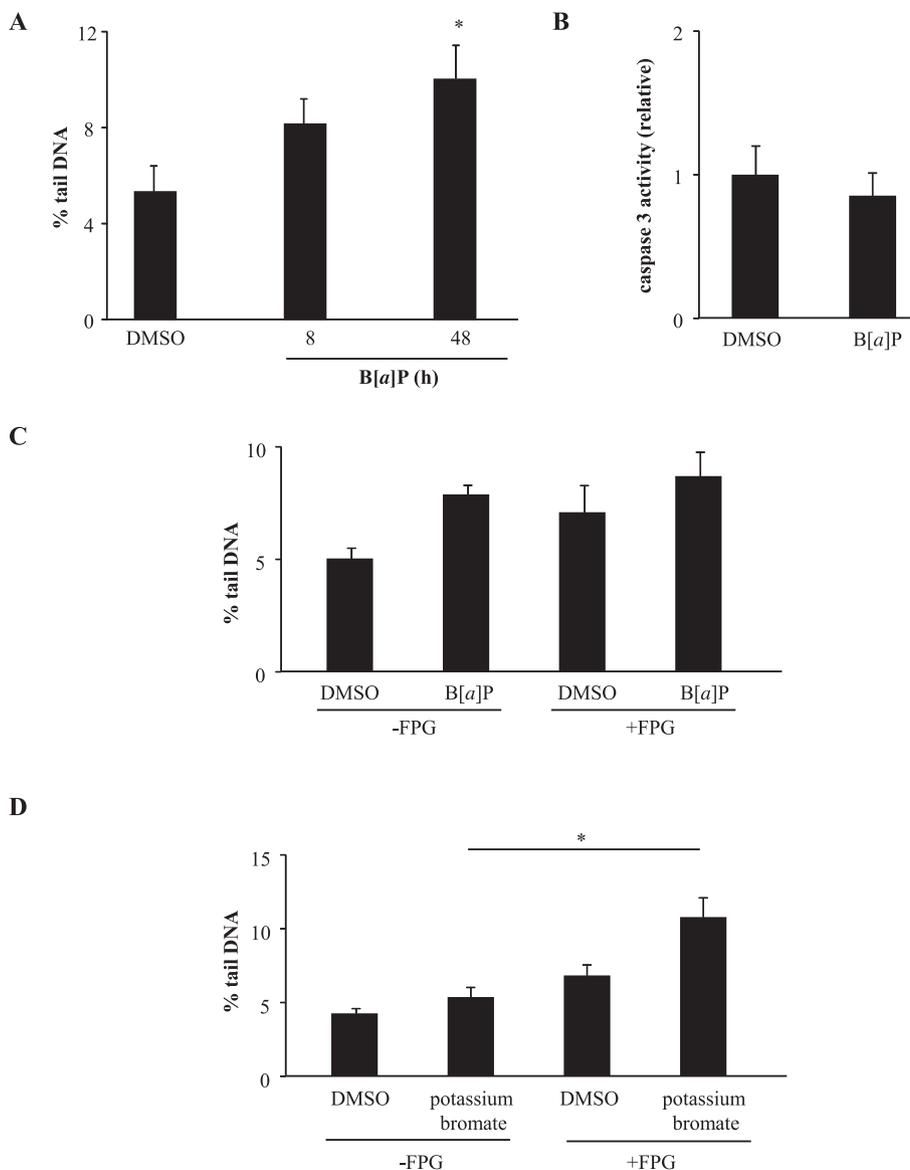
To examine in more detail the nature of the DNA damage, we first studied the phosphorylation of H2AX on Ser139, an H2A histone variant (called γ-H2AX once phosphorylated). γ-H2AX is considered as an early event after the introduction of strand breaks, forming distinct foci close to these breaks, that has been suggested as a specific marker for DNA DSBs [25,26]. In the present

study, the formation of γ-H2AX foci was analyzed by immunostaining after B[a]P treatment for 8 and 48 h, defining cells as positive if more than 5 foci/nuclei were detected (Fig. 4A). As shown in Fig. 4A, significant distinctive foci characteristic of DNA DSBs were detected after a 48-h treatment with B[a]P. To further validate the nature of the damage induced upon B[a]P treatment, we performed immunofluorescence staining to detect 53BP1 foci, a second marker of DNA DSBs [25,26]. Similarly, 53BP1-positive cells were significantly increased after B[a]P treatment for 48 h with a co-localization between γ-H2AX foci and 53BP1 foci (Fig. 4A). Interestingly, α-NF significantly counteracted the DNA DSB response induced upon B[a]P treatment for 48 h, as shown by the significant decrease of both γ-H2AX and 53BP1 foci (Fig. 4B and C).

### 3.3. B[a]P induces a DDR with ATM kinase activation thus inducing p53-dependent response and cell survival in activated T lymphocytes

We next characterized DDR signalling pathways in T lymphocytes treated with 2 μM B[a]P for 48 h. Since ATM kinase plays a critical role in the cellular response to DSB formation [25,26], we assessed its activation by examining levels of phosphorylated ATM at ser1981 (phospho-ATM) using Western blotting. As shown in Fig. 5A, we found that phospho-ATM was not only expressed in activated T lymphocytes as previously described [27], but it also significantly increased upon B[a]P treatment for 48 h. We also revealed increased nuclear localization of phospho-ATM by immunofluorescence (Fig. 5B), as well as a slight, but significant, increased phosphorylation of its primary substrate checkpoint kinase CHK2 on Thr68 (Fig. 5A). A more pronounced, but not significant, increase in the phosphorylation on ser317 of the effector kinase CHK1 was also observed after B[a]P treatment (Fig. 5A). To address in detail the role of ATM in the DDR, B[a]P treatment was conducted in the presence or absence of KU-55933, an inhibitor of ATM, and immunofluorescence staining to detect γ-H2AX foci was performed as classically reported [28]. Immunostaining of γ-H2AX foci indicated that KU-55933 completely abrogated the B[a]P-induced γ-H2AX foci (Fig. 5C), thus confirming ATM activation by B[a]P-induced DSBs. Based on the current model for p53 activation upon DNA damage after ATM activation [29], the phosphorylation of p53 at ser15 was also investigated. As shown in Fig. 5D, a treatment with 2 μM B[a]P for 48 h caused a marked but not significant increase in p53 phosphorylation. This increase was accompanied by significant elevations in mRNA expression of various pro-survival p53 downstream target genes such as the E3 ubiquitin protein-ligase mdm2 and the cycle-dependent kinase inhibitor 1A CDKN1A, after a 48-h treatment with B[a]P; gadd45A mRNA expression was also increased but failed to reach a significant level (Fig. 5E). Since KU-55933 is able to counteract both B[a]P-induced p53 phosphorylation and its transcriptional transactivation (Fig. 5E inset), this p53 activation also appears ATM-dependent.

Consistent with the CDKN1A mRNA up-regulation, protein levels for p21 were significantly increased after treatment with 2 μM B[a]P for 48 h (Fig. 6A), prompting us to analyze the effect of B[a]P on DNA replication [30]. As shown in Fig. 6B, incorporation of [<sup>3</sup>H]-methyl-thymidine monitored during the last 18 h of culture indicated a significant decrease in replicative DNA synthesis in B[a]P-treated T lymphocytes for 48 h. Parallel experiments using CFSE dilution demonstrated that such treatment significantly increased the % of non-dividing lymphocytes and decreased, without reaching a significant level, the % of lymphocytes with three or more divisions (Fig. 6C). A slight, but not statistically significant, increase in G2/M phase was also found after 48-h treatment with B[a]P (data not shown). Interestingly, there was no evidence of apoptosis at 48 h after treatment with 2 μM B[a]P as indicated by



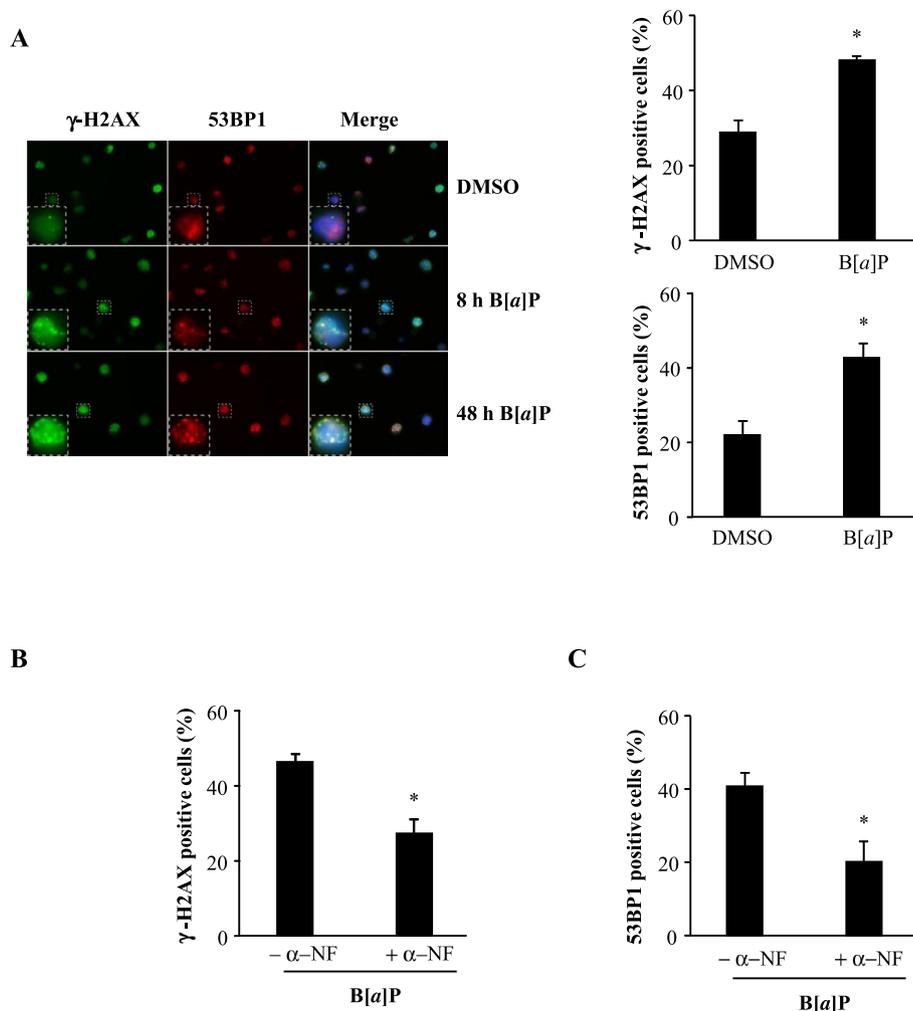
**Fig. 3.** Induction of DNA damage in response to B[a]P treatment in activated human T lymphocytes. T lymphocytes activated for 72 h were treated with vehicle (DMSO) or with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 8 (A) and 48 h of culture (A, B, C) and with 3 mM potassium bromate for the last 2 h of culture (D). (A, C, D) DNA damage was analyzed using alkaline comet assay (A) and FPG-modified alkaline comet assay (C, D). Data are expressed as % tail DNA and are shown as mean  $\pm$  SEM of six (A) and eight (C, D) independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors with duplicate per experiment. (B) Apoptotic effects were assayed by measuring caspase-3 activity. Data are expressed relative to the caspase-3 activity in DMSO-treated T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of seven independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors with duplicate per experiment. \*  $p < 0.05$  when compared with DMSO-treated T lymphocytes (analysis of variance followed by Dunnett's multirange test (A)) and with potassium bromate-treated T lymphocytes in absence of FPG (analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls's multirange test (D)).

caspase 3 assay (Fig. 3B) and mRNA levels of apoptosis-regulating genes such as BBC3 and PMAIP1 (Fig. 5E).

#### 3.4. B[a]P induces DSB repair pathways but leads to gene mutations in activated T lymphocytes

The well-documented link between DNA replication delay and activation of repair machinery [31] prompted us to examine the cellular repair of B[a]P-damaged DNA. We have first profiled a panel of 84 DNA repair genes using the RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR array on pools of RNAs isolated from DMSO or B[a]P-treated cultures of T lymphocytes established from 9 different blood donors. After a 24-h B[a]P treatment, we found 14 genes whose expression was shown to be regulated considering a cut-off of 1.5-fold

(Fig. 7A). Among these genes, five were associated with the nucleotide excision pathway, i.e. those encoding the DNA repair excision proteins ERCC6, ERCC4, ERCC3 and RAD23B, and the STE20 like kinase SLK. Five genes belong to the DSB repair functional group such as the breast cancer genes 1 and 2 BRCA1 and BRCA2, the DSB repair nuclease MRE11A and the BRCA1-interacting protein 1 BRIP1 for Homologous recombination (HR) and the X-ray repair cross complementing 5 XRCC5 for the non-homologous end-joining DNA repair system. To characterize repair events by homologous recombination previously reported to be involved in DSB repair [32], we next performed immunofluorescence staining to detect the recruitment of RAD51, a crucial recombinase protein involved in HR after treatment with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h. As shown in Fig. 7B, the number of RAD51-positive cells significantly



**Fig. 4.** Induction of DNA DSBs in response to B[a]P treatment in activated human T lymphocytes. T lymphocytes activated for 72 h were treated with vehicle (DMSO) or with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 8 (A) and 48 h of culture (A, B, C) and pre-treated or not with 2  $\mu$ M  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF) before B[a]P treatment for the last 48 h of culture (B, C). DNA DSBs were detected by  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 immunostaining and analyzed by fluorescence microscopy (magnification  $\times 63$ ). (A) Representative photographs of co-localization of  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 are displayed on the left panel. Data are expressed as % of T lymphocytes positive for  $\gamma$ -H2AX (A, B) and 53BP1 (A, C) foci formation when  $>5$  foci/nuclei were quantified and are shown as mean  $\pm$  SEM of four (A) and five (B, C) independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors. \* $p < 0.05$  when compared with DMSO-treated T lymphocytes (A) and with  $\alpha$ -NF-untreated T lymphocytes (B, C) (paired Student's *t* tests).

increased after B[a]P treatment with a co-localization between  $\gamma$ -H2AX foci and RAD51 foci (Fig. 7B), thus revealing the HR machinery mobilization.

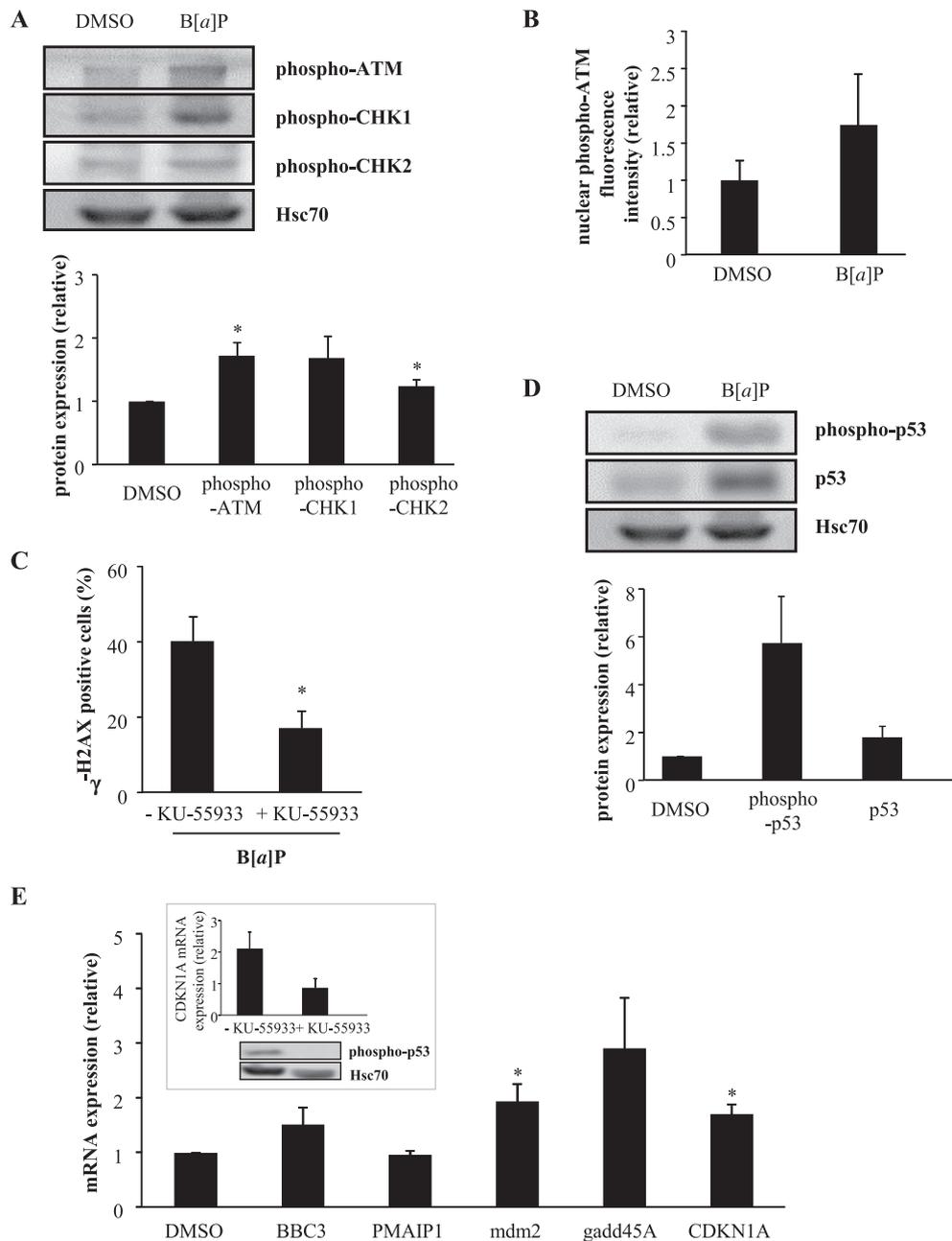
Ten days after B[a]P treatment for 48 h, T lymphocytes were isolated for Pig A mutagenesis analysis. As shown in Fig. 7C and despite an important inter-individual differences in B[a]P response, the Pig A mutant frequency was significantly increased in B[a]P-treated lymphocytes when compared with their DMSO counterparts.

#### 4. Discussion

PAHs are ubiquitous environmental contaminants exerting various toxic effects, mainly associated with AhR activation and the subsequent induction of CYP1-metabolizing enzymes [3]. Although several studies suggested a possible link between exposure to PAHs and the risk of T cell lymphoma [8], their exact role to the development of lymphoma remains unclear. Recently, we have reported an up-regulation of the AhR by the physiologically relevant T-cell stimulation approach by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in primary human lymphocytes [15]. Interestingly, this

up-regulation had functional consequences such as the induction of CYP1 expression and activity [15,33], thus suggesting their increased ability to metabolize AhR ligands and to produce consequent DNA damage. The aim of the present study was to characterize the genotoxic response produced by the prototypical PAH B[a]P, and to study the DDR elicited in these CD3/CD28-activated primary human T lymphocytes.

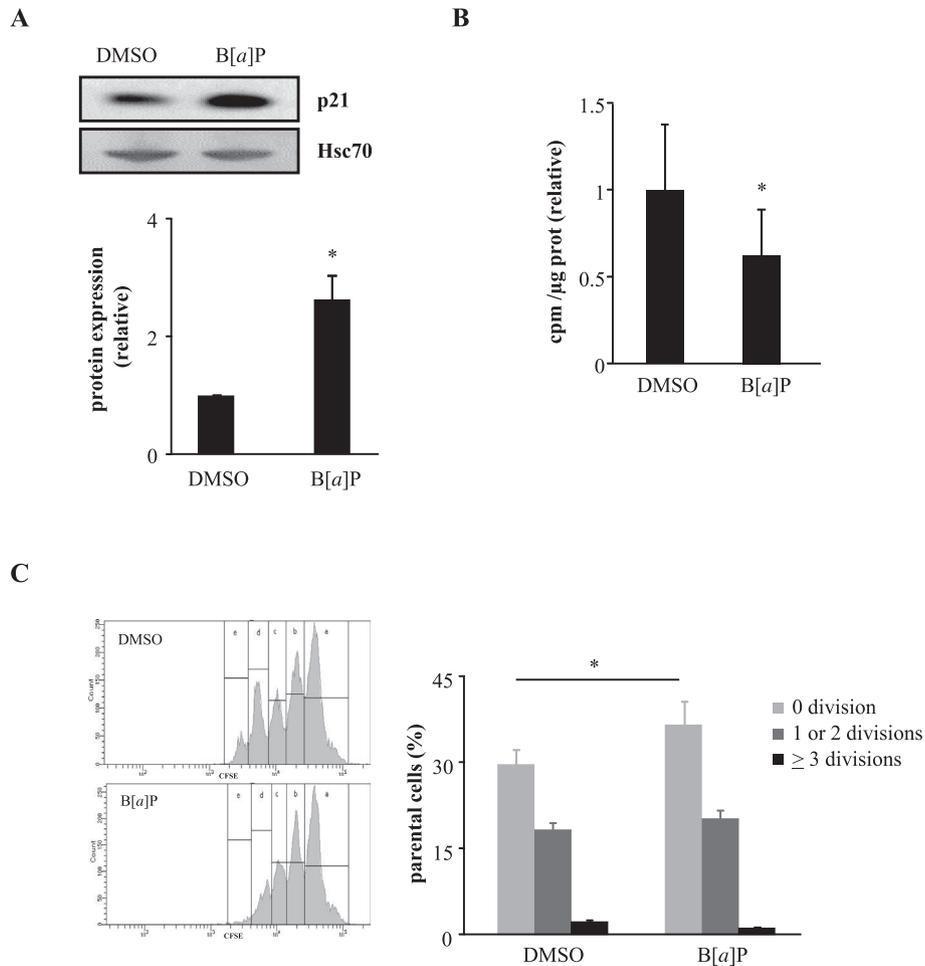
We have first reported that, following a 24-h CD3/CD28-mediated T lymphocyte activation inducing an AhR functional activation [15], a 48-h treatment with 2  $\mu$ M B[a]P increases both mRNA and protein expression of CYP1A1 and 1B1, associated with an increased CYP1 catalytic activation. This B[a]P-induced CYP1 activity leads to the formation of highly reactive metabolites as detected by quantifying dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts. dG-N<sup>2</sup>-BPDE DNA adducts have been already described in phytohemagglutinin-activated T lymphocytes but following a direct treatment with BPDE reactive metabolite [34]. Here, we demonstrated the sufficient ability of activated T lymphocytes to bioactivate and convert B[a]P into reactive metabolites after a 48-h treatment, mainly via its effects on CYP1 expression and activity as shown by using the CYP1 inhibitor  $\alpha$ -NF. Despite the more inducible CYP1A1 mRNA expression as previously reported



**Fig. 5.** Induction of a DDR with ATM kinase activation increasing p53 activity in response to B[a]P treatment in activated human T lymphocytes. T lymphocytes activated for 72 h were treated with vehicle (DMSO) or with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 48 h of culture (A, B, D, E) and pre-treated or not with 10  $\mu$ M KU-55933 before B[a]P treatment for the last 48 h of culture (C, E). (A, D) Expression of the phosphorylated forms of ATM (phospho-ATM), CHK1 (phospho-CHK1) and CHK2 (phospho-CHK2) (A) and of p53 (phospho-p53) and total p53 (p53) proteins (D) was analyzed by Western blotting. Representative blots are displayed on the upper panel. (B) Activation of ATM was detected by nuclear phospho-ATM immunostaining and analyzed by fluorescence microscopy (magnification  $\times 63$ ). Data are expressed relative to protein expression level (A, D) and to nuclear phospho-ATM fluorescence intensity (B) in DMSO-treated T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of four (A, phospho-ATM), five (A, phospho-CHK1 and phospho-CHK2, D) and eight (B) independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors. (C) DNA DSBs were detected by  $\gamma$ -H2AX immunostaining and analyzed by fluorescence microscopy (magnification  $\times 63$ ). Data are expressed as % of T lymphocytes positive for  $\gamma$ -H2AX foci formation when  $>5$  foci/nuclei were quantified and are shown as mean  $\pm$  SEM of six samples pooled from independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors. (E) mRNA expression of pro-apoptotic and pro-survival p53 target genes was analyzed using RT-qPCR. Data are expressed relative to mRNA expression level in DMSO-treated T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of seven independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors with triplicate per experiment. The inhibition by KU-55933 of B[a]P-induced p53 phosphorylation and of the subsequent induction of its transcriptional target gene CDKN1A by Western blotting and RT-qPCR analysis respectively are displayed in the inset.  $p < 0.05$  when compared with DMSO-treated T lymphocytes (A, E) and with KU-55933-untreated T lymphocytes (C) (paired Student's *t* tests).

in cultured human lymphocytes treated with AhR ligands [35] and because the levels of CYP1B1 protein increased greatly upon B[a]P treatment in activated T lymphocytes, the bioactivation of B[a]P proceeded probably via CYP1B1 induction in agreement with a very recent study [36]. CYP1B1 has been already reported to play a prominent part in the metabolic activation and genotoxic effects

of PAHs [37] and in Ah-related lymphomas [38]. By using the comet assay, we observed that 48 h after B[a]P treatment, T lymphocytes also exhibited significant amounts of DNA damage, also relying upon metabolic activation of B[a]P. Because reactive oxygen species could be produced by CYP activity and that DNA damage could be biomarkers of oxidative stress, we used the

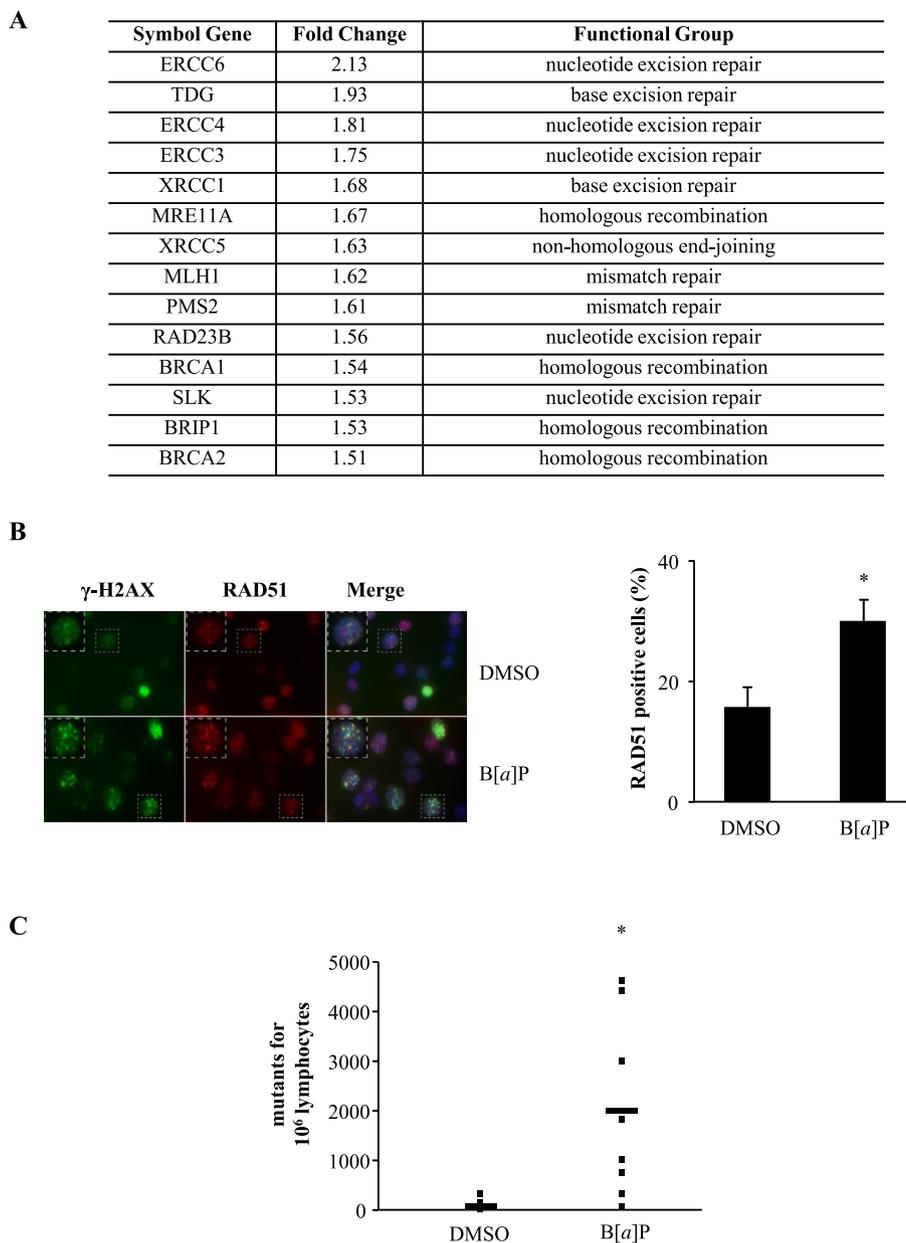


**Fig. 6.** Induction of p21 expression, alteration of DNA synthesis and cellular division in response to B[a]P treatment in activated human T lymphocytes. T lymphocytes activated for 72 h were treated with vehicle (DMSO) or with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 48 h of culture. (A) Expression of p21 protein was analyzed by Western blotting. A representative blot is displayed on the upper panel. Data are expressed relative to protein expression level in DMSO-treated T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of six independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors. (B) [ $^3$ H]-methyl-thymidine incorporation into DNA was determined during the last 18 h of culture. Data are expressed relative to the [ $^3$ H]-methyl-thymidine incorporation in DMSO-treated T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of eight independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors with triplicate per experiment. (C) Cell division was analyzed by flow cytometry using CFSE dilution. Representative graphs saved during flow cytometry analysis are displayed on the left panel. Data are expressed as % of parental cells and are shown as mean  $\pm$  SEM of five independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors with duplicate per experiment. \*  $p < 0.05$  when compared with DMSO-treated T lymphocytes (paired Student's *t* test (A, B) and analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls's multirange test (C)).

FPG-modified alkaline comet assay to detect oxidative damage. No induction of oxidative DNA damage was observed upon B[a]P treatment as reported by Genies et al. [39]. Indeed, whereas they showed significant levels of oxidative lesions upon treatment with 2  $\mu$ M B[a]P in different human cell lines, they concluded that the frequency of oxidative lesions was much lower than the frequency of BPDE adducts representing only a minor contribution to the genotoxicity of B[a]P [39]. A thorough characterization of the DNA damage produced by B[a]P revealed the generation of DNA DSBs using  $\gamma$ -H2AX staining. Although the phosphorylation of H2AX into  $\gamma$ -H2AX is considered as a hallmark of the number of DSBs generated, it has also been reported to be activated by other stresses such as chromatin structure changes [25,26]. Using 53BP1, an additional marker of DSBs [25,26], and as indicated by its colocalization with  $\gamma$ -H2AX, we confirmed that B[a]P induces true DNA DSBs in activated T lymphocytes. Additionally, a 48-h treatment with B[a]P triggered ATM-CHK2 checkpoint pathway activation, compatible with a DSB-type response [25,26].

In contrast to its genotoxic effects, B[a]P did not alter cell viability by inducing apoptosis in activated T lymphocytes after a 48-h treatment with 2  $\mu$ M. This concentration of B[a]P has been already

reported to have a limited impact on viability in different human cell lines [39]. It could be explained by an efficient DDR, a well-co-ordinated network of signalling cascade occurring upon DNA damage [40]. In primary activated T lymphocytes, it is reasonable to hypothesize that p53 is central in this situation given the roles of p53 target genes in survival and death [41]. We found that B[a]P induces the accumulation and the phosphorylation of p53, as well as the induction of its transcriptional targets. Among p53-responsive genes, we reported preferential up-regulation of pro-survival genes such as its negative regulator mdm2, the cell cycle and DNA damage regulators gadd45A and CDKN1A, thereby affecting the survival-death balance. A marked increase in the corresponding protein p21 encoded by CDKN1A gene was associated, probably conferring increased T lymphocyte survival towards B[a]P treatment, as previously reported in human diploid lung fibroblasts treated with B[a]P [42]. This survival response was accompanied by a decrease in DNA synthesis and in cellular division. However, although strong induction of p21 occurred, only marginal changes in the cell cycle distribution (i.e., a slightly enhanced fraction within the G2/M phases (data not shown)) were observed 48 h following B[a]P treatment. These data are consistent with



**Fig. 7.** Recruitment of RAD51 to DNA DSBs and Pig A mutation frequency in response to B[a]P treatment in activated human T lymphocytes. T lymphocytes activated for 72 h were treated with vehicle (DMSO) or with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 24 h (A) and 48 h of culture (B, C). (A) Top regulated DNA repair genes were detected by expression profiling analysis using the RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR array and selected on the basis of a 1.5-fold change factor of mRNA expression in response to B[a]P. Data are expressed relative to mRNA expression level in DMSO-treated T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are from one experiment performed on pools of RNAs isolated from cultures of T lymphocytes established from 9 blood donors. (B) Recruitment of RAD51 to DNA DSBs was detected by  $\gamma$ -H2AX and RAD51 immunostaining and analyzed by fluorescence microscopy (magnification x63). Representative photographs of co-localization of  $\gamma$ -H2AX and RAD51 are displayed on the left panel. Data are expressed as % of T lymphocytes positive for RAD51 foci formation when >5 foci/nuclei were quantified and are shown as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors. (C) After a 48-h treatment with B[a]P, T lymphocytes were maintained in a proliferation media for ten days and then analyzed for the Pig A mutation frequency. Data are shown as mean  $\pm$  SEM of eight independent experiments performed with T lymphocytes from different blood donors. \*  $p < 0.05$  when compared with DMSO-treated T lymphocytes (paired Student's  $t$  test (B, C)).

recent studies in human fibroblasts treated with BPDE showing a slow-down of replication without any pronounced cell cycle arrest to protect against cell death [43]. These data are in agreement with ours showing that B[a]P failed to induce T lymphocyte apoptosis over a treatment of 48 h as evidenced by the absence of significant changes in caspase activity. Combined with other studies reporting that CHK1 protects cells from apoptosis [44,45], activation of the ATM-CHK1 pathway might be sufficient to prevent T lymphocyte death and contribute to survival following B[a]P-induced DSBs. Cell survival may be also correlated with an increase in the efficiency of

DNA repair mechanisms as reported for B[a]P with nucleotide excision repair removing DNA adducts or with translesion DNA synthesis which enable cells to tolerate DNA damage [46]. Thereby, in addition to the changes detected in mRNA levels of genes involved in excision repair, the mRNA expression levels of HR factors (MRE11A, BRCA1, BRIP1 and BRCA2) increased in response to B[a]P, and the recombinase RAD51 protein is recruited to B[a]P-induced DSBs demonstrating the role of HR in response to B[a]P. In the present study, we cannot exclude that part of the generated DSBs upon B[a]P treatment are repaired by the error-prone non-

homologous end-joining pathway. We propose then a mechanism by which activated T lymphocytes repair B[a]P-induced DSBs thus allowing their survival but placing them at greater risk to accumulate mutations, as suggested for some B-lymphocyte tumours [47]. By using the Pig A mutagenesis assay, we reported that B[a]P treatment resulted in an increased gene mutation frequency in activated T lymphocytes treated with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h. The mutagenic activity of B[a]P has been extensively studied in humans using both *in vivo* and *in vitro* approaches [6]. Most of the *in vitro* studies of DNA damage and mutations due to PAHs have been performed using human transformed cell lines, opening the question of the relevance of the data obtained in these studies to human normal cells and tissues. Consequently, the use of primary human T lymphocytes, which are normal non-transformed human cells, may be more adequate to better characterize the response of normal human cells to PAHs. Finally, the relevance of the physiological activation of human T lymphocytes, triggering an efficient mobilization of AhR [15], is of great interest towards exposure to PAHs. Indeed, one may speculate that exposure to these carcinogenic contaminants, may contribute to exacerbated DNA alterations during an immune response. Altogether, these data indicate that primary activated human T lymphocytes appear to be a major cell type targeted by PAHs reinforcing thus the link suggested between PAH exposure and risk of T lymphoma [8].

In conclusion, the present study demonstrates the metabolic efficiency of primary human activated T lymphocytes towards contaminants such as B[a]P to form specific DNA damage and increase mutation frequency, proposing them as a good model to analyze human health issues depending on the environment.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgements

This work was supported by The French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES with the support of the Cancer TMOI of the French National Alliance for Life and Health Sciences (AVIESAN) (2014/1/052). Marie Liamin is a recipient of ANSES. The authors acknowledge the assistance provided by Marianne Chevalier for comet assays, Serge Boiteux for kindly providing FPG and Dominique Lagadic-Gossman for critical reading of the manuscript. LC-MS analyses were achieved in the MetaToul-AXIOM platform, which is part of the French national infrastructure for metabolomics and fluxomics: MetaboHUB (MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010). The authors are also grateful to the MRic Photonics and to the flow cytometry platforms of Biosit, Université de Rennes 1 (France).

### References

- [1] H.A. Hattemer-Frey, C.C. Travis, Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure, *Toxicol. Ind. Health* 7 (1991) 141–157.
- [2] M. Sørensen, H. Autrup, O. Hertel, H. Wallin, L.E. Knudsen, S. Loft, Personal exposure to PM<sub>2.5</sub> and biomarkers of DNA damage, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12 (2003) 191–196.
- [3] T. Shimada, Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21 (2006) 257–276.
- [4] K. Peltonen, A. Dipple, Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation, *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 37 (1995) 52–58.
- [5] B. Moorthy, C. Chu, D.J. Carlin, Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer, *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 145 (2015) 5–15.
- [6] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 92 (2010) 1–853.
- [7] E.D. Kroese, P.M. Dortant, H. van Steeg, C.T. van Oostrom, C.W. van der Houven van Oordt, H.J. van Kranen, A. de Vries, P.W. Wester, C.F. van Kreijl, Use of E mu-PIM-1 transgenic mice short-term *in vivo* carcinogenicity testing: lymphoma induction by benzo[a]pyrene, but not by TPA, *Carcinogenesis* 18 (1997) 975–980.
- [8] C.T. DellaValle, N.C. Deziel, R.R. Jones, J.S. Colt, A.J.D. Roos, J.R. Cerhan, W. Cozen, R.K. Severson, A.R. Flory, L.M. Morton, M.H. Ward, Polycyclic aromatic hydrocarbons: determinants of residential carpet dust levels and risk of non-Hodgkin lymphoma, *Cancer Causes Control* 27 (2016) 1–13.
- [9] P. Okano, H.N. Miller, R.C. Robinson, H.V. Gelboin, Comparison of benzo(a)pyrene and (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene metabolism in human blood monocytes and lymphocytes, *Cancer Res.* 39 (1979) 3184–3193.
- [10] R.C. Gupta, K. Earley, F.F. Becker, Analysis of DNA adducts in putative premalignant hepatic nodules and nontarget tissues of rats during 2-acetylaminofluorene carcinogenesis, *Cancer Res.* 48 (1988) 5270–5274.
- [11] D. Li, M. Wang, L. Cheng, M.R. Spitz, W.N. Hittelman, Q. Wei, *In vitro* induction of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer, *Cancer Res.* 56 (1996) 3638–3641.
- [12] O. Pelkonen, K. Vähäkangas, D.W. Nebert, Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to DNA: comparison with mutagenesis and tumorigenesis, *J. Toxicol. Environ. Health* 6 (1980) 1009–1020.
- [13] C.L. Thompson, Z. McCoy, J.M. Lambert, M.J. Andries, G.W. Lucier, Relationships among benzo(a)pyrene metabolism, benzo(a)pyrene-diol-epoxide: DNA adduct formation, and sister chromatid exchanges in human lymphocytes from smokers and nonsmokers, *Cancer Res* 49 (1989) 6503–6511.
- [14] A. Trickett, Y.L. Kwan, T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads, *J. Immunol. Methods* 275 (2003) 251–255.
- [15] L. Prigent, M. Robineau, S. Jouneau, C. Morzadec, L. Louarn, L. Vernhet, O. Fardel, L. Sparfel, The aryl hydrocarbon receptor is functionally upregulated early in the course of human T-cell activation, *Eur. J. Immunol.* 44 (2014) 1330–1340.
- [16] C.M. Kendzierski, Y. Zhang, H. Lan, A.D. Attie, The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments, *Biostatistics Oxford England* 4 (2003) 465–477.
- [17] L. Sparfel, M.-L. Pinel-Marie, M. Boize, S. Koscielny, S. Desmots, A. Pery, O. Fardel, Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene, *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 114 (2010) 247–259.
- [18] T. Shimada, H. Yamazaki, M. Feroozesh, N.E. Hopkins, W.L. Alworth, F.P. Guengerich, Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1048–1056.
- [19] E.L. Jamin, A. Riu, T. Douki, L. Debrauwer, J.-P. Cravedi, D. Zalko, M. Audebert, Combined genotoxic effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (B[a]P) and an heterocyclic amine (PhIP) in relation to colorectal carcinogenesis, *PLoS One* 8 (2013) e58591.
- [20] P. Lebailly, G. Mirey, F. Herin, Y. Lecluse, B. Salles, E. Boutet-Robinet, DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying season, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 88 (2015) 963–972.
- [21] A. Azqueta, L. Arbillaga, A. López de Cerain, A. Collins, Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG, *Mutagenesis* 28 (2013) 271–277.
- [22] Y. Cao, L. Yang, N. Feng, O. Shi, J. Xi, X. You, C. Yin, H. Yang, K. Horibata, M. Honma, B. Qian, W. Weng, Y. Luan, A population study using the human erythrocyte PIG-A assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 57 (2016) 605–614.
- [23] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis* 23 (2008) 143–151.
- [24] J. Bausinger, G. Speit, Induction and repair of DNA damage measured by the comet assay in human T lymphocytes separated by immunomagnetic cell sorting, *Mutat. Res.* 769 (2014) 42–48.
- [25] A. Kinner, W. Wu, C. Staudt, G. Iliakis, Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 5678–5694.
- [26] D.R. Pilch, O.A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig, W.M. Bonner, Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites, *Biochem. Cell Biol.* 81 (2003) 123–129.
- [27] T. Tanaka, M. Kajstura, H.D. Halicka, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes, *Cell Prolif.* 40 (2007) 1–13.
- [28] I. Hickson, Y. Zhao, C.J. Richardson, S.J. Green, N.M.B. Martin, A.I. Orr, P.M. Reaper, S.P. Jackson, N.J. Curtin, G.C.M. Smith, Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM, *Cancer Res.* 64 (2004) 9152–9159.
- [29] E. Oya, J. Ovrevik, V.M. Arlt, E. Nagy, D.H. Phillips, J.A. Holme, DNA damage and DNA damage response in human bronchial epithelial BEAS-2B cells following exposure to 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone: role in apoptosis, *Mutagenesis* 26 (2011) 697–708.
- [30] T. Abbas, A. Dutta, P21 in cancer: intricate networks and multiple activities, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 400–414.
- [31] J.H. Houtgraaf, J. Versmissen, W.J. van der Giessen, A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells, *Cardiovasc. Revasc. Med.* 7 (2006) 165–172.
- [32] A. Beucher, J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A.A. Goodarzi, A. Krempler, P.A. Jeggo, M. Löbrich, ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2, *EMBO J.* 28 (2009) 3413–3427.

- [33] M. Bellamri, L. Le Hegarat, L. Vernhet, G. Baffet, R.J. Turesky, S. Langouët, Human T lymphocytes bioactivate heterocyclic aromatic amines by forming DNA adducts, *Environ. Mol. Mutagen.* 57 (2016) 656–667.
- [34] J. Bausinger, P. Schütz, A.L. Piberger, G. Speit, Further characterization of benzo[a]pyrene diol-epoxide (BPDE)-induced comet assay effects, *Mutagenesis* 31 (2016) 161–169.
- [35] M.B. van Duursen, J.T. Sanderson, M. van den Berg, Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility, *Toxicol. Sci.* 85 (2005) 703–712.
- [36] K. Shiizaki, M. Kawanishi, T. Yagi, Modulation of benzo[a]pyrene–DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor, *Genes Environ.* 39 (2017).
- [37] S. Uno, T.P. Dalton, N. Dragin, C.P. Curran, S. Derkenne, M.L. Miller, H.G. Shertzer, F.J. Gonzalez, D.W. Nebert, Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate, *Mol. Pharmacol.* 69 (2006) 1103–1114.
- [38] J.T. Buters, S. Sakai, T. Richter, T. Pineau, D.L. Alexander, U. Savas, J. Doehmer, J. M. Ward, C.R. Jefcoate, F.J. Gonzalez, Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 1977–1982.
- [39] C. Genies, A. Maître, E. Lefèbvre, A. Jullien, M. Chopard-Lallier, T. Douki, The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs, *PLoS One* 8 (2013) e78356.
- [40] A. Ciccia, J.-W. Huang, L. Izhar, M.E. Sowa, J.W. Harper, S.J. Elledge, Treacher Collins syndrome TCOF1 protein cooperates with NBS1 in the DNA damage response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 18631–18636.
- [41] H.S. Madapura, D. Salamon, K.G. Wiman, S. Lain, G. Klein, E. Klein, N. Nagy, P53 contributes to T cell homeostasis through the induction of pro-apoptotic SAP, *Cell Cycle* 11 (2012) 4563–4569.
- [42] B. Binková, Y. Giguère, P. Rössner Jr., M. Dostál, R.J. Šrám, The effect of dibenzo[a, l]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21WAF1 proteins and cell cycle distribution, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 471 (2000) 57–70.
- [43] M. Christmann, C. Boisseau, R. Kitzinger, C. Berac, S. Allmann, T. Sommer, D. Aasland, B. Kaina, M.T. Tomacic, Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 10727–10743.
- [44] K. Myers, M.E. Gagou, P. Zuazua-Villar, R. Rodriguez, M. Meuth, ATR and Chk1 suppress a caspase-3-dependent apoptotic response following DNA replication stress, *PLoS Genet.* 5 (2009) e1000324.
- [45] S. Sidi, T. Sanda, R.D. Kennedy, A.T. Hagen, C.A. Jette, R. Hoffmans, J. Pascual, S. Imamura, S. Kishi, J.F. Amatruda, J.P. Kanki, D.R. Green, A.A. D'Andrea, A.T. Look, Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3, *Cell* 133 (2008) 864–877.
- [46] M. Christmann, B. Kaina, Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 8403–8420.
- [47] F.N. Papavasiliou, D.G. Schatz, Cell-cycle-regulated DNA double-strand breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes, *Nature* 408 (2000) 216–221.

### III.1.1 – Contexte de l'étude

Comme nous l'avons détaillé précédemment, le lymphocyte T, cellule clé de l'immunité adaptative, constitue une des cibles cellulaires majeures de la toxicité des HAPs. Une altération de l'immunité humorale et cellulaire (Ward *et al.*, 1986), une perturbation de la réponse T cytotoxique antitumorale (House *et al.*, 1989) et une atrophie thymique conduisant à une déplétion en lymphocytes T (Jeon *et al.*, 2005) ont été rapportées après exposition aux HAPs dans des modèles murins. Dans ces mêmes modèles, l'inactivation génique du RAh conduit à des anomalies des populations lymphocytaires (Fernandez-Salguero *et al.*, 1997), laissant supposer un rôle clé, joué par le RAh, dans la physiologie lymphocytaire chez l'animal. Les effets des HAPs sur la fonction lymphocytaire humaine, apparaissent en revanche moins bien documentés. Chez l'homme, les études concernant l'exposition aux HAPs, comme le B[a]P, ont essentiellement mis en évidence la présence de nombreux adduits à l'ADN dans les lymphocytes (Li *et al.*, 1996 ; Gammon *et al.*, 2002). La formation d'adduits, résultant du métabolisme du B[a]P, est alors suspectée de participer à la formation de tumeurs, notamment suite à l'apparition de mutations dans des gènes essentiels, tels que le gène suppresseur de tumeur, TP53, codant pour la protéine p53 (Moorthy *et al.*, 2015). Le B[a]P, est ainsi le seul HAP à avoir été classé par le CIRC comme cancérigène avéré pour l'homme, pour les cancers du poumon, de la vessie et de la peau (CIRC, 2010). De plus, des études épidémiologiques ont suggéré un lien, entre l'exposition à des mélanges d'HAPs contenant du B[a]P, et la survenue de lymphomes à cellules T (Morton *et al.*, 2014 ; DellaValle *et al.*, 2016). Ces données sont en accord avec les études associant l'augmentation de l'incidence de ces pathologies tumorales ces dernières années avec l'exposition à des contaminants chimiques (Clapp *et al.*, 2009).

Le lymphocyte T, facilement accessible par simple ponction sanguine, et particulièrement abondant dans le sang, est un modèle cellulaire très largement employé pour analyser les adduits à l'ADN liés aux HAPs, et les paramètres impliqués dans la formation et/ou la réparation de tels dommages (Pastorelli *et al.*, 2002). Dans ce contexte, le but de notre étude a été de caractériser les effets génotoxiques du B[a]P, après exposition *in vitro* des lymphocytes T humains en culture primaire. Les lymphocytes T étant quiescents, nous avons choisi de les activer par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, mimant une activation physiologique par présentation d'antigène (Trickett *et al.*, 2002). Dans de nombreuses et anciennes études, les lymphocytes T ont souvent été

activés par des lectines mitogènes, telles que la Phytohémagglutinine (PHA) et ce modèle de lymphocyte T humain activé par ces agents a été largement utilisé pour analyser leurs réponses aux HAPs (Atlas *et al.*, 1976, Paigen *et al.*, 1977 ; Kouri *et al.*, 1984). Les agents mitogènes, tels que la PHA, se lient aux glycoprotéines de la membrane cellulaire, dont le TCR, permettant ainsi l'activation lymphocytaire (Kay *et al.*, 1991), mais entraînant également des réponses cellulaires non spécifiques. Nous avons donc choisi de stimuler nos lymphocytes T humains en culture primaire, avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 immobilisés sur des billes magnétiques. Cette technique d'activation permet un ratio de prolifération identique à celui induit par la PHA, et est supérieur à celui induit par les anticorps libres (Lamers *et al.*, 1992 ; Levine *et al.*, 1996). Cette stimulation apparaît donc efficace dans l'activation des lymphocytes T, comme objectivé par la mesure des ARNm codant pour l'IL-2, facteur de croissance permettant leur expansion clonale et leur différenciation (Ullman *et al.*, 1990). Une étude récente menée dans l'équipe a montré qu'une telle activation, par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, entraînait une augmentation des niveaux d'expression et d'activité du RAh (Prigent *et al.*, 2014). L'induction de l'activité du RAh par les agents mitogènes, comme la PHA, avait aussi été décrite dans les anciennes études (Busbee *et al.*, 1972 ; Paigen *et al.*, 1977 ; Kouri *et al.*, 1984). En revanche, aucune étude ne s'était intéressée à l'effet de la stimulation lymphocytaire, particulièrement celle réalisée de manière physiologiquement pertinente par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28, sur la réponse aux HAPs. C'est pourquoi, nous avons testé l'idée, que les lymphocytes T ainsi activés seraient capables de métaboliser les ligands exogènes du RAh, tels que le B[a]P, conduisant à la possible formation de dommages au niveau de l'ADN, qui pourraient avoir des conséquences en termes de mutations et expliquer potentiellement le lien avec la survenue de lymphomes.

Pour cela, nous avons activé nos lymphocytes T pendant 24 heures avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28, permettant l'acquisition d'un RAh fonctionnel (Prigent *et al.*, 2014), puis nous les avons exposés à des concentrations croissantes de B[a]P pendant différents temps. Nous avons déterminé les conditions optimales d'exposition au B[a]P en suivant l'expression génique, protéique et l'activité des CYPs de la famille 1, témoignant de la réponse lymphocytaire à ce contaminant. Notre travail s'est alors focalisé sur l'étude des effets d'une exposition à 2  $\mu$ M de B[a]P pour un temps de 48 heures, révélant l'induction maximale de l'expression et de l'activité des CYPs de la famille 1. Cette concentration de 2  $\mu$ M de B[a]P a été utilisée dans des études toxicologiques *in vitro* antérieures (Hockley *et al.*, 2006, Sparfel *et al.*, 2010), elle

apparaît toutefois élevée, même si réaliste par rapport aux concentrations en conditions réelles (Lijinski *et al.*, 1991 ; Izzotti *et al.*, 1991). Dans ces conditions, nous avons analysé les effets génotoxiques du B[a]P et déterminé les voies de réponses aux dommages à l'ADN activées dans notre modèle lymphocytaire.

### III.1.2 – Résultats de l'étude

#### III.1.2.1 – Effets génotoxiques du B[a]P : étude de la formation d'adduits à l'ADN dérivés du B[a]P dans les lymphocytes T humains activés.

Nous avons choisi de mesurer les niveaux d'adduits à l'ADN dérivés du BPDE sur la guanine en position N<sup>2</sup> (dG-N<sup>2</sup>-BPDE), pour rendre compte de la génotoxicité du B[a]P dans notre modèle, comme classiquement décrit (Harrigan *et al.*, 2004 ; Marie *et al.*, 2008 ; Stampfer *et al.*, 1981). Nous avons sélectionné la technique d'HPLC couplée à deux spectromètres de masse en tandem, afin de doser ces adduits. Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le Dr Emilien Jamin sur la plateforme METATOUL de TOXALIM (UMR INRA 1331) à Toulouse. Cette technique possède une bonne spécificité, sans requérir d'étape pré-analytique lourde d'hydrolyse acide, et possède également une bonne sensibilité. Son inconvénient reste la quantité d'ADN nécessaire au dosage (jusqu'à 100 µg d'ADN ; contre 5 µg pour une technique de post-marquage au P<sup>32</sup>). Nous montrons que les niveaux d'adduits à l'ADN dérivés du BPDE, sont augmentés dans les lymphocytes T humains en culture primaire, après une exposition à 2 µM de B[a]P pendant 48 heures. De manière intéressante, si les adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE ont déjà été mesurés dans des lymphocytes T humains en culture primaire, ils l'ont été seulement après exposition directe au métabolite réactif BPDE (Stierum *et al.*, 1994 ; Bausinger *et al.*, 2016). Nos résultats montrent donc la capacité des lymphocytes T humains, activés de façon physiologiquement relevante, à former des adduits sur la guanine, en position N<sup>2</sup>, après exposition au B[a]P. Cette formation apparaît principalement dépendante de l'activité métabolique des CYPs de la famille 1, puisque l'utilisation de l' $\alpha$ -NF, inhibiteur de l'activité de l'éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) dépendante des CYPs de la famille 1 (Shimada *et al.*, 2010), conduit à la diminution significative du taux d'adduits, générés dans notre modèle. Des études établissent, que l'activité EROD est majoritairement induite par le CYP1A1, bien que le CYP1B1 soit aussi capable d'exercer cette activité (Shimada *et al.*, 1997). Dans notre étude, nous avons utilisé

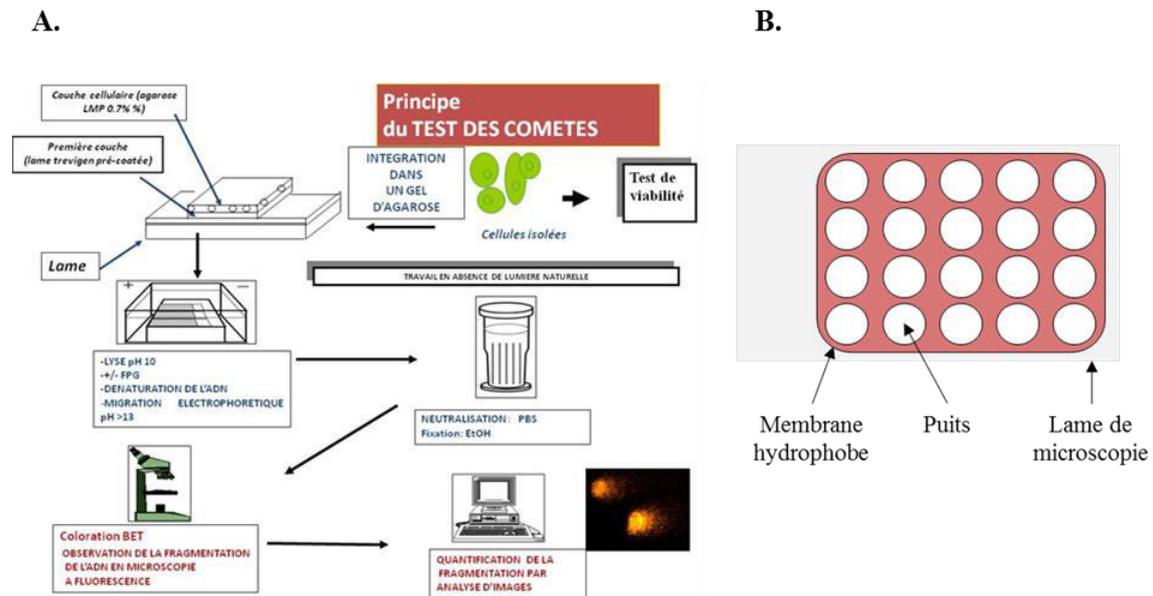
l'éthoxyrésorufine comme substrat modèle pour l'activité des deux CYPs 1A1 et 1B1, comme classiquement réalisé (Shimada *et al.*, 1998 ; Sparfel *et al.*, 2004 ; Sparfel *et al.*, 2006). Les CYP1A1 et 1B1 sont exprimés dans les tissus extra-hépatiques, y compris dans les lymphocytes du sang périphérique. Dans les lymphocytes T activés, les ARNm des CYP1A1 et 1B1 sont détectables avec une expression basale supérieure du CYP1B1 par rapport au CYP1A1 (van Duursen *et al.*, 2005). Bien que l'ARNm du CYP1B1 apparaisse exprimé dans de nombreux tissus normaux, la protéine correspondante n'a pas été détectée dans ces tissus par comparaison aux tissus cancéreux (McFayden *et al.*, 2005). Après traitement par des ligands du RAh, l'ARNm du CYP1A1 apparaît toutefois plus inductible que celui du CYP1B1, dans les lymphocytes humains du sang périphérique (van Duursen *et al.*, 2005). Ces données sont en accord avec nos résultats concernant les ARNm des CYP1A1 et CYP1B1 induits par le B[a]P. Cependant, nous observons une induction protéique du CYP1B1 supérieure à celle du CYP1A1. Une étude récente a montré que les niveaux d'expression d'ARNm du CYP1A1 induits par le B[a]P n'était pas forcément suivis d'une augmentation forte de l'expression protéique et de l'activité des CYP de la famille 1, du fait d'une régulation par certains microRNAs et/ou une stabilisation de la protéine (Chanyshev *et al.*, 2014). L'augmentation plus marquée des niveaux protéiques du CYP1B1 suggère alors une possible bioactivation du B[a]P majoritairement par ce CYP. De façon intéressante, l'activation métabolique de certains HAPs par le CYP1B1, a été liée au développement de lymphomes chez l'animal (Buters *et al.*, 1999).

#### III.1.2.2. – Effets génotoxiques du B[a]P : étude des altérations primaires de l'ADN après exposition au B[a]P dans les lymphocytes T humains activés.

Parallèlement à la détection d'adduits à l'ADN, nous avons mesuré la production d'altérations primaires de l'ADN, rendant également compte de la génotoxicité induite par ce composé. Nous avons choisi de mesurer ces altérations en utilisant le test des comètes. Le test des comètes est une des techniques les plus utilisées pour détecter des effets génotoxiques *in vitro* et *in vivo*. C'est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose, qui permet de quantifier les lésions primaires de l'ADN dans les cellules eucaryotes (Singh *et al.*, 1988), et plus précisément, les dommages de types cassures simple brin, double brin, ou encore les sites alcali-labiles (Collins *et al.*, 2008). Par

ailleurs, le test des comètes a fait l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) pour les essais de produits chimiques *in vivo* sur cellules de mammifères (Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay, 2016). Cette technique présente les avantages d'être rapide, sensible, de nécessiter une faible quantité de cellules et d'être utilisable avec de nombreux types tissulaires, en particulier les cellules en suspension comme les lymphocytes. Il a ainsi été rapporté, que le test des comètes est capable de mettre en évidence des dommages importants au niveau de l'ADN dans les lymphocytes périphériques de rats exposés de manière endotrachéale au B[a]P (Garry *et al.*, 2003), ou après exposition *in vitro* à du B[a]P (Baumgartner *et al.*, 2012). Dans des lymphocytes T humains le test des comètes a été utilisé pour rendre compte de la génotoxicité du BPDE (Bausinger et Speit, 2015). Contrairement au test des micronoyaux, également très utilisé dans les études de génotoxicité concernant les HAPs, le test des comètes ne nécessite pas de cellules en division. Il est également apparu plus sensible que le test des micronoyaux, dans la détection des dommages à l'ADN causés par des radiations ionisantes dans des lymphocytes humains (He *et al.*, 2000).

La réalisation du test des comètes pour cette étude a nécessité l'installation de la technique au laboratoire. Pour cela, je me suis rendue à Toulouse afin d'acquérir les connaissances et compétences techniques nécessaires à la mise en place de ce test à Rennes, par collaboration avec le Dr Elisa Boutet-Robinet du laboratoire TOXALIM (UMR INRA 1331). Comme nous le précisons précédemment, le test des comètes consiste en une électrophorèse sur microgel d'agarose, qui permet de quantifier les lésions primaires de l'ADN dans les cellules eucaryotes (Singh *et al.*, 1988). Cette électrophorèse est réalisée sur des lames de microscopie et l'un des inconvénients majeurs de ce test est le faible débit, dû à l'utilisation d'une lame de microscopie par point d'expérimentation. Comme réalisé lors de mon apprentissage à Toulouse et pour remédier à ce problème, nous avons travaillé avec des lames permettant l'analyse simultanée de 20 points d'expérimentation (CometSlides™ 20 puits, Trevigen) (**Figure 36**).



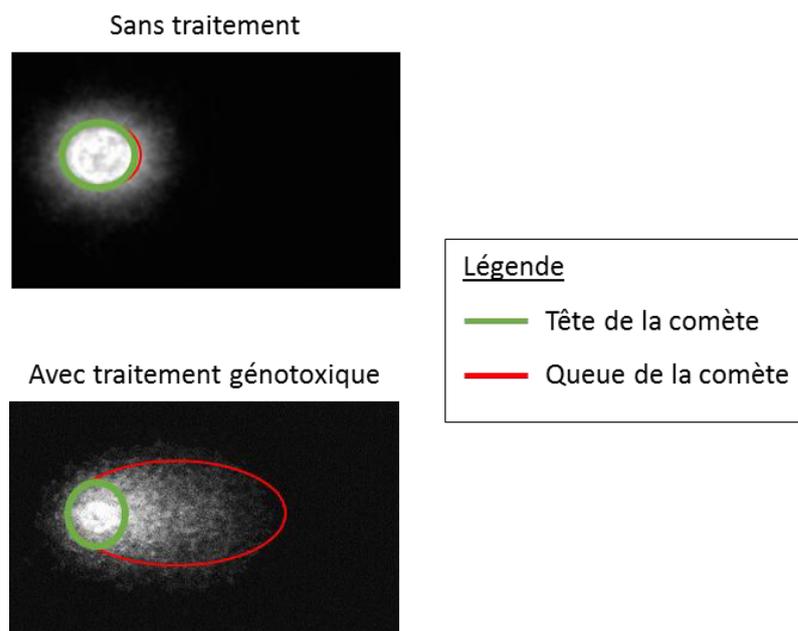
**Figure 36 : Principe du test des comètes et représentation d'une lame 20 puits (CometSlides™ Trevigen)** (A) Les cellules sont incluses dans l'agarose et déposées sur une lame déjà recouverte d'une couche d'agarose. Les cellules sont lysées dans l'agarose et l'ADN est soumis à un courant électrique en condition alcaline (pH >13). La réaction est ensuite neutralisée et les lames sont fixées avant d'être colorées avec un agent intercalant de l'ADN fluorescent, puis observées au microscope à fluorescence. (B) Représentation d'une lame de 20 puits permettant l'analyse simultanée de différentes conditions par le test des comètes.

Le protocole de récupération des lymphocytes T, d'inclusion en agarose, de lyse des cellules à pH 10 et de dénaturation de l'ADN en condition alcaline à pH  $\geq 13$ , est également celui appris à Toulouse. En revanche, pour l'étape de marquage de l'ADN, du fait d'équipements de microscopie différents entre les deux villes, nous avons dû adapter notre choix de marqueur. Nous avons testé différents marqueurs d'ADN présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**) et choisi de conserver le SYBR™Gold Nucleic Acid Gel Stain (ThermoFischer), marqueur fluorescent dérivé des cyanines. Contrairement aux marqueurs d'ADN classiquement utilisés pour le test des comètes (Bromure d'Ethidium (BET) ou le SYBR™Green), il est très photostable, pénètre rapidement dans les gels d'agarose et se lie avec une bonne affinité à l'ADN double brin et simple brin. Il est dix fois plus sensible dans des conditions dénaturantes que le BET, et présente aussi l'avantage d'avoir un meilleur rapport signal/bruit de fond que le BET.

**Tableau 4: Comparaison des différents marqueurs d'ADN utilisés pour le test des comètes.**

Marqueurs (intercalants)	Avantages	Inconvénients
Bromure d'éthidium (BET) S'intercale entre les bases d'ADN	Coût - Photobleaching - Longueurs d'ondes : Excitation : 366 nm Emission : 605 nm	Temps d'exposition 10 à 20 sec Sensibilité
SYBR Green™ S'intercale entre les sillons de l'ADN	Sensibilité ++ Temps d'exposition 1 sec Longueurs d'ondes : Excitation : 497 nm Emission : 520 nm	Coût ++ Photobleaching +++
SYBR Gold™ S'intercale entre les sillons de l'ADN	Sensibilité +++ Temps d'exposition 1 sec Photobleaching - Longueurs d'ondes : Excitation : 300 et 495 nm Emission : 537 nm	Coût +++

Nous avons ensuite réalisé l'observation de nos lames marquées, avec un système de microscopie à fluorescence (Vidéo microscope LEICA DMRIB), présent sur la plateforme de microscopie de Biosit (Université de Rennes 1). Les images sont acquises manuellement, avec un appareil photo CoolSnapHQ Princeton, et non de manière automatique, comme lors de mon apprentissage à Toulouse. Pour chaque puits de la lame, une série d'acquisitions, couvrant la surface du puits, est réalisée. Comme présenté sur la figure 37, l'exposition au méthyl-méthane-sulfonate (MMS), agent génotoxique reconnu et utilisé comme contrôle positif de notre test (Bausinger et Speit, 2014), permet l'observation par microscopie de cellules ayant un profil de comètes. La comète est divisée en deux parties, la « tête » correspondant à la zone résiduelle du noyau, et la « queue » correspondant à la zone de migration des boucles d'ADN décondensées (**Figure 37**).



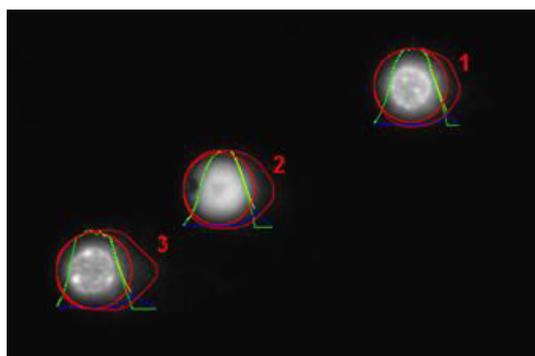
**Figure 37 : Induction de comètes après traitement des lymphocytes T humains par le MMS.** Des lymphocytes T humains en culture primaire ont été activés par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et ont été exposés ou non à 80  $\mu\text{M}$  de MMS pendant les deux dernières heures de culture. Les dommages à l'ADN sont visualisés grâce au test des comètes et un marquage de l'ADN au SYBR<sup>TM</sup>Gold suivi d'une acquisition grâce à un microscope à fluorescence (objectif x20). La localisation de la tête de la comète est marquée en vert et celle de la queue de la comète est marquée en rouge.

Les conditions d'acquisition, ainsi que l'analyse des images de microscopie, ont aussi nécessité une mise au point au laboratoire. Dans cet objectif, nous avons testé différents logiciels d'analyse d'images présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**).

**Tableau 5 : Comparaison des différents logiciels d'analyse d'images utilisés pour le test des comètes.**

Logiciels	Avantages	Inconvénients
Comet Assay IV	Sélection automatique de la tête et du corps de la comète Possibilité de modifier les sélections Principal logiciel utilisé pour l'analyse des comètes	Prix (4000 \$)
Comet Score	Prix (95 \$)	Sélection manuelle de la tête et du corps de chaque comète N'enregistre pas les images traitées
Open Comet (ImagJ)	Prix (gratuit) De plus en plus utilisé pour l'analyse des comètes Enregistre toutes les photos après analyse Numérote chaque cellule analysée (traçabilité)	Pas de sélection manuelle possible

Nous avons choisi de travailler avec le plugin « OpenComet » du logiciel ImageJ. Ce logiciel gratuit présente l'avantage d'une analyse automatique des images, détectant automatiquement les zones définissant la tête et la queue de la comète. Il permet aussi de conserver, après chaque analyse, une photo de l'image analysée, où les cellules sont numérotées (**Figure 38**), et les valeurs mesurées pour chaque cellule sont référencées dans un tableur permettant une traçabilité des résultats obtenus.



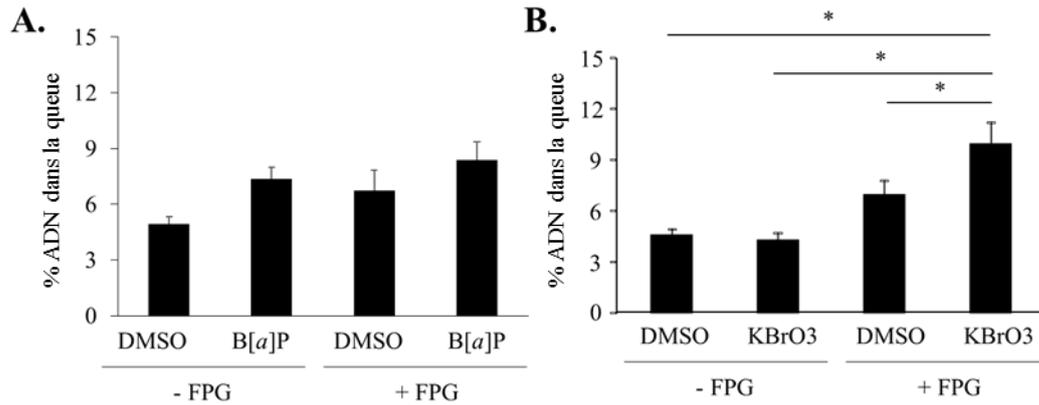
**Figure 38 : Acquisition et analyse d'images de comètes par le logiciel OpenComet.**

*Des lymphocytes T humains en culture primaires ont été activés par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et ont été exposés à 2 $\mu$ M de B[a]P pendant les 48 dernières heures de culture. Les dommages à l'ADN sont visualisés grâce au test des comètes et un marquage de l'ADN au SYBR<sup>TM</sup>Gold. L'image a été acquise grâce à un microscope à fluorescence grossissement x63 et l'analyse de l'image a été réalisée avec le logiciel « OpenComet ». Pour chaque cellule le logiciel détermine une courbe d'intensité de fluorescence pour la tête de la comète (vert fluo), pour la queue de la comète (bleu) et pour la comète entière (jaune).*

Les niveaux de dommages à l'ADN sont évalués, pour chaque cellule, par une mesure de l'intensité de fluorescence de chaque pixel de la queue de la comète divisé par l'intensité de fluorescence des pixels de la tête et de la queue. Etant donné qu'il existe une corrélation linéaire entre les niveaux d'intensité de fluorescence et la quantité d'ADN marquée par le SYBR<sup>TM</sup>GOLD, les résultats sont donnés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète. Les résultats obtenus correspondent à la médiane des valeurs pour 100 cellules analysées par point. Nos résultats montrent une augmentation du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète pour les lymphocytes T humains en culture primaire exposés à 2  $\mu$ M de B[a]P pendant 48 heures. De manière intéressante, les dommages à l'ADN mesurés sont, en partie, liés au métabolisme du B[a]P puisque l'utilisation d' $\alpha$ -NF diminue les niveaux de dommages induits par le B[a]P. Les niveaux de dommages observés sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature pour des lymphocytes T exposés à 2,5  $\mu$ M de B[a]P pendant 48 heures (Oh *et al.*, 2004). Le test des comètes

révélant les cassures de l'ADN, nous avons vérifié l'absence d'apoptose dans les lymphocytes T suite à l'exposition au B[a]P, afin de s'assurer que les résultats observés correspondent à des dommages à l'ADN et non à la dégradation de l'ADN liée à l'apoptose. Nous n'avons détecté, ni augmentation de l'activité des caspases-3, ni diminution de la viabilité grâce au test WST-1 (Water Soluble Tetrazolium Salt-1) (données non illustrées).

Le B[a]P est aussi connu pour entraîner un stress oxydant, *via* l'activité des CYPs, les cycles redox spontanés des quinones (Holme *et al.*, 2007), ou encore la déplétion en glutathion, induite par certains métabolites du B[a]P (Romero *et al.*, 1997). Le stress oxydant résultant, peut alors participer à la formation de bases oxydées, comme la 8-oxo-G, responsables, elles aussi, d'effets génotoxiques du B[a]P (Xing *et al.*, 2013). Nous avons choisi d'utiliser un test des comètes « modifié » (Collins *et al.*, 1993), pour rendre de compte de ces niveaux d'oxydation de l'ADN. Le test des comètes modifié consiste en une étape supplémentaire, impliquant une glycosylase capable de cliver, entre autre, les bases oxydées de l'ADN et de former, à la place de ces bases, des sites abasiques (Azqueta *et al.*, 2013). Nous avons choisi d'utiliser l'enzyme Formamidopyrimidine DNA Glycosylase (FPG), une enzyme impliquée dans la reconnaissance et le clivage de certaines bases oxydées, dont la 8-oxo-G (Mickaels *et al.*, 1992, Boiteux, 1993). Cette technique a déjà été utilisée pour étudier les effets d'une exposition *in vitro* à des agents génotoxiques, dans des modèles de lymphocytes T humains (Bausinger et Speit, 2014 ; Cavallo *et al.*, 2003). Nous n'avons pas observé de majoration des niveaux de dommages à l'ADN en présence de FPG, dans les lymphocytes T humain en culture primaire activés et exposés à 2  $\mu$ M de B[a]P pendant 48 heures. En revanche, nous observons l'augmentation du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète après traitement avec un agent pro-oxydant fort, le Potassium Bromate (KBrO<sub>3</sub>), utilisé ici comme contrôle positif (Bausinger et Speit, 2014) (**Figure 39**).

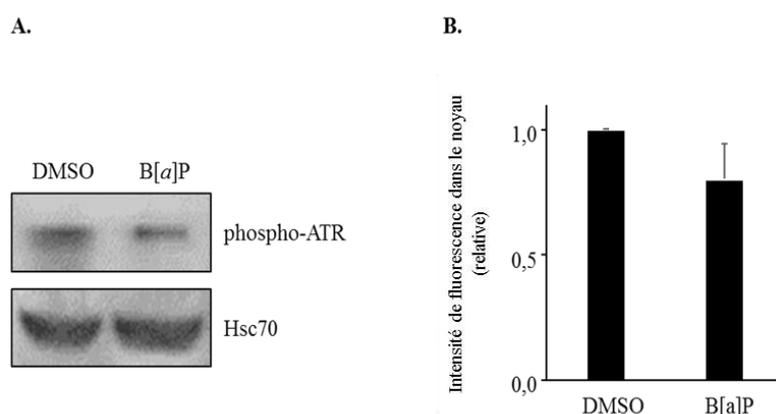


**Figure 39 : Mesure des dommages révélés par le test des comètes en présence de FPG.** Des lymphocytes T humains en culture primaires ont été activés par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et ont été exposés à (A) 2 $\mu$ M de B[a]P pendant les 48 dernières heures de culture, ou à (B) 3 mM de bromate de potassium (KBrO<sub>3</sub>) pendant les 2 dernières heures de culture. Les dommages à l'ADN ont été quantifiés grâce au test des comètes en conditions alcalines modifié par l'ajout de FPG. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète et représentent les moyennes  $\pm$  SEM de (A) neuf ou (B) six expériences indépendantes réalisées en duplicata à partir de donneurs différents. \* $p$ <0.05 (Analyse de la variance suivi d'un test Student-Newman-Keuls's multirange (B))

Pour renforcer nos données concernant le stress oxydant, nous avons cherché à réaliser un dosage de la 8-Oxo-G sur la plateforme METATOUL de Toulouse. La 8-Oxo-G est le principal dommage oxydatif retrouvé lors des expositions aux HAPs dans des modèles cellulaires (Park *et al.*, 2006). Suite à des problèmes techniques de seuil de base trop élevés dans les conditions témoins, nous n'avons pas pu poursuivre ces dosages. Nos résultats, montrant l'absence de dommages oxydatifs par le test des comètes dans nos conditions, sont en accord avec l'étude de Génies *et al.*, (Génies *et al.*, 2013) montrant que le stress oxydant ne représente qu'une contribution mineure à la génotoxicité du B[a]P.

### III.1.2.3. – Réponse lymphocytaire à la génotoxicité du B[a]P : étude des voies de réponse aux dommages

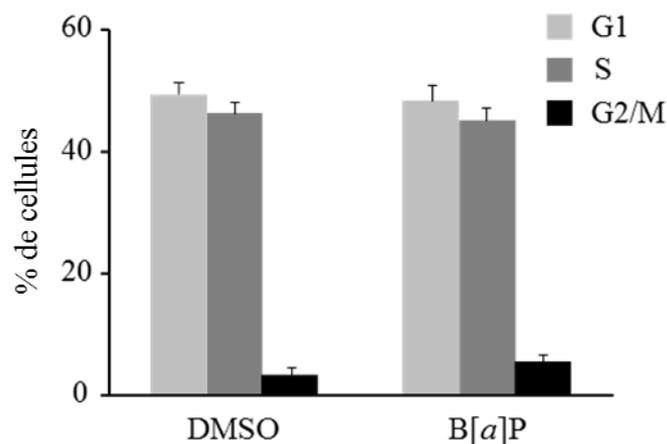
Face aux lésions induites par le B[a]P dans notre modèle de lymphocytes T humains, nous avons souhaité connaître la prise en charge de celles-ci par nos cellules. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la réparation des dommages induits ou à leur persistance sous forme de mutations. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la détection des dommages à l'ADN est possible par l'intervention de protéines senseurs qui reconnaissent ces lésions (Lee et Paull, 2005 ; Chen et Wold, 2014). Ces protéines recrutent des kinases, ATM et ATR, essentielles à la réponse aux dommages à l'ADN. Ces sérines/thréonines kinases possèdent des rôles partagés : ATR étant plutôt activée lors de cassure simple brin ou lors de l'arrêt des fourches de réplication, et ATM plutôt par les cassures double brin (Bakkenist et Kastan, 2003 ; Nam et Cortez, 2011 ; Paulsen et Cimprich, 2007). Nos résultats mettent en évidence une activation de la voie d'ATM et non celle d'ATR (**Figure 40**), compatible avec une réponse aux cassures double brin dans l'ADN (Smith *et al.*, 2010). Cette activation d'ATM est identifiée pas une augmentation de ses niveaux protéiques et de sa translocation nucléaire dans notre modèle.



**Figure 40 : Absence d'activation de la voie d'ATR en présence de B[a]P dans les lymphocytes T humains.** (A, B) Des lymphocytes T humains en culture primaires ont été activés par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et ont été exposés à 2 $\mu$ M de B[a]P pendant les 48 dernières heures de culture (A) L'expression protéique de phospho-ATR a été analysée par western-blot. Les niveaux d'Hsc70 sont utilisés comme marqueur de charge. (B) l'activation d'ATR a été détectée par immunomarquage nucléaire de phospho-ATR et analysée par microscopie à fluorescence (objectif x63). Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence relative dans le noyau des cellules traitées, par rapport à la condition contrôle (DMSO) arbitrairement placée à 1 unité. (A, B) Les résultats sont représentatifs de cinq expériences indépendantes réalisées à partir de donneurs différents.

Nous montrons également, grâce à un inhibiteur spécifique d'ATM, la phosphorylation par cette kinase du variant d'histone H2AX sur la sérine 139 ( $\gamma$ -H2AX), laissant supposer la présence de cassures double brin. Pour identifier de manière formelle ces cassures double brin, j'ai mis au point des co-marquages de protéines nucléaires témoignant de ces cassures à l'aide d'anticorps fluorescents. Les lymphocytes T humains étant des cellules non-adhérentes, il a fallu mettre au point les conditions d'adhésion des lymphocytes sur lame de polysine, ainsi que les conditions de leur pré-perméabilisation et perméabilisation, afin d'obtenir un marquage spécifique des protéines nucléaires sous forme de foyers, caractéristiques d'un recrutement au niveau d'un site de dommage à l'ADN. Grâce à la mise en évidence de la co-localisation de protéines senseurs des cassures double brin, l'histone H2AX phosphorylé en position 139 ( $\gamma$ -H2AX) et la protéine 53BP1, nous avons certifié la présence de cassures double brin causées par le B[a]P. La mise en évidence de l'histone  $\gamma$ -H2AX a été très utilisée afin de rendre compte de la présence de cassures double brin (Huang *et al.*, 2004). Cependant, cette histone n'est pas seulement liée à la présence de cassure double brin. D'autres mécanismes cellulaires peuvent être à l'origine de sa phosphorylation (Turinetti et Giachino, 2015). C'est pour cette raison, que nous avons choisi comme second marqueur, la protéine 53BP1. Recrutée au niveau de ces cassures, cette protéine peut se fixer aux histones et orienter la réparation des dommages par recombinaison homologue (RH) ou la non-homologous end-joining (NHEJ) (Gupta *et al.*, 2014). La co-localisation de ces deux protéines, a déjà été utilisée pour rapporter la présence de cassures double brin dans des lymphocytes T humains soumis à des radiations ionisantes (Vandevoorde *et al.*, 2016). Ainsi, nous rapportons une augmentation du nombre de foyers  $\gamma$ -H2AX-53BP1, confirmant la présence de cassures double brin dans les lymphocytes T humains exposés au B[a]P.

Nos résultats nous ont également permis de montrer que l'activation d'ATM était associée à une phosphorylation des protéines effectrices CHK1/CHK2, ainsi qu'à une phosphorylation de la protéine p53. Dans notre modèle de lymphocyte T exposé au B[a]P, la protéine p53 semble capable d'exercer son rôle de suppresseur de tumeurs *via* un ralentissement du cycle cellulaire, une diminution de la synthèse d'ADN. Parallèlement ? nous observons une légère augmentation du pourcentage de lymphocytes T en phase G2/M (**Figure 41**).

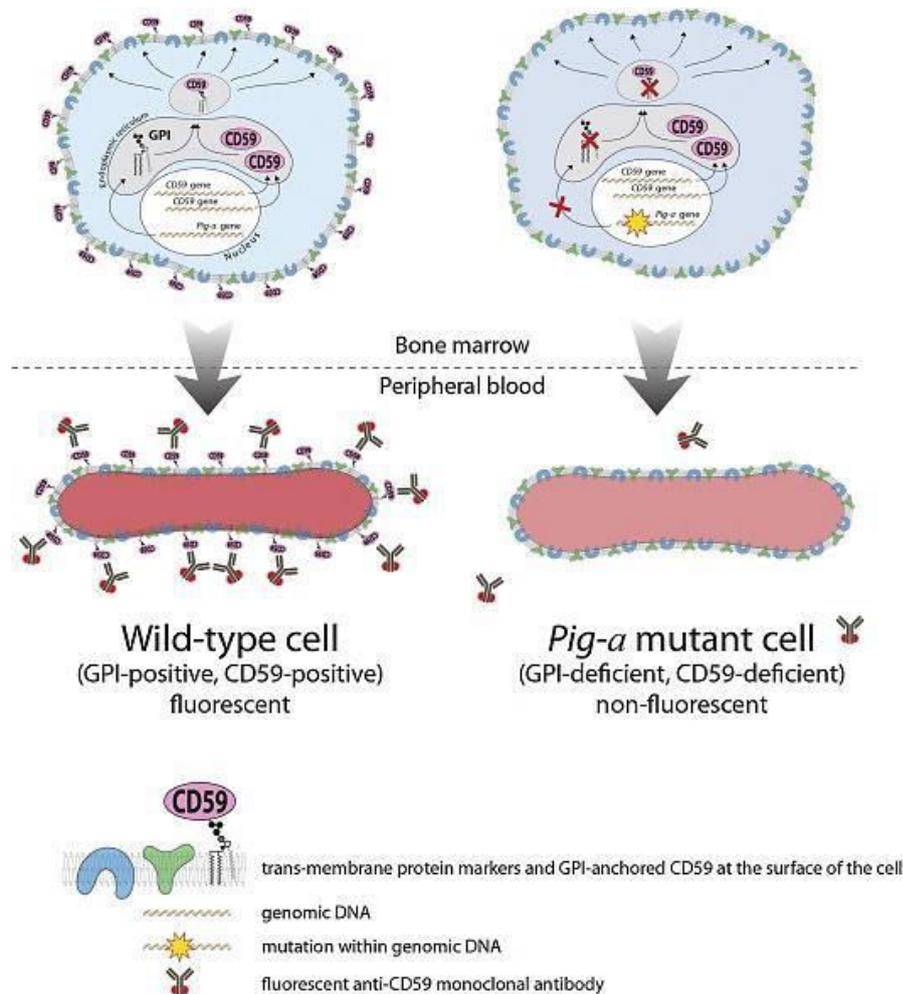


**Figure 41 : Ralentissement de la réplication des lymphocytes T humains en culture primaire, induit par le B[a]P, en phase G2/M.** Des lymphocytes T humains en culture primaire ont été activés par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et ont été exposés à 2 $\mu$ M de B[a]P pendant les 48 dernières heures de culture. Le pourcentage de cellules aux différentes phases du cycle cellulaire a été estimé par cytométrie en flux après marquage des lymphocytes à l'iodure de propidium. Les résultats représentent le pourcentage de cellules en phase G1, S ou phase G2/M en fonction du traitement. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM de sept expériences indépendantes réalisées à partir de donneurs différents.

L'augmentation des niveaux intracellulaires de la protéine p53 atteignent aussi un seuil suffisant pour lui permettre de réaliser sa fonction de facteur de transcription en activant la transcription de gènes cibles comme CDKN1A (p21), Gadd45 $\alpha$  ou mdm2, sûrement à l'origine des effets précédemment cités. Enfin, comme p53 peut avoir un rôle direct dans la réparation de l'ADN et notamment dans la RH (Rieckmann *et al.*, 2013), nous avons cherché à caractériser la participation de cette dernière dans la prise en charge des dommages liés au B[a]P. Pour cela, nous avons analysé le recrutement de RAD51, une protéine centrale de la RH, au niveau des foyers  $\gamma$ -H2AX, à l'aide des expériences de co-marquages précédemment mises au point. Ces résultats montrent l'implication de ce système de réparation dans la prise en charge des cassures double brin, causées par une exposition au B[a]P, dans notre modèle. Le B[a]P a déjà été impliqué dans l'activation de ce système de réparation dans d'autres modèles cellulaires (Tung *et al.*, 2014). Le B[a]P a aussi été montré capable d'activer la NHEJ, un autre mécanisme de réparation des cassures double brin (Tung *et al.*, 2014). Nous ne pouvons donc pas exclure l'implication d'autres systèmes de réparation, comme ce dernier ou d'autres comme le système NER, impliqué dans la réparation des adduits volumineux à l'ADN. Dans ce sens, nous avons identifié un certain nombre d'ARNm codant pour les enzymes impliquées dans ces

systèmes NHEJ (XRCC5) et NER (ERCC6, ERCC4, ERCC3, RAD23B et SLK), grâce à une approche transcriptomique ciblée sur les gènes de dommages et de la réparation.

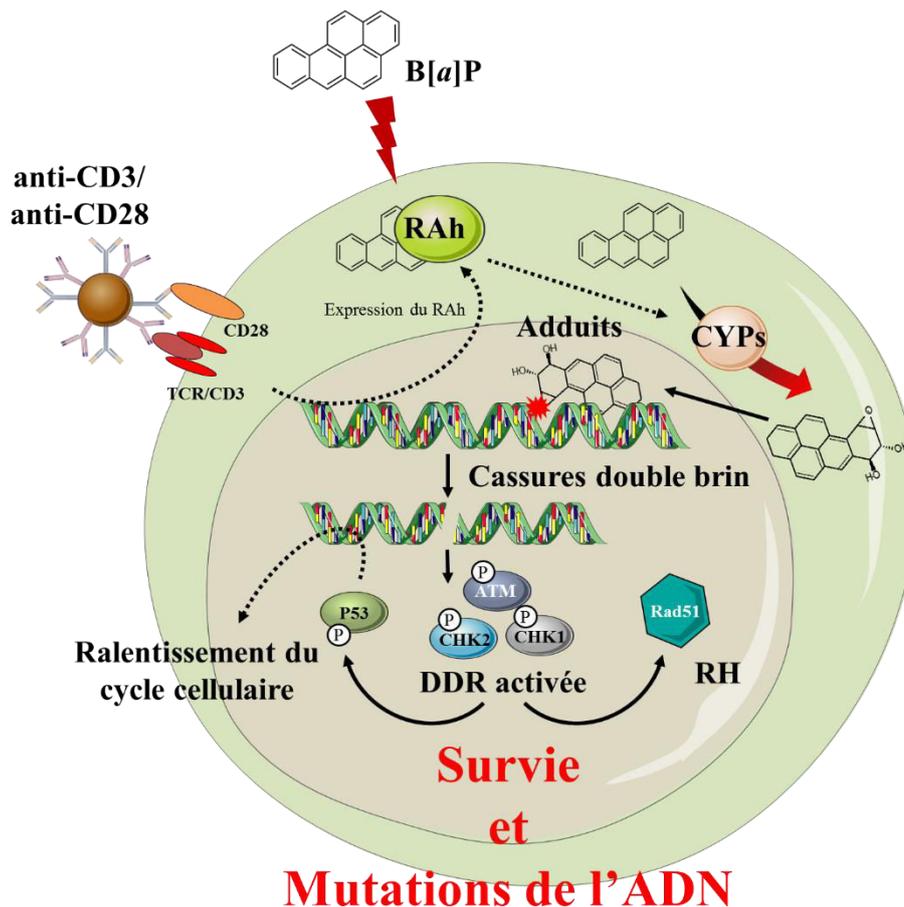
Au total, nos lymphocytes T exposés au B[a]P présentent des altérations de l'ADN mais survivent. Nous avons alors émis l'hypothèse que ces dommages pouvaient être réparés et nous avons ici mis en évidence l'implication de la réparation par RH, par le recrutement de RAD51. Ce système de réparation par RH n'est pas un système sans erreurs et il est impliqué dans la survenue de mutations (Lichten *et al.*, 1990). La survenue de mutations dans certains gènes, comme TP53, dans les lymphocytes T humains, a été liée au développement de certains cancers suite à une exposition aux HAPs (Kucab *et al.*, 2015). Pour évaluer la survenue de mutations suite à l'exposition au B[a]P dans notre modèle, nous avons réalisé un test Pig-A (phosphatidylinositol-glycane classe A) en collaboration avec le Dr Marc Audebert du laboratoire TOXALIM (UMR INRA 1331) à Toulouse. Le gène PIG-A est présent en un seul exemplaire dans le génome des mammifères, et code pour une sous-unité du complexe N-acétylglucosamine transférase participant à la synthèse d'une ancre glycosylphosphatidyl inositol (GPI). La mutation de ce gène entraîne l'absence de cette ancre GPI en surface des cellules, et un marquage avec des anticorps fluorescents, dirigés contre les protéines CD29 ou CD24 associées à cette ancre, permet de rendre compte de la survenue de mutations dans ce gène (Bryce *et al.*, 2008) (**Figure 42**). Ce test présente l'avantage d'être rapide et, contrairement aux tests de mutation couramment utilisés dans les cellules de mammifères, il permet une détection directe du phénotype mutant GPI(-) par cytométrie en flux.



**Figure 42 : Principe du test Pig-A** D'après Bhaskar et al., 2015.

Chez l'Homme, des mutations dans ce gène ont déjà été rapportées dans des PBMC exposés au B[a]P (Ware et al., 2001). Grâce à ce test, nous avons mis en évidence une augmentation de la fréquence de mutations dans les lymphocytes T humains exposés à 2  $\mu\text{M}$  de B[a]P pendant 48 heures. De nombreuses études ont montré le caractère mutagène du B[a]P (CIRC, 2010), mais la plupart de celles-ci ont été menées dans des cellules transformées. Ainsi, les lymphocytes T humains en culture primaire, qui sont des cellules normales, cibles originelles des contaminants environnementaux, représentent un modèle plus adéquat à la caractérisation de la réponse aux HAPs chez l'Homme.

En conclusion, cette étude montre l'efficacité métabolique des lymphocytes T humains en culture primaire, activés de façon physiologiquement relevante, en présence de contaminants comme le B[a]P ; elle décrit également leur capacité à former des dommages à l'ADN et leur prise en charge par les systèmes de réparation associée à une survie lymphocytaire, enfin, elle met en évidence l'augmentation de la fréquence de mutations malgré cette prise en charge (Figure 43).

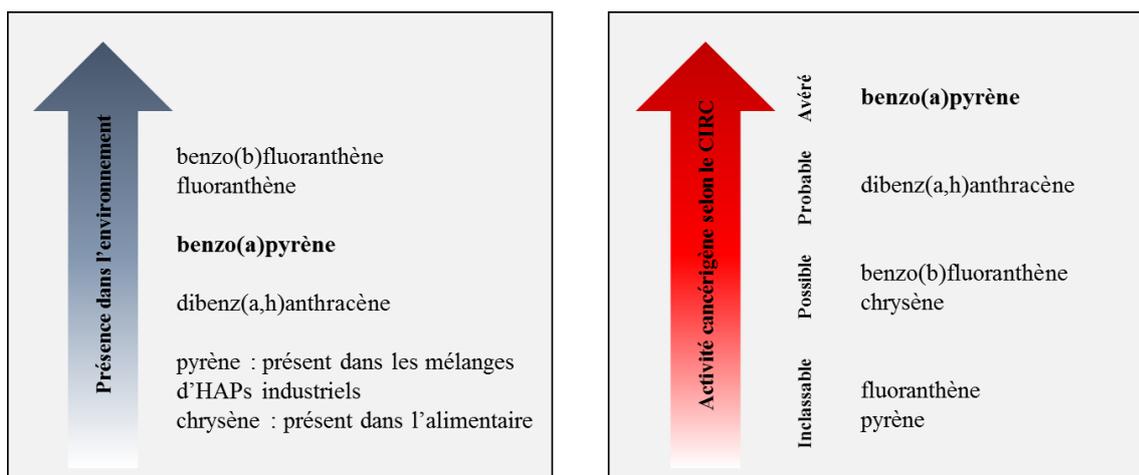


**Figure 43 : Schéma bilan des effets génotoxiques du B[a]P dans les lymphocytes T humains activés.** L'activation des lymphocytes T par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 conduit à une augmentation de l'expression d'un RAh fonctionnel. Le B[a]P, ligand de ce récepteur l'active et entraîne une augmentation des CYPs de la famille 1 conduisant à la bioactivation du B[a]P en composé réactif, le BPDE, capable de former des adduits à l'ADN en position N<sup>2</sup> de la guanine. L'exposition au B[a]P conduit à la formation de cassures double brin de l'ADN. Ces dommages activent la voie de signalisation de réponse au dommage dépendante d'ATM et conduit à un ralentissement du cycle cellulaire, ainsi qu'une activation du système de réparation RH. Cette réponse aux dommages favorise la survie des lymphocytes, mais n'empêche pas l'apparition de mutations.

### III.1.3. – Poursuite de l'étude

De manière générale, l'Homme n'est pas exposé à un seul HAP, mais à des mélanges d'HAPs (Rodgman *et al.*, 2000, Schubert *et al.*, 2003). En effet, cette famille regroupe plus d'une centaine de composés retrouvés dans l'environnement sous forme de mélanges plus ou moins complexes, dont la composition, tant qualitative que quantitative, dépend de nombreux paramètres (par exemple, la source de production et la température de combustion). Ces mélanges sont difficiles à caractériser et à mesurer. De plus, les données expérimentales disponibles étudient généralement l'effet d'un seul HAP et seule la toxicité d'un nombre restreint d'HAPs est actuellement documentée. Une des difficultés de l'étude des effets de mélanges complexes, est l'infinité de combinaisons qui participent à l'induction des effets observés (Carpenter *et al.*, 2002). Ainsi, l'évaluation du risque cancérigène de mélanges d'HAPs est à l'heure actuelle mal maîtrisée. L'évaluation du potentiel cancérigène de ces mélanges est principalement basée sur le B[a]P comme HAP de référence. Des facteurs d'équivalence toxique (TEFs) sont calculés en se basant sur la toxicité propre de chaque HAP et sont rapportés au potentiel toxique du B[a]P, dont le TEF est pris pour unité. Le calcul des TEFs se base d'une part sur les similitudes structurales entre les HAPs et sur l'hypothèse que tous possèdent comme mécanisme d'action toxique l'activation du RAh. Le calcul des TEFs, considère donc que les effets des HAPs composant le mélange, sont additifs et ne présentent pas d'interaction entre eux. Cependant, des incertitudes subsistent du fait notamment du manque de connaissance sur des interactions potentielles, pouvant conduire à la survenue d'effets synergiques ou antagonistes entre les HAPs du mélange (Nisbet et LaGoy, 1992).

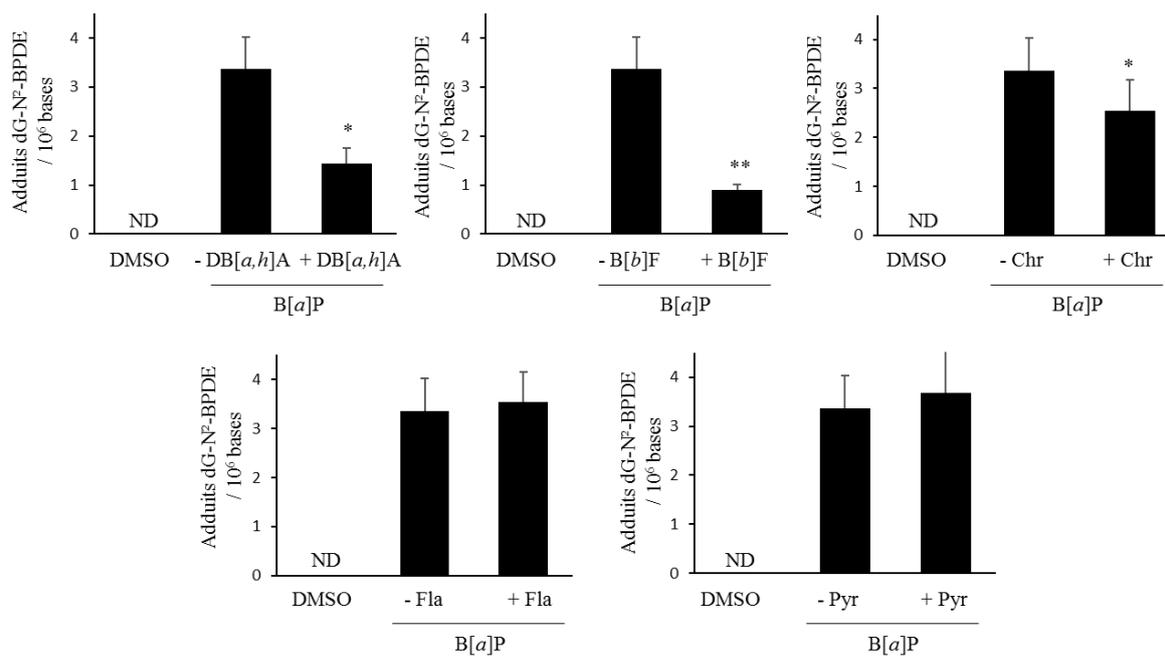
Afin d'approfondir les connaissances sur les effets génotoxiques combinés des HAPs, retrouvés dans les mélanges auxquels l'Homme est exposé, nous avons souhaité étudier les effets de cinq HAPs sur la modulation des effets génotoxiques du B[a]P dans les lymphocytes T humains en culture primaire. Les HAPs choisis pour cette étude sont : le dibenz(a,h)anthracène (DB[a,h]A), le benzo(b)fluoranthène (B[b]F), le fluoranthène (Fla), le pyrène (Pyr) et le chrysène (Chr). Ces HAPs ont été choisis en fonction de leur toxicité et leur présence relative dans l'environnement (**Figure 44**). Certains représentent des HAPs principalement retrouvés dans les mélanges d'expositions professionnelles (Pyr) d'autre dans l'alimentation (Chr). Ces cinq HAPs sont tous classés comme prioritaires par l'US-EPA (**Tableau 1**).



**Figure 44 : Différents HAPs choisis pour cette étude en fonction de leur présence dans l'environnement ainsi que de leurs effets cancérigènes selon le CIRC (CIRC, 2010).**

Nous avons choisi de travailler avec des mélanges binaires, pour avoir une approche bien contrôlée et plus mécanistique de l'impact des mélanges d'HAPs. Par ailleurs, nous réalisons nos mélanges en équimolaire toujours avec le B[a]P, qui se trouve (1) en proportion constante dans de nombreux mélanges d'HAPs (Bull et Collins, 2013) et (2) parce qu'il est le référent pour évaluer le potentiel cancérigène des HAPs en mélange. Ainsi, en comparant les réponses du B[a]P et celles de mélanges binaires, nous déterminerons comment la composition du mélange module la réponse du B[a]P et nous pourrions préciser les interactions au sein de ce mélange.

Nous avons commencé par caractériser la modulation des effets génotoxiques du B[a]P, en mesurant les niveaux d'adduits stables à l'ADN du BPDE en position N<sup>2</sup> de la guanine (dG-N<sup>2</sup>-BPDE) par HPLC-MS/MS, selon le même protocole que celui décrit dans l'article 1. Trois des cinq HAPs testés, le DB[a,h]A, le B[b]F et le Chr, entraînent une diminution significative de la quantité d'adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE, lors de co-expositions avec le B[a]P. Le Pyr et le Fla, quant à eux, ne modulent pas les niveaux de dG-N<sup>2</sup>-BPDE (Figure 45).



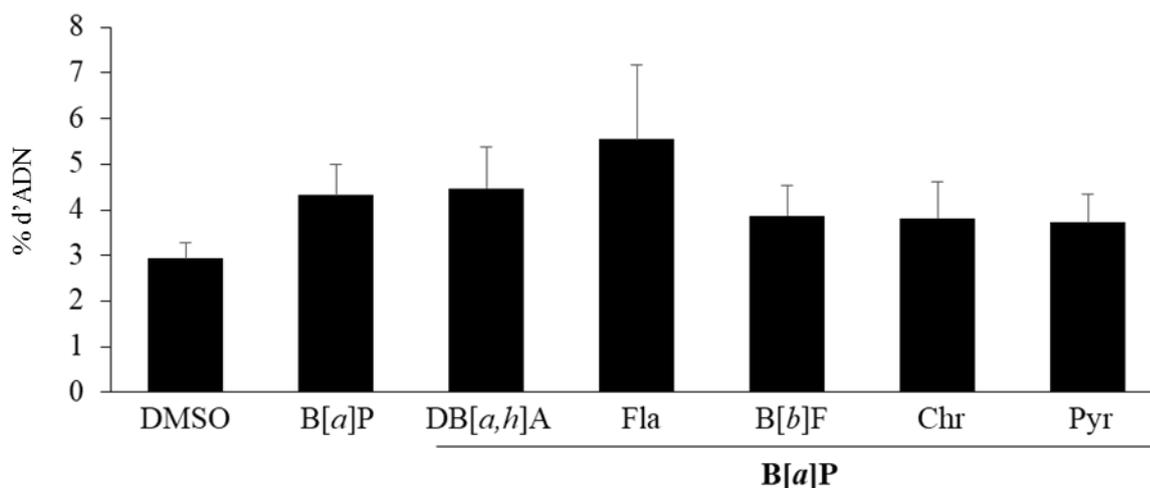
**Figure 45: Mesure du niveau d'adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE en présence d'autres HAPs.**

Des lymphocytes T humains en culture primaire ont été activés avec des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et exposés à 2  $\mu$ M de B[a]P et 2  $\mu$ M d'un autre HAP pendant les 48 dernières heures de culture. Les adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE ont été mesurés par HPLC-MS/MS. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM de six expériences indépendantes réalisées à partir de donneurs différents. \* $p < 0.05$  et \*\* $p < 0.01$  comparé à la condition B[a]P seul (Test de Student apparié, *t* test)

De façon intéressante, les trois HAPs diminuant les niveaux d'adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE sont classés comme cancérigènes probables (DB[a,h]A) ou possibles (B[b]F et Chr) par le CIRC (CIRC, 2010). De plus, ces HAPs possèdent une affinité pour le RAh plus importante que le B[a]P (DB[a,h]A et B[b]F) (Vondráček *et al.*, 2017). Le Fla et le Pyr qui ne modifient pas les niveaux d'adduits du B[a]P dans les lymphocytes T humains, ont été considérés par le CIRC comme agents inclassables quant à leur cancérogénicité (CIRC, 2010) et présentent une affinité très faible vis-à-vis du RAh (Vondráček *et al.*, 2017).

Nous avons ensuite mesuré la modulation des dommages à l'ADN induits par le B[a]P en présence d'un autre HAP à l'aide du test des comètes. Le B[a]P entraîne ici une légère augmentation, non statistiquement significative, du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète. Ce pourcentage lors de co-exposition avec un autre HAP ne varie pas de manière significative dans notre modèle. Une légère augmentation du pourcentage

d'ADN dans la queue de la comète est toutefois observée en présence de B[a]P et de Fla (Figure 46).

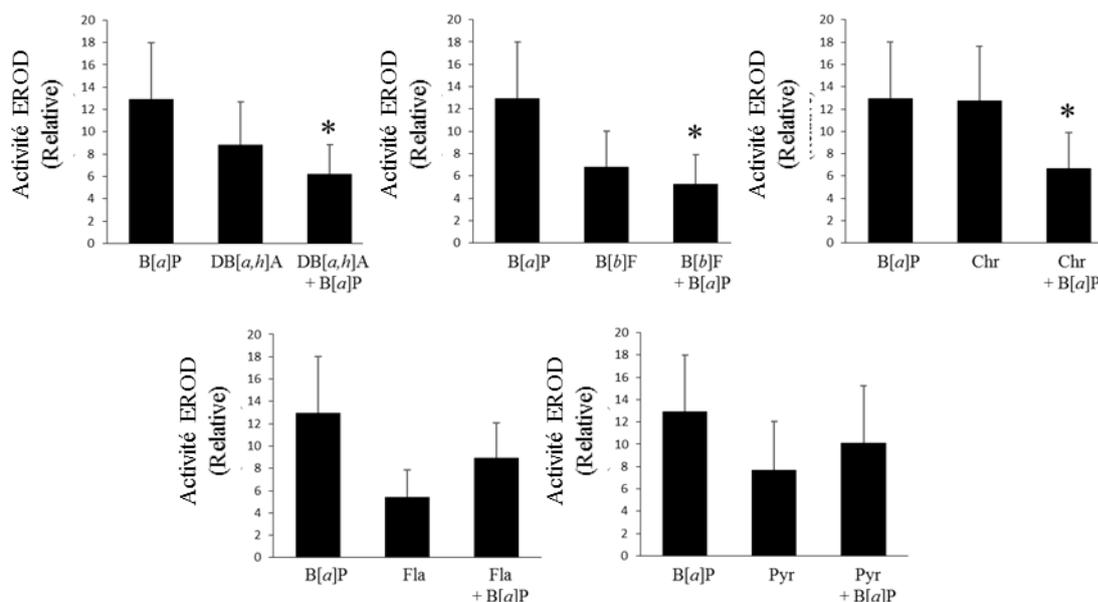


**Figure 46 : Mesure des dommages en présence de B[a]P seul ou en mélange avec d'autres HAPs.** Des lymphocytes T humains en culture primaire ont été activés avec des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et exposés à 2  $\mu$ M de B[a]P et 2  $\mu$ M d'un autre HAP pendant les 48 dernières heures de culture. Les niveaux de dommages à l'ADN ont été mesurés par le test des comètes. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue des comètes et représentent les moyennes  $\pm$  SEM de huit expériences indépendantes réalisées à partir de donneurs différents.

Le fait que trois HAPs (DB[a,h]A, B[b]F et Chr), soient capables de diminuer l'endommagement de l'ADN par le B[a]P par formation d'adduits sans qu'il y ait de variations du pourcentage de dommage détectés par le test des comètes, nous fait penser à la production d'autres lésions de l'ADN. La participation d'autres dommages que les adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE dans le déclenchement des cassures a déjà été rapporté pour le B[a]P (Park *et al.*, 2009). Dans cette étude, nous ne nous sommes intéressés uniquement qu'aux adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE, adduits majoritaires résultant du métabolisme du B[a]P par la voie du CYP1 et de l'époxyde hydrolase (Shiizaki *et al.*, 2013). Cependant, lors d'exposition à des mélanges, les compétitions entre les différents composés du mélange, aux niveaux des enzymes du métabolisme, peuvent orienter le métabolisme du B[a]P vers d'autres voies que celle-ci et favoriser la formation d'autres adduits à l'ADN (Shimada et Guengerich, 2006). De la même manière, les métabolites des autres HAPs peuvent aussi former des adduits à l'ADN pouvant participer au caractère génotoxiques de ces composés. Il serait alors intéressant de doser certains de ces adduits dans les conditions de co-expositions afin de vérifier si la diminution des niveaux d'adduits au B[a]P n'est pas accompagnée d'une augmentation des niveaux d'adduits résultant du métabolisme des

autres HAPs. Par exemple, les quatre énantiomères d'un des métabolites du DB[*a,h*]A, le 3,4-diol-1,2-époxyde présentent des effets mutagènes et sont capables de se lier à l'ADN (Chang *et al.*, 2013). Ainsi, le dosage de ces adduits pourrait permettre de caractériser un peu plus les effets génotoxiques des mélanges d'HAPs. Les dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes ne reflètent pas exclusivement leur formation, mais aussi les mécanismes de réparation agissant sur ces dommages (Marczynski *et al.*, 2011). Cette différence nous permet aussi d'évoquer une des faiblesses du test des comètes, son ultrasensibilité. En effet, ce test nous révèle les moindres variations survenues surtout pendant l'électrophorèse à l'origine de variations inter-expériences et inter-laboratoires observées. Nous avons toutefois manipulé nos échantillons avec soin et utilisé des contrôles internes pour l'évaluation de ces variations, notamment un même lot de PBMC utilisé à Toulouse et à Rennes validant le seuil des dommages détectés dans notre modèle.

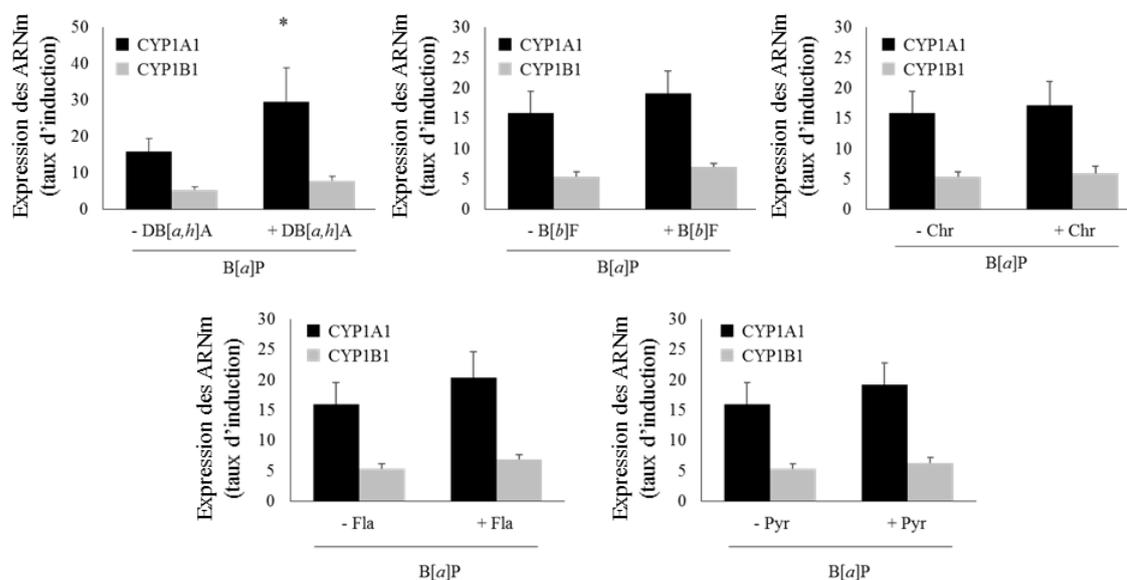
Comme les niveaux d'adduits à l'ADN dérivés du B[*a*]P pouvaient être modulés en présence d'un autre HAPs, nous avons poursuivi notre étude en analysant la modulation de l'activité métabolique induite par le B[*a*]P par un autre HAP. La mesure de l'activité EROD, induite par tous les HAPs selon l'ordre de puissance B[*a*]P > Chr > DB[*a,h*]A > Pyr > B[*b*]F > Fla, montre que, lors de co-expositions avec le B[*a*]P, seuls le DB[*a,h*]A, le B[*b*]F et le Chr sont capables de diminuer de manière significative l'activité induite par le B[*a*]P (**Figure 47**). Ces résultats reflètent bien ce qui était observé pour les adduits issus du B[*a*]P (**Figure 45**), et suggèrent une compétition des HAPs au niveau des CYPs. Ainsi, le DB[*a,h*]A aurait une affinité plus forte pour les CYPs que le B[*a*]P, mais induirait moins leur activité, expliquant à la fois la diminution de l'activité catalytique des CYPs, et la diminution des niveaux d'adduits à l'ADN dérivés du BPDE. Le Fla et le Pyr qui ne modulaient pas le taux d'adduits dérivés du B[*a*]P (**Figure 45**), diminuent aussi l'activité EROD induite par le B[*a*]P mais de manière non significative (**Figure 47**).



**Figure 47 : Activité métabolique des CYP1 en présence de différents HAPs, seuls ou en mélange binaire avec le B[a]P.** Des lymphocytes T humains en culture primaire ont été activés avec des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et exposés à 2  $\mu$ M de B[a]P et 2  $\mu$ M d'un autre HAP pendant les 48 dernières heures. L'activité EROD a été mesurée par spectrofluorimétrie. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM de cinq expériences indépendantes réalisées à partir de donneurs différents. \* $p < 0.05$  comparé à la condition B[a]P seul (Test ANOVA mesures répétées, suivi d'un test de Dunnett).

Parallèlement, l'analyse de l'expression des ARNm des CYP1A1 et 1B1 induits par les HAPs en mélange binaire avec le B[a]P (**Figures 48**) ne permet pas d'établir une corrélation avec les résultats obtenus pour l'activité EROD ou la mesure d'adduits. En effet, l'expression des ARNm des CYP1A1 et CYP1B1, induite par le B[a]P semble peu affectée par la co-exposition avec d'autres HAPs, sauf pour le CYP1A1 en présence DB[a,h]A. Des effets similaires ont été rapportés dans une lignée pulmonaire humaine, où les mélanges complexe d'HAPs, entraînaient une diminution des niveaux d'adduits à l'ADN dérivés du BPDE, tandis que les niveaux d'expression des gènes cibles du RAh (CYP1A1 et CYP1B1) n'étaient pas modifiés (Líbalová *et al.*, 2014). Par ailleurs, les études menées sur les effets génotoxiques des HAPs en mélange ont donné des résultats différents en fonction des types cellulaires. En effet, dans le foie, les niveaux d'adduits à l'ADN dérivés du BPDE sont augmentés lors d'exposition à des mélanges binaire d'HAPs (Tarantini *et al.*, 2011), en présence de DB[a,h]A ou de B[b]F. Enfin, les niveaux d'adduits à l'ADN dérivés du BPDE varient en fonction du statut en CYP1A1 et CYP1B1. De façon intéressante, il a été mis en évidence que le CYP1A1 participait plutôt aux mécanismes de détoxification et que le CYP1B1 était plutôt impliqué dans la

bioactivation du B[a]P (Sagredo *et al.*, 2006) et l'immunotoxicité induite par ce dernier (Uno *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que le CYP1B1 déterminait la susceptibilité du développement de lymphomes dans un modèle murin en présence d'HAPs (Buters *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la bioactivation du B[a]P et la formation d'adduits dG-N<sup>2</sup>-BPDE résultante, seraient plutôt liées à l'activité métabolique du CYP1B1 dans les lymphocytes T humains, et de façon intéressante le DB[a,h]A est considéré comme un très faible compétiteur de l'activité catalytique des CYP1A1 (IC<sub>50</sub>>1000 nM) mais comme un très fort compétiteur de l'activité du CYP1B1 (IC<sub>50</sub> 5,2 nM) (Shimada et Guengerich, 2006). De façon similaire, le B[b]F a été montré un compétiteur faible du CYP1A1 et du CYP1B1, avec un effet un peu moins fort pour le CYP1B1 que le DB[a,h]A (Shimada et Guengerich, 2006). Ainsi, les HAPs présentant une activité compétitrice importante seraient en mesure d'entraîner une diminution de la formation de BPDE dans la cellule avec pour conséquence une diminution des niveaux d'adduits à l'ADN.



**Figure 48 : Expression des CYP1A1 et CYP1B1 en présence de B[a]P seul ou en mélange binaire avec d'autres HAPs.** Des lymphocytes T humains en culture primaire ont été activés avec des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures et exposés à 2  $\mu$ M de B[a]P avec ou sans 2  $\mu$ M d'un autre HAP pendant les 48 dernières heures de culture. L'expression des CYP1A1 et CYP1B1 a été évaluée par RT-qPCR. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM de neuf expériences indépendantes réalisées en triplicata, réalisées à partir du sang de donateurs différents. \* $p$ <0.05 et \*\* $p$ <0.01 comparé à la condition B[a]P seul (Test de Student apparié,  $t$  test).

Ces données illustrent la complexité d'analyse des effets des mélanges et de réconciliation des données obtenus avec ceux-ci. Cette complexité est sûrement liée aux différents niveaux d'interactions cellulaire et moléculaire des HAPs. En effet, de nombreuses études toxicologiques rapportent qu'il est difficile de prédire aujourd'hui de manière formelle la toxicité d'un mélange de substances à partir de celle de chacun de ses composants. A l'heure actuelle il est recommandé de procéder à des études toxicologiques sur des modèles biologiques pertinents au regard de la physiologie humaine, afin de caractériser la nature et les mécanismes de l'effet mélange par rapport à celui des substances prises séparément.

**Cette partie nous a permis de mettre en évidence la modulation de la production d'adduits à l'ADN dérivés du B[a]P en présence d'autres HAPs tels que le DB[a,h]A, le B[b]F et le Chr, en lien avec leur capacité à inhiber l'activité des CYPs induite par le B[a]P. Il serait intéressant d'évaluer le potentiel mutagène des mélanges d'HAPs dans les lymphocytes T humains en culture primaire à l'aide du test Pig-A. En effet, l'évaluation des niveaux de mutations, induits par des composés cancérigènes ou suspectés de l'être, a été décrite comme la meilleure façon de mesurer le potentiel cancérigène de ces composés étant donné que la mutation est le produit final des dommages à l'ADN, impliqué dans la survenue de cancers (Poirier, 2016).**

## III.2 Article 2

### **Toxicogenomic signature of human T lymphocytes exposed to benzo[*a*]pyrene**

Marie LIAMIN, Hélène LE MENTEC, Bertrand EVRARD, Frédéric CHALMEL and  
Lydie SPARFEL

**En rédaction.**

## **Toxicogenomic signature of human T lymphocytes exposed to benzo[*a*]pyrene**

Marie Liamin<sup>1,2</sup>, Hélène Le Mentec<sup>1,2</sup>, Bertrand Evrard<sup>1</sup>, Frédéric Chalmel<sup>1</sup> and Lydie Sparfel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET - INSERM UMR 1085), 35000 Rennes, France;

<sup>2</sup>Université de Rennes 1, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, structure fédérative de recherche Biosit UMS CNRS 3480/US INSERM 018, 35043 Rennes, France ;

Corresponding author: Lydie Sparfel, IRSET– INSERM UMR 1085 Université de Rennes 1, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France. Telephone: +33 2 23 23 47 63; Fax: +33 2 23 23 47 94; e-mail: lydie.sparfel@univ-rennes1.fr

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor ; B[*a*]P, benzo[*a*]pyrene ; CTR, control ; CYPs, cytochromes P-450; DMSO, dimethylsulfoxide; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; IFN, interferon; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons

## **Abstract**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) such as benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), are widely distributed carcinogenic and immunotoxic environmental contaminants, known to affect T lymphocytes. Despite extensive studies conducted, the molecular targets and pathways involved in their immunotoxic effects in human T lymphocytes remain unknown. Here, we analysed the gene expression profile of primary human T lymphocytes treated by the prototypical PAH, B[*a*]P using a microarray-based transcriptome analysis. After a-48h exposure to B[*a*]P, we identified 158 genes differentially expressed in T lymphocytes including not only genes well-known to be affected by PAHs such as CYP1A1, CYP1B1, AHRR, NQO1 and TIPARP but also other ones not previously shown to be targeted by B[*a*]P. We further confirmed by RT-qPCR the altered expression levels of some of these genes including GJB2, GJB6, CABLES1, OLIG3, IFI44L, IFI44, OASL, IFIT2 or THY1. Functional enrichment analysis revealed that those candidates were significantly associated with the aryl hydrocarbon and interferon signalling pathways and with cellular movement and immune cell trafficking. These results then suggest that genes involved in T lymphocyte migration are significantly affected by exposure to B[*a*]P. Overall, the present study paves the way towards deciphering the molecular basis of the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons.

## 1. Introduction

Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) is a prototypical polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) that is formed by incomplete combustion of organic materials and found in large amounts in diet, air pollution, cigarette smoke and some occupational atmospheres (Hattemer-Frey and Travis, 1991). Human exposure to this commonly environmental contaminant has been correlated to various pathological situations such as cancer development, and inflammation contributing to cardiovascular and pulmonary diseases (Clark et al., 2012; Rubin, 2001). Therefore, B[*a*]P has been classified as a priority toxicant by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA), the World Health Organization (WHO) and the European Union. Most of the B[*a*]P-related toxic effects have been linked to the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and its subsequent binding to specific xenobiotic responsive elements found in the promoter of responsive genes (Hankinson, 1995). For example, the activation of the AhR-related signalling pathway by B[*a*]P results in the up-regulation of xenobiotic metabolizing enzymes such as cytochromes P-450 (CYPs) 1A1, 1A2 and 1B1, that, in turn bioactivate B[*a*]P into epoxide derivatives, which account in a major way for carcinogenic effects in several organs such as lung, liver and lymphoid tissue (de Vries et al., 1997).

Among cell types targeted by B[*a*]P, lymphocytes, in particular T cells expressing AhR and possessing CYP1-metabolizing system (Okano et al., 1979; Prigent et al., 2014), appear to be a major one. Early *in vitro* and *in vivo* studies using rodent models reported B[*a*]P-mediated immunotoxic effects such as suppression of antibody production in response to a T-dependent antigen (White et al., 1985), decrease in T-cell responses to mitogens (Wojdani and Alfred, 1984) or inhibition of cytotoxic T-lymphocyte generation and natural killer cell activity (Selgrade et al., 1988). Such alterations of immune resistance mechanisms that interfere with T lymphocyte functions has been postulated to facilitate the development of tumors in responsive animals (DEAN et al., 1983). In humans, B[*a*]P ability to modulate

immune function has been less characterized and data that specifically demonstrate immunosuppressive effects of B[a]P on response of human T lymphocytes are more limited (Davila et al., 1996; Mudzinski, 1993). Most studies using human T lymphocytes mainly reported the presence of DNA adducts occurring after B[a]P exposure that may influence cancer development (Gammon et al., 2002; Li et al., 1996). However, the link with T lymphocyte immune response remains unanswered. Recently, we have reported an up-regulation of AhR expression and activity in primary cultures of human T lymphocytes by the physiologically relevant T-cell stimulation approach by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Prigent et al., 2014). We have also demonstrated that this up-regulation is associated with an increased ability to metabolize PAHs such as B[a]P that produce specific DNA damage and increase mutation frequency (Liamin et al., 2017). Altogether, our data propose primary activated human T lymphocytes as a good model to analyse human health issues depending on the environment. Using a microarray-based transcriptome analysis of activated human T lymphocytes, the present study aims at characterizing global transcriptional alterations after exposure to B[a]P and identifying signalling pathways and biological functions affected by this PAH. Together these results gain a comprehensive insight into the immune response regulation after B[a]P exposure and support the hypothesis that this environmental contaminant fully exerts immunotoxic effects in human T lymphocytes.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Cell culture and treatment*

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from blood donor buffy coats (written consent for the use of blood samples for the research protocol obtained according to the regulation for blood transfusion of the French blood organization Etablissement Français du Sang, Rennes (France)) by Ficoll (Thermofischer Scientific, Braunschweig, Germany) gradient centrifugation. After separation of monocytes by a 1-h adhesion step, T lymphocytes were purified from nonadherent cells by negative selection using Dynabeads<sup>®</sup> Untouched<sup>™</sup> Human T Cells Kit (Thermofischer Scientific). T lymphocytes were cultured in RPMI medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 20 IU/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin, and 10% decompemented fetal calf serum (Thermofischer Scientific), and stimulated with Dynabeads<sup>®</sup> T-Expander beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Thermofischer Scientific) before a 48-h treatment with 2 µM B[a]P (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as previously reported (Liamin et al., 2017). B[a]P was used as stock solutions in dimethylsulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in culture medium was always < 0.2% v/v and control (CTR) cultures received vehicle containing the same dose of DMSO (CTR) as treated cultures.

### *2.2. Microarray experiments*

*RNA extraction.* Total RNA was isolated from T lymphocytes using the TRIzol method (Thermofischer Scientific) and then purified using a RNeasy Mini Kit with on-column RNase-free DNase digestion (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's protocol. RNA was next quantified with the nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Rockland, DE), and RNA integrity was assessed with RNA 6000 Nano LabChip kit using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA). Only RNA with an RNA integrity number  $> 9$  was used for further analysis (2100 expert software, Agilent Technologies). Independent T lymphocyte cultures isolated from 16 blood donors, each available in CTR (DMSO) and B[a]P-treated conditions were performed. Equal amounts of RNAs were pooled from these cultures to constitute four equimolar pools with four different blood donors *per* pool. Pooling small samples of cells for array analysis is considered advantageous in situations where the level of biological variation could be high compared to technical variation on the array (Kendzioriski et al., 2003; Sparfel et al., 2010).

*Microarray hybridization.* Total RNA was amplified and labelled using the Gene Chip™ WT PLUS Reagent Kit according to the manufacturer's instructions (ThermoFischer Scientific). For each sample, RNA pools were hybridized to Human Clariom™ S GeneChip (ThermoFischer Scientific). Arrays were immediately scanned, and images were analysed and rigorously quality controlled for hybridization artefacts.

*Data normalization.* The resulting CEL files were processed using the *oligo* package available performed in R/Bioconductor (Gentleman et al., 2004). Data were then normalized and background corrected using the SCAN.UPC package (Piccolo et al., 2013) with the Brainarray custom CDF file for directly mapping Affymetrix probe to Entrez gene identifiers (hta20\_Hs\_ENTREZG version 21.0.0) (Dai et al., 2005). The data were further quality controlled by box plots and correlation matrix (Suppl. Fig. 1). Data were uploaded to the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) repository under the accession number GSEXXX (Barrett et al., 2013).

### 2.3. Statistical filtration of differentially expressed genes

The statistical filtration of the genes differentially expressed between CTR and treated samples was performed using the Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN)

suite of tools (Chalmel and Primig, 2008). Briefly, we first filtered genes with at least one signal above the background expression cutoff ( $> 0.0$ ) and with a minimal variation of 10% between both experimental conditions as determined by the inflection point of the fold-change curve (Suppl. Fig. 2). Finally, a paired Student's t test ( $p \leq 0.05$ ) was used to identify significantly differentially expressed genes which were further classified into two expression patterns: down-regulated and up-regulated genes after B[a]P exposure.

#### 2.4. Functional analysis

*Enrichment analysis.* Enrichments were estimated by calculating the Fisher exact probability using the Gaussian hypergeometric test implemented in the AMEN suite (Chalmel and Primig, 2008). A given annotation term was considered enriched in a group of genes when the  $p$ -value (adjusted by the false discovery rate method) was  $\leq 0.01$  and the number of genes in this group bearing this annotation term was  $\geq 3$  (Suppl. Fig. 3).

*Ingenuity Pathway Analysis:* The Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Qiagen, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) was used to identify and associate signalling pathways and biological functions to the experimental results.

#### 2.5. RT-qPCR assays

Total RNA was isolated from the same independent T lymphocyte cultures isolated from 16 blood donors as used for microarray experiments using the TRIzol method (Thermofischer Scientific) and then reverse-transcribed into cDNA using the RT Applied Biosystems kit (Foster City, CA, USA). qPCR assays were performed using gene-specific primers from Eurogentec (Seraing, Belgium). The amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of

the total amount of cDNA tested to a 18S mRNA endogenous reference as previously described (Liamin et al., 2017).

## *2.6. Statistical analysis*

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical significance of the differences was assessed using GraphPad InStat (GraphPad software, INC., La Jolla, CA, USA) by paired Student's *t* test. Correlation between gene expression changes detected by RT-qPCR assays and corresponding changes detected by microarray experiments was analysed using Spearman's rank test. The criterion of significance was  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

Human T lymphocytes purified from healthy blood donors and activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 72 h mimicking physiological T cell activation (Prigent et al., 2014; Trickett and Kwan, 2003) were treated with DMSO (CTR) or B[a]P at a concentration of 2  $\mu$ M for the last 48 h. We previously reported that such treatment conditions trigger optimal activation of AhR leading to maximal response of target genes such as CYP1A1 and CYP1B1 without altering T lymphocyte viability (Liamin et al., 2017; Prigent et al., 2014), allowing us to examine the effects of B[a]P on gene expression profiles in these activated human T lymphocytes.

#### *3.1. B[a]P exposure alters the expression of 158 genes in human T lymphocytes.*

Using the criteria described in the Materials and Methods section, we were able to identify 158 genes displaying significant signal changes after a 48-h treatment with 2  $\mu$ M B[a]P (Fig. 1). The full list of these genes is given in supplementary Table 1. Among these differentially expressed genes, 97 and 61 were found to be up-regulated and down-regulated in B[a]P treated samples, respectively (Table 1). The top 15 most relevant up-regulated and down-regulated genes are summarized in Table 1. Among these genes, CYP1A1 and CYP1B1, which are known to be under the control of AhR (Hankinson, 1995) appear, as expected, as the top genes over-expressed after exposure to B[a]P, validating our experimental conditions.

#### *3.2. Expression profiles for selected candidate genes were validated by RT-qPCR analysis.*

##### *Verification of candidate gene expression by RT-qPCR*

We next performed RT-qPCR assays on the same samples to confirm transcriptional changes observed for candidate genes selected from the microarray-based transcriptome analysis. We thus selected the most significantly affected genes for further PCR experimental validations

including: CYP1A1, CYP1B1, GJB2, GJB6, TIPARP, TMEM167A, OLIG3, CABLES1, KIT and ASB2 for the 10 most up-regulated genes and IFI44L, COL6A3, IFI44, MCPH1, LYST, MX1, OASL, PRG4, IFIT2 and THY1 for the 10 most down-regulated ones. The direction of changes in mRNA expression determined by RT-qPCR closely matched the microarray data for all the genes tested, except for TMEM167A which showed a down-regulated expression instead of the expected induction (Fig. 2). Using RT-qPCR analysis, CYP1A1, CYP1B1, GJB2, GJB6, TIPARP, OLIG3, CABLES1, KIT and ASB2 transcriptional levels were found to be up-regulated after B[a]P exposure; the inductions reaching a significant level for all these genes except for OLIG3 and TIPARP (Fig. 2A). RT-qPCR analysis also confirmed the decrease in expression of the most down-regulated genes with a significant effect for IFI44L, IFI44, MX1, OASL, PRG4, IFIT2 and THY1 (Fig. 2B). We found that results from microarray experiments are significantly correlated with those from RT-q-PCR assays when considering these top20 most affected genes, with a Spearman's correlation coefficient of 0.802 (Fig. 3). We also selected classical housekeeping genes such as GAPDH and ACTB as negative controls and found, as expected, that they did not demonstrated differential expression after B[a]P exposure (data not shown). Altogether, the RT-qPCR validations confirmed the robustness of the microarray dataset.

### *3.3. Functional analysis revealed that B[a]P exposure alters migration of T lymphocytes in humans*

To investigate global signalling pathways and biological functions affected by B[a]P treatment, the 158 candidate genes whose expression levels were significantly altered in T lymphocytes after exposure to B[a]P were imported into the IPA tool. We first analysed the canonical pathways by IPA software and found that, unsurprisingly, 'AhR signalling' ( $p$ -value 5.81E-04) was the top pathway enriched in human T lymphocytes treated by B[a]P (data not

shown). A more detailed IPA analysis by submitting separately the 97 up-regulated and the 61 down-regulated transcripts revealed that ‘AhR signalling’, ‘Protein Kinase A signalling’, ‘Estrogen-mediated S-phase entry’ and ‘Cell cycle: G1/S checkpoint regulation’ pathways are the four most significant pathways in the up-regulated gene set whereas, for the down-regulated genes, it is the ‘interferon (IFN) signalling’, the ‘granulocyte adhesion and diapedesis’, the ‘role of pattern recognition receptors in recognition of bacteria and viruses’, and ‘activation of IRF by cytosolic pattern recognition receptors’ pathways (Table 2). Among genes belonging to ‘AhR signalling’, we recently reported the regulation of CYP1A1, CYP1B1 and CDKN1A in human T lymphocytes after exposure to B[a]P (Liamin et al., 2017). AhRR, CCNE2 and NQO1 have already been reported to be robust target of B[a]P but, in cell types distinct from primary T lymphocytes (Bernshausen et al., 2006; Brauze et al., 2017). We then performed the RT-qPCR-based validation of these genes using twelve individual RNA samples isolated from CTR and B[a]P treated T lymphocytes established from the same subjects used in the pool (Fig. 4A). Interestingly, ‘IFN signalling’ and ‘activation of IRF by cytosolic pattern recognition receptors’ pathways were closely associated with genes that exhibited significant down-regulation in human T lymphocytes treated with B[a]P (Table 2). We thus validated by RT-qPCR analysis the unexpected down-regulation of IFIT3, MX1, OAS1 which are all related to ‘IFN signalling’ and those of DDX58, IFIH1 and IFIT2 belonging to ‘activation of IRF by cytosolic pattern recognition receptors’ (Fig. 4B). A significant effect was observed for IFIT3, MX1, DDX58 and IFIT2 using the same twelve RNA samples as for AhR signalling-related genes (Fig. 4B). We next identified the significant biological functions and diseases associated with the set of 158 genes affected by B[a]P treatment. As shown in Table 3, the five most significant disease and disorder biological functions associated with B[a]P-modulated genes in T lymphocytes were cancer, haematological disease, immunological disease, organismal injury and abnormalities,

and antimicrobial response. Cellular movement, cell death and survival, cellular function and maintenance, cell-to-cell signalling and interaction and cellular growth and proliferation were the top five significant molecular and cellular functional categories altered after B[a]P treatment of human T lymphocytes (Table 3). Immune cell trafficking, haematological system development and function, tissue morphology, digestive system development and function and lymphoid tissue structure and development were the five most significant categories in physiological development and system function associated with B[a]P-modulated genes in T lymphocytes (Table 3). Interestingly, IPA functional analysis revealed the prominence of the cellular movement and immune cell trafficking-related categories for enrichment of the regulated genes. Indeed, we found a significant altered expression of a considerable number of genes associated with adhesion of immune cells and recruitment of lymphocytes, the majority of which involved in T cell migration. Based upon our analysis and our T cell migration interest, twelve genes were selected for validation by RT-qPCR analysis using the same four RNA pools used for microarray experiment (Table 4). We confirmed the up-regulation of IL-22, CXCR5, S1PR1, CD226, GPR15 and SOS1, as well as the down-regulation of DDX58, CCL3, SELL, OSM and ANXA1, in human T lymphocytes treated with B[a]P (Table 4). Whether IL-22 and CXCR5 have been already described as B[a]P-target genes, the other ones, *i.e.*, S1PR1, CD226, DDX58, CCL3, SELL, OSM, GPR15, SOS1 and ANXA1 appear as novel B[a]P targets highlighting the possible interplay between B[a]P exposure and altered migration of T lymphocytes.

## Discussion

The aim of the present study was to characterize the global transcriptional responses of human T lymphocytes to B[a]P. The use of whole arrays-based transcriptomic study permits a large scale analysis without *a priori* selection, and provides a wide picture of gene expression in the treated cells. Some large-scale studies have already examined gene expression regulation after B[a]P treatment, but most of these microarrays-based transcriptomic analyses have been performed using human transformed cell lines or rodent cells (Hockley et al., 2006, 2007; de Waard et al., 2008), opening the question of the relevance of the data obtained in these studies to human normal cells and tissues. Data obtained using primary human cultures, which are normal non-transformed human cells, may be consequently more adequate to better characterize the response of normal human cells/tissues to environmental contaminants such as B[a]P. We also recently showed that physiological activation of human T lymphocytes by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies is of great interest towards the exposure to PAHs (Liamin et al., 2017). Such a T-cell activation is an established state-of-the art method for fundamental studies such as gene expression as previously reported (Raghavan et al., 2002). Additionally, human T cells such as Jurkat appear not able to elicit a significant response to environmental contaminant without the help of antigen-presenting cells (Riechelmann et al., 2007). To the best of our knowledge, our study provides the first insight into the global transcriptional activity that underlie the effects of B[a]P on activated primary human T lymphocytes, a relevant model for human health issues.

Our microarray data indicated that a 48-h treatment with B[a]P resulted in 158 genes significantly regulated in primary human T lymphocytes, representing more less 1 % of the analysed genes. In the present study, the number of responsive genes appears modest. We cannot exclude that other treatment conditions in terms of timing could result in an amplified effect on T lymphocytes. Moreover, gene expression has been previously reported to be

tightly regulated in activated human T lymphocytes through rapid mRNA decay as a part of an homeostatic mechanism to down-modulate an immune response, reflecting transient responses in this model (Raghavan et al., 2002). Except for the AhR target genes, CYP1A1 and CYP1B1 (Hankinson, 1995), few of the 158 differentially expressed transcripts displayed strong amplitude in the changes observed. Compression of level expression in microarray has been already reported (Ambroise et al., 2011) and could be due to stringent normalization conditions. Nevertheless, our study identified 158 transcripts that were differentially regulated in human T lymphocytes after a 48-h treatment with B[a]P, whose changes in microarray experiments were significantly correlated with those found in RT-qPCR assays, demonstrating the global robustness of our transcriptomic analysis.

Among genes identified by our study, some have been already described to be targeted by B[a]P in various cell types distinct from lymphocytes. It is notably the case for CYP1A1, CYP1B1, FDXR, NQO1, CDKN1A, AhRR, ASB2 or TIPARP up-regulated genes (Bernshausen et al., 2006; Hockley et al., 2006, 2007; Keshava et al., 2005; Sparfel et al., 2010) and MX1 or SLC25A37 down-regulated ones (Keshava et al., 2009; Lu et al., 2009), which therefore can appear as robust PAH targets. Many target genes reported in the present work have however not been identified in previous studies investigating the transcriptional signature of PAHs in different cell types, which likely supports the concept of cell-specific genomic response to PAHs (Frericks et al. 2006) and discards the idea of a universal battery of AhR-responsive genes. Moreover, we previously analysed the transcriptional signature of human macrophages exposed to B[a]P (Sparfel et al., 2010) and found that the degree of overlap between B[a]P-induced expression profiles of macrophages and T lymphocytes is surprisingly small, reinforcing the idea that the majority of transcriptional responses are cell type-specific. Nevertheless, AhR- and p53-target genes such as CYP1A1, CYP1B1, AhRR, ASB2 or CDKN1A and RRM2B were the genes modulated in both type of cells, both

encoding enzymes important in the detoxication and the DNA damage response induced after B[a]P exposure (Liamin et al., 2017; Sparfel et al., 2010). Interestingly, our study allow us to identify novel B[a]P target genes such as GJB2, GJB6, CABLES1, OLIG3, IFI44L, IFI44, OASL, IFIT2 or THY1. Further investigations are needed to clarify the potential of these genes as new biomarkers of exposure to PAHs.

Beyond the identification of individual genes, our analysis also focused on the identification and characterization of biological functions altered after treatment of human T lymphocytes with B[a]P. Whether the activation of the two canonical pathways AhR and p53 signalling was expected as recently reported by our data showing CYP1A1, CYP1B1 or CDKN1A regulations in our model (Liamin et al., 2017), the prominence of the IFN signalling pathway for enrichment of the down-regulated genes was surprising. IFNs are cytokines having important physiological and pathological roles in infection and cancers (Negishi et al., 2017). Several links have been already proposed between aromatic hydrocarbons exposure and modulation of IFN signalling, for example in atherogenesis in response to B[a]P treatment (Johnson et al., 2003) or during viral infection explaining the severity of inflammatory lung diseases after exposure to dioxins (Neff-LaFord et al., 2007). More recently, Guan *et al.* (Guan et al., 2017) reported a suppression of IFN $\gamma$  production by B[a]P in activated mouse T lymphocytes, contributing to its immunotoxic effects. Additionally, our study identify T lymphocyte migration as a novel biological function and ‘agranulocyte adhesion and diapedesis’ as a dominant pathway (data not shown) regulated after treatment of human T lymphocytes with B[a]P for 48 h. T cell migration is an essential process in both lymphocyte homing and recruitment to site of infection to initiate an immune response (Krummel et al., 2016). Since our microarray study revealed some genes associated with transendothelial migration and as endothelial cells act as partners for cell-cell interactions serving as a major regulation of the T lymphocyte trafficking process (Carman

and Martinelli, 2015), further investigation is required to study the impact of B[a]P on transendothelial T lymphocyte migration and its contribution to immunotoxicity of this PAH.

### **Acknowledgements**

This work was supported by The French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES with the support of the Cancer TMOI of the French National Alliance for Life and Health Sciences (AVIESAN) (2014/1/052). Marie Liamin is a recipient of ANSES. The authors are grateful to Dr Elisa Boutet and Dr Laurence Huc (Toxalim Toulouse, France) for providing access to Ingenuity Pathway Analysis.

## Figure legends

**Fig. 1: Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in B[a]P-treated T lymphocytes.** (A) A flow chart outlines our procedure to filter genes that display statistically significant signal changes when DMSO (CTR) and B[a]P-treated samples were compared. (B) A heatmap provides an overview of the 97 up-regulated and the 61 down-regulated mRNA signal intensities obtained with the four replicate DMSO (CTR) and B[a]P-treated pools.

**Fig. 2: Validation by RT-qPCR analysis of the 10 most significantly up-regulated (A) and the 10 most significantly down-regulated (B) genes identified by microarrays after treatment of human T lymphocytes with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h.** T lymphocytes activated for 72 h were treated with DMSO (CTR) or with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 48 h of culture. mRNA expression was analyzed using RT-qPCR. Data are expressed relative to mRNA expression level in CTR T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments performed on the same pools of RNAs isolated from CTR or B[a]P-treated cultures established from 16 blood donors (four donors contributing equally to each pool) as in microarray experiments with triplicate *per* experiment. \* $p < 0.05$  when compared with CTR T lymphocytes (paired Student's t test).

**Fig. 3: Correlation between fold change factors for B[a]P-mediated gene expression alterations from the microarray analysis *versus* those from RT-qPCR assays.** RT-qPCR values included in this correlation were those found in Fig. 2. Spearman's  $\rho$  correlation coefficient and  $p$ -value are indicated on the right.

**Fig. 4: Validation by RT-qPCR analysis of AhR (A) and IFN (B) signaling-related genes identified by microarrays after treatment of human T lymphocytes with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h.** T lymphocytes activated for 72 h were treated with DMSO (CTR) or with 2  $\mu$ M B[a]P for the last 48 h of culture. mRNA expression was analyzed using RT-qPCR. Data are expressed relative to mRNA expression level in CTR T lymphocytes, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as mean  $\pm$  SEM of twelve independent experiments performed on individual RNAs isolated from CTR or B[a]P-treated cultures established from the same blood donors as in microarray experiments with triplicate *per* experiment. \* $p < 0.05$  when compared with CTR T lymphocytes (paired Student's t test).

## References

- Ambroise, J., Bearzatto, B., Robert, A., Govaerts, B., Macq, B., and Gala, J.L. (2011). Impact of the spotted microarray preprocessing method on fold-change compression and variance stability. *BMC Bioinformatics* 12, 413.
- Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Holko, M., et al. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 41, D991-995.
- Bernshausen, T., Jux, B., Esser, C., Abel, J., and Fritsche, E. (2006). Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch. Toxicol.* 80, 206–211.
- Brauze, D., Zawierucha, P., Kiwerska, K., Bednarek, K., Oleszak, M., Rydzanicz, M., and Jarmuz-Szymczak, M. (2017). Induction of expression of aryl hydrocarbon receptor-dependent genes in human HepaRG cell line modified by shRNA and treated with  $\beta$ -naphthoflavone. *Mol. Cell. Biochem.* 425, 59–75.
- Carman, C.V., and Martinelli, R. (2015). T Lymphocyte–Endothelial Interactions: Emerging Understanding of Trafficking and Antigen-Specific Immunity. *Front. Immunol.* 6.
- Chalmel, F., and Primig, M. (2008). The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics* 9, 86.
- Clark, J.D., Serdar, B., Lee, D.J., Arheart, K., Wilkinson, J.D., and Fleming, L.E. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and serum inflammatory markers of cardiovascular disease. *Environ. Res.* 117, 132–137.
- Dai, M., Wang, P., Boyd, A.D., Kostov, G., Athey, B., Jones, E.G., Bunney, W.E., Myers, R.M., Speed, T.P., Akil, H., et al. (2005). Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res.* 33, e175.
- Davila, D.R., Romero, D.L., and Burchiel, S.W. (1996). Human T cells are highly sensitive to suppression of mitogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and this effect is differentially reversed by alpha-naphthoflavone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 333–341.
- DEAN, J.H., LUSTER, M.I., BOORMAN, G.A., LAUER, L.D., and WARD, E.C. (1983). Immunotoxicity of Tumor Promoting Environmental Chemicals and Phorbol Diesters. In *Advances in Immunopharmacology*, J.W. HADDEN, L. CHEDID, P. DUKOR, F. SPREAFICO, and D. WILLOUGHBY, eds. (Amsterdam: Pergamon), pp. 23–31.
- Frericks, M., Meissner, M., and Esser C. (2007). Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 320-332.
- Gammon, M.D., Santella, R.M., Neugut, A.I., Eng, S.M., Teitelbaum, S.L., Paykin, A., Levin, B., Terry, M.B., Young, T.L., Wang, L.W., et al. (2002). Environmental toxins and breast cancer on Long Island. I. Polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 11, 677–685.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.

Guan, S., Huang, Y., Feng, Z., Xu, L., Jin, Y., and Lu, J. (2017). The toxic effects of benzo[a]pyrene on activated mouse T cells in vitro. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 39, 117–123.

Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 307–340.

Hattemer-Frey, H.A., and Travis, C.C. (1991). Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicol. Ind. Health* 7, 141–157.

Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Giddings, I., and Phillips, D.H. (2006). Time- and concentration-dependent changes in gene expression induced by benzo(a)pyrene in two human cell lines, MCF-7 and HepG2. *BMC Genomics* 7, 260.

Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Te Poele, R., Workman, P., Giddings, I., and Phillips, D.H. (2007). AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797–1810.

Johnson, C.D., Balagurunathan, Y., Lu, K.P., Tadesse, M., Falahatpisheh, M.H., Carroll, R.J., Dougherty, E.R., Afshari, C.A., and Ramos, K.S. (2003). Genomic profiles and predictive biological networks in oxidant-induced atherogenesis. *Physiol. Genomics* 13, 263–275.

Kenzdorski, C.M., Zhang, Y., Lan, H., and Attie, A.D. (2003). The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostat. Oxf. Engl.* 4, 465–477.

Keshava, C., Whipkey, D., and Weston, A. (2005). Transcriptional signatures of environmentally relevant exposures in normal human mammary epithelial cells: benzo[a]pyrene. *Cancer Lett.* 221, 201–211.

Keshava, C., Divi, R.L., Einem, T.L., Richardson, D.L., Leonard, S.L., Keshava, N., Poirier, M.C., and Weston, A. (2009). Chlorophyllin significantly reduces benzo[a]pyrene-DNA adduct formation and alters cytochrome P450 1A1 and 1B1 expression and EROD activity in normal human mammary epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 134–144.

Krummel, M.F., Bartumeus, F., and Gérard, A. (2016). T-cell Migration, Search Strategies and Mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 193–201.

Li, D., Wang, M., Cheng, L., Spitz, M.R., Hittelman, W.N., and Wei, Q. (1996). In vitro induction of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer. *Cancer Res.* 56, 3638–3641.

Liamin, M., Boutet-Robinet, E., Jamin, E.L., Fernier, M., Khoury, L., Kopp, B., Le Ferrec, E., Vignard, J., Audebert, M., and Sparfel, L. (2017). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 137, 113–124.

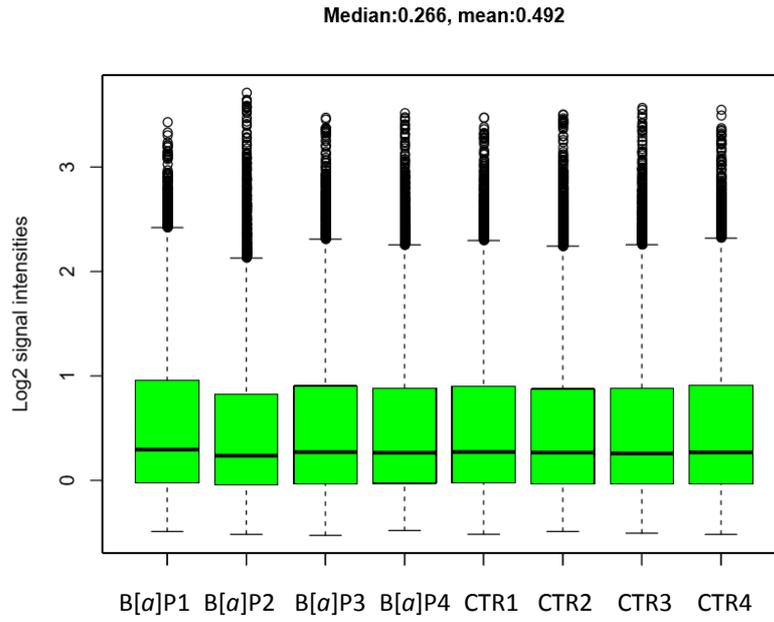
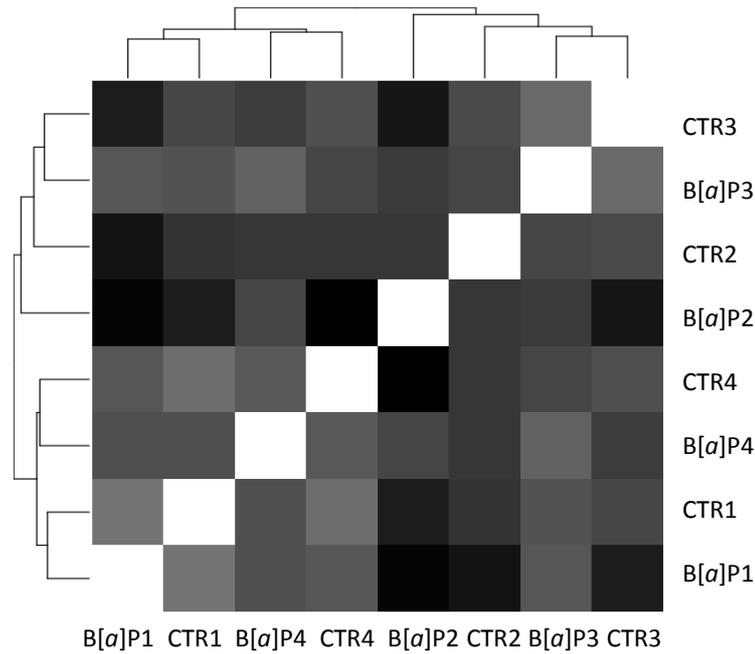
- Lu, X., Shao, J., Li, H., and Yu, Y. (2009). Early whole-genome transcriptional response induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in a normal human cell line. *Genomics* 93, 332–342.
- Mudzinski, S.P. (1993). Effects of benzo[a]pyrene on concanavalin A-stimulated human peripheral blood mononuclear cells in vitro: inhibition of proliferation but no effect on parameters related to the G1 phase of the cell cycle. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119, 166–174.
- Neff-LaFord, H., Teske, S., Bushnell, T.P., and Lawrence, B.P. (2007). Aryl hydrocarbon receptor activation during influenza virus infection unveils a novel pathway of IFN-gamma production by phagocytic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 247–255.
- Negishi, H., Taniguchi, T., and Yanai, H. (2017). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Okano, P., Miller, H.N., Robinson, R.C., and Gelboin, H.V. (1979). Comparison of benzo(a)pyrene and (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene metabolism in human blood monocytes and lymphocytes. *Cancer Res.* 39, 3184–3193.
- Piccolo, S.R., Withers, M.R., Francis, O.E., Bild, A.H., and Johnson, W.E. (2013). Multiplatform single-sample estimates of transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17778–17783.
- Prigent, L., Robineau, M., Jouneau, S., Morzadec, C., Louarn, L., Vernhet, L., Fardel, O., and Sparfel, L. (2014). The aryl hydrocarbon receptor is functionally upregulated early in the course of human T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* 44, 1330–1340.
- Raghavan, A., Ogilvie, R.L., Reilly, C., Abelson, M.L., Raghavan, S., Vasdewani, J., Krathwohl, M., and Bohjanen, P.R. (2002). Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 30, 5529–5538.
- Riechelmann, H., Deutsche, T., Grabow, A., Heinzow, B., Butte, W., and Reiter, R. (2007). Differential response of Mono Mac 6, BEAS-2B, and Jurkat cells to indoor dust. *Environ. Health Perspect.* 115, 1325–1332.
- Rubin, H. (2001). Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 22, 1903–1930.
- Selgrade, M.J., Daniels, M.J., Burlison, G.R., Lauer, L.D., and Dean, J.H. (1988). Effects of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, benzo[a]pyrene and cyclosporin A on murine cytomegalovirus infection: studies of resistance mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.* 10, 811–818.
- Sparfel, L., Pinel-Marie, M.-L., Boize, M., Koscielny, S., Desmots, S., Pery, A., and Fardel, O. (2010). Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 114, 247–259.
- Trickett, A., and Kwan, Y.L. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* 275, 251–255.

de Vries, A., Dollé, M.E., Broekhof, J.L., Muller, J.J., Kroese, E.D., van Kreijl, C.F., Capel, P.J., Vijg, J., and van Steeg, H. (1997). Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lacZ transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: correlation with tumour development. *Carcinogenesis* 18, 2327–2332.

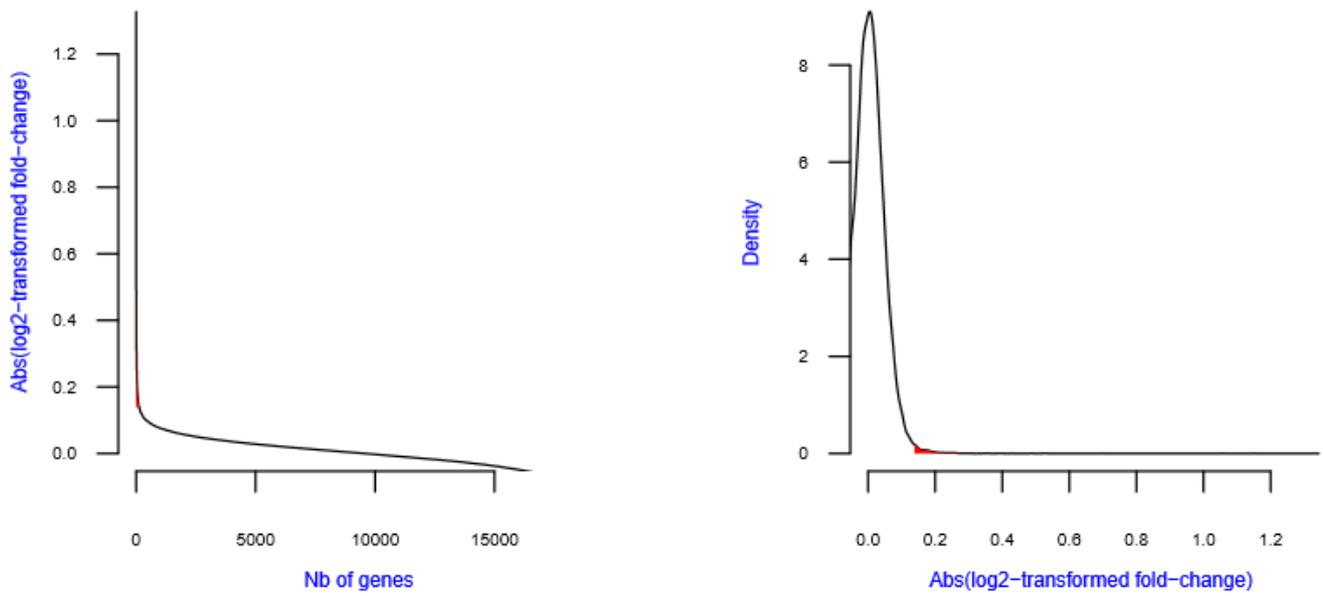
de Waard, W.J., Aarts, J.M.M.J.G., Peijnenburg, A. a. C.M., Baykus, H., Talsma, E., Punt, A., de Kok, T.M.C.M., van Schooten, F.J., and Hoogenboom, L. a. P. (2008). Gene expression profiling in Caco-2 human colon cells exposed to TCDD, benzo[a]pyrene, and natural Ah receptor agonists from cruciferous vegetables and citrus fruits. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 22, 396–410.

White, K.L., Lysy, H.H., and Holsapple, M.P. (1985). Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: a structure-activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacology* 9, 155–164.

Wojdani, A., and Alfred, L.J. (1984). Alterations in cell-mediated immune functions induced in mouse splenic lymphocytes by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 44, 942–945.

**A****B**

**Suppl Fig. 1: Quality control for microarray data.** The variations between the arrays were visualized by box plots (A) and correlation matrix (B).



**Suppl Fig. 2: Selection criteria for microarray data.** The filtered genes with at least one signal above the background expression cutoff (= 0.0) and with a minimal variation of 10% between both experimental conditions were determined by the inflection point of the fold change curve.

Depleted	p-value		Enriched	
	1	0.95 0.05		
				20170401_STEP4 20170401_STEP4.
<b>biological_process (27 terms)</b>	17287	55	93	
0002376 immune system process	2484	28 / 8	17 / 13	
0051607 defense response to virus	179	9 / 1	1 / 1	
0006955 immune response	1627	21 / 5	7 / 9	
0045087 innate immune response	658	14 / 2	1 / 4	
0060337 type I interferon signaling pathway	66	6 / 0	0 / 0	
0019221 cytokine-mediated signaling pathway	609	12 / 2	4 / 3	
0009605 response to external stimulus	1819	19 / 6	19 / 10	
0071346 cellular response to interferon-gamma	125	6 / 0	0 / 1	
0071310 cellular response to organic substance	2114	19 / 7	19 / 11	
0002683 negative regulation of immune system proc	398	8 / 1	6 / 2	
0007166 cell surface receptor signaling pathway	2242	19 / 7	21 / 12	
0050708 regulation of protein secretion	418	8 / 1	2 / 2	
0002252 immune effector process	998	12 / 3	5 / 5	
0032647 regulation of interferon-alpha production	24	3 / 0	0 / 0	
0015908 fatty acid transport	68	4 / 0	0 / 0	
0060333 interferon-gamma-mediated signaling path	71	4 / 0	0 / 0	
0044763 single-organism cellular process	10027	29 / 32	75 / 54	
0051716 cellular response to stimulus	6258	28 / 20	54 / 34	
0044707 single-multicellular organism process	5557	19 / 18	49 / 30	
0048513 animal organ development	2934	12 / 9	32 / 16	
0050794 regulation of cellular process	10661	42 / 34	76 / 57	
0048523 negative regulation of cellular process	4476	22 / 14	43 / 24	
0009966 regulation of signal transduction	2847	10 / 9	32 / 15	
0048514 blood vessel morphogenesis	375	3 / 1	10 / 2	
0007154 cell communication	5341	25 / 17	49 / 29	
0051057 positive regulation of small GTPase mediat	53	0 / 0	5 / 0	
0034754 cellular hormone metabolic process	108	1 / 0	6 / 1	
<b>KEGG_PATHWAY (3 terms)</b>	7349	29	44	
p53 signaling pathway (KEGG:04115)	67	0 / 0	7 / 0	
FoxO signaling pathway (KEGG:04068)	132	1 / 1	7 / 1	
Pathways in cancer (KEGG:05200)	391	2 / 2	10 / 2	

**Suppl Fig. 3: Enrichment analysis for microarray data.** Enrichment were estimated by calculating the Fischer exact probability using the Gaussian hypergeometric test implemented in the AMEN suite. A given annotation term was considered enriched in a group of genes when the p-value (adjusted by the false discovery rate method) was  $\leq 0.01$  and the number of genes in this group bearing this annotation term was  $\geq 3$ .

**Genes differentially regulated after treatment of human T lymphocytes with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h**

ID	GeneName	Description	Differential expression (log-2)
23461	ABCA5	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5;ATP-binding cassette A5	0.142
10257	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4;MRP/cMOAT-related ABC transporter;bA464I2.1 (ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4);canalicular multispecific organic anion transporter (ABC superfamily);multi-specific organic anion transporter B	-0.141
2180	ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1;LACS 1;LACS 2;acyl-CoA synthetase 1;fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 1;fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 2;lignoceroyl-CoA synthase;long-chain acyl-CoA synthetase 1;long-chain acyl-CoA synthetase 2;long-chain fatty acid-CoA ligase 2;long-chain fatty-acid-coenzyme A ligase 1;palmitoyl-CoA ligase 1;palmitoyl-CoA ligase 2;palmitoyl-CoA ligase 1	-0.160
115	ADCY9	adenylate cyclase 9;ATP pyrophosphate-lyase 9;adenylate cyclase type IX;adenylyl cyclase 9;type IX ATP pyrophosphate-lyase	0.178
119	ADD2	adducin 2 (beta);erythrocyte adducin subunit beta	0.155
976	ADGRE5	adhesion G protein-coupled receptor E5;CD97 molecule;leukocyte antigen CD97;seven transmembrane helix receptor;seven-span transmembrane protein;seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation	-0.138
9289	ADGRG1	adhesion G protein-coupled receptor G1;7-transmembrane protein with no EGF-like N-terminal domains-1;G protein-coupled receptor 56	0.346
133	ADM	adrenomedullin;preproadrenomedullin;proadrenomedullin N-20 terminal peptide	0.196
3899	AFF3	AF4/FMR2 family, member 3;MLLT2-related protein;lymphoid nuclear protein 4;lymphoid nuclear protein related to AF4;protein LAF-4	-0.140
57491	AHRR	aryl-hydrocarbon receptor repressor;ahR repressor;aryl hydrocarbon hydroxylase regulator;class E basic helix-loop-helix protein 77;dioxin receptor repressor	0.156
301	ANXA1	annexin A1;annexin I (lipocortin I);annexin-1;calpactin II;calpactin-2;chromobindin-9;phospholipase A2 inhibitory protein	-0.158
10123	ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C;ADP ribosylation factor-like protein 7;ADP-ribosylation factor-like 7;ADP-ribosylation factor-like protein 7;ADP-ribosylation factor-like protein LAK	0.186
51676	ASB2	ankyrin repeat and SOCS box containing 2;ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2a	0.388
55252	ASXL2	additional sex combs like transcriptional regulator 2;additional sex combs like 2;additional sex combs-like protein 2;polycomb group protein ASXH2	-0.177
80162	ATHL1	ATH1, acid trehalase-like 1 (yeast)	0.161
55509	BATF3	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3;21 kDa small nuclear factor isolated from T-cells;21-kD small nuclear factor isolated from T cells;B-ATF-3;Jun dimerization protein 1;Jun dimerization protein p21SNFT	-0.158
353500	BMP8A	bone morphogenetic protein 8a;BMP-8A	-0.204
664	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	0.166
53838	C11orf24	chromosome 11 open reading frame 24	0.144
128346	C1orf162	chromosome 1 open reading frame 162	-0.160
203228	C9orf72	chromosome 9 open reading frame 72	-0.141

91768	CABLES1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1;interactor with CDK3 1	0.426
800	CALD1	caldesmon 1	0.184
6348	CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3;G0/G1 switch regulatory protein 19-1;PAT 464.1;SIS-beta;macrophage inflammatory protein 1-alpha;small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a);tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein	-0.177
414062	CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3;G0/G1 switch regulatory protein 19-2;LD78-beta(1-70);chemokine (C-C motif) ligand 3-like, centromeric;small inducible cytokine A3-like 1;tonsillar lymphocyte LD78 beta protein	-0.145
9560	CCL4L2	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2;MIP-1-beta;macrophage inflammatory protein 1-beta;macrophage inflammatory protein-1b2;monocyte adherence-induced protein 5-alpha;small inducible cytokine A4-like	-0.203
83605	CCM2	cerebral cavernous malformation 2;malcavernin	0.169
9134	CCNE2	cyclin E2	0.169
901	CCNG2	cyclin G2	0.176
135228	CD109	CD109 molecule;150 kDa TGF-beta-1-binding protein;C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 7;Gov platelet alloantigens;activated T-cell marker CD109;platelet-specific Gov antigen	0.262
4345	CD200	CD200 molecule;CD200 antigen;MRC OX-2 antigen;antigen identified by monoclonal antibody MRC OX-2	-0.165
10666	CD226	CD226 molecule;DNAX accessory molecule 1;DNAX accessory molecule-1;T lineage-specific activation antigen 1 antigen;adhesion glycoprotein;platelet and T cell activation antigen 1	0.220
928	CD9	CD9 molecule;5H9 antigen;BA-2/p24 antigen;CD9 antigen (p24);cell growth-inhibiting gene 2 protein;leukocyte antigen MIC3;motility related protein-1;tetraspanin-29	0.212
1026	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1);CDK-interacting protein 1;CDK-interaction protein 1;DNA synthesis inhibitor;melanoma differentiation associated protein 6;wild-type p53-activated fragment 1	0.267
148523	CIART	circadian associated repressor of transcription;chIP-derived repressor of network oscillator;computationally highlighted repressor of the network oscillator	0.172
134147	CMBL	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas);carboxymethylenebutenolidase-like (Pseudomonas)	0.152
1293	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3;collagen VI, alpha-3 polypeptide	-0.337
643	CXCR5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5;Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5);Burkitt lymphoma receptor 1, GTP-binding protein;CXC-R5;CXCR-5;MDR-15;monocyte-derived receptor 15	0.156
1543	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1;CYPIA1;aryl hydrocarbon hydroxylase;cytochrome P1-450, dioxin-inducible;cytochrome P450 form 6;cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), polypeptide 1;cytochrome P450-C;cytochrome P450-P1;flavoprotein-linked monooxygenase;xenobiotic monooxygenase	1.152
1545	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1;aryl hydrocarbon hydroxylase;cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile);flavoprotein-linked monooxygenase;microsomal monooxygenase;xenobiotic monooxygenase	1.058
23586	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58;DEAD box protein 58;DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide;RNA helicase RIG-I;retinoic acid-inducible gene 1 protein;retinoic acid-inducible gene 1 protein	-0.148
91319	DERL3	derlin 3;DERtrin 3;DERtrin-3;Der1-like domain family, member 3;degradation in endoplasmic reticulum protein 3;der1-like protein 3	0.168
10202	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2;dehydrogenase/reductase member 2;dicarbonyl reductase HEP27;protein D;short chain dehydrogenase/reductase family 25C member 1;short chain dehydrogenase/reductase family 25C, member 1;short-chain alcohol dehydrogenase family member	0.189
10170	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9;3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase;NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase;retinol dehydrogenase 15;retinol dehydrogenase homolog;short chain dehydrogenase/reductase family 9C member 4;short chain dehydrogenase/reductase family 9C, member 4;short-chain dehydrogenase/reductase retSDR8;tracheobronchial epithelial cell-specific retinol dehydrogenase	-0.150
30836	DNTTIP2	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2;LPTS-interacting protein 2;acidic 82 kDa protein mRNA;estrogen receptor binding protein;tdT-interacting factor 2	0.139

1803	DPP4	dipeptidyl-peptidase 4;ADCP-2;DPP IV;T-cell activation antigen CD26;adenosine deaminase complexing protein 2;dipeptidyl peptidase IV;dipeptidylpeptidase 4;dipeptidylpeptidase IV (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	-0.222
1846	DUSP4	dual specificity phosphatase 4;MAP kinase phosphatase 2;VH1 homologous phosphatase 2;dual specificity protein phosphatase hVH2;mitogen-activated protein kinase phosphatase 2;serine/threonine specific protein phosphatase	0.140
144455	E2F7	E2F transcription factor 7;E2F-7	0.181
60401	EDA2R	ectodysplasin A2 receptor;EDA-A2 receptor;X-linked ectodysplasin-A2 receptor;tumor necrosis factor receptor superfamily member XEDAR	0.154
5167	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1;E-NPP 1;Ly-41 antigen;alkaline phosphodiesterase 1;membrane component chromosome 6 surface marker 1;membrane component, chromosome 6, surface marker 1;phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase 1;plasma-cell membrane glycoprotein 1;plasma-cell membrane glycoprotein PC-1	-0.207
2034	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1;EPAS-1;HIF-1-alpha-like factor;HIF-1alpha-like factor;HIF-2-alpha;HIF2-alpha;PAS domain-containing protein 2;basic-helix-loop-helix-PAS protein MOP2;class E basic helix-loop-helix protein 73;hypoxia-inducible factor 2 alpha;hypoxia-inducible factor 2-alpha;member of PAS protein 2	-0.174
2109	ETFB	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide;beta-ETF;electron transfer flavoprotein beta subunit;electron transfer flavoprotein beta-subunit;electron transfer flavoprotein, beta polypeptide;electron-transferring-flavoprotein, beta polypeptide	0.153
59271	EVA1C	eva-1 homolog C (C. elegans);family with sequence similarity 176, member C;protein FAM176C	-0.182
51466	EVL	Enah/Vasp-like;ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like	0.154
2184	FAH	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase);FAA;beta-diketonase	0.183
642273	FAM110C	family with sequence similarity 110, member C	0.179
2232	FDXR	ferredoxin reductase;AR;adrenodoxin reductase;adrenodoxin-NADP(+) reductase;ferredoxin--NADP(+) reductase	0.147
83888	FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2;37 kDa killer-specific secretory protein;FGF-BP2;FGF-binding protein 2;FGFBP-2;HBp17-RP;HBp17-related protein;killer-specific secretory protein of 37 kDa	0.362
246176	GAS2L2	growth arrest-specific 2 like 2;GAS2-related protein on chromosome 17	-0.162
257144	GCSAM	germinal center-associated, signaling and motility;germinal center B-cell-expressed transcript 2 protein;germinal center expressed transcript 2;germinal center-associated lymphoma protein;human germinal center-associated lymphoma	0.147
2708	GJB2	gap junction protein, beta 2, 26kDa;connexin 26;gap junction protein beta 2;mutant gap junction protein beta 2	0.702
10804	GJB6	gap junction protein, beta 6, 30kDa;connexin 30;connexin-30;ectodermal dysplasia 2, hidrotic (Clouston syndrome);gap junction protein, beta 6 (connexin 30)	0.528
2740	GLP1R	glucagon-like peptide 1 receptor;GLP-1 receptor;GLP-1-R;GLP-1R	-0.145
2838	GPR15	G protein-coupled receptor 15;brother of Bonzo	0.171
84636	GPR174	G protein-coupled receptor 174	-0.154
9290	GPR55	G protein-coupled receptor 55	0.228
3003	GZMK	granzyme K (granzyme 3; tryptase II);NK-Tryp-2;NK-tryptase-2;fragmentin-3;granzyme 3;granzyme K (serine protease, granzyme 3;granzyme-3;tryptase II	-0.155
3090	HIC1	hypermethylated in cancer 1;zinc finger and BTB domain-containing protein 29	0.210
79618	HMBOX1	homeobox containing 1;homeobox telomere-binding protein 1;homeobox-containing protein PBHNF	-0.149

8870	IER3	immediate early response 3;PACAP-responsive gene 1 protein;anti-death protein;differentiation-dependent gene 2 protein;expressed in pancreatic carcinoma;gly96, mouse, homolog of;immediate early protein GLY96;immediate early response 3 protein;immediately early gene X-1;protein DIF-2	0.181
10561	IFI44	interferon-induced protein 44;TBC/LysM-associated domain containing 5;interferon-induced, hepatitis C-associated microtubular aggregate protein (44kD);microtubule-associated protein 44	-0.322
10964	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	-0.451
64135	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1;CADM-140 autoantigen;DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide;RIG-I-like receptor 2;RNA helicase-DEAD box protein 116;clinically amyopathic dermatomyositis autoantigen 140 kDa;helicard,helicase with 2 CARD domains;melanoma differentiation associated protein-5;melanoma differentiation-associated protein 5;murabutide down-regulated protein	-0.160
3433	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2;Interferon, alpha-inducible protein (MW 54kD);interferon-induced 54 kDa protein;interferon-induced protein 54	-0.267
3437	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3;CIG49;IFI-60K;IFIT-3;IFIT-4;ISG-60;interferon-induced 60 kDa protein;interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4;retinoic acid-induced gene G protein	-0.163
50616	IL22	interleukin 22;IL-10-related T-cell-derived inducible factor;IL-10-related T-cell-derived-inducible factor;cytokine Zcyto18	0.215
3575	IL7R	interleukin 7 receptor;CD127 antigen;IL-7 receptor subunit alpha;IL-7R subunit alpha;IL-7RA;interleukin 7 receptor alpha chain;interleukin 7 receptor isoform H5-6	-0.150
3581	IL9R	interleukin 9 receptor;IL-9 receptor	0.216
3631	INPP4A	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type I, 107kDa;inositol polyphosphate-4-phosphatase, type I, 107kD;type I inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase	0.197
3394	IRF8	interferon regulatory factor 8;interferon consensus sequence binding protein 1	-0.220
81168	ITM2C	integral membrane protein 2C;BRICHOS domain containing 2C;cerebral protein 14;integral membrane protein 3;transmembrane protein BRI3	0.307
8850	KAT2B	K(lysine) acetyltransferase 2B;CREBBP-associated factor;histone acetylase PCAF;histone acetyltransferase PCAF;lysine acetyltransferase 2B;p300/CBP-associated factor	0.196
56479	KCNQ5	potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 5;KQT-like 5;potassium channel protein;potassium channel subunit alpha KvLQT5;potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5;voltage-gated potassium channel subunit Kv7.5	-0.232
3815	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog;p145 c-kit;piebald trait protein;proto-oncogene c-Kit;proto-oncogene tyrosine-protein kinase Kit;soluble KIT variant 1;tyrosine-protein kinase Kit;v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene-like protein	0.401
144811	LACC1	laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1	0.179
3903	LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1;leukocyte-associated Ig-like receptor 1	0.177
54900	LAX1	lymphocyte transmembrane adaptor 1;LAT-like membrane associated protein;linker for activation of x cells;membrane-associated adapter protein LAX	0.138
4000	LMNA	lamin A/C;70 kDa lamin;lamin A/C-like 1;prelamin-A/C;renal carcinoma antigen NY-REN-32	0.259
102724748	LOC102724748	uncharacterized LOC102724748	-0.147
10161	LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6;G-protein coupled purinergic receptor P2Y5;LPA receptor 6;LPA-6;P2Y purinoceptor 5;RB intron encoded G-protein coupled receptor;oleoyl-L-alpha-lysophosphatidic acid receptor;purinergic receptor 5;purinergic receptor P2Y G protein-coupled protein 5;purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	0.251
54947	LPCAT2	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2;1-AGP acyltransferase 11;1-AGPAT 11;1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 11;1-acylglycerophosphocholine O-acyltransferase;1-alkylglycerophosphocholine O-acyltransferase;LPAAT-alpha;LPC acyltransferase 2;LPCAT-2;acetyl-CoA:lyso-PAF acyltransferase;acetyl-CoA:lyso-platelet-activating factor acyltransferase;acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 2;acyltransferase like 1;acyltransferase-like 1;lyso-PAF acyltransferase;lyso-platelet-	0.204
9404	LPXN	leupaxin	0.231
4041	LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5;low density lipoprotein receptor-related protein 7	0.140

2615	LRRC32	leucine rich repeat containing 32;garpin;glycoprotein A repetitions predominant	-0.159
54674	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3;fibronectin type III, immunoglobulin and leucine rich repeat domains 5;leucine-rich repeat protein, neuronal 3;neuronal leucine-rich repeat protein 3	0.142
1130	LYST	lysosomal trafficking regulator;Chediak-Higashi syndrome 1;beige homolog	-0.282
84441	MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila);mam-2	-0.159
79648	MCPH1	microcephalin 1;BRCT-repeat inhibitor of TERT expression 1	-0.319
126308	MOB3A	MOB kinase activator 3A;MOB LAK;MOB-LAK;MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2A;mob1 homolog 2A;mps one binder kinase activator-like 2A	0.165
4599	MX1	MX dynamin-like GTPase 1;interferon-induced protein p78;interferon-inducible protein p78;interferon-regulated resistance GTP-binding protein MxA;myxoma resistance protein 1;myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	-0.2812
4628	MYH10	myosin, heavy chain 10, non-muscle;cellular myosin heavy chain, type B;myosin heavy chain, nonmuscle type B;myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle;nonmuscle myosin II heavy chain-B;nonmuscle myosin heavy chain 10;nonmuscle myosin heavy chain IIB	0.144
10398	MYL9	myosin, light chain 9, regulatory;20 kDa myosin light chain;myosin RLC;myosin regulatory light chain 1;myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform;myosin regulatory light chain 9;myosin regulatory light chain MRLC1;myosin, light polypeptide 9, regulatory	0.282
64005	MYO1G	myosin IG;minor histocompatibility antigen HA-2;myosin-Ig	0.190
26509	MYOF	myoferlin;fer-1-like 3, myoferlin;fer-1-like family member 3;fer-1-like protein 3	0.296
85409	NKD2	naked cuticle homolog 2 (Drosophila);Dvl-binding protein NKD2	0.244
9111	NMI	N-myc (and STAT) interactor;N-myc interactor	-0.163
1728	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1;DT-diaphorase;NAD(P)H:Quinone acceptor oxidoreductase type 1;NAD(P)H:menadiione oxidoreductase 1;NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1;NAD(P)H:quinone oxidoreductase;azoreductase;diaphorase (NADH/NADPH) (cytochrome b-5 reductase);diaphorase-4;dioxin-inducible 1;menadiione reductase;phyloquinone reductase;quinone reductase 1	0.181
26012	NSMF	NMDA receptor synaptonuclear signaling and neuronal migration factor;nasal embryonic LHRH factor;nasal embryonic luteinizing hormone-releasing hormone factor	0.192
4938	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa;(2-5')oligo(A) synthase 1;(2-5')oligo(A) synthetase 1;2',5'-oligo A synthetase 1;2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa;2'-5' oligoadenylate synthetase 1 p41 isoform;2'-5' oligoadenylate synthetase 1 p48 isoform;2'-5' oligoadenylate synthetase 1 p49 isoform;2'-5' oligoadenylate synthetase 1 p52 isoform;2'-5'-oligoisoadenylate synthetase 1;2-5A synthase 1;2-5A synthetase 1;E18/E16;p46/p42 OAS	-0.181
8638	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like;2'-5'-OAS-RP;2'-5'-OAS-related protein;59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein;59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein;TR-interacting protein 14;thyroid receptor-interacting protein 14	-0.269
167826	OLIG3	oligodendrocyte transcription factor 3;class B basic helix-loop-helix protein 7;class E basic helix-loop-helix protein 20;oligo3	0.484
5008	OSM	oncostatin M	-0.202
5025	P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 4;ATP receptor;ATP-gated cation channel protein;P2X receptor, subunit 4;purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4;purinergic receptor P2X4;purinoceptor P2X4	0.248
64761	PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12;ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 12;zinc finger CCCH type domain containing 1	-0.185
83666	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9;ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 9;PARP-9;b aggressive lymphoma protein;poly (ADP-ribose) polymerase 9	-0.161
10769	PLK2	polo-like kinase 2;PLK-2;serine/threonine-protein kinase SNK;serum-inducible kinase	0.142
5450	POU2AF1	POU class 2 associating factor 1;B-cell-specific coactivator OBF-1;BOB-1;OCA-B;OCT-binding factor 1;POU domain, class 2, associating factor 1	-0.178

5468	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma;PPAR-gamma;nuclear receptor subfamily 1 group C member 3;peroxisome proliferator-activated nuclear receptor gamma variant 1	-0.167
81706	PPP1R14C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C;PKC-potentiated PP1 inhibitory protein;kinase C-enhanced PP1 inhibitor;kinase-enhanced PP1 inhibitor;serologically defined breast cancer antigen NY-BR-81	0.224
10216	PRG4	proteoglycan 4;articular superficial zone protein;hemangiopoietin;lubricin;megakaryocyte stimulating factor;superficial zone proteoglycan	-0.266
138639	PTPDC1	protein tyrosine phosphatase domain containing 1;protein tyrosine phosphatase PTP9Q22	0.164
5774	PTPN3	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3;cytoskeletal-associated protein tyrosine phosphatase;protein-tyrosine phosphatase H1	0.349
23682	RAB38	RAB38, member RAS oncogene family;Rab-related GTP-binding protein;melanoma antigen NY-MEL-1	0.328
5920	RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3;HRAS-like suppressor 4;RAR-responsive protein TIG3;retinoic acid-inducible gene 1;retinoid-inducible gene 1 protein;tazarotene-induced gene 3 protein	-0.179
115727	RASGRP4	RAS guanyl releasing protein 4;guanyl nucleotide releasing protein 4	0.174
8787	RGS9	regulator of G-protein signaling 9;regulator of G-protein signalling 9	-0.166
9781	RNF144A	ring finger protein 144A;UbcM4-interacting protein 4;probable E3 ubiquitin-protein ligase RNF144A;ring finger protein 144;ubiquitin conjugating enzyme 7 interacting protein 4;ubiquitin-conjugating enzyme 7-interacting protein 4	0.149
50484	RRM2B	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible);TP53-inducible ribonucleotide reductase M2 B;p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2 homolog;p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2 short form beta;p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2-like protein	0.247
1901	SIPR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1;S1P receptor 1;S1P receptor Edg-1;endothelial differentiation G-protein coupled receptor 1;endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1;sphingosine 1-phosphate receptor EDG1;sphingosine 1-phosphate receptor Edg-1	0.141
154075	SAMD3	sterile alpha motif domain containing 3;SAM domain-containing protein 3	-0.187
64092	SAMSN1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1;SAM and SH3 domain containing 2;SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1;SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals protein 1;SH3-SAM adaptor protein;Src homology domain 3 (SH3)-containing adapter protein SH3 lymphocyte protein 2;hematopoietic adapter-containing SH3 and sterile alpha-motif (SAM) domains 1;hematopoietic adapter-containing SH3 and sterile alpha-motif (SAM) domains 1;hematopoietic adaptor	0.177
6303	SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1;diamine N-acetyltransferase 1;polyamine N-acetyltransferase 1;putrescine acetyltransferase;spermidine/spermine N1-acetyltransferase alpha	-0.144
6304	SATB1	SATB homeobox 1;special AT-rich sequence binding protein 1 (binds to nuclear matrix/scaffold-associating DNA);special AT-rich sequence-binding protein 1	-0.194
6402	SELL	selectin L;CD62 antigen-like family member L;gp90-MEL;leukocyte surface antigen Leu-8;leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 1;lymph node homing receptor;lymphocyte adhesion molecule 1;pln homing receptor	-0.233
27244	SESN1	sestrin 1;p53 activated gene 26;p53 regulated PA26 nuclear protein	0.151
57823	SLAMF7	SLAM family member 7;19A24 protein;CD2 subset 1;CD2-like receptor activating cytotoxic cells;CD2-like receptor-activating cytotoxic cells;membrane protein FOAP-12;novel LY9 (lymphocyte antigen 9) like protein;protein 19A	0.160
6509	SLC1A4	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4;ASCT-1;alanine/serine/cysteine/threonine transporter 1;glutamate/neutral amino acid transporter;solute carrier family 1 member 4	0.146
51312	SLC25A37	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37;mitochondrial iron transporter 1;mitochondrial solute carrier protein;mitoferrin;predicted protein of HQ2217;solute carrier family 25, member 37	-0.159
5172	SLC26A4	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 4;sodium-independent chloride/iodide transporter	-0.173
6513	SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1;choreoathetosis/spasticity, episodic (paroxysmal choreoathetosis/spasticity);glucose transporter type 1, erythrocyte/brain;hepG2 glucose transporter;human T-cell leukemia virus (I and II) receptor;receptor for HTLV-1 and HTLV-2	0.164
401548	SNX30	sorting nexin family member 30	0.149

6654	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila);SOS-1;gingival fibromatosis, hereditary, 1;guanine nucleotide exchange factor	-0.143	
401236	STMND1	stathmin domain containing 1	0.236	
387082	SUMO4	small ubiquitin-like modifier 4;SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2;SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 4;insulin-dependent diabetes mellitus 5;small ubiquitin-like modifier 4 protein	0.302	
7041	TGFB11	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1;androgen receptor coactivator 55 kDa protein;androgen receptor coactivator ARA55;androgen receptor-associated protein of 55 kDa;hydrogen peroxide-inducible clone 5 protein;hydrogen peroxide-inducible clone-5	-0.142	
7070	THY1	Thy-1 cell surface antigen;CDw90;Thy-1 T-cell antigen;thy-1 antigen	0.145	
201633	TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains;V-set and immunoglobulin domain containing 9;V-set and immunoglobulin domain-containing protein 9;V-set and transmembrane domain containing 3;V-set and transmembrane domain-containing protein 3;Washington University cell adhesion molecule	-0.265	
25976	TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase;ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 14;poly [ADP-ribose] polymerase 7	0.204	
51768	TM7SF3	transmembrane 7 superfamily member 3;seven span transmembrane protein;seven transmembrane protein TM7SF3	0.528	
153339	TMEM167A	transmembrane protein 167A;transmembrane protein 167	0.144	
23670	TMEM2	transmembrane protein 2	0.491	0,491
9540	TP53I3	tumor protein p53 inducible protein 3;p53-induced gene 3 protein;quinone oxidoreductase homolog	0.186	0,186
9618	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4;MLN 62;RING finger protein 83;TRAF4 variant 6;cysteine-rich domain associated with RING and Traf domains protein 1;cysteine-rich domain associated with ring and TRAF domain;malignant 62;metastatic lymph node gene 62 protein;tumor necrosis receptor-associated factor 4A	0.140	0,140
1831	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3;DSIP-immunoreactive leucine zipper protein;DSIP-immunoreactive peptide;TSC-22 related protein;TSC-22-like protein;TSC-22-related protein;delta sleep inducing peptide, immunoreactor;delta sleep-inducing peptide immunoreactor;glucocorticoid-induced leucine zipper protein	0.146	0,146
90139	TSPAN18	tetraspanin 18;tspan-18	-0.173	-0,173
10628	TXNIP	thioredoxin interacting protein;thioredoxin binding protein 2;thioredoxin-binding protein 2;upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3;vitamin D3 up-regulated protein 1	0.149	0,149
401447	USP17L1	ubiquitin specific peptidase 17-like family member 1;deubiquitinating enzyme 17-like protein 1;putative ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 1;ubiquitin thioesterase 17-like protein 1;ubiquitin-specific-processing protease 17-like protein 1	0.141	0,141
64393	ZMAT3	zinc finger, matrin-type 3;WIG-1/PAG608 protein;p53 target zinc finger protein;p53-activated gene 608 protein;zinc finger protein WIG-1;zinc finger protein WIG1;zinc finger, matrin type 3	0.199	0,199

---

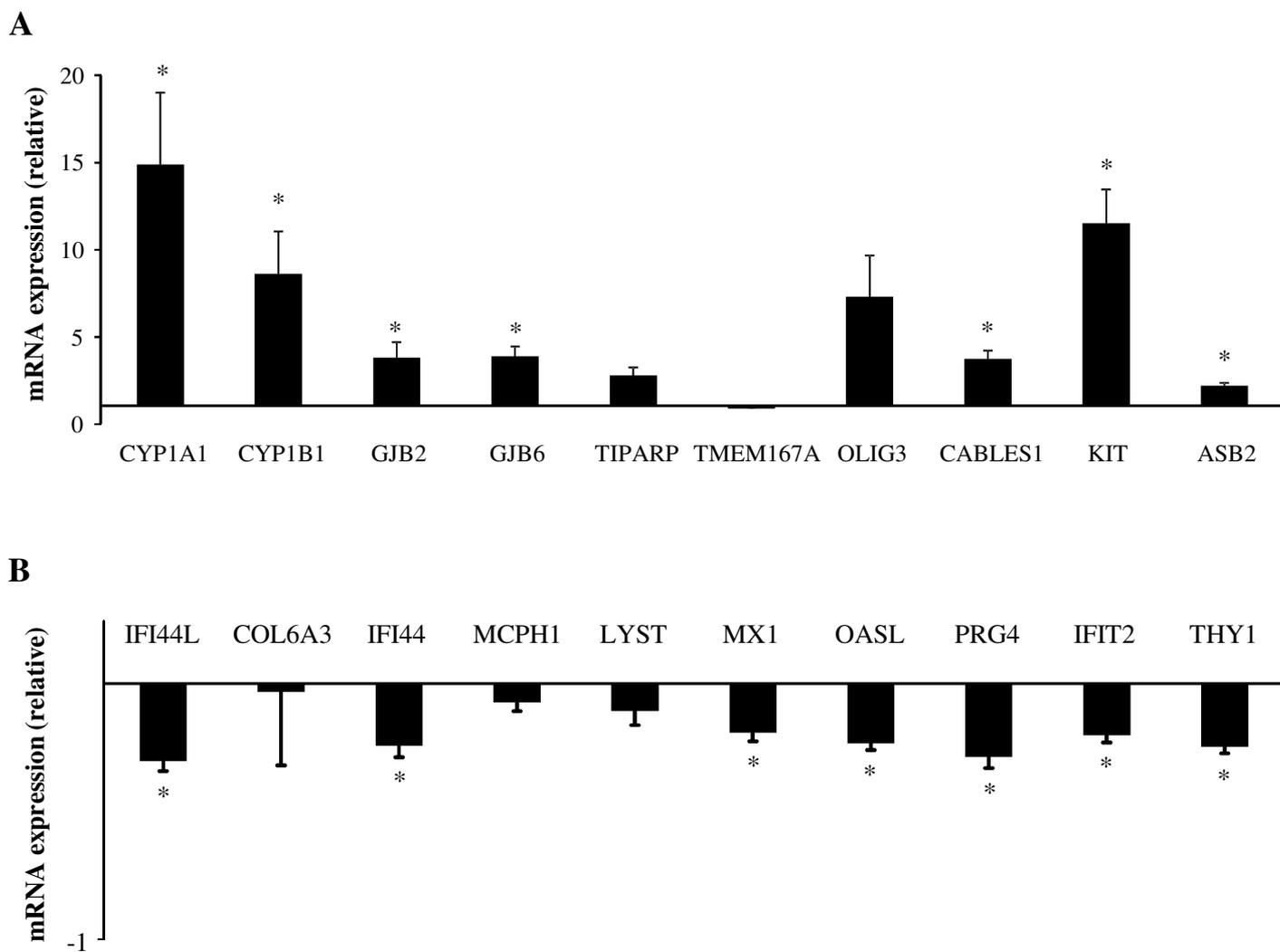
s after treatment of human T lymphocytes with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h

ID	GeneName	Description	Differential expression (log <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	p-value
<b>Top 15 up-regulated genes</b>				
1543	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1;CYP1A1;aryl hydrocarbon hydroxylase;cytochrome P1-450, dioxin-inducible;cytochrome P450 form 6;cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), polypeptide 1;cytochrome P450-	1.152	5.9E-03
1545	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1;aryl hydrocarbon hydroxylase;cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile);flavoprotein-linked monooxygenase;microsomal monooxygenase;xenobiotic	1.058	4.7E-03
2706	GJB2	gap junction protein, beta 2, 26kDa;connexin 26;gap junction protein beta 2;mutant gap junction protein beta 2	0.702	5.7E-03
10804	GJB6	gap junction protein, beta 6, 30kDa;connexin 30;connexin-30;ectodermal dysplasia 2, hidrotic (Clouston syndrome);gap junction protein, beta 6 (connexin 30)	0.528	7.7E-03
25976	TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase;ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 14;poly [ADP-ribose] polymerase 7	0.528	1.0E-02
153339	TMEM167A	transmembrane protein 167A;transmembrane protein 167	0.491	3.0E-02
167826	OLIG3	oligodendrocyte transcription factor 3;class B basic helix-loop-helix protein 7;class E basic helix-loop-helix protein 20;oligo3	0.484	2.7E-02
91768	CABLES1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1;interactor with CDK3 1	0.426	3.1E-04
3815	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog;p145 c-kit;piebald trait protein;proto-oncogene c-Kit;proto-oncogene tyrosine-protein kinase Kit;soluble KIT variant 1;tyrosine-protein kinase Kit;v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene-	0.401	1.2E-05
51676	ASB2	ankyrin repeat and SOCS box containing 2;ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2a	0.388	5.6E-04
83888	FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2;37 kDa killer-specific secretory protein;FGF-BP2;FGF-binding protein 2;FGFBP-2;HBp17-RP;HBp17-related protein;killer-specific secretory protein of 37 kDa	0.362	2.0E-03
5774	PTPN3	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3;cytoskeletal-associated protein tyrosine phosphatase;protein-tyrosine phosphatase H1	0.349	1.1E-02
9289	ADGRG1	adhesion G protein-coupled receptor G1;7-transmembrane protein with no EGF-like N-terminal domains-1;G protein-coupled receptor 56	0.346	5.8E-03
23682	RAB38	RAB38, member RAS oncogene family;Rab-related GTP-binding protein;melanoma antigen NY-MEL-1	0.328	4.6E-03
81618	ITM2C	integral membrane protein 2C;BRICHOS domain containing 2C;cerebral protein 14;integral membrane protein 3;transmembrane protein BRI3	0.307	1.5E-02
<b>Top 15 down-regulated genes</b>				
10964	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	-0.451	1.7E-02
1293	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3;collagen VI, alpha-3 polypeptide	-0.337	6.3E-03
10561	IFI44	interferon-induced protein 44;TBC/LysM-associated domain containing 5;interferon-induced, hepatitis C-associated microtubular aggregate protein (44kD);microtubule-associated protein 44	-0.322	3.2E-02
79648	MCPH1	microcephalin 1;BRCT-repeat inhibitor of TERT expression 1	-0.319	1.0E-02
1130	LYST	lysosomal trafficking regulator;Chediak-Higashi syndrome 1;beige homolog	-0.282	2.2E-02
4599	MX1	MX dynamin-like GTPase 1;interferon-induced protein p78;interferon-inducible protein p78;interferon-regulated resistance GTP-binding protein MxA;myxoma resistance protein 1;myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	-0.282	4.8E-02
8638	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like;2'-5'-OAS-RP;2'-5'-OAS-related protein;59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein;59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein;TR-interacting protein 14;thyroid receptor-interacting protein 14	-0.269	2.0E-03
3433	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2;Interferon, alpha-inducible protein (MW 54kD);interferon-induced 54 kDa protein;interferon-induced protein 54	-0.267	5.6E-04
10216	PRG4	proteoglycan 4;articular superficial zone protein;hemangiopoietin;lubricin;megakaryocyte stimulating factor;superficial zone proteoglycan	-0.266	3.4E-02
7070	THY1	Thy-1 cell surface antigen;CDw90;Thy-1 T-cell antigen;thy-1 antigen	-0.265	1.0E-02
6402	SELL	selectin L;CD62 antigen-like family member L;gp90-MEL;leukocyte surface antigen Leu-8;leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 1;lymph node homing receptor;lymphocyte adhesion molecule 1;pln homing receptor	-0.233	3.1E-02
56479	KCNQ5	potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 5;KQT-like 5;potassium channel protein;potassium channel subunit alpha KvLQTS;potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5;voltage-gated potassium channel subunit Kv7.5	-0.232	1.7E-02
1803	DPP4	dipeptidyl-peptidase 4;ADCP-2;DPP IV;T-cell activation antigen CD26;adenosine deaminase complexing protein 2;dipeptidyl peptidase IV;dipeptidylpeptidase 4;dipeptidylpeptidase IV (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	-0.222	2.3E-02
3394	IRF8	interferon regulatory factor 8;interferon consensus sequence binding protein 1	-0.220	1.2E-02
5167	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1;E-NPP 1;Ly-41 antigen;alkaline phosphodiesterase 1;membrane component chromosome 6 surface marker 1;membrane component, chromosome 6, surface marker 1;phosphodiesterase I/nucleotide	-0.207	2.1E-02

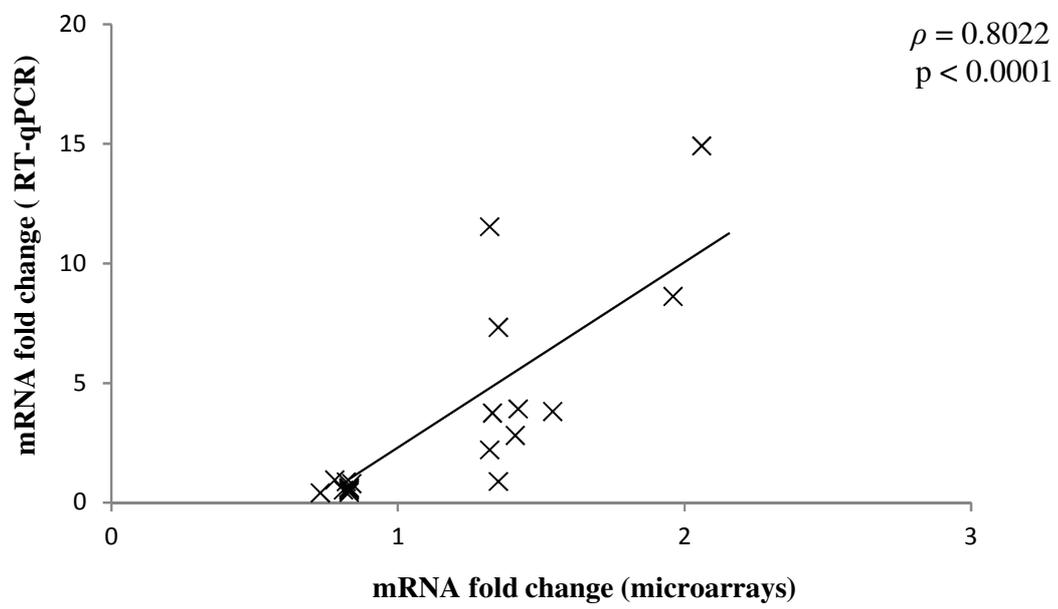
<sup>a</sup>Differential expression (log<sub>2</sub>) corresponds to the difference in mRNA expression measured in log<sub>2</sub> intensities between B[a]P and DMSO (CTR) conditions; they are the medians of four microarray experiments, performed on pools of RNAs isolated from CTR or B[a]P-treated primary cultures of T lymphocytes established from 16 blood donors (four donors contributing equally to each pool).







**Fig. 2**



**Fig. 3**

**Table 2: Top canonical pathways regulated after treatment of human T lymphocytes with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h**

Top Pathways	<sup>a</sup> <i>p</i> -value	<sup>b</sup> Regulated Genes
<b>Up-regulated genes</b>		
Aryl Hydrocarbon Receptor Signalling	3.99E-05	AhRR, CCNE2, CDKN1A, CYP1A1, CYP1B1, NQO1
Protein Kinase A Signalling	7.36E-05	ADCY9, ADD2, DUSP4, MYH10, MYL9, PPP1R14C, PTPDC1, PTPN3, SAMD3
Estrogen-mediated S-phase entry	2.06E-04	CCNE2, CDKN1A, E2F7
Cell cycle: G1/S checkpoint regulation	2.14E-04	CCNE2, CDKN1A, E2F7, SAMD3
<b>Down-regulated genes</b>		
Interferon Signalling	1.41E-04	IFIT3, MX1, OAS1
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	1.74E-04	CCL3, CCL3L3, CCL4L1, CCL4L2, SELL, THY1
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	5.97E-04	DDX58, IFIH1, OAS1, OSM
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	7.42E-04	DDX58, IFIH1, IFIT2

<sup>a</sup>*p*-values were calculated using the IPA software.

<sup>b</sup>The number of genes whose expression was altered by B[a]P treatment was given for each pathway by the IPA software.



**Table 3: Top diseases and biological functions regulated after treatment of human T lymphocytes with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h**

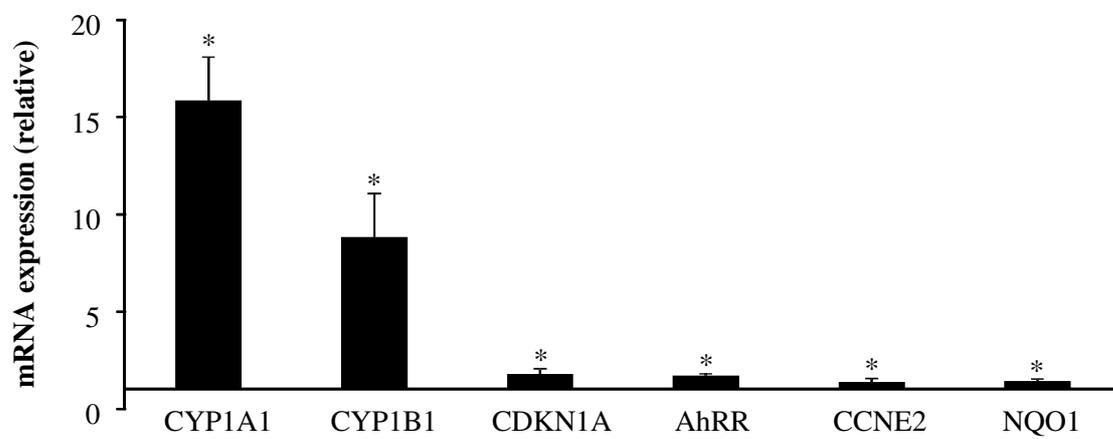
Network	Top Functions	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	Focus genes <sup>b</sup>
<b>Disease and Disorder</b>			
1	Cancer	1.82E-03 - 1.61E-12	144
2	Hematological Disease	1.64E-03 - 1.61E-12	67
3	Immunological Disease	1.64E-03 - 1.61E-12	73
4	Organismal Injury and Abnormalities	1.82E-03 - 1.61E-12	147
5	Antimicrobial Response	2.89E-04 - 2.23E-10	19
<b>Molecular and Cellular functions</b>			
1	Cellular Movement	1.77E-03 - 6.81E-12	60
2	Cell Death and Survival	1.59E-03 - 2.05E-11	77
3	Cellular Function and Maintenance	1.30E-03 - 7.97E-11	52
4	Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1.82E-03 - 4.36E-08	41
5	Cellular Growth and Proliferation	1.68E-03 - 5.20E-08	77
<b>Physiological system development and function</b>			
1	Immune Cell Trafficking	1.82E-03 - 6.81E-12	45
2	Hematological System Development and Function	1.82E-03 - 5.20E-10	64
3	Tissue Morphology	1.67E-03 - 2.55E-09	56
4	Digestive System Development and Function	1.07E-03 - 1.75E-07	25
5	Lymphoid Tissue Structure and Development	1.78E-03 - 1.75E-07	48

<sup>a</sup>*p*-values were calculated using the IPA software.

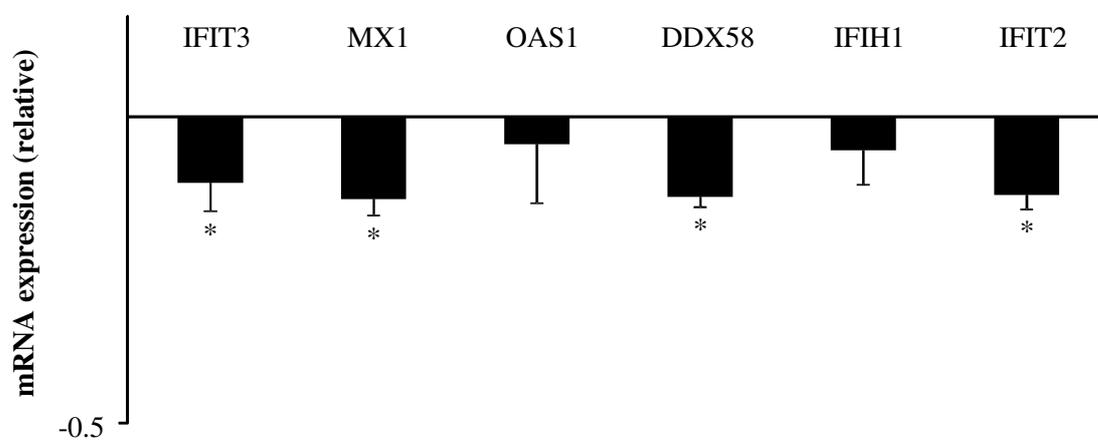
<sup>b</sup>The number of genes whose expression was altered by B[a]P treatment was given for each diseases and functions by the IPA software.



**A**



**B**



**Fig. 4**

**Table 4: Validation by RT-qPCR analysis of T lymphocyte migration-related genes identified by microarrays after treatment of human T lymphocytes with 2  $\mu$ M B[a]P for 48 h.**

GeneName	Description	mRNA expression (relative) <sup>a</sup>	
		microarray	RT-qPCR
<b>Up-regulated genes</b>			
IL22	interleukin 22;IL-10-related T-cell-derived inducible factor;IL-10-related T-cell-derived-inducible factor;cytokine Zcyto18	1.17 $\pm$ 0.02*	1.78 $\pm$ 0.06*
CXCR5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5;Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5);Burkitt lymphoma receptor 1, GTP-binding protein;CXCR-5;CXCR-5;MDR-15;monocyte-derived receptor 15	1.13 $\pm$ 0.04*	1.44 $\pm$ 0.11*
S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1;S1P receptor 1;S1P receptor Edg-1;endothelial differentiation G-protein coupled receptor 1;endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1;sphingosine 1-phosphate receptor EDG1;sphingosine 1-	1.10 $\pm$ 0.01*	1.22 $\pm$ 0.03*
CD226	CD226 molecule;DNAX accessory molecule 1;DNAX accessory molecule-1;T lineage-specific activation antigen 1 antigen;adhesion glycoprotein;platelet and T cell activation antigen 1	1.17 $\pm$ 0.02*	1.38 $\pm$ 0.07*
GPR15	G protein-coupled receptor 15;brother of Bonzo	1.13 $\pm$ 0.02*	1.42 $\pm$ 0.07*
SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila);SOS-1;gingival fibromatosis, hereditary, 1;guanine nucleotide exchange factor	1.16 $\pm$ 0.02*	1.49 $\pm$ 0.13*
<b>Down-regulated genes</b>			
DPP4	dipeptidyl-peptidase 4;ADCP-2;DPP IV;T-cell activation antigen CD26;adenosine deaminase complexing protein 2;dipeptidyl peptidase IV;dipeptidylpeptidase 4;dipeptidylpeptidase IV (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	0.86 $\pm$ 0.03*	nd <sup>b</sup>
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58;DEAD box protein 58;DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide;RNA helicase RIG-I;retinoic acid-inducible gene 1 protein;retinoic acid-inducible gene 1 protein	0.91 $\pm$ 0.01*	0.70 $\pm$ 0.05*
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3;G0/G1 switch regulatory protein 19-1;PAT 464.1;SIS-beta;macrophage inflammatory protein 1- alpha;small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a);tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein	0.89 $\pm$ 0.03*	0.72 $\pm$ 0.07*
SELL	selectin L;CD62 antigen-like family member L;gp90-MEL;leukocyte surface antigen Leu-8;leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 1;lymph node homing receptor;lymphocyte adhesion molecule 1;pln homing receptor	0.84 $\pm$ 0.04*	0.77 $\pm$ 0.05*
OSM	oncostatin M	0.88 $\pm$ 0.03*	0.68 $\pm$ 0.05*
ANXA1	annexin A1;annexin I (lipocortin I);annexin-1;calpactin II;calpactin-2;chromobindin-9;phospholipase A2 inhibitory protein	0.89 $\pm$ 0.02*	0.77 $\pm$ 0.15

<sup>a</sup>mRNA expression for each gene corresponds to the relative ratio of mRNA expression in B[a]P-treated T lymphocytes versus CTR counterparts. They are the means  $\pm$  SEM of four independent experiments performed on RNA pools isolated from CTR or B[a]P-treated cultures established from 16 blood donors (four donors contributing equally to each pool). \*p < 0.05 when compared with CTR T lymphocytes (paired Student's t test).

<sup>b</sup>not determined



### III.2.1 Contexte de l'étude

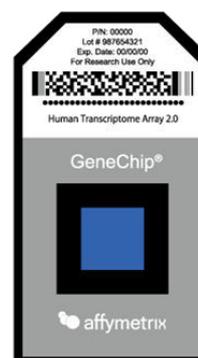
Outre leurs effets cancérigènes certains HAPs, parmi lesquels le B[a]P, présentent des effets immunotoxiques, dont des effets immunosuppresseurs et des effets inflammatoires. Ces effets ont bien été caractérisés dans des modèles de rongeurs *in vitro* et *in vivo*. En effet, chez l'animal il a été montré, qu'une exposition au B[a]P entraînait une perturbation de la réponse T cytotoxique antitumorale (House *et al.*, 1989), une suppression de la production d'anticorps en réponse à la présentation d'un antigène par des lymphocytes T (White *et al.*, 1984), une inhibition de la génération de lymphocytes T cytotoxiques et de l'activité des cellules NK (Selgrade *et al.*, 1988) ou encore une diminution de la prolifération des lymphocytes T en réponse aux agents mitogéniques (Wojdani et Alfred, 1984). Les principaux effets rapportés chez l'animal concernent l'immunosuppression, particulièrement étudiée dans des modèles de cellules de l'immunité innée. Chez l'Homme, les cellules de l'immunité innée se sont aussi révélées des cibles des HAPs. Ainsi, une exposition *in vitro* au B[a]P a été associée à une altération de la différenciation des monocytes humains en cellules dendritiques (Laupeze *et al.*, 2002) et en macrophages (Van Grevenynghe *et al.*, 2003), ou encore l'induction d'une apoptose dans ces mêmes macrophages différenciés (Van Grevenynghe *et al.*, 2004). Parallèlement, le B[a]P s'est révélé capable d'augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  (Lecureur *et al.*, 2005), l'IL-8 (Podechard *et al.*, 2008) ou CCL1 (N'Diaye *et al.*, 2006), dans des macrophages humains en culture primaire. Concernant les cellules de l'immunité adaptative, comme le lymphocyte, d'anciennes études rapportent qu'une exposition *in vitro* au B[a]P serait associée à une diminution de la réponse des lymphocytes T humains aux agents mitogéniques (Davila *et al.*, 1996). Chez l'homme, l'exposition aux HAPs s'est surtout traduite par la présence de nombreux adduits à l'ADN dans les lymphocytes, le niveau de ces adduits ayant été associé à un risque de développement de certains cancers (Agudo *et al.*, 2017 ; Arora *et al.*, 2015 ; Gammon *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2001). Des études sur les expositions professionnelles aux HAPs ont, enfin, rapportées des légères modifications de la fonction immunitaire, telle qu'une diminution du taux d'IgG et d'IgA, sans qu'il y ait toutefois de signes cliniques de développement de pathologies (Szczeklik *et al.*, 1994). Dans la mesure où notre modèle de lymphocyte T humain en culture primaire activé, exprimant un RAh fonctionnel, s'est révélé une cible notable des effets génotoxiques du B[a]P, nous avons souhaité nous intéresser aux effets immunotoxiques

de ce contaminant dans ces cellules. En effet, les différentes cibles moléculaires lymphocytaires du B[a]P, associées au développement d'effets immunotoxiques restent mal connus.

Dans ce cadre, nous avons cherché à caractériser la réponse globale des lymphocytes T humains activés à une exposition au B[a]P, en analysant leur transcriptome. Le transcriptome est l'ensemble des ARNs issus de l'expression des gènes du génome d'un type cellulaire ou d'un tissu, à un moment et dans des conditions données. Nous avons choisi d'analyser le transcriptome des lymphocytes T humains exposés au B[a]P, par la technique à haut débit et sans *a priori* des puces à ADN (encore appelées « microarray ») permettant de mesurer simultanément le niveau d'expression d'un large ensemble d'ARNm contenus dans un échantillon, et donc, d'identifier des signatures transcriptionnelles dans un contexte biologique particulier. Du fait de la présence d'une plateforme transcriptome Affymetrix et de la collaboration possible avec le Dr Frédéric Chalmel (IRSET UMR INSERM 1085), notre choix s'est porté sur l'utilisation d'une puce Clariom™ S « human » de la société Affymetrix. Les caractéristiques de cette puce sont présentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 6**).

**Tableau 6: Caractéristiques de la puce Clariom S d'Affymetrix.**

Contenu de la puce	
Gènes	> 20 800
Transcrits	> 337 100
Total des sondes	> 211 300
Sondes ciblant des gènes	> 205 800
Taille des sondes	25 bases 5 µm
Orientation des sondes	Anti-sens
Sensibilité	> 1,5 µM

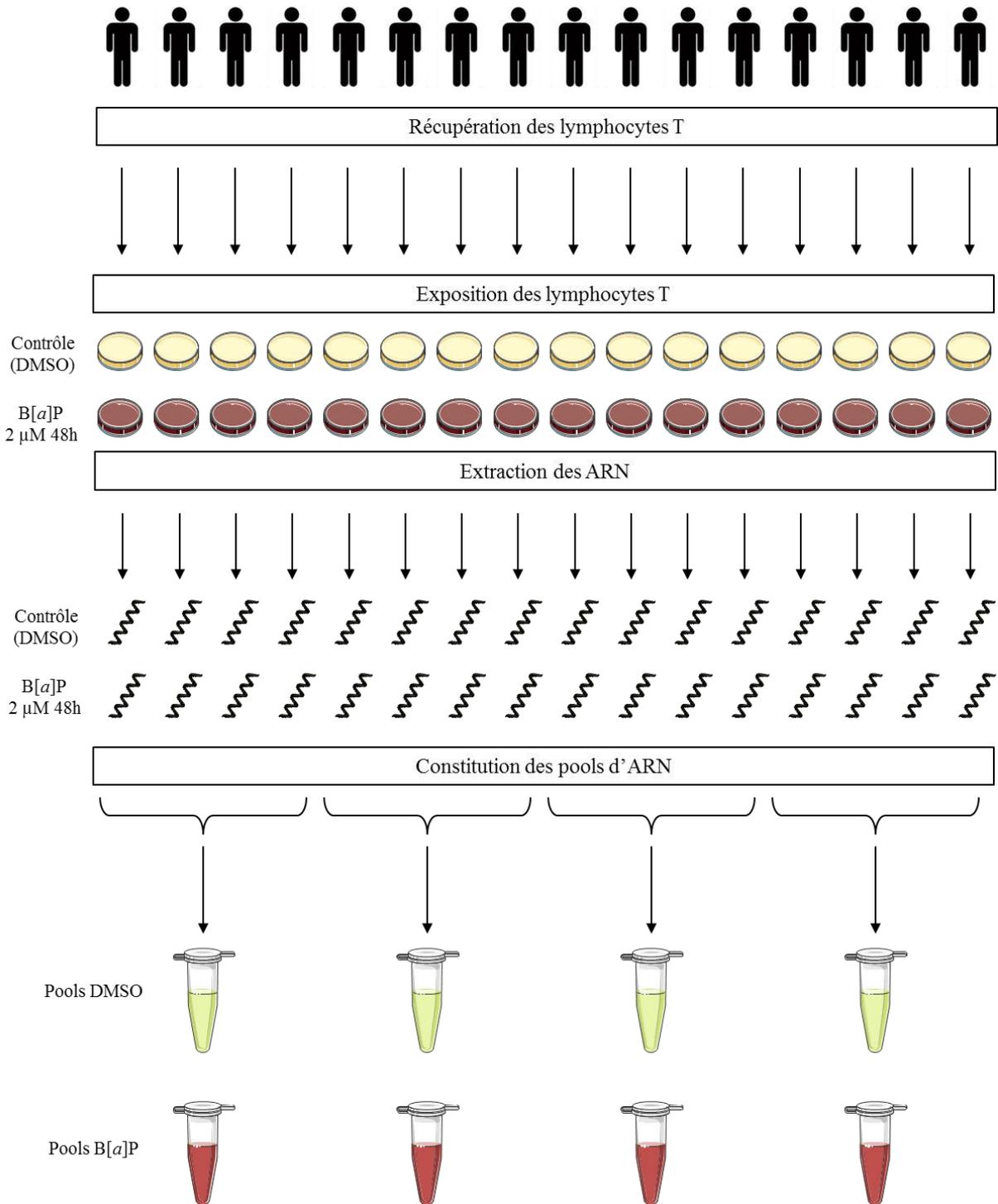


Elle se focalise sur l'analyse des gènes annotés et permet de couvrir complètement le génome transcrit, sans les variants d'épissage codants et non codants, afin de réaliser une analyse plus simple des gènes d'intérêts. Selon les conditions optimales de réponse au B[a]P des lymphocytes T humains définies par notre précédente étude, notre travail a

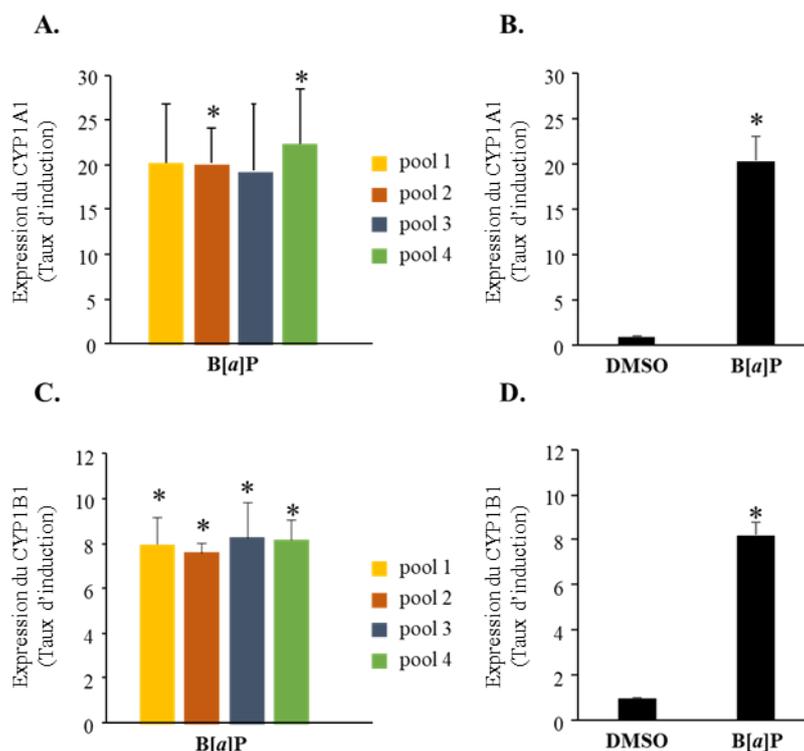
déterminé les profils d'expression géniques, les voies de signalisation et les fonctions biologiques régulées par le B[a]P dans notre modèle.

### III.2.2 – Résultats de l'étude

Notre étude transcriptomique a été réalisée à partir de pools d'ARNs isolés de lymphocytes T humains activés et exposés ou non (DMSO) à 2  $\mu$ M de B[a]P pendant 48 heures. Nous avons sélectionné les lymphocytes T humains provenant de seize donneurs différents, tous répondeurs au B[a]P. En accord avec les données de la littérature (Vral *et al.*, 2004), et celle de notre précédente étude, nous constatons des variations dans l'induction de l'expression des CYP1A1 et CYP1B1 selon les donneurs. Afin de réduire les effets des variations interindividuelles et de caractériser au mieux la signature biologique (Kendziorski *et al.*, 2005), nous avons utilisé la stratégie des pools d'ARN. Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès au sein du laboratoire, lors de l'étude du transcriptome de macrophages humains exposés au B[a]P (Sparfel *et al.*, 2010). Ainsi, en respectant certaines conditions préconisées, telles que la constitution de pools d'ARN en mélange équimolaire et la réalisation d'au moins trois points de microarrays par condition d'expérience (Kendziorski *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2007), nous avons, à partir de seize donneurs, constitué quatre pools d'ARN, chaque pool équimolaire comprenant quatre individus (**Figure 49**) répondant de manière homogène à l'exposition au B[a]P (**Figure 50**).

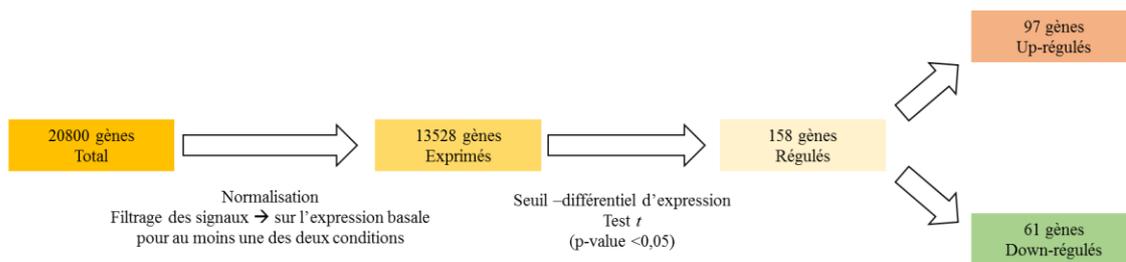


**Figure 49 : Méthodologie de l'exposition des lymphocytes T humains au B[a]P et de constitution des pools d'ARN pour l'hybridation sur les puces à ADN.**



**Figure 50: Etude de l'expression des CYP1A1 et CYP1B1 induite par le B[a]P pour chaque pool et pour l'ensemble des 16 donneurs de l'analyse.** Des lymphocytes T humains ont été isolés à partir du sang de 16 donneurs différents et ont été activés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pendant 72 heures avant d'être exposés à  $2 \mu\text{M}$  de B[a]P pendant les 48 dernières heures de culture. (A, B, C, D) L'expression génique des (A, B) CYP1A1 et (C, D) CYP1B1 a été analysée par RT-qPCR. (A, C) Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM d'expression des (A) CYP1A1 et (C) CYP1B1 de 4 individus constituant un pool. (B, D) les résultats représentent les moyennes  $\pm$  SEM d'expression génique des (B) CYP1A1 et (D) CYP1B1 de l'ensemble des 16 individus. \*  $p < 0.05$  comparé à la condition DMSO correspondante arbitrairement placée à 1 (test de Student, *t* test).

Les pools d'ARNs ont été ensuite hybridés sur quatre arrays Affymetrix (**Figure 49**). Après normalisation des données, nous avons sélectionné les gènes différentiellement exprimés selon la méthodologie présentée en figure 51 (**Figure 51**). Une première filtration est établie en sélectionnant les gènes au moins exprimés ( $>0,0$ ) dans une des deux conditions B[a]P ou DMSO. Puis un tri est réalisé sur la base du différentiel d'expression ( $<-0,137$  ou  $>0,137$  en base  $\log_2$ ). Enfin, un test statistique de student, en condition appariée et avec un seuil de significativité défini à  $p < 0,05$  permet de retenir les gènes dont l'expression est significativement modifiée après exposition au B[a]P.



**Figure 51 : Méthodologie d'analyse des données de la puce à ADN.**

### III.2.2.1 – Extraction des gènes signatures spécifiques

Nos résultats nous ont permis d'identifier 158 gènes dont l'expression est significativement régulée par le B[a]P dans les lymphocytes T humains après une exposition à 2  $\mu$ M pendant 48 heures. Ces 158 gènes comprennent 97 gènes dont l'expression est augmentée (up-régulés) et 61 gènes dont l'expression est diminuée (down-régulés). Ces 158 gènes représentent moins de 1% des gènes présents sur la puce à ADN, ce qui peut apparaître faible mais en cohérence avec d'autres études transcriptomiques pangénomiques ayant examiné les effets du B[a]P (Keshava *et al.*, 2005b ; Mahadevan *et al.*, 2005 ; Hockley *et al.*, 2006). De plus, dans la mesure où le temps et la dose d'exposition au B[a]P module la proportion de gènes régulés sur l'ensemble du génome (Hockley *et al.*, 2006 ; Sparfel *et al.*, 2010 ; van Delft *et al.*, 2010), nous ne pouvons pas exclure que des conditions de traitement au B[a]P différentes seraient à l'origine d'un plus grand nombre de régulations géniques, comme il a été montré précédemment au laboratoire, dans les macrophages humains exposés au B[a]P (Sparfel *et al.*, 2010). Enfin, l'expression génique dans les lymphocytes T activés a été montrée comme étant finement régulée, et ce par une diminution rapide des ARNm dans le but de contrôler la réponse immunitaire, soulignant ainsi une réponse transitoire de l'expression des gènes dans ce modèle (Raghavan *et al.*, 2002). Nos résultats montrent également que le B[a]P est à l'origine de variations de l'expression génique de faibles amplitudes dans les lymphocytes T humains. Cette compression des différentiels d'expression a déjà été décrite avec la technique des microarrays et pourrait être due à des conditions stringentes de normalisation (Ambroise *et al.*, 2011). Nos données ont toutefois été validées sur les mêmes pools d'ARN que ceux utilisés en microarray, par une approche de qPCR, avec une corrélation significative entre les deux approches, témoignant de la robustesse de celles-ci. Concernant l'identification des gènes mis en

évidence par notre étude transcriptomique, nous observons certains gènes déjà connus comme étant des cibles du B[a]P dans les lymphocytes T humains, tels que le CYP1A1 et le CYP1B1 ou la CDKN1A (Liamin *et al.*, 2017) validant nos expériences de microarrays. Nous observons aussi des régulations géniques par le B[a]P déjà décrites dans d'autres modèles cellulaires comme celle du RRAh, de la cycline CCNE2, de la NQO1 ou de la poly[ADP-ribose]polymerase TiPARP (Bernshausen *et al.*, 2006; Brauze *et al.*, 2017). Nous avons validé ces régulations géniques sur les ARNm individuels extraits des lymphocytes T humains des sujets ayant servi à la réalisation des pools de l'étude transcriptomique. Nos résultats nous ont aussi permis d'identifier de nouveaux gènes cibles du B[a]P tels que le facteur de croissance de fibroblastes FGF2, le marqueur CD109, le TGF111, les protéines induites par l'IFN, IFI44L, IFI44 et IFIT2, la protéine oligoadenylate synthase-like OASL ou l'antigène de surface THY1. Comme précédemment, nous avons validé, sur les mêmes ARNs individuels, l'augmentation de l'expression génique de FGF2, CD109 et TGF111 et la diminution de celle de IFIT2, IFI44L, IFI44, OASL, PRG4 et THY1. Il pourrait alors être intéressant de vérifier si des régulations similaires existent au niveau protéique pour ces derniers. Ceci serait particulièrement intéressant pour des gènes identifiés tel que positivement régulés par le B[a]P dans notre modèle, comme le récepteur tyrosine kinase KIT, l'adrénomédulline ADM, la protéine contenant des domaines Stathmin STMND1, la chaîne de collagène COL6A3, et la phosphatase INPP4, pour lesquels une faible expression basale apparaît suivie d'une forte induction par le B[a]P (données non illustrées) en ARNm dans notre modèle, laissant supposer des rôles intéressants de ceux-ci dans les fonctions lymphocytaires.

### III.2.2.2 – Identification des voies ou fonctions biologiques spécifiques.

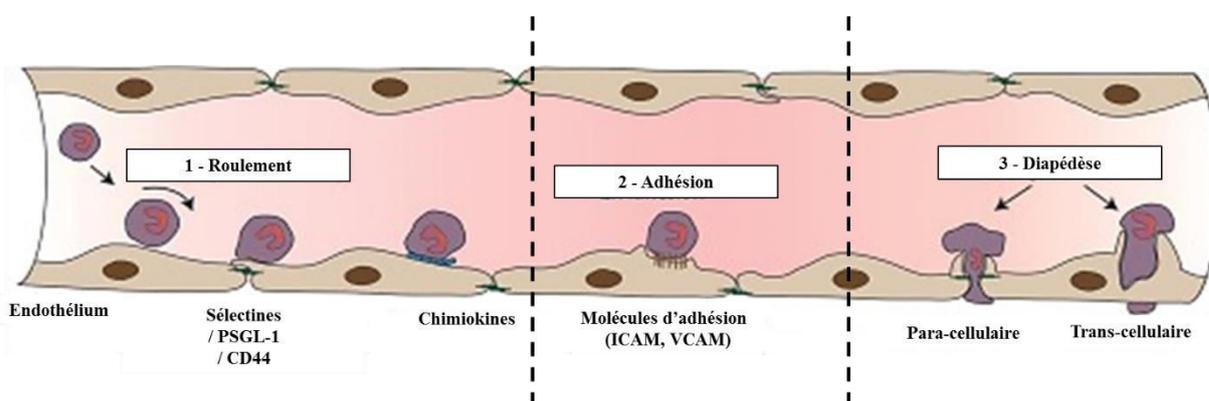
L'analyse *in silico* de nos données transcriptomiques a été réalisée avec l'application logicielle Ingenuity Pathway Analysis (IPA). IPA est une base de données contenant les interactions biologiques et les annotations fonctionnelles créées à partir de millions de relations modélisées entre gènes, ARN, protéines, métabolites, cellules, tissus, médicaments et maladies. A partir de résultats expérimentaux (dans notre cas, données de microarrays sur l'ensemble des 158 gènes régulés), il permet d'établir les relations entre les molécules, les mécanismes et fonctions et les réseaux d'intérêts afin de générer de nouvelles hypothèses à tester. L'utilisation d'IPA montre de manière peu surprenante que la voie majeure de signalisation activée par une exposition des lymphocytes T humains au B[a]P est la voie du RAh, avec la régulation des gènes tels que le CYP1A1, le CYP1B1 l'AhRR, la CCNE2, la NQO1, la CDKN1A. De manière inattendue, l'application logicielle IPA nous a permis de mettre en évidence un effet du B[a]P sur la voie de l'interféron. Cette voie, impliquée notamment dans la réponse antivirale (Green *et al.*, 2013 ; Xia *et al.*, 2014), et la réponse antitumorale (Yuan *et al.*, 2014), a déjà été liée au caractère immunotoxique des HAPs, notamment dans les processus pro-inflammatoires impliqués dans l'asthme (Tang *et al.*, 2012 ; Hew *et al.*, 2015). Concernant les fonctions biologiques altérées en réponse au B[a]P, IPA souligne qu'un grand nombre de gènes régulés sont impliqués dans les mouvements cellulaires et le trafic des cellules immunitaires. Cela a attiré notre attention et nous avons réalisé un état des lieux bibliographique sur les liens entre exposition au B[a]P et altération de la capacité migratoire des lymphocytes T humains. Peu de données sont apparues. Une seule étude protéomique fait état d'une diminution de l'expression de protéines impliquées dans la motilité cellulaire par le B[a]P dans la lignée de cellules T Jurkat (Oh *et al.*, 2004). Toujours dans des modèles de cellules cancéreuses, il a été rapporté une diminution de la migration cellulaire par la TCDD, celle-ci favorisant la survie de ces cellules et étant en cohérence avec l'influence de facteurs environnementaux sur les processus impliqués dans la progression tumorales (Barouki *et al.*, 2010). L'équipe ayant rapporté ces résultats montre également une induction du gène SOS1 connu pour son rôle important dans les fonctions cellulaires de division, différenciation et migration des cellules cancéreuses hépatiques (Pierre *et al.*, 2011). De manière intéressante, notre analyse transcriptomique met aussi en évidence l'induction de ce gène par le B[a]P dans les lymphocytes T

humains activés. La régulation, mise en évidence par le B[a]P, de la fonction de migration, associées celle de la voie de signalisation de l'adhésion et de la diapédèse des cellules agranulocytes (données non illustrées), nous fait émettre l'hypothèse que le B[a]P pourrait altérer la capacité migratoire des lymphocytes T.

**Cette analyse présente une « photographie » des gènes lymphocytaires régulés par le B[a]P à une concentration de 2  $\mu$ M et pour un temps d'exposition de 48 heures et supporte l'hypothèse que les lymphocytes T humains représentent une cible majeure de la toxicité du B[a]P.**

### III.2.3 – Poursuite de l'étude

Comme nous venons de le voir, l'impact du B[a]P sur le recrutement et la migration des lymphocytes T a été très peu documenté. Dans la mesure où un certain nombre de gènes identifiés par notre étude transcriptomique est en lien avec la migration transendothéliale tels que la protéine d'adhésion SELL, la chimiokine CCL3, le récepteur S1PR1 et le marqueur CD226, nous avons choisi de tester l'effet du B[a]P sur la migration des lymphocytes à travers l'endothélium à l'aide d'un test simple de migration cellulaire. La migration des lymphocytes peut se faire par passage para-cellulaire ou par passage trans-cellulaire au niveau de l'endothélium (Timmerman *et al.*, 2016) (**Figure**

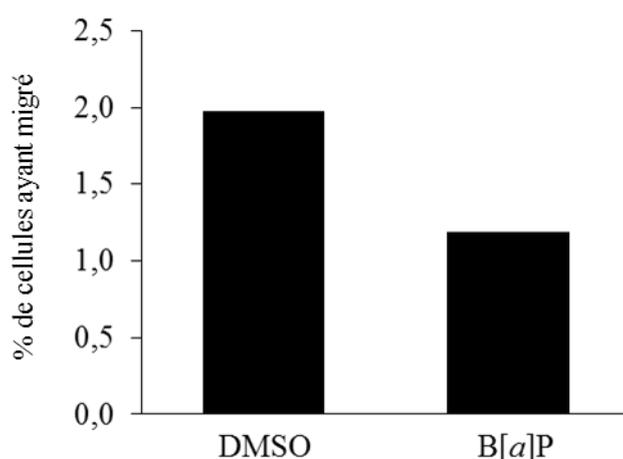


52).

**Figure 52 : Etapes de la migration des leucocytes et diapédèse au niveau de l'endothélium.** Le recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires est initié par les cytokines et chimiokines produites au niveau du site inflammatoire. Les leucocytes circulant sont « capturés » par des molécules d'adhésion endothéliales possédant de faible affinité d'interaction avec leurs ligands leucocytaires (E- et L-sélectines). Cette capture permet un ralentissement des leucocytes et leur roulement sur l'endothélium. Les chimiokines présentes au niveau de l'endothélium entraîne un changement de conformation des intégrines leucocytaires, comme LFA-1 ou VLA-4, permettant le contact avec les molécules d'adhésion endothéliale ICAM (Intercellular adhesion molecule 1) et VCAM (vascular cell adhesion molecule 1) respectivement. Cette interaction conduit à une adhésion forte des leucocytes et à leur arrêt. Enfin, les leucocytes franchissent la barrière endothéliale en migrant soit de façon para-cellulaire à travers les jonctions intercellulaires, soit de façon trans-cellulaire par transcytose, à travers une cellule endothéliale. D'après Timmerman *et al.*, 2016

Le mode de passage para-cellulaire est le plus utilisé par les leucocytes pour franchir l'endothélium (Carman *et al.*, 2007), mais la migration trans-cellulaire représente un mécanisme moins contraignant pour la cellule. La migration *via* ce processus est augmentée au niveau de l'endothélium microvasculaire, passant de 10 % de cellules migrant par diapédèse trans-cellulaire dans les endothéliums de gros vaisseaux sanguins à 30 % dans les endothéliums de micro-vaisseaux sanguins (Carman *et al.*, 2007).

Afin de documenter un éventuel effet du B[a]P sur la migration des lymphocytes T, nous avons mis au point la culture de cellules endothéliales HMEC-1 sur des inserts pour plaque multi-puits, de porosité 8  $\mu\text{m}$ . Les cellules HMEC-1, lignée issue de cellules endothéliales de vaisseaux microvasculaires de prépuce humain, présentent les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles des cellules endothéliales microvasculaires normales et sont capables de lier de façon spécifiques les lymphocytes (Ades *et al.*, 1992). Vingt-quatre heures avant l'expérience de migration, les cellules HMEC-1 confluentes sont stimulées avec du TNF- $\alpha$ , favorisant l'expression de molécules d'adhésion, telles que les protéines ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) favorisant l'adhésion et la diapédèse leucocytaire (Panés *et al.*, 1995 ; Elices *et al.*, 1990 ; Madge et Pober, 2001). Les lymphocytes T issus du sang de donneurs, activés par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pendant 72 heures puis exposés à 2  $\mu\text{M}$  de B[a]P pendant les 48 dernières heures, sont déposés sur les cellules HMEC-1 pendant 3 heures. A la fin de ce temps, les lymphocytes T ayant migré à travers les cellules endothéliales sont récupérés puis comptés. Une coloration au bleu trypan est réalisée en parallèle afin de s'assurer de la viabilité lymphocytaire. Nos premiers résultats (**Figure 53**) montrent une diminution du pourcentage de lymphocytes T ayant migré au travers des cellules HMEC-1, suggérant ainsi une diminution de la capacité migratoire de nos cellules exposées au B[a]P. Ces résultats préliminaires sont basés sur deux expériences indépendantes et sont à reproduire dans les semaines qui suivent en ajoutant notamment un contrôle positif de la migration lymphocytaire par addition de facteurs chémoattractants. Nous pourrions aussi évaluer le rôle de la signalisation à l'IFN pour laquelle nous avons vu une perturbation après exposition au B[a]P.



**Figure 53: Etude de la migration transendothéliale des lymphocyte T humains en présence de B[a]P.** Des lymphocytes T humains en culture primaire, activés avec des anticorps anti-CD3/anti-CD28 pendant 72 heures ont été exposés ou non (DMSO) à 2  $\mu$ M de B[a]P pendant les 48 dernières heures. La capacité de migration des cellules est représentée par le pourcentage de lymphocytes T ayant migré dans le compartiment inférieur après une exposition au DMSO ou au B[a]P. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences indépendantes réalisées à partir des lymphocytes issus de donneurs différents.

**Pour conclure, nos premiers résultats soulignent une perturbation de la capacité migratoire des lymphocytes T humains normaux après exposition au B[a]P. Ces résultats suggèrent un rôle du B[a]P, et plus largement des HAPs, sur les fonctions de migration des lymphocytes T.**

## IV – CONCLUSION GENERALE

De nombreux aspects de mon travail ont déjà été discutés dans les paragraphes précédents de ce manuscrit. Aussi, je ne discuterai ici que des perspectives à long terme de nos études.

Ces dernières années, l'exposition humaine à de nombreux polluants environnementaux est devenue une préoccupation majeure en santé publique. Parmi les contaminants environnementaux, les HAPs constituent une famille de composés organiques très répandus. Ils sont essentiellement formés lors des processus de combustion dans des proportions relativement importantes imposant aujourd'hui la surveillance de leurs teneurs dans l'alimentation ou dans l'air ambiant (Domingo et Nadal 2015; Kim *et al.*, 2013). Le B[a]P est considéré comme le HAP de référence. Il a été classé comme cancérigène avéré pour l'Homme (Groupe 1) par le CIRC et est considéré comme traceur du risque cancérigène pour la famille des HAPs. D'autres HAPs sont également classés par le CIRC comme agents cancérigènes probables (groupe 2a, comme le DB[a,h]A), ou cancérigène possible (groupe 2b, comme le Chr). Les autres effets des HAPs sur la santé humaine ne sont que partiellement connus, et ont surtout été documentés à partir d'études expérimentales chez l'animal. Des effets sur le foie, le système sanguin, le système cardiovasculaire ou encore des effets reprotoxiques ou immunosuppresseurs ont ainsi été mis en évidence (CIRC, 2010). La toxicité des HAPs sur le système immunitaire pourrait contribuer à leurs effets néfastes sur la santé humaine. En effet, ce système, en nous protégeant des agressions extérieures et des xénobiotiques, est en première ligne face à une exposition à des contaminants environnementaux. Son affaiblissement est aujourd'hui largement reconnu quant au développement de nombreuses pathologies liées à notre environnement, comme l'asthme ou le cancer. De nombreux effets immunotoxiques des HAPs ont été décrits dans des modèles animaux, rapportant des altérations de l'immunité innée, mais aussi, et surtout, de l'immunité adaptative. Ainsi, les lymphocytes, cellules clés de cette immunité, se sont révélés des cellules cibles de la toxicité des HAPs, et des effets immunosuppresseurs altérant à la fois l'immunité humorale et cellulaire ont été rapportés, chez des rongeurs (Dean et Thurmond, 1987). Si ces modèles se sont révélés pertinents pour l'étude en immunologie, il est à l'heure actuelle clairement établi que la transposition à l'Homme, des données expérimentales établies dans ces modèles, est incertaine (Mestas et Hughes, 2004). En effet, les composants et les propriétés du système immunitaire chez la souris et chez l'Homme ne sont pas rigoureusement identiques. A titre d'exemple, des effets

contradictoires sur la différenciation des lymphocytes pro-inflammatoires Th17 ont été rapportés après exposition à la TCDD chez ces deux espèces (Ho et Steinman, 2008). Dans la mesure où le lymphocyte est un acteur important dans l'organisme, dont la dérégulation participe à de nombreux troubles, tels que ceux observés par un traitement aux HAPs, il semble justifié de documenter les effets de ces contaminants sur la fonction lymphocytaire humaine. Il existe des interactions complexes entre système immunitaire, et plus particulièrement entre les lymphocytes T, et les HAPs. Chez l'Homme, les expositions professionnelles au coke et aux bitumes entraînent une diminution de la prolifération des lymphocytes T (Karakaya *et al.*, 2004), et les expositions aux fumées de feu de bois entraînent des changements dans les populations de lymphocytes T (Burchiel *et al.*, 2016). Ces études épidémiologiques, permettent de prendre en compte la complexité biologique du système immunitaire, mais ne permettent pas de comprendre les mécanismes en cause dans la perturbation mise en évidence lors d'expositions à des mélanges dont les compositions sont mal caractérisées. A ce niveau, seule l'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* pourrait se révéler utile. Ainsi, les lymphocytes T, facilement accessibles par simple ponction sanguine chez l'Homme, et particulièrement abondants dans le sang, apparaissent comme un modèle biologique pertinent pour analyser les effets d'une exposition aux HAPs, et identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces effets. Il permet par ailleurs d'identifier des signatures moléculaires géniques, en réponse aux HAPs, potentiellement intéressantes comme biomarqueurs d'exposition et ou d'effet. A l'heure actuelle, différents biomarqueurs sont proposés pour évaluer l'exposition humaine aux HAPs, comme la mesure des métabolites des HAPs dans les urines (1-OHP et 3-OHB[a]P) et les tests génotoxiques (adduits à l'ADN et aberrations chromosomiques), dont la mise en pratique et l'interprétation peuvent être délicates (Bonassi *et al.*, 2011). L'étude des cibles géniques lymphocytaires des HAPs reflète la réponse génomique de cette cellule après exposition aux contaminants correspondants par conséquence à des biomarqueurs d'effets précoces des HAPs. Les données obtenues étant quantifiables, elles sont ensuite susceptibles d'être modélisables pour une utilisation potentielle en épidémiologie moléculaire. Cette approche de découverte de nouveaux biomarqueurs d'exposition dans les cellules sanguines a été mise au point avec succès pour des travailleurs exposés au benzène (Forrest *et al.*, 2005).

Dans ce cadre, le but de mon travail de thèse a été de caractériser la réponse des lymphocytes T humains en culture primaire à une exposition au B[a]P, seul ou en

mélange avec d'autres HAPs. Nos objectifs étaient : (1) sur un plan fondamental, d'identifier les mécanismes moléculaires en lien avec la toxicité des HAPs dans ce modèle primaire, et (2) sur un plan plus appliqué, de proposer des biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet à ces contaminants à partir de signatures transcriptionnelles identifiées. Mon travail s'est limité à l'étude des effets du B[a]P seul et en mélange binaire avec un autre HAP. Cette approche simple permet de mettre en évidence la modulation des effets du B[a]P, considéré comme le HAP de référence et d'analyser ses interactions avec un autre HAP. En effet, il a été montré que plus le mélange était complexe, moins il se produisait d'interactions (Parvez *et al.*, 2009).

Dans notre première étude (Liamin *et al.*, 2017), nous avons mis en évidence les effets génotoxiques du B[a]P dans les lymphocytes T humains en culture primaire activés de façon physiologiquement pertinente avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Ces effets sont liés à la survenue de dommages à l'ADN suivis de mutations sans altération de la viabilité cellulaire dans ce modèle. Ces résultats décrivent pour la première fois le caractère mutagène du B[a]P dans des lymphocytes T humains en culture primaire et renforcent le lien entre exposition aux HAPs et la survenue de lymphomes récemment décrite. Si des études menées chez l'animal ont montré qu'une exposition aux HAPs augmentait la survenue de lymphomes, (Buters *et al.*, 1999 ; Dobrovolsky *et al.*, 2015), seulement deux études épidémiologiques mettent en évidence un lien entre l'exposition à des mélanges contenant des HAPs et la survenue de lymphomes à cellules T (Morton *et al.*, 2014 ; DellaValle *et al.*, 2016). Nos travaux mettent en évidence le lien entre l'exposition *in vitro* au B[a]P et la survenue de mutations, modifications définitives de l'ADN transmises aux cellules fille dont la participation à l'initiation tumorale est largement reconnue, identifiant l'exposition à ces contaminants comme facteurs de risque contribuant à la survenue d'un cancer. De telles associations entre propriétés génotoxiques et immunotoxiques lymphocytaires et risques de lymphomes ont été décrites pour des xénobiotiques comme les pesticides dont l'exposition est là aussi suspectée dans l'augmentation des risques de ces tumeurs. En effet, des agriculteurs exposés à certains pesticides présentent un nombre élevé de cellules sanguines porteuses d'une translocation chromosomique, modification définitive de l'ADN associée au développement de certains lymphomes (Agopian *et al.*, 2009 ; Chiu *et al.*, 2009). De même, l'exposition au rayonnement solaire, à l'origine de mutations suite à la formation de dimères de thymine dans l'ADN, représente un facteur de risque pour la survenue de lymphomes par

altération du système immunitaire (Bruce *et al.*, 2007). Parallèlement à l'identification des facteurs de risques contribuant à la survenue de cancers, il convient de caractériser les mutations génétiques contribuant à la transformation tumorale. Celles-ci peuvent être identifiées par exemple par des techniques de séquençage à haut débit, conduisant alors au développement de nouveaux biomarqueurs de la pathologie cancéreuse. A ce niveau, l'utilisation de cellules circulantes comme le lymphocyte présente un intérêt certain. Les lymphocytes T ont ainsi récemment été utilisés pour rendre compte de la survenue de mutations dans certains gènes comme TP53 ou ATM (Coffee *et al.*, 2017).

Dans notre deuxième étude (Liamin *et al.*, en rédaction), une analyse globale transcriptomique des lymphocytes T humains exposés au B[a]P nous permet de disposer d'un certain nombre de gènes cibles du HAP et par conséquent d'aborder les bases moléculaires de ses effets toxiques vis-à-vis du lymphocyte. De manière générale, une analyse transcriptomique pangénomique et donc sans *a priori*, sur lymphocytes humains après exposition aux HAPs apparaît intéressante car les cellules humaines normales, bien qu'étant les cibles originelles des contaminants environnementaux, sont relativement peu analysées en toxicogénomique. De plus, la nature exacte des cibles géniques lymphocytaires régulées par les HAPs, ainsi que le lien avec le risque génotoxique mis en évidence dans notre première étude ne sont pas caractérisés. Nos résultats, en lien avec nos études plus anciennes, montrant la faisabilité et l'intérêt de l'approche transcriptomique dans des modèles immunologiques humains de culture primaire pour identifier les signatures moléculaires d'exposition aux HAPs (Sparfel *et al.*, 2010), démontrent la spécificité cellulaire de réponse génique préalablement décrite dans d'autres modèles cellulaires (Frericks *et al.*, 2007). En effet, un certain nombre des signatures géniques mises en évidence apparaissent spécifiques du lymphocyte, et peu chevauchantes avec les cibles identifiées dans le macrophage humain exposé au B[a]P (Sparfel *et al.*, 2010). C'est le cas par exemple, pour les gènes impliqués dans la voie de l'IFN. Ces derniers apparaissent en effet inhibés dans notre modèle et un rapprochement avec une augmentation de la prévalence des infections virales peut alors être envisagée. En effet, l'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes T CD4+ s'est révélé essentiel à la survie de l'hôte et la réponse immunitaire à médiation cellulaire, lors d'infections chez la souris (Green *et al.*, 2013). De plus, l'exposition à l'IFN de type I augmente le nombre de lymphocyte T CD8+ *in vivo* (Wiesel *et al.*, 2012) et favorise la réponse antitumorale médiée par ces lymphocytes (Yuan *et al.*, 2014). Si dans ces modèles de rongeurs,

l'impact des HAPs, sur ces réponses lymphocytaires à l'IFN, a bien été mis en évidence (Guan *et al.*, 2017), chez l'Homme, il n'existe que peu de données sur celles-ci. Ceci peut être dû à l'absence d'indicateurs d'immunotoxicité dans les études cliniques et épidémiologiques concernant l'effet de contaminants environnementaux sur la santé humaine. Du fait de la nature multifactorielle complexe du système immunitaire, et des réponses immunes, les études d'exposition *in vivo* apparaissent comme la meilleure solution. Cependant, les études *in vitro* sont intéressantes pour appréhender un mécanisme d'immunotoxicité chez l'Homme comme nous venons de le voir pour la voie de l'IFN. La sécrétion d'IFN dans notre modèle doit être caractérisée, de même que les voies de signalisation impliquées dans la réponse à ces cytokines en nous intéressant plus particulièrement à son effet sur l'adhésion et la migration cellulaire. En effet, notre analyse transcriptomique nous a permis de mettre en évidence des signatures lymphocytaires liées à l'exposition au B[a]P impliquant une diminution de la migration des lymphocytes T et plus particulièrement leur migration transendothéliale. Chez la souris, il a été montré que la restauration de l'expression de l'IFN- $\gamma$  au niveau des tumeurs augmente la migration des cellules immunitaires dépendante des chimiokines vers ces sites de tumeurs (Peng *et al.*, 2012), et notamment la migration des lymphocytes T vers les sites d'inflammation en permettant la migration transendothéliale (Tay *et al.*, 2003). De manière générale, très peu d'études se sont intéressées aux effets des HAPs sur la fonction de migration lymphocytaire, et plus particulièrement sur celle de la migration transendothéliale. Seules deux études associent l'exposition aux HAPs à une diminution de la motilité des cellules T de la lignée Jurkat (Oh *et al.*, 2004) et à une diminution de l'expression des molécules d'adhésion situées à la surface de l'endothélium vasculaire (Lo *et al.*, 2017). Dans la mesure où la migration transendothéliale des lymphocytes T représente un évènement clé lors des processus tels que l'inflammation, elle-même affectée par une exposition aux HAPs (Baricza *et al.*, 2016), il apparaît très intéressant de rechercher l'effet du B[a]P sur la transmigration endothéliale des lymphocytes T, et de vérifier si un lien existe avec la diminution de la signalisation de l'IFN observée dans notre modèle. Il apparaît aussi intéressant de rechercher l'impact des autres HAPs, utilisés lors de notre première étude, seuls ou en mélanges avec le B[a]P, sur la migration transendothéliale des lymphocytes T. En effet, si la génotoxicité des différents HAPs, semble globalement dépendante de la liaison au RAh, et implique l'activation des CYPs (Moorthy *et al.*, 2015), leurs effets immunotoxiques n'impliquent pas toujours cette activation. Par exemple, le B[a]P et le Chr induisent tous les deux l'activité du CYP1A1

suite à l'activation du RAh, mais si l'activation de ce dernier participe aux effets immunosuppresseurs du B[a]P, il n'est pas impliqué dans l'immunosuppression induite par le Chr (Silkworth *et al.*, 1995). Dans la mesure où notre étude transcriptomique nous a permis d'identifier un nouveau mécanisme potentiel d'immunotoxicité du B[a]P, nous souhaitons mesurer l'impact d'autres HAPs, seuls et en mélange avec le B[a]P, sur ce mécanisme. A plus long terme, nous pourrions corréler les effets sur la migration transendothéliale des différents HAPs avec leur capacité à induire des effets inflammatoires.

L'étude des profils de transcriptomes, afin d'émettre des hypothèses concernant leurs mécanismes de toxicité, permet de mettre en évidence la régulation de gènes spécifiques et d'y associer des voies de signalisation en réponse aux stress environnementaux (McHale *et al.*, 2010). Ainsi, en identifiant ici plusieurs cibles géniques régulées par les HAPs, nous disposons de potentiels biomarqueurs précoces d'exposition et/ou d'effet à ces contaminants. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe de nombreuses limites à l'utilisation des biomarqueurs actuellement disponibles pour l'exposition aux HAPs. De ce fait, la recherche de nouveaux biomarqueurs en santé environnementale représente un champ d'investigation scientifique de première importance. Les approches globales comme la toxicogénomique, visant à analyser les profils transcriptomiques de milliers de gènes en réponse à une substance chimique traduisant une réponse *in situ* de l'organisme, apparaissent ici pertinentes. De telles approches dans des modèles lymphocytaires sont intéressantes à développer du fait, non seulement, de la facilité d'obtention du matériel cellulaire, par simple prélèvement sanguin, mais aussi de leur capacité à être représentatifs d'une exposition à long terme par rapport à d'autres cellules sanguines comme les monocytes ou les granulocytes, témoins d'une exposition récente. Toutefois, à l'heure actuelle, ces approches sont peu utilisées du fait d'un seuil de base difficile à déterminer, ainsi que des variabilités d'expression associées aux différents stades de la vie, et du vieillissement (Wild *et al.*, 2013).

**Au total, les résultats acquis dans ce travail ont permis d'améliorer notablement nos connaissances sur l'immunotoxicité des HAPs : gènes, voies de signalisation et fonctions régulées, développement de biomarqueurs d'exposition ou d'effet. La caractérisation des dangers potentiels associés à l'exposition à ces contaminants environnementaux grâce à l'analyse des mécanismes cellulaires et**

**moléculaires de toxicité, apparait comme une étape essentielle pour évaluer leurs risques sanitaires et environnementaux. Ce type d'études, associé à la mesure de l'exposition, est primordial pour prévoir des mesures de gestion appropriées en santé environnementale.**

## Bibliographie

- Abbott, B. D., L. S. Birnbaum, et G. H. Perdew. « Developmental Expression of Two Members of a New Class of Transcription Factors: I. Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in the C57BL/6N Mouse Embryo ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 204, n° 2 (octobre 1995): 133-43. <https://doi.org/10.1002/aja.1002040204>.
- Abdelrahim, Maen, Eric Ariazi, Kyoung Hyun Kim, Shaheen Khan, Rola Barhoumi, Robert Burghardt, Shengxi Liu, et al. « 3-Methylcholanthrene and Other Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists Directly Activate Estrogen Receptor Alpha ». *Cancer Research* 66, n° 4 (15 février 2006): 2459-67. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3132>.
- Abdel-Shafy, Hussein I., et Mona S. M. Mansour. « A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation ». *Egyptian Journal of Petroleum* 25, n° 1 (1 mars 2016): 107-23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- Adachi, J., Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C. A. Miller, T. Kato, K. Saeki, et T. Matsuda. « Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine ». *The Journal of Biological Chemistry* 276, n° 34 (24 août 2001): 31475-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100238200>.
- Ades, Edwin W, Francisco J Candal, Robert A Swerlick, Velma G George, Susan. Summers, Diane C Bosse, et Thomas J Lawley. « HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line ». *Journal of Investigative Dermatology* 99, n° 6 (1 décembre 1992): 683-90. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12613748>.
- Agirre, Xabier, José Luis Vizmanos, María J. Calasanz, Marina García-Delgado, María J. Larráyo, et Francisco J. Novo. « Methylation of CpG Dinucleotides and/or CCWGG Motifs at the Promoter of TP53 Correlates with Decreased Gene Expression in a Subset of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients ». *Oncogene* 22, n° 7 (20 février 2003): 1070-72. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206236>.
- Agopian, Julie, Jean-Marc Navarro, Anne-Claire Gac, Yannick Lecluse, Mélanie Briand, Pierre Grenot, Pascal Gauduchon, et al. « Agricultural Pesticide Exposure and the Molecular Connection to Lymphomagenesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 206, n° 7 (6 juillet 2009): 1473-83. <https://doi.org/10.1084/jem.20082842>.
- Agudo, Antonio, Marco Peluso, Armelle Munnia, Leila Luján-Barroso, Aurelio Barricarte, Pilar Amiano, Carmen Navarro, et al. « Aromatic DNA Adducts and Breast Cancer Risk: A Case-Cohort Study within the EPIC-Spain ». *Carcinogenesis* 38, n° 7 (1 juillet 2017): 691-98. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx047>.
- Alexandrov, Kroum, Margarita Rojas, et Christian Rolando. « DNA Damage by Benzo(a)Pyrene in Human Cells Is Increased by Cigarette Smoke and Decreased by a Filter Containing Rosemary Extract, Which Lowers Free Radicals ». *Cancer Research* 66, n° 24 (15 décembre 2006): 11938-45. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3277>.
- Allan, Lenka L., Jennifer J. Schlezinger, Maryam Shansab, et David H. Sherr. « CYP1A1 in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced B Lymphocyte Growth Suppression ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, n° 1 (31 mars 2006): 227-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.131>.
- Ambroise, Jérôme, Bertrand Bearzatto, Annie Robert, Bernadette Govaerts, Benoît Macq, et Jean-Luc Gala. « Impact of the spotted microarray preprocessing method on fold-change compression and variance stability ». *BMC Bioinformatics* 12 (25 octobre 2011): 413. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-413>.

- Ambudkar, S. V., S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, et M. M. Gottesman. « Biochemical, Cellular, and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39 (1999): 361-98. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>.
- Anandakumar, P., S. Kamaraj, S. Jagan, G. Ramakrishnan, S. Asokkumar, C. Naveenkumar, S. Raghunandhakumar, et T. Devaki. « Capsaicin Inhibits Benzo(a)Pyrene-Induced Lung Carcinogenesis in an in Vivo Mouse Model ». *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 61, n° 11 (novembre 2012): 1169-75. <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0511-1>.
- Andersson, Björn, Susann Fält, et Bo Lambert. « Strand specificity for mutations induced by (+)-anti BPDE in the hprt gene in human T-lymphocytes ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 269, n° 1 (septembre 1992): 129-40. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90168-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90168-2).
- Andreola, F., P. M. Fernandez-Salguero, M. V. Chiantore, M. P. Petkovich, F. J. Gonzalez, et L. M. De Luca. « Aryl Hydrocarbon Receptor Knockout Mice (AHR<sup>-/-</sup>) Exhibit Liver Retinoid Accumulation and Reduced Retinoic Acid Metabolism ». *Cancer Research* 57, n° 14 (15 juillet 1997): 2835-38.
- Apetoh, Lionel, Francisco J. Quintana, Caroline Pot, Nicole Joller, Sheng Xiao, Deepak Kumar, Evan J. Burns, David H. Sherr, Howard L. Weiner, et Vijay K. Kuchroo. « The Aryl Hydrocarbon Receptor Interacts with C-Maf to Promote the Differentiation of Type 1 Regulatory T Cells Induced by IL-27 ». *Nature Immunology* 11, n° 9 (septembre 2010): 854-61. <https://doi.org/10.1038/ni.1912>.
- Archuleta, M. M., G. L. Schieven, J. A. Ledbetter, G. G. Deanin, et S. W. Burchiel. « 7,12-Dimethylbenz[a]Anthracene Activates Protein-Tyrosine Kinases Fyn and Lck in the HPB-ALL Human T-Cell Line and Increases Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C-Gamma 1, Formation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate, and Mobilization of Intracellular Calcium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, n° 13 (1 juillet 1993): 6105-9.
- Atlas, Steven A., Elliot S. Vesell, et Daniel W. Nebert. « Genetic Control of Interindividual Variations in the Inducibility of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in Cultured Human Lymphocytes ». *Cancer Research* 36, n° 12 (1 décembre 1976): 4619-30.
- Azqueta, Amaya, Leire Arbillaga, Adela López de Cerain, et Andrew Collins. « Enhancing the Sensitivity of the Comet Assay as a Genotoxicity Test, by Combining It with Bacterial Repair Enzyme FPG ». *Mutagenesis* 28, n° 3 (mai 2013): 271-77. <https://doi.org/10.1093/mutage/get002>.
- Baba, T., J. Mimura, K. Gradin, A. Kuroiwa, T. Watanabe, Y. Matsuda, J. Inazawa, K. Sogawa, et Y. Fujii-Kuriyama. « Structure and Expression of the Ah Receptor Repressor Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 276, n° 35 (31 août 2001): 33101-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011497200>.
- Bach, Peter B., Michael W. Kattan, Mark D. Thornquist, Mark G. Kris, Ramsey C. Tate, Matt J. Barnett, Lillian J. Hsieh, et Colin B. Begg. « Variations in Lung Cancer Risk among Smokers ». *Journal of the National Cancer Institute* 95, n° 6 (19 mars 2003): 470-78.
- Backlund, Maria, et Magnus Ingelman-Sundberg. « Different Structural Requirements of the Ligand Binding Domain of the Aryl Hydrocarbon Receptor for High- and Low-Affinity Ligand Binding and Receptor Activation ». *Molecular Pharmacology* 65, n° 2 (1 février 2004): 416-25. <https://doi.org/10.1124/mol.65.2.416>.
- Bakkenist, Christopher J., et Michael B. Kastan. « DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation ». *Nature* 421, n° 6922 (30 janvier 2003): 499-506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>.

- Bakr, A., C. Oing, S. Köcher, K. Borgmann, I. Dornreiter, C. Petersen, E. Dikomey, et W.Y. Mansour. « Involvement of ATM in homologous recombination after end resection and RAD51 nucleofilament formation ». *Nucleic Acids Research* 43, n° 6 (31 mars 2015): 3154-66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv160>.
- Balkwill, Fran, et Christian Joffroy. « TNF: A Tumor-Suppressing Factor or a Tumor-Promoting Factor? » *Future Oncology (London, England)* 6, n° 12 (décembre 2010): 1833-36. <https://doi.org/10.2217/fon.10.155>.
- Ball, Helen J., Angeles Sanchez-Perez, Silvia Weiser, Christopher J. D. Austin, Florian Astelbauer, Jenny Miu, James A. McQuillan, Roland Stocker, Lars S. Jermiin, et Nicholas H. Hunt. « Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice ». *Gene* 396, n° 1 (1 juillet 2007): 203-13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.010>.
- Barbeau, Damien, Anne Maître, et Marie Marques. « Highly Sensitive Routine Method for Urinary 3-Hydroxybenzo[a]Pyrene Quantitation Using Liquid Chromatography-Fluorescence Detection and Automated off-Line Solid Phase Extraction ». *The Analyst* 136, n° 6 (21 mars 2011): 1183-91. <https://doi.org/10.1039/c0an00428f>.
- Baricza, Eszter, Viola Tamási, Nikolett Marton, Edit I. Buzás, et György Nagy. « The Emerging Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in the Activation and Differentiation of Th17 Cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, n° 1 (1 janvier 2016): 95-117. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2056-2>.
- Barouki, Robert, et Xavier Coumoul. « Cell Migration and Metastasis Markers as Targets of Environmental Pollutants and the Aryl Hydrocarbon Receptor ». *Cell Adhesion & Migration* 4, n° 1 (mars 2010): 72-76.
- Barouki, Robert, Xavier Coumoul, et Pedro M. Fernandez-Salguero. « The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein ». *FEBS Letters* 581, n° 19 (31 juillet 2007): 3608-15. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.046>.
- Baumgartner, A., M. Kurzawa-Zegota, J. Laubenthal, E. Cemeli, et D. Anderson. « Comet-Assay Parameters as Rapid Biomarkers of Exposure to Dietary/Environmental Compounds -- an in Vitro Feasibility Study on Spermatozoa and Lymphocytes ». *Mutation Research* 743, n° 1-2 (18 mars 2012): 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.027>.
- Bausinger, Julia, Petra Schütz, Ann Liza Piberger, et Günter Speit. « Further characterization of benzo[a]pyrene diol-epoxide (BPDE)-induced comet assay effects ». *Mutagenesis* 31, n° 2 (1 mars 2016): 161-69. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev067>.
- Bausinger, Julia, et Günter Speit. « DNA repair capacity of cultured human lymphocytes exposed to mutagens measured by the comet assay and array expression analysis ». *Mutagenesis* 30, n° 6 (1 novembre 2015): 811-20. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev040>.
- Bausinger, Julia, et Günter Speit. « Induction and Repair of DNA Damage Measured by the Comet Assay in Human T Lymphocytes Separated by Immunomagnetic Cell Sorting ». *Mutation Research* 769 (novembre 2014): 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.07.005>.
- Beckerman, Rachel, et Carol Prives. « Transcriptional Regulation by P53 ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, n° 8 (août 2010): a000935. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000935>.
- Beischlag, Timothy V., Song Wang, David W. Rose, Joseph Torchia, Suzanne Reisz-Porszasz, Khurshid Muhammad, Walter E. Nelson, Markus R. Probst, Michael G. Rosenfeld, et Oliver Hankinson. « Recruitment of the NCoA/SRC-1/P160 Family of Transcriptional Coactivators by the Aryl Hydrocarbon Receptor/Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 22, n° 12 (juin 2002): 4319-33.

- Bennett, P., D. B. Ramsden, et A. C. Williams. « Complete Structural Characterisation of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor Gene ». *Clinical Molecular Pathology* 49, n° 1 (février 1996): M12-16.
- Berghard, A., K. Gradin, I. Pongratz, M. Whitelaw, et L. Poellinger. « Cross-Coupling of Signal Transduction Pathways: The Dioxin Receptor Mediates Induction of Cytochrome P-450IA1 Expression via a Protein Kinase C-Dependent Mechanism ». *Molecular and Cellular Biology* 13, n° 1 (janvier 1993): 677-89.
- Bernshausen, Thorsten, Bettina Jux, Charlotte Esser, Josef Abel, et Ellen Fritsche. « Tissue Distribution and Function of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl Hydrocarbon Receptor Deficient Mice ». *Archives of Toxicology* 80, n° 4 (1 avril 2006): 206-11. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0025-5>.
- Bersten, David C., Adrienne E. Sullivan, Daniel J. Peet, et Murray L. Whitelaw. « BHLH-PAS Proteins in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 13, n° 12 (décembre 2013): 827-41. <https://doi.org/10.1038/nrc3621>.
- Bhalli, Javed A., Joseph G. Shaddock, Mason G. Pearce, Vasily N. Dobrovolsky, Xuefei Cao, Robert H. Heflich, et Hans-Werner Vohr. « Report on Stage III Pig-a Mutation Assays Using Benzo[a]Pyrene ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52, n° 9 (décembre 2011): 731-37. <https://doi.org/10.1002/em.20675>.
- Bhaskar, Anthony M. Lynch, Robert H. Heflich, Stephen D. Dertinger, Vasily N. Dobrovolsky, Roland Froetschl, Katsuyoshi Horibata, et al. « The in vivo Pig-a assay: A report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 783, n° Supplement C (1 mai 2015): 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.09.007>.
- Billiard, Sonya M., Joel N. Meyer, Deena M. Wassenberg, Peter V. Hodson, et Richard T. Di Giulio. « Nonadditive Effects of PAHs on Early Vertebrate Development: Mechanisms and Implications for Risk Assessment ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 105, n° 1 (septembre 2008): 5-23. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm303>.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu, et S. J. Parsons. « C-Src-Mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated with Modulation of Receptor Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 274, n° 12 (19 mars 1999): 8335-43.
- Blanton, R. H., M. Lyte, M. J. Myers, et P. H. Bick. « Immunomodulation by Polyaromatic Hydrocarbons in Mice and Murine Cells ». *Cancer Research* 46, n° 6 (juin 1986): 2735-39.
- Bock, K. W., H. Gschaidmeier, H. Heel, T. Lehmköster, P. A. Münzel, F. Raschko, et B. Bock-Hennig. « AH Receptor-Controlled Transcriptional Regulation and Function of Rat and Human UDP-Glucuronosyltransferase Isoforms ». *Advances in Enzyme Regulation* 38 (1998): 207-22.
- Bodduluru, Lakshmi Narendra, Eshvendar Reddy Kasala, Rajaram Mohanrao Madhana, Chandana C. Barua, Md Iftikar Hussain, Prakash Haloi, et Probodh Borah. « Naringenin ameliorates inflammation and cell proliferation in benzo(a)pyrene induced pulmonary carcinogenesis by modulating CYP1A1, NFκB and PCNA expression ». *International Immunopharmacology* 30, n° Supplement C (1 janvier 2016): 102-10. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.036>.
- Bohonowych, Jessica E., et Michael S. Denison. « Persistent Binding of Ligands to the Aryl Hydrocarbon Receptor ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 98, n° 1 (juillet 2007): 99-109. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm085>.

- Boiteux, S. « Properties and Biological Functions of the NTH and FPG Proteins of *Escherichia Coli*: Two DNA Glycosylases That Repair Oxidative Damage in DNA ». *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 19, n° 2 (juillet 1993): 87-96.
- Bolden, Ashley L., Johanna R. Rochester, Kim Schultz, et Carol F. Kwiatkowski. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Female Reproductive Health: A Scoping Review ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 73 (octobre 2017): 61-74. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.012>.
- Bonassi, Stefano, Randa El-Zein, Claudia Bolognesi, et Michael Fenech. « Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies ». *Mutagenesis* 26, n° 1 (1 janvier 2011): 93-100. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq075>.
- Bose, K. S., et R. H. Sarma. « Delineation of the Intimate Details of the Backbone Conformation of Pyridine Nucleotide Coenzymes in Aqueous Solution ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66, n° 4 (27 octobre 1975): 1173-79.
- Bosetti, C., P. Boffetta, et C. La Vecchia. « Occupational Exposures to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Respiratory and Urinary Tract Cancers: A Quantitative Review to 2005 ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 18, n° 3 (mars 2007): 431-46. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl172>.
- Boström, Carl-Elis, Per Gerde, Annika Hanberg, Bengt Jernström, Christer Johansson, Titus Kyrklund, Agneta Rannug, Margareta Törnqvist, Katarina Victorin, et Roger Westerholm. « Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air ». *Environmental Health Perspectives* 110 Suppl 3 (juin 2002): 451-88.
- Bouchard, M., et C. Viau. « Urinary Excretion Kinetics of Pyrene and Benzo(a)Pyrene Metabolites Following Intravenous Administration of the Parent Compounds or the Metabolites ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 139, n° 2 (août 1996): 301-9. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0169>.
- Braithwaite, E., X. Wu, et Z. Wang. « Repair of DNA Lesions Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Cell-Free Extracts: Involvement of Two Excision Repair Mechanisms in Vitro ». *Carcinogenesis* 19, n° 7 (juillet 1998): 1239-46.
- Brauze, Damian, Piotr Zawierucha, Katarzyna Kiwerska, Kinga Bednarek, Martyna Oleszak, Malgorzata Rydzanicz, et Malgorzata Jarmuz-Szymczak. « Induction of expression of aryl hydrocarbon receptor-dependent genes in human HepaRG cell line modified by shRNA and treated with  $\beta$ -naphthoflavone ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 425, n° 1 (2017): 59-75. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2862-3>.
- Brenerová, Petra, Timo Hamers, Jorke H. Kamstra, Jan Vondráček, Simona Strapáčová, Patrik L. Andersson, et Miroslav Machala. « Pure Non-Dioxin-like PCB Congeners Suppress Induction of AhR-Dependent Endpoints in Rat Liver Cells ». *Environmental Science and Pollution Research* 23, n° 3 (1 février 2016): 2099-2107. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4819-6>.
- Bregues, Muriel, Ariane Lapierre, Céline Bourcier, André Pèlerin, Mahmut Özsahin, et David Azria. « T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 17, n° 2 (1 février 2017): 119-27. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1271715>.
- Brescia, G., L. Celotti, E. Clonfero, G. H. Neumann, A. Forni, V. Foà, M. Pisoni, G. M. Ferri, et G. Assennato. « The Influence of Cytochrome P450 1A1 and Glutathione S-Transferase M1 Genotypes on Biomarker Levels in Coke-Oven Workers ». *Archives of Toxicology* 73, n° 8-9 (novembre 1999): 431-39.

- Bryce, Steven M., Jeffrey C. Bemis, et Stephen D. Dertinger. « In Vivo Mutation Assay Based on the Endogenous Pig-a Locus ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49, n° 4 (1 mai 2008): 256-64. <https://doi.org/10.1002/em.20379>.
- Bull, Sarah, et Chris Collins. « Promoting the Use of BaP as a Marker for PAH Exposure in UK Soils ». *Environmental Geochemistry and Health* 35, n° 1 (1 février 2013): 101-9. <https://doi.org/10.1007/s10653-012-9462-2>.
- Burchiel, Scott W., Fredine T. Lauer, Debra MacKenzie, Shea McClain, Philip J. Kuehl, Jacob D. McDonald, et Kevin S. Harrod. « Changes in HPBMC markers of immune function following controlled short-term inhalation exposures of humans to hardwood smoke ». *Inhalation Toxicology* 28, n° 2 (28 janvier 2016): 61-70. <https://doi.org/10.3109/08958378.2015.1136714>.
- Busbee, D. L., J. O. Norman, et R. L. Ziprin. « Comparative Uptake, Vascular Transport, and Cellular Internalization of Aflatoxin-B1 and Benzo(a)Pyrene ». *Archives of Toxicology* 64, n° 4 (1990): 285-90.
- Busbee, D. L., C. R. Shaw, et E. T. Cantrell. « Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction in Human Leukocytes ». *Science* 178, n° 4058 (20 octobre 1972): 315-16. <https://doi.org/10.1126/science.178.4058.315>.
- Buters, Jeroen T. M., Shuichi Sakai, Thomas Richter, Thierry Pineau, David L. Alexander, Uzen Savas, Johannes Doehmer, Jerrold M. Ward, Colin R. Jefcoate, et Frank J. Gonzalez. « Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, n° 5 (2 mars 1999): 1977-82.
- Butler, J. P., G. B. Post, P. J. Liroy, J. M. Waldman, et A. Greenberg. « Assessment of Carcinogenic Risk from Personal Exposure to Benzo(a)Pyrene in the Total Human Environmental Exposure Study (THEES) ». *Air & Waste: Journal of the Air & Waste Management Association* 43, n° 7 (juillet 1993): 970-77.
- Cadet, Jean, Anne-Gaëlle Bourdat, Cédric D'Ham, Victor Duarte, Didier Gasparutto, Anthony Romieu, et Jean-Luc Ravanat. « Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Special Issue in Honor of Ruggiero Montesano, 462, n° 2-3 (avril 2000): 121-28. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00022-3).
- Cadet, Jean, Thierry Douki, Didier Gasparutto, et Jean-Luc Ravanat. « Oxidative Damage to DNA: Formation, Measurement and Biochemical Features ». *Mutation Research* 531, n° 1-2 (29 octobre 2003): 5-23.
- Cai, Yanming, Jungang Lv, Wen Zhang, et Linlin Zhang. « Dietary Exposure Estimates of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Xuanwei and Fuyuan, Counties in a High Lung Cancer Incidence Area in China ». *Journal of Environmental Monitoring: JEM* 14, n° 3 (mars 2012): 886-92. <https://doi.org/10.1039/c2em10807k>.
- Caino, M. Cecilia, Jose L. Oliva, Hao Jiang, Trevor M. Penning, et Marcelo G. Kazanietz. « Benzo[a]Pyrene-7,8-Dihydrodiol Promotes Checkpoint Activation and G2/M Arrest in Human Bronchoalveolar Carcinoma H358 Cells ». *Molecular Pharmacology* 71, n° 3 (mars 2007): 744-50. <https://doi.org/10.1124/mol.106.032078>.
- Carman, Christopher V., Peter T. Sage, Tracey E. Sciuto, Miguel A. de la Fuente, Raif S. Geha, Hans D. Ochs, Harold F. Dvorak, Ann M. Dvorak, et Timothy A. Springer. « Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes ». *Immunity* 26, n° 6 (juin 2007): 784-97. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.015>.
- Carpenter, David O, Kathleen Arcaro, et David C Spink. « Understanding the human health effects of chemical mixtures. » *Environmental Health Perspectives* 110, n° Suppl 1 (février 2002): 25-42.

- Carrier, F., R. A. Owens, D. W. Nebert, et A. Puga. « Dioxin-Dependent Activation of Murine Cyp1a-1 Gene Transcription Requires Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation ». *Molecular and Cellular Biology* 12, n° 4 (avril 1992): 1856-63.
- Cavalieri, E. L., et E. G. Rogan. « Central Role of Radical Cations in Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 25, n° 7 (juillet 1995): 677-88.  
<https://doi.org/10.3109/00498259509061885>.
- Cavalieri, E. L., et E. G. Rogan. « The Approach to Understanding Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis. The Central Role of Radical Cations in Metabolic Activation ». *Pharmacology & Therapeutics* 55, n° 2 (1992): 183-99.
- Cavallo, D., C. L. Ursini, A. Setini, C. Chianese, P. Piegari, B. Perniconi, et S. Iavicoli. « Evaluation of Oxidative Damage and Inhibition of DNA Repair in an in Vitro Study of Nickel Exposure ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 17, n° 5-6 (décembre 2003): 603-7.
- Chakravarti, Dhruvajyoti, Divya Venugopal, Paula C. Mailander, Jane L. Meza, Sheila Higginbotham, Ercole L. Cavalieri, et Eleanor G. Rogan. « The Role of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Inducing Mutations in Mouse Skin ». *Mutation Research* 649, n° 1-2 (8 janvier 2008): 161-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.08.007>.
- Chang, Richard L., Alexander W. Wood, Mou Tuan Huang, Jian Guo Xie, Xiao Xing Cui, Kenneth R. Reuhl, D. R. Boyd, et al. « Mutagenicity and Tumorigenicity of the Four Enantiopure Bay-Region 3,4-Diol-1,2-Epoxy Isomers of Dibenz[a,h]Anthracene ». *Carcinogenesis* 34, n° 9 (septembre 2013): 2184-91.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgt164>.
- Chang, T. K. H., F. J. Gonzalez, et D. J. Waxman. « Evaluation of Triacetyloleandomycin,  $\alpha$ -Nasymphthoflavone and Diethylthiocarbamate as Selective Chemical Probes for Inhibition of Human Cytochromes P450 ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 311, n° 2 (1 juin 1994): 437-42. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1259>.
- Chanyshev, M. D., N. I. Kosorotikov, S. E. Titov, N. N. Kolesnikov, et L. F. Gulyaeva. « Expression of MicroRNAs, CYP1A1 and CYP2B1 in the Livers and Ovaries of Female Rats Treated with DDT and PAHs ». *Life Sciences* 103, n° 2 (17 mai 2014): 95-100.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.031>.
- Chaturvedi, P., W. K. Eng, Y. Zhu, M. R. Mattern, R. Mishra, M. R. Hurle, X. Zhang, et al. « Mammalian Chk2 Is a Downstream Effector of the ATM-Dependent DNA Damage Checkpoint Pathway ». *Oncogene* 18, n° 28 (15 juillet 1999): 4047-54.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202925>.
- Chen, Mei-Ru, Perng-Jy Tsai, et Ying-Fang Wang. « Assessing Inhalatory and Dermal Exposures and Their Resultant Health-Risks for Workers Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Contained in Oil Mists in a Fastener Manufacturing Industry ». *Environment International* 34, n° 7 (octobre 2008): 971-75.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.02.008>.
- Chen, Ran, et Marc S. Wold. « Replication Protein A: Single-Stranded DNA's First Responder: Dynamic DNA-Interactions Allow Replication Protein A to Direct Single-Strand DNA Intermediates into Different Pathways for Synthesis or Repair ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 36, n° 12 (décembre 2014): 1156-61. <https://doi.org/10.1002/bies.201400107>.
- Chen, S. X., et P. Schopfer. « Hydroxyl-Radical Production in Physiological Reactions. A Novel Function of Peroxidase ». *European Journal of Biochemistry* 260, n° 3 (mars 1999): 726-35.

- Chen, Samuel H. T., Ying-Hsiung Lee, Fu-Chan Wei, Jehn-Yih Huang, et Hung-Chi Chen. « In Vivo Evaluation of Leucocyte Dynamics in Cremaster Muscle in Rats after Exposure to Cigarette Smoke ». *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* 36, n° 6 (2002): 321-25.
- Chen, Wenshu, Mabel T. Padilla, Xiuling Xu, Dhimant Desai, Jacek Krzeminski, Shantu Amin, et Yong Lin. « Quercetin Inhibits Multiple Pathways Involved in Interleukin 6 Secretion from Human Lung Fibroblasts and Activity in Bronchial Epithelial Cell Transformation Induced by Benzo[a]Pyrene Diol Epoxide ». *Molecular Carcinogenesis* 55, n° 11 (1 novembre 2016): 1858-66. <https://doi.org/10.1002/mc.22434>.
- Chen, Y. H., et R. H. Tukey. « Protein Kinase C Modulates Regulation of the CYP1A1 Gene by the Aryl Hydrocarbon Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 271, n° 42 (18 octobre 1996): 26261-66.
- Chen, Yi-Ling, Jung-Hua Fang, Ming-Derg Lai, et Yan-Shen Shan. « Depletion of CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells Can Promote Local Immunity to Suppress Tumor Growth in Benzo[a]Pyrene-Induced Forestomach Carcinoma ». *World Journal of Gastroenterology* 14, n° 38 (14 octobre 2008): 5797-5809.
- Cheon, HyeonJoo, Young-Seok Woo, Ji Young Lee, Hee Sook Kim, Hyun Jin Kim, Sungwon Cho, Nam Hee Won, et Jeongwon Sohn. « Signaling Pathway for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin-Induced TNF-Alpha Production in Differentiated THP-1 Human Macrophages ». *Experimental & Molecular Medicine* 39, n° 4 (31 août 2007): 524-34. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.58>.
- Chiu, Brian C.-H., et Aaron Blair. « Pesticides, Chromosomal Aberrations, and Non-Hodgkin's Lymphoma ». *Journal of Agromedicine* 14, n° 2 (2009): 250-55. <https://doi.org/10.1080/10599240902773140>.
- Cho, Young C., Wenchao Zheng, et Colin R. Jefcoate. « Disruption of Cell-Cell Contact Maximally but Transiently Activates AhR-Mediated Transcription in 10T1/2 Fibroblasts ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 199, n° 3 (15 septembre 2004): 220-38. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.12.025>.
- Christmann, Markus, Catherine Boisseau, Rebekka Kitzinger, Christian Berac, Sebastian Allmann, Tina Sommer, Dorthe Aasland, Bernd Kaina, et Maja T. Tomicic. « Adaptive Upregulation of DNA Repair Genes Following Benzo(a)Pyrene Diol Epoxide Protects against Cell Death at the Expense of Mutations ». *Nucleic Acids Research* 44, n° 22 (15 décembre 2016): 10727-43. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw873>.
- Chung, Kian Fan. « P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Asthma and COPD ». *Chest* 139, n° 6 (juin 2011): 1470-79. <https://doi.org/10.1378/chest.10-1914>.
- Ciolino, H. P., T. T. Wang, et G. C. Yeh. « Diosmin and Diosmetin Are Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor That Differentially Affect Cytochrome P450 1A1 Activity ». *Cancer Research* 58, n° 13 (1 juillet 1998): 2754-60.
- Cioroiu, Bogdan Ionel, Doina Tarcau, Simona Cucu-Man, Irina Chisalita, et Mona Cioroiu. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Lung Tissue of Patients with Pulmonary Cancer from Romania. Influence According as Demographic Status and ABO Phenotypes ». *Chemosphere* 92, n° 5 (juillet 2013): 504-11. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.014>.
- Clapp, Richard. « Industrial Carcinogens: A Need for Action ». *Reviews on Environmental Health* 24, n° 4 (décembre 2009): 257-62.
- Clavel, J., L. Mandereau, J. C. Limasset, D. Hémon, et S. Cordier. « Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and the Risk of Bladder Cancer: A French Case-Control Study ». *International Journal of Epidemiology* 23, n° 6 (décembre 1994): 1145-53.

- Coffee, Bradford, Hannah C. Cox, John Kidd, Scott Sizemore, Krystal Brown, Susan Manley, et Debora Mancini-DiNardo. « Detection of Somatic Variants in Peripheral Blood Lymphocytes Using a next Generation Sequencing Multigene Pan Cancer Panel ». *Cancer Genetics* 211 (février 2017): 5-8. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2017.01.002>.
- Coleman, Michael D. *Human Drug Metabolism: An Introduction*. John Wiley & Sons, 2010.
- Collins, A. R., M. Dusinská, C. M. Gedik, et R. Stětina. « Oxidative Damage to DNA: Do We Have a Reliable Biomarker? » *Environmental Health Perspectives* 104 Suppl 3 (mai 1996): 465-69.
- Collins, Andrew R., Susan J. Duthie, et Victoria L. Dobson. « Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA ». *Carcinogenesis* 14, n° 9 (1 septembre 1993): 1733-35. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.9.1733>.
- Collins, Andrew R., Naouale El Yamani, Yolanda Lorenzo, Sergey Shaposhnikov, Gunnar Brunborg, et Amaya Azqueta. « Controlling variation in the comet assay ». *Frontiers in Genetics* 5 (20 octobre 2014). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00359>.
- Collins, Andrew R., Amaia Azqueta Oscoz, Gunnar Brunborg, Isabel Gaivão, Lisa Giovannelli, Marcin Kruszewski, Catherine C. Smith, et Rudolf Stetina. « The Comet Assay: Topical Issues ». *Mutagenesis* 23, n° 3 (mai 2008): 143-51. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.
- Conney, A. H. « Induction of Microsomal Enzymes by Foreign Chemicals and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture ». *Cancer Research* 42, n° 12 (décembre 1982): 4875-4917.
- Coombs, M. M., T. S. Bhatt, et C. W. Vose. « Microsomal Metabolites of the Aryl Hydrocarbon Hydroxylase and Tumour Inhibitor 7,8-Benzoflavone ». *Carcinogenesis* 2, n° 2 (1981): 135-40.
- Costa, C., S. Catania, R. De Pasquale, R. Stancanelli, G. M. Scribano, et A. Melchini. « Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: Role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation ». *Toxicology* 271, n° 3 (27 mai 2010): 83-86. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.02.014>.
- Culp, S. J., D. W. Gaylor, W. G. Sheldon, L. S. Goldstein, et F. A. Beland. « A Comparison of the Tumors Induced by Coal Tar and Benzo[a]Pyrene in a 2-Year Bioassay ». *Carcinogenesis* 19, n° 1 (janvier 1998): 117-24.
- Cuzick, J., M. N. Routledge, D. Jenkins, et R. C. Garner. « DNA Adducts in Different Tissues of Smokers and Non-Smokers ». *International Journal of Cancer* 45, n° 4 (15 avril 1990): 673-78.
- D. GRIFFIN, GUY, EUGENIA E. CALLE, MAX D. MORRIS, K YVONNE LONG, SHIRLEY S. SCHUFFMAN, et William Mitchell. « Inhibition of Murine Interferon Production Following In Vivo Administration of Benzo[ a ]pyrene ». *Journal of interferon research* 6 (1 mai 1986): 115-21. <https://doi.org/10.1089/jir.1986.6.115>.
- Dahlhaus, M., E. Almstadt, P. Henschke, S. Lüttgert, et K. E. Appel. « Induction of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine and Single-Strand Breaks in DNA of V79 Cells by Tetrachloro-p-Hydroquinone ». *Mutation Research* 329, n° 1 (juin 1995): 29-36.
- Davarinos, N. A., et R. S. Pollenz. « Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus Following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosplasmic Proteasome Following Nuclear Export ». *The Journal of Biological Chemistry* 274, n° 40 (1 octobre 1999): 28708-15.
- Davila, Donna R., David L. Romero, et Scott W. Burchiel. « Human T Cells Are Highly Sensitive to Suppression of Mitogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and This Effect Is Differentially Reversed by  $\alpha$ -Naphthoflavone ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 139, n° 2 (1 août 1996): 333-41. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0173>.

- Dawson, R. M. « The Reaction of Choline and 3,3-Dimethyl-1-Butanol with the Acetylzyme from Acetylcholinesterase ». *Journal of Neurochemistry* 25, n° 6 (décembre 1975): 783-87.
- Dean, J. H., et L. M. Thurmond. « Immunotoxicology: An Overview ». *Toxicologic Pathology* 15, n° 3 (1987): 265-71. <https://doi.org/10.1177/019262338701500302>.
- DellaValle, Curt T., Nicole C. Deziel, Rena R. Jones, Joanne S. Colt, Anneclaire J. De Roos, James R. Cerhan, Wendy Cozen, et al. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Determinants of Residential Carpet Dust Levels and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma ». *Cancer Causes & Control* 27, n° 1 (1 janvier 2016): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0660-y>.
- Denisov, Iliia G., Thomas M. Makris, Stephen G. Sligar, et Ilme Schlichting. « Structure and Chemistry of Cytochrome P450 ». *Chemical Reviews* 105, n° 6 (juin 2005): 2253-77. <https://doi.org/10.1021/cr0307143>.
- Denissenko, M. F., A. Pao, M. Tang, et G. P. Pfeifer. « Preferential Formation of Benzo[a]Pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53 ». *Science (New York, N.Y.)* 274, n° 5286 (18 octobre 1996): 430-32.
- Deutsch-Wenzel, R. P., H. Brune, et G. Grimmer. « Experimental Studies on the Carcinogenicity of Five Nitrogen Containing Polycyclic Aromatic Compounds Directly Injected into Rat Lungs ». *Cancer Letters* 20, n° 1 (août 1983): 97-101.
- Diggs, Deacquita L., Kelly L. Harris, Perumalla V. Rekhadevi, et Aramandla Ramesh. « Tumor Microsomal Metabolism of the Food Toxicant, Benzo(a)Pyrene, in ApcMin Mouse Model of Colon Cancer ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33, n° 4 (août 2012): 1255-60. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0375-6>.
- DiNatale, Brett C., Iain A. Murray, Jennifer C. Schroeder, Colin A. Flaveny, Tejas S. Lahoti, Elizabeth M. Laurenzana, Curtis J. Omiecinski, et Gary H. Perdew. « Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling ». *Toxicological Sciences* 115, n° 1 (1 mai 2010): 89-97. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq024>.
- Dipple, A. « Formation, Metabolism, and Mechanism of Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Cancer Research* 43, n° 5 Suppl (mai 1983): 2422s-2425s.
- Dizdaroglu, M., E. Coskun, et P. Jaruga. « Measurement of Oxidatively Induced DNA Damage and Its Repair, by Mass Spectrometric Techniques ». *Free Radical Research* 49, n° 5 (mai 2015): 525-48. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1014814>.
- Dobrovolsky, Vasily N., Javier Revollo, Mason G. Pearce, M. Monserrat Pacheco-Martinez, et Haixia Lin. « CD48-Deficient T-Lymphocytes from DMBA-Treated Rats Have de Novo Mutations in the Endogenous Pig-a Gene ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56, n° 8 (1 octobre 2015): 674-83. <https://doi.org/10.1002/em.21959>.
- Dolwick, K. M., J. V. Schmidt, L. A. Carver, H. I. Swanson, et C. A. Bradfield. « Cloning and Expression of a Human Ah Receptor CDNA ». *Molecular Pharmacology* 44, n° 5 (novembre 1993): 911-17.
- Domingo, José L., et Martí Nadal. « Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature ». *Food and Chemical Toxicology* 86, n° Supplement C (1 décembre 2015): 144-53. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.002>.
- Dong, L., Q. Ma, et J. P. Whitlock. « DNA Binding by the Heterodimeric Ah Receptor. Relationship to Dioxin-Induced CYP1A1 Transcription in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 271, n° 14 (5 avril 1996): 7942-48.
- Dreiherr, Jacob, et Ella Kordysh. « Non-Hodgkin Lymphoma and Pesticide Exposure: 25 Years of Research ». *Acta Haematologica* 116, n° 3 (2006): 153-64. <https://doi.org/10.1159/000094675>.

- Du, Baoheng, Nasser K. Altorki, Levy Kopelovich, Kotha Subbaramaiah, et Andrew J. Dannenberg. « Tobacco Smoke Stimulates the Transcription of Amphiregulin in Human Oral Epithelial Cells: Evidence of a Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein-Dependent Mechanism ». *Cancer Research* 65, n° 13 (1 juillet 2005): 5982-88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0628>.
- Durocher, D., et S. P. Jackson. « DNA-PK, ATM and ATR as Sensors of DNA Damage: Variations on a Theme? » *Current Opinion in Cell Biology* 13, n° 2 (avril 2001): 225-31.
- Duursen, Van van, Majorie B. M, J. Thomas Sanderson, et Martin van den Berg. « Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in Human Blood Lymphocytes Are Not Suitable as Biomarkers of Exposure to Dioxin-like Compounds: Polymorphisms and Interindividual Variation in Expression and Inducibility ». *Toxicological Sciences* 85, n° 1 (1 mai 2005): 703-12. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi089>.
- Ebert, Bettina, Albrecht Seidel, et Alfonso Lampen. « Identification of BCRP as Transporter of Benzo[a]Pyrene Conjugates Metabolically Formed in Caco-2 Cells and Its Induction by Ah-Receptor Agonists ». *Carcinogenesis* 26, n° 10 (octobre 2005): 1754-63. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi139>.
- Elices, M. J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler, et R. R. Lobb. « VCAM-1 on Activated Endothelium Interacts with the Leukocyte Integrin VLA-4 at a Site Distinct from the VLA-4/Fibronectin Binding Site ». *Cell* 60, n° 4 (23 février 1990): 577-84.
- Emmons, R. B., D. Duncan, P. A. Estes, P. Kiefel, J. T. Mosher, M. Sonnenfeld, M. P. Ward, I. Duncan, et S. T. Crews. « The Spineless-Aristapedia and Tango BHLH-PAS Proteins Interact to Control Antennal and Tarsal Development in Drosophila ». *Development (Cambridge, England)* 126, n° 17 (septembre 1999): 3937-45.
- Enan, E., et F. Matsumura. « Identification of C-Src as the Integral Component of the Cytosolic Ah Receptor Complex, Transducing the Signal of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) through the Protein Phosphorylation Pathway ». *Biochemical Pharmacology* 52, n° 10 (22 novembre 1996): 1599-1612.
- Enan, E., et F. Matsumura. « Significance of TCDD-Induced Changes in Protein Phosphorylation in the Adipocyte of Male Guinea Pigs ». *Journal of Biochemical Toxicology* 9, n° 3 (juin 1994): 159-70.
- Epe, Bernd, Michael Pflaum, Martin Häring, Jutta Hegler, et Helga Rüdiger. « Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems ». *Toxicology Letters* 67, n° 1 (1 avril 1993): 57-72. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(93\)90046-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4274(93)90046-Z).
- Esser, Charlotte. « The immune phenotype of AhR null mouse mutants: Not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation ». *Biochemical Pharmacology* 77, n° 4 (15 février 2009): 597-607. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.002>.
- Esser, Charlotte, et Agneta Rannug. « The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology ». *Pharmacological Reviews* 67, n° 2 (2015): 259-79. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009001>.
- Esser, Charlotte, Agneta Rannug, et Brigitta Stockinger. « The Aryl Hydrocarbon Receptor in Immunity ». *Trends in Immunology* 30, n° 9 (septembre 2009): 447-54. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.06.005>.
- Esser, Charlotte, Vladimir Temchura, Marc Majora, Claudia Hundeiker, Christoph Schwärzler, et Ursula Günthert. « Signaling via the AHR Leads to Enhanced Usage of CD44v10 by Murine Fetal Thymic Emigrants: Possible Role for CD44 in Emigration ». *International Immunopharmacology* 4, n° 6 (juin 2004): 805-18. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.03.006>.

- Ewa, Błaszczuk, et Mielżyńska-Švach Danuta. « Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts ». *Journal of Applied Genetics* 58, n° 3 (2017): 321-30.  
<https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>.
- Ewing, Per, Bo Blomgren, Ake Ryrfeldt, et Per Gerde. « Increasing Exposure Levels Cause an Abrupt Change in the Absorption and Metabolism of Acutely Inhaled Benzo(a)Pyrene in the Isolated, Ventilated, and Perfused Lung of the Rat ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 91, n° 2 (juin 2006): 332-40.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj104>.
- Fang, Chih-Yeu, Chung-Chun Wu, Chia-Lang Fang, Wei-Yu Chen, et Chi-Long Chen. « Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines ». *PLoS ONE* 12, n° 6 (7 juin 2017).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178960>.
- Fernandez-Salguero, P. M., J. M. Ward, J. P. Sundberg, et F. J. Gonzalez. « Lesions of Aryl-Hydrocarbon Receptor-Deficient Mice ». *Veterinary Pathology* 34, n° 6 (novembre 1997): 605-14. <https://doi.org/10.1177/030098589703400609>.
- Figuroa, Jonine D., Núria Malats, Montserrat García-Closas, Francisco X. Real, Debra Silverman, Manolis Kogevinas, Stephen Chanock, et al. « Bladder cancer risk and genetic variation in AKR1C3 and other metabolizing genes ». *Carcinogenesis* 29, n° 10 (1 octobre 2008): 1955-62. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn163>.
- Flaveny, Colin A., et Gary H. Perdew. « Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity ». *Molecular and cellular pharmacology* 1, n° 3 (1 janvier 2009): 119-23.
- Forrest, Matthew S., Qing Lan, Alan E. Hubbard, Luoping Zhang, Roel Vermeulen, Xin Zhao, Guilian Li, et al. « Discovery of Novel Biomarkers by Microarray Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression in Benzene-Exposed Workers ». *Environmental Health Perspectives* 113, n° 6 (juin 2005): 801-7.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.7635>.
- Förster, K., R. Preuss, B. Rossbach, T. Brüning, J. Angerer, et P. Simon. « 3-Hydroxybenzo[a]Pyrene in the Urine of Workers with Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Different Industries ». *Occupational and Environmental Medicine* 65, n° 4 (avril 2008): 224-29.  
<https://doi.org/10.1136/oem.2006.030809>.
- Forster, Paul M., Andrea R. Burbank, Carine Livage, Gérard Férey, et Anthony K. Cheetham. « The Role of Temperature in the Synthesis of Hybrid Inorganic-Organic Materials: The Example of Cobalt Succinates ». *Chemical Communications (Cambridge, England)*, n° 4 (21 février 2004): 368-69. <https://doi.org/10.1039/b311156c>.
- Fortini, P., C. Ferretti, B. Pascucci, L. Narciso, D. Pajalunga, E. M. R. Puggioni, R. Castino, C. Isidoro, M. Crescenzi, et E. Dogliotti. « DNA Damage Response by Single-Strand Breaks in Terminally Differentiated Muscle Cells and the Control of Muscle Integrity ». *Cell Death and Differentiation* 19, n° 11 (novembre 2012): 1741-49.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2012.53>.
- Foster, Carolyn A., Brigitte Mandak, Elizabeth Kromer, et Antal Rot. « Calcitonin Gene-Related Peptide Is Chemotactic for Human T Lymphocytes ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 657, n° 1 (1 juin 1992): 397-404. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb22785.x>.
- Frankenberg-Schwager, M., et D. Frankenberg. « DNA Double-Strand Breaks: Their Repair and Relationship to Cell Killing in Yeast ». *International Journal of Radiation Biology* 58, n° 4 (octobre 1990): 569-75.
- Frericks, Markus, Marc Meissner, et Charlotte Esser. « Microarray Analysis of the AHR System: Tissue-Specific Flexibility in Signal and Target Genes ». *Toxicology and Applied*

- Pharmacology* 220, n° 3 (1 mai 2007): 320-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.014>.
- Fritsche, Ellen, Claudia Schäfer, Christian Calles, Thorsten Bernsmann, Thorsten Bernshausen, Melanie Wurm, Ulrike Hübenthal, et al. « Lightning up the UV Response by Identification of the Arylhydrocarbon Receptor as a Cytoplasmatic Target for Ultraviolet B Radiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 21 (22 mai 2007): 8851-56.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0701764104>.
- Furness, Sebastian G. B., Michael J. Lees, et Murray L. Whitelaw. « The Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor as a Model for Adaptive Responses of BHLH/PAS Transcription Factors ». *FEBS Letters* 581, n° 19 (31 juillet 2007): 3616-25.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.011>.
- Gaertner, R. R. W., et G. P. Thériault. « Risk of Bladder Cancer in Foundry Workers: A Meta-Analysis ». *Occupational and Environmental Medicine* 59, n° 10 (octobre 2002): 655-63.
- Galván, Noé, Doug E. Teske, Guodong Zhou, Bhagavatula Moorthy, Peter S. MacWilliams, Charles J. Czaprynski, et Colin R. Jefcoate. « Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in liver and lung by benzo(a)pyrene and 7,12-d imethylbenz(a)anthracene do not affect distribution of polycyclic hydrocarbons to target tissue: role of AhR and CYP1B1 in bone marrow cytotoxicity ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 202, n° 3 (1 février 2005): 244-57. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.026>.
- GAMMON, MARILIE D., SHARON K. SAGIV, SYBIL M. ENG, SUMITRA SHANTAKUMAR, MIA M. GAUDET, SUSAN L. TEITELBAUM, JULIE A. BRITTON, et al. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–DNA Adducts and Breast Cancer: A Pooled Analysis ». *Archives of environmental health* 59, n° 12 (décembre 2004): 640-49. <https://doi.org/10.1080/00039890409602948>.
- Garry, Sébastien, Fabrice Nessler, El Moukhtar Aliouat, Jean-Marie Haguenoer, et Daniel Marzin. « Potent Genotoxic Activity of Benzo[a]Pyrene Coated onto Hematite Measured by Unscheduled DNA Synthesis in Vivo in the Rat ». *Mutagenesis* 18, n° 5 (septembre 2003): 449-55.
- Garry, Sébastien, Fabrice Nessler, ElMoukhtar Aliouat, Jean-Marie Haguenoer, et Daniel Marzin. « Assessment of Genotoxic Effect of Benzo[a]Pyrene in Endotracheally Treated Rat Using the Comet Assay ». *Mutation Research* 534, n° 1-2 (10 janvier 2003): 33-43.
- Gaspari, Laura, Seong Sil Chang, Regina M. Santella, Seymour Garte, Paola Pedotti, et Emanuela Taioli. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Human Sperm as a Marker of DNA Damage and Infertility ». *Mutation Research* 535, n° 2 (3 mars 2003): 155-60.
- Geacintov, N. E., M. Cosman, B. Mao, A. Alfano, V. Ibanez, et R. G. Harvey. « Spectroscopic Characteristics and Site I/Site II Classification of Cis and Trans Benzo[a]Pyrene Diolepoxide Enantiomer-Guanosine Adducts in Oligonucleotides and Polynucleotides ». *Carcinogenesis* 12, n° 11 (novembre 1991): 2099-2108.
- Gebhardt, Thomas, Paul G. Whitney, Ali Zaid, Laura K. Mackay, Andrew G. Brooks, William R. Heath, Francis R. Carbone, et Scott N. Mueller. « Different Patterns of Peripheral Migration by Memory CD4+ and CD8+ T Cells ». *Nature* 477, n° 7363 (8 septembre 2011): 216-19. <https://doi.org/10.1038/nature10339>.
- Genies, Camille, Anne Maître, Emmanuel Lefèbvre, Amandine Jullien, Marianne Chopard-Lallier, et Thierry Douki. « The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs ». *PLoS ONE* 8, n° 11 (8 novembre 2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078356>.

- Gerarde, H. W. « The Toxicology of the Mono- and Dicyclic Aromatic Hydrocarbons of Industrial Importance: Summary ». *A.M.A. Archives of Industrial Health* 21 (mars 1960): 268.
- Gerarde, H.W. « The aromatic hydrocarbons. Industrial Hygiene and Toxicology, 2 Toxicology. », 1962.
- Gerde, P., B. A. Muggenburg, M. D. Hoover, et R. F. Henderson. « Disposition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Respiratory Tract of the Beagle Dog: I. The Alveolar Region ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 121, n° 2 (1 août 1993): 313-18. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1159>.
- Gerde, P., B. A. Muggenburg, J. R. Thornton-Manning, J. L. Lewis, K. H. Pyon, et A. R. Dahl. « Benzo[a]pyrene at an environmentally relevant dose is slowly absorbed by, and extensively metabolized in, tracheal epithelium. » *Carcinogenesis* 18, n° 9 (1 septembre 1997): 1825-32. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.9.1825>.
- Gerde, Per, Bruce A. Muggenburg, Tony Stephens, Johnnye L. Lewis, Kee H. Pyon, et Alan R. Dahl. « A Relevant Dose of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone Is Extensively Metabolized and Rapidly Absorbed in the Canine Tracheal Mucosa ». *Cancer Research* 58, n° 7 (1 avril 1998): 1417-22.
- Gillner, M., J. Bergman, C. Cambillau, M. Alexandersson, B. Fernström, et J. A. Gustafsson. « Interactions of Indolo[3,2-b]Carbazoles and Related Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Specific Binding Sites for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin in Rat Liver ». *Molecular Pharmacology* 44, n° 2 (août 1993): 336-45.
- Giri, Shiv Kumar, Anita Yadav, Anil Kumar, Kapil Dev, Sachin Gulati, Ranjan Gupta, Neeraj Aggarwal, et Sanjeev Kumar Gautam. « CYP1A1 Gene Polymorphisms: Modulator of Genetic Damage in Coal-Tar Workers ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 13, n° 7 (2012): 3409-16.
- Go, Ryeo-Eun, Kyung-A Hwang, et Kyung-Chul Choi. « Cytochrome P450 1 family and cancers ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 147, n° Supplement C (1 mars 2015): 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.003>.
- Godschalk, Roger W. L., Frederik-Jan Van Schooten, et Helmut Bartsch. « A Critical Evaluation of DNA Adducts as Biological Markers for Human Exposure to Polycyclic Aromatic Compounds ». *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36, n° 1 (31 janvier 2003): 1-11.
- Goldberg, Michal, Manuel Stucki, Jacob Falck, Damien D'Amours, Dinah Rahman, Darryl Pappin, Jiri Bartek, et Stephen P. Jackson. « MDC1 Is Required for the Intra-S-Phase DNA Damage Checkpoint ». *Nature* 421, n° 6926 (27 février 2003): 952-56. <https://doi.org/10.1038/nature01445>.
- Gonzalez, F. J., et P. Fernandez-Salguero. « The Aryl Hydrocarbon Receptor: Studies Using the AHR-Null Mice ». *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 26, n° 12 (décembre 1998): 1194-98.
- Gradin, K., M. L. Whitelaw, R. Toftgård, L. Poellinger, et A. Berghard. « A Tyrosine Kinase-Dependent Pathway Regulates Ligand-Dependent Activation of the Dioxin Receptor in Human Keratinocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 269, n° 38 (23 septembre 1994): 23800-807.
- Green, Angela M., Robert DiFazio, et JoAnne L. Flynn. « IFN- $\gamma$  from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190, n° 1 (1 janvier 2013): 270-77. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200061>.
- Grova, N., F. Faÿs, E. M. Hardy, et B. M. R. Appenzeller. « New Insights into Urine-Based Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Exposure from a Rat Model: Identification of Relevant Metabolites and Influence of Elimination Kinetics ».

- Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 228 (septembre 2017): 484-95.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.060>.
- Grova, Nathalie, Jean-Philippe Antignac, Emilie M. Hardy, Fabrice Monteau, Karine Pouponneau, Bruno Le Bizec, et Brice M. R. Appenzeller. « Identification of New Tetrahydroxylated Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Hair as Biomarkers of Exposure and Signature of DNA Adduct Levels ». *Analytica Chimica Acta* 995 (1 décembre 2017): 65-76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.002>.
- Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch, et C. A. Bradfield. « The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40 (2000): 519-61. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519>.
- Guengerich, F. P., et T. Shimada. « Oxidation of Toxic and Carcinogenic Chemicals by Human Cytochrome P-450 Enzymes ». *Chemical Research in Toxicology* 4, n° 4 (août 1991): 391-407.
- Gunter, Marc J., Rao L. Divi, Martin Kulldorff, Roel Vermeulen, Kathryn J. Haverkos, Maryanne M. Kuo, Paul Strickland, Miriam C. Poirier, Nathaniel Rothman, et Rashmi Sinha. « Leukocyte Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adduct Formation and Colorectal Adenoma ». *Carcinogenesis* 28, n° 7 (juillet 2007): 1426-29.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgm022>.
- Gupta, Arun, Clayton R. Hunt, Sharmistha Chakraborty, Raj K. Pandita, John Yordy, Deepti B. Ramnarain, Nobuo Horikoshi, et Tej K. Pandita. « Role of 53BP1 in the Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice ». *Radiation Research* 181, n° 1 (janvier 2014): 1-8. <https://doi.org/10.1667/RR13572.1>.
- Gutierrez, Mark A., Sonnet S. Davis, Andrew Rosko, Steven M. Nguyen, Kylie P. Mitchell, Samiha Mateen, Joana Neves, et al. « A Novel AhR Ligand, 2AI, Protects the Retina from Environmental Stress ». *Scientific Reports* 6 (1 juillet 2016): 29025.  
<https://doi.org/10.1038/srep29025>.
- Hackman, P., S. M. Hou, F. Nyberg, G. Pershagen, et B. Lambert. « Mutational Spectra at the Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) Locus in T-Lymphocytes of Nonsmoking and Smoking Lung Cancer Patients ». *Mutation Research* 468, n° 1 (22 juin 2000): 45-61.
- Hagenmaier, H., T. Wiesmüller, G. Golor, R. Krowke, H. Helge, et D. Neubert. « Transfer of Various Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) via Placenta and through Milk in a Marmoset Monkey ». *Archives of Toxicology* 64, n° 8 (1990): 601-15.
- Hahn, Mark E. « Aryl Hydrocarbon Receptors: Diversity and Evolution ». *Chemico-Biological Interactions* 141, n° 1-2 (20 septembre 2002): 131-60.
- Hainaut, P., et G. P. Pfeifer. « Patterns of P53 G-->T Transversions in Lung Cancers Reflect the Primary Mutagenic Signature of DNA-Damage by Tobacco Smoke ». *Carcinogenesis* 22, n° 3 (mars 2001): 367-74.
- Hall, M., et P. L. Grover. « Stereoselective Aspects of the Metabolic Activation of Benzo[a]Pyrene by Human Skin in Vitro ». *Chemico-Biological Interactions* 64, n° 3 (1988): 281-96.
- Hall, M., D. K. Parker, P. L. Grover, J. Y. Lu, N. E. Hopkins, et W. L. Alworth. « Effects of 1-Ethynylpyrene and Related Inhibitors of P450 Isozymes upon Benzo[a]Pyrene Metabolism by Liver Microsomes ». *Chemico-Biological Interactions* 76, n° 2 (1990): 181-92.
- Hall, T. J., G. Cambridge, et P. R. James. « Development of a Co-Culture System with Induced HepG2 Cells and K562 Cells for Examining Drug Metabolism in Vitro. Studies with Cyclophosphamide, Ondansetron and Cisplatin ». *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 72, n° 2 (mai 1991): 161-68.

- Hankinson, O. « The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35 (1995): 307-40.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.001515>.
- Hankinson, Oliver. « Role of Coactivators in Transcriptional Activation by the Aryl Hydrocarbon Receptor ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, n° 2 (15 janvier 2005): 379-86. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.031>.
- Harrigan, Jeanine A., Chad M. Vezina, Barbara P. McGarrigle, Noreen Ersing, Harold C. Box, Alexander E. Maccubbin, et James R. Olson. « DNA Adduct Formation in Precision-Cut Rat Liver and Lung Slices Exposed to Benzo[a]pyrene ». *Toxicological Sciences* 77, n° 2 (1 février 2004): 307-14. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh030>.
- Hartlerode, Andrea J., et Ralph Scully. « Mechanisms of Double-Strand Break Repair in Somatic Mammalian Cells ». *The Biochemical Journal* 423, n° 2 (25 septembre 2009): 157-68. <https://doi.org/10.1042/BJ20090942>.
- Harvey, R. G., C. Cortez, T. Sugiyama, Y. Ito, T. W. Sawyer, et J. DiGiovanni. « Biologically Active Dihydrodiol Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Structurally Related to the Potent Carcinogenic Hydrocarbon 7,12-Dimethylbenz[a]Anthracene ». *Journal of Medicinal Chemistry* 31, n° 1 (janvier 1988): 154-59.
- Harvey, Dai, Ran, Lim, Blair, et Penning. « Syntheses of adducts of active metabolites of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons with 2'-deoxyribonucleosides », 31 octobre 2005. <https://doi.org/10.1080/10406630500447019>.
- Hussain, Iqbal, Zeid A. ALOthman, Abdulrahman A. Alwarthan, Mohd Marsin Sanagi, et Imran Ali. « Chiral Xenobiotics Bioaccumulations and Environmental Health Prospectives ». *Environmental Monitoring and Assessment* 187, n° 8 (1 août 2015): 490. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4704-2>.
- Hattermer-Frey, H. A., et C. C. Travis. « Benzo-a-Pyrene: Environmental Partitioning and Human Exposure ». *Toxicology and Industrial Health* 7, n° 3 (mai 1991): 141-57. <https://doi.org/10.1177/074823379100700303>.
- Hayashibara, Toshihisa, Yasuaki Yamada, Naoki Mori, Hitomi Harasawa, Kazuyuki Sugahara, Takayuki Miyaniishi, Shimeru Kamihira, et Masao Tomonaga. « Possible Involvement of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Adult T-Cell Leukemia (ATL) Leukemogenesis: Constitutive Activation of AhR in ATL ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300, n° 1 (3 janvier 2003): 128-34.
- He, J. L., W. L. Chen, L. F. Jin, et H. Y. Jin. « Comparative Evaluation of the in Vitro Micronucleus Test and the Comet Assay for the Detection of Genotoxic Effects of X-Ray Radiation ». *Mutation Research* 469, n° 2 (20 septembre 2000): 223-31.
- He, Yao, Bin Jiang, Liang Shou Li, Lan Sun Li, Lisanne Ko, Lei Wu, Dong Ling Sun, et al. « Secondhand Smoke Exposure Predicted COPD and Other Tobacco-Related Mortality in a 17-Year Cohort Study in China ». *Chest* 142, n° 4 (octobre 2012): 909-18. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2884>.
- Head, Jennifer L., et B. Paige Lawrence. « The aryl hydrocarbon receptor is a modulator of anti-viral immunity ». *Biochemical pharmacology* 77, n° 4 (15 février 2009): 642-53. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.031>.
- Heath-Pagliuso, S., W. J. Rogers, K. Tullis, S. D. Seidel, P. H. Cenijn, A. Brouwer, et M. S. Denison. « Activation of the Ah Receptor by Tryptophan and Tryptophan Metabolites ». *Biochemistry* 37, n° 33 (18 août 1998): 11508-15. <https://doi.org/10.1021/bi980087p>.
- Hecht, Stephen S. « Human Urinary Carcinogen Metabolites: Biomarkers for Investigating Tobacco and Cancer ». *Carcinogenesis* 23, n° 6 (juin 2002): 907-22.
- Henkler, Frank, Kristin Stolpmann, et Andreas Luch. « Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses ». *EXS* 101 (2012): 107-31. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_5).

- Henry, E. C., J. C. Bemis, O. Henry, A. S. Kende, et T. A. Gasiewicz. « A Potential Endogenous Ligand for the Aryl Hydrocarbon Receptor Has Potent Agonist Activity in Vitro and in Vivo ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 450, n° 1 (1 juin 2006): 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.02.008>.
- Hew, K. M., A. I. Walker, A. Kohli, M. Garcia, A. Syed, C. McDonald-Hyman, E. M. Noth, et al. « Childhood exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons is linked to epigenetic modifications and impaired systemic immunity in T cells ». *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 45, n° 1 (janvier 2015): 238-48. <https://doi.org/10.1111/cea.12377>.
- Hewitt, Rebecca, Albert Forero, Paz J. Luncsford, et Francis L. Martin. « Enhanced Micronucleus Formation and Modulation of BCL-2:BAX in MCF-7 Cells after Exposure to Binary Mixtures ». *Environmental Health Perspectives* 115 Suppl 1 (décembre 2007): 129-36. <https://doi.org/10.1289/ehp.9361>.
- Himmelstein, Matthew W., Peter J. Boogaard, Jean Cadet, Peter B. Farmer, James H. Kim, Elizabeth A. Martin, Rudranath Persaud, et David E. G. Shuker. « Creating Context for the Use of DNA Adduct Data in Cancer Risk Assessment: II. Overview of Methods of Identification and Quantitation of DNA Damage ». *Critical Reviews in Toxicology* 39, n° 8 (2009): 679-94. <https://doi.org/10.1080/10408440903164163>.
- Hiramoto, K., X. Li, M. Makimoto, T. Kato, et K. Kikugawa. « Identification of Hydroxyhydroquinone in Coffee as a Generator of Reactive Oxygen Species That Break DNA Single Strands ». *Mutation Research* 419, n° 1-3 (9 novembre 1998): 43-51.
- Ho, Peggy, et Lawrence Steinman. « The aryl hydrocarbon receptor: A regulator of Th17 and Treg cell development in disease ». *Cell research* 18 (1 juillet 2008): 605-8. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.63>.
- Hockley, Sarah L., Volker M. Arlt, Daniel Brewer, Ian Giddings, et David H. Phillips. « Time- and Concentration-Dependent Changes in Gene Expression Induced by Benzo(a)Pyrene in Two Human Cell Lines, MCF-7 and HepG2 ». *BMC Genomics* 7 (16 octobre 2006): 260. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-260>.
- Hodek, Petr, Jitka Koblihová, René Kizek, Eva Frei, Volker M. Arlt, et Marie Stiborová. « The Relationship between DNA Adduct Formation by Benzo[a]Pyrene and Expression of Its Activation Enzyme Cytochrome P450 1A1 in Rat ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, n° 3 (novembre 2013): 989-96. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.004>.
- Hoffman, E. C., H. Reyes, F. F. Chu, F. Sander, L. H. Conley, B. A. Brooks, et O. Hankinson. « Cloning of a Factor Required for Activity of the Ah (Dioxin) Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 252, n° 5008 (17 mai 1991): 954-58.
- Holme, Jørn A., Morgane Gorria, Volker M. Arlt, Steinar Ovrebø, Anita Solhaug, Xavier Tekpli, Nina E. Landvik, Laurence Huc, Olivier Fardel, et Dominique Lagadic-Gossmann. « Different Mechanisms Involved in Apoptosis Following Exposure to Benzo[a]Pyrene in F258 and Hepa1c1c7 Cells ». *Chemico-Biological Interactions* 167, n° 1 (5 avril 2007): 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.008>.
- Houessou, Justin Koffi, Daniel Goujot, Bertrand Heyd, et Valerie Camel. « Modeling the Formation of Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons During the Roasting of Arabica Coffee Samples ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, n° 10 (1 mai 2008): 3648-56. <https://doi.org/10.1021/jf073233j>.
- Houlston, R. S. « CYP1A1 Polymorphisms and Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis ». *Pharmacogenetics* 10, n° 2 (mars 2000): 105-14.
- Houtgraaf, Jaco H., Jorie Versmissen, et Wim J. van der Giessen. « A Concise Review of DNA Damage Checkpoints and Repair in Mammalian Cells ». *Cardiovascular*

- Revascularization Medicine: Including Molecular Interventions* 7, n° 3 (septembre 2006): 165-72. <https://doi.org/10.1016/j.carrev.2006.02.002>.
- Hu, Wenwei, Zhaohui Feng, et Arnold J. Levine. « The Regulation of Multiple P53 Stress Responses Is Mediated through MDM2 ». *Genes & Cancer* 3, n° 3-4 (1 mars 2012): 199-208. <https://doi.org/10.1177/1947601912454734>.
- Huang, Xuan, H. Dorota Halicka, et Zbigniew Darzynkiewicz. « Detection of Histone H2AX Phosphorylation on Ser-139 as an Indicator of DNA Damage (DNA Double-Strand Breaks) ». In *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0727s30>.
- Hubbard, Troy D., Iain A. Murray, et Gary H. Perdew. « Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation ». *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 43, n° 10 (octobre 2015): 1522-35. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064246>.
- Ichiba, M., L. Hagmar, A. Rannug, B. Högstedt, A. K. Alexandrie, U. Carstensen, et K. Hemminki. « Aromatic DNA Adducts, Micronuclei and Genetic Polymorphism for CYP1A1 and GST1 in Chimney Sweeps ». *Carcinogenesis* 15, n° 7 (juillet 1994): 1347-52.
- Ide, F., N. Iida, Y. Nakatsuru, H. Oda, K. Tanaka, et T. Ishikawa. « Mice Deficient in the Nucleotide Excision Repair Gene XPA Have Elevated Sensitivity to Benzo[a]Pyrene Induction of Lung Tumors ». *Carcinogenesis* 21, n° 6 (juin 2000): 1263-65.
- Ikuta, Togo, et Kaname Kawajiri. « Zinc Finger Transcription Factor Slug Is a Novel Target Gene of Aryl Hydrocarbon Receptor ». *Experimental Cell Research* 312, n° 18 (1 novembre 2006): 3585-94. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.002>.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). « Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some on-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. », 2010. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). « Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs. », 2004. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/Suppl7.pdf>.
- Ishida, Masaru, Shuji Mikami, Toshiaki Shinojima, Takeo Kosaka, Ryuichi Mizuno, Eiji Kikuchi, Akira Miyajima, Yasunori Okada, et Mototsugu Oya. « Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Invasion of Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Is Associated with Poor Prognosis and Cigarette Smoke ». *International Journal of Cancer* 137, n° 2 (15 juillet 2015): 299-310. <https://doi.org/10.1002/ijc.29398>.
- Iwasaki, Akiko, et Ruslan Medzhitov. « Control of adaptive immunity by the innate immune system ». *Nature immunology* 16, n° 4 (avril 2015): 343-53. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Izzotti, A., G. A. Rossi, M. Bagnasco, et S. De Flora. « Benzo[a]Pyrene Diol-epoxide-DNA Adducts in Alveolar Macrophages of Smokers ». *Carcinogenesis* 12, n° 7 (juillet 1991): 1281-85.
- Jain, S., K. M. Dolwick, J. V. Schmidt, et C. A. Bradfield. « Potent Transactivation Domains of the Ah Receptor and the Ah Receptor Nuclear Translocator Map to Their Carboxyl Termini ». *The Journal of Biological Chemistry* 269, n° 50 (16 décembre 1994): 31518-24.
- Jaruga, P., E. Speina, D. Gackowski, B. Tudek, et R. Olinski. « Endogenous Oxidative DNA Base Modifications Analysed with Repair Enzymes and GC/MS Technique ». *Nucleic Acids Research* 28, n° 6 (15 mars 2000): E16.

- Jedrychowski, Wieslaw A., Frederica P. Perera, Deliang Tang, Virginia Rauh, Renata Majewska, Elzbieta Mroz, Elzbieta Flak, et al. « The Relationship between Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and PAH-DNA Adducts in Cord Blood ». *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 23, n° 4 (juillet 2013): 371-77. <https://doi.org/10.1038/jes.2012.117>.
- Jeffers, John R., Evan Parganas, Youngsoo Lee, Chunying Yang, JinLing Wang, Jennifer Brennan, Kirsteen H. MacLean, et al. « Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways ». *Cancer Cell* 4, n° 4 (1 octobre 2003): 321-28. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00244-7).
- Jeng, Hueiwang Anna, Chih-Hong Pan, et Mu-Rong Chao. « 1-Hydroxypyrene as a Biomarker for Assessing the Effects of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Semen Quality and Sperm DNA Integrity ». *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 48, n° 2 (2013): 152-58. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.716741>.
- Jensen, M. S., L. M. Mabeck, G. Toft, A. M. Thulstrup, et J. P. Bonde. « Lower Sperm Counts Following Prenatal Tobacco Exposure ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 20, n° 9 (septembre 2005): 2559-66. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei110>.
- Jeon, Tae Won, Chun Hua Jin, Sang Kyu Lee, Dong Wook Lee, Sun Hee Hyun, Ghee Hwan Kim, In Hye Jun, et al. « In Vivo and in Vitro Immunosuppressive Effects of Benzo[k]Fluoranthene in Female Balb/c Mice ». *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 68, n° 23-24 (10 décembre 2005): 2033-50. <https://doi.org/10.1080/15287390491009147>.
- Ji, Guixiang, Aihua Gu, Pengfei Zhu, Yankai Xia, Yong Zhou, Fan Hu, Ling Song, Shoulin Wang, et Xinru Wang. « Joint Effects of XRCC1 Polymorphisms and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure on Sperm DNA Damage and Male Infertility ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 116, n° 1 (juillet 2010): 92-98. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq112>.
- Jiranosornkul, Supat, et Charles A. Laughton. « Destabilization of DNA Duplexes by Oxidative Damage at Guanine: Implications for Lesion Recognition and Repair ». *Journal of the Royal Society, Interface* 5 Suppl 3 (6 décembre 2008): S191-198. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0304.focus>.
- John, Kaarthik, Channa Keshava, Diana L. Richardson, Ainsley Weston, et Joginder Nath. « Immune Response Signatures of Benzo{alpha}pyrene Exposure in Normal Human Mammary Epithelial Cells in the Absence or Presence of Chlorophyllin ». *Cancer Genomics & Proteomics* 6, n° 1 (février 2009): 1-11.
- Johnsen, Anders R., et Ulrich Karlson. « PAH Degradation Capacity of Soil Microbial Communities--Does It Depend on PAH Exposure? ». *Microbial Ecology* 50, n° 4 (novembre 2005): 488-95. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0022-5>.
- Johnsen, Anders R., Lukas Y. Wick, et Hauke Harms. « Principles of Microbial PAH-Degradation in Soil ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 133, n° 1 (janvier 2005): 71-84. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>.
- Jongeneelen, F. J. « Methods for Routine Biological Monitoring of Carcinogenic PAH-Mixtures ». *The Science of the Total Environment* 199, n° 1-2 (20 juin 1997): 141-49.
- Justus, Calvin R., Nancy Leffler, Maria Ruiz-Echevarria, et Li V. Yang. « In vitro Cell Migration and Invasion Assays ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n° 88 (1 juin 2014). <https://doi.org/10.3791/51046>.
- Jux, Bettina, Stephanie Kadow, et Charlotte Esser. « Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity Are Impaired in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, n° 11 (1 juin 2009): 6709-17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713344>.

- Käfferlein, Heiko U., Boleslaw Marczyński, Patrice Simon, Jürgen Angerer, Hans-Peter Rihs, Michael Wilhelm, Kurt Straif, Beate Pesch, et Thomas Brüning. « Internal Exposure to Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and DNA Damage: A Null Result in Brief ». *Archives of Toxicology* 86, n° 8 (1 août 2012): 1317-21. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0882-7>.
- Kamangar, Farin, Paul T. Strickland, Akram Pourshams, Reza Malekzadeh, Paolo Boffetta, Mark J. Roth, Christian C. Abnet, et al. « High Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons May Contribute to High Risk of Esophageal Cancer in Northeastern Iran ». *Anticancer Research* 25, n° 1B (février 2005): 425-28.
- Kanaly, Robert A., et Shigeaki Harayama. « Advances in the Field of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria ». *Microbial Biotechnology* 3, n° 2 (mars 2010): 136-64. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00130.x>.
- Karakaya, Asuman, Ilker Ates, et Berran Yucesoy. « Effects of Occupational Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure on T-Lymphocyte Functions and Natural Killer Cell Activity in Asphalt and Coke Oven Workers ». *Human & Experimental Toxicology* 23, n° 7 (1 juillet 2004): 317-22. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht455oa>.
- Kawanishi, S., S. Inoue, S. Oikawa, N. Yamashita, S. Toyokuni, M. Kawanishi, et K. Nishino. « Oxidative DNA Damage in Cultured Cells and Rat Lungs by Carcinogenic Nickel Compounds ». *Free Radical Biology & Medicine* 31, n° 1 (1 juillet 2001): 108-16.
- Kay, J. E. « Mechanisms of T Lymphocyte Activation ». *Immunology Letters* 29, n° 1-2 (juillet 1991): 51-54.
- Kay, Neil E., Nancy D. Bone, Yean K. Lee, Diane F. Jelinek, Pamela Leland, Traci E. Battle, David A. Frank, et Raj K. Puri. « A Recombinant IL-4-Pseudomonas Exotoxin Inhibits Protein Synthesis and Overcomes Apoptosis Resistance in Human CLL B Cells ». *Leukemia Research* 29, n° 9 (septembre 2005): 1009-18. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.11.025>.
- Kekatpure, Vikram D., Andrew J. Dannenberg, et Kotha Subbaramaiah. « HDAC6 Modulates Hsp90 Chaperone Activity and Regulates Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 284, n° 12 (20 mars 2009): 7436-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808999200>.
- Kendzioriski, C., R. A. Irizarry, K.-S. Chen, J. D. Haag, et M. N. Gould. « On the utility of pooling biological samples in microarray experiments ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n° 12 (22 mars 2005): 4252-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500607102>.
- Kendzioriski, C. M., Y. Zhang, H. Lan, et A. D. Attie. « The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments ». *Biostatistics* 4, n° 3 (1 juillet 2003): 465-77. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/4.3.465>.
- Kennedy, Daniel R., Loretta S. Gawron, Jianhua Ju, Wen Liu, Ben Shen, et Terry A. Beerman. « Single Chemical Modifications of the C-1027 Eneidyne Core, a Radiomimetic Antitumor Drug, Affect Both Drug Potency and the Role of Ataxia-Telangiectasia Mutated in Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks ». *Cancer Research* 67, n° 2 (15 janvier 2007): 773-81. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2893>.
- Kerkvliet, N. I., L. B. Steppan, J. A. Brauner, J. A. Deyo, M. C. Henderson, R. S. Tomar, et D. R. Buhler. « Influence of the Ah Locus on the Humoral Immunotoxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin: Evidence for Ah-Receptor-Dependent and Ah-Receptor-Independent Mechanisms of Immunosuppression ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 105, n° 1 (août 1990): 26-36.
- Keshava, Channa, Rao L. Divi, Diana L. Whipkey, Bonnie L. Frye, Erin McCanlies, Maryanne Kuo, Miriam C. Poirier, et Ainsley Weston. « Induction of CYP1A1 and CYP1B1 and

- Formation of Carcinogen-DNA Adducts in Normal Human Mammary Epithelial Cells Treated with Benzo[a]Pyrene ». *Cancer Letters* 221, n° 2 (28 avril 2005): 213-24. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.038>.
- Keshava, Channa, Diana Whipkey, et Ainsley Weston. « Transcriptional Signatures of Environmentally Relevant Exposures in Normal Human Mammary Epithelial Cells: Benzo[a]Pyrene ». *Cancer Letters* 221, n° 2 (28 avril 2005): 201-11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.037>.
- Kewley, Robyn J., Murray L. Whitelaw, et Anne Chapman-Smith. « The Mammalian Basic Helix-Loop-Helix/PAS Family of Transcriptional Regulators ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, n° 2 (février 2004): 189-204.
- Kielbassa, Schmitz, et Volker. « Disruption of Endothelial Microfilaments Selectively Reduces the Transendothelial Migration of Monocytes », 1998. [https://ac-els-cdn-com.gate2.inist.fr/S0014482798941337/1-s2.0-S0014482798941337-main.pdf?\\_tid=a9884a76-cf6d-11e7-a9b5-00000aab0f27&acdnat=1511345736\\_bdd948237c99444cfd7c96975be6e80c](https://ac-els-cdn-com.gate2.inist.fr/S0014482798941337/1-s2.0-S0014482798941337-main.pdf?_tid=a9884a76-cf6d-11e7-a9b5-00000aab0f27&acdnat=1511345736_bdd948237c99444cfd7c96975be6e80c).
- Kikugawa, Kiyomi, Natsuki Oikawa, Azusa Miyazawa, Ken-ichi Shindo, et Tetsuta Kato. « Interaction of Nitric Oxide with Glutathione or Cysteine Generates Reactive Oxygen Species Causing DNA Single Strand Breaks ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, n° 6 (juin 2005): 998-1003.
- Kim, Jeong M., Jeffrey P. Rasmussen, et Alexander Y. Rudensky. « Regulatory T Cells Prevent Catastrophic Autoimmunity throughout the Lifespan of Mice ». *Nature Immunology* 8, n° 2 (février 2007): 191-97. <https://doi.org/10.1038/ni1428>.
- Kim, Se Jin, Chang-Bo Ko, Channy Park, Bok-Ryang Kim, Tae-Ho Sung, Dai-Ha Koh, Nam-Song Kim, Kyung-Jae Oh, Sang-Young Chung, et Raekil Park. « P38 MAP Kinase Regulates Benzo(a)Pyrene-Induced Apoptosis through the Regulation of P53 Activation ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, n° 2 (15 décembre 2005): 121-29. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.009>.
- Kim, Sun-Hee, Ellen C. Henry, Dong-Kyu Kim, Yun-Hee Kim, Kum Joo Shin, Myoung Sook Han, Taehoon G. Lee, et al. « Novel Compound 2-Methyl-2H-Pyrazole-3-Carboxylic Acid (2-Methyl-4-o-Tolylazo-Phenyl)-Amide (CH-223191) Prevents 2,3,7,8-TCDD-Induced Toxicity by Antagonizing the Aryl Hydrocarbon Receptor ». *Molecular Pharmacology* 69, n° 6 (juin 2006): 1871-78. <https://doi.org/10.1124/mol.105.021832>.
- Kimura, Akihiro, Tetsuji Naka, Keiko Nohara, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, et Tadimitsu Kishimoto. « Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Stat1 Activation and Participates in the Development of Th17 Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 28 (15 juillet 2008): 9721-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804231105>.
- Kincses, Zsigmond Tamas, József Toldi, et László Vécsei. « Kynurenines, Neurodegeneration and Alzheimer's Disease ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, n° 8 (août 2010): 2045-54. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01123.x>.
- Kiyohara, Chikako, Taro Shirakawa, et Julian M. Hopkin. « Genetic Polymorphism of Enzymes Involved in Xenobiotic Metabolism and the Risk of Lung Cancer ». *Environmental Health and Preventive Medicine* 7, n° 2 (mai 2002): 47-59. <https://doi.org/10.1007/BF02897330>.
- Knuckles, M. E., F. Inyang, et A. Ramesh. « Acute and Subchronic Oral Toxicities of Benzo[a]Pyrene in F-344 Rats ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 61, n° 2 (juin 2001): 382-88.
- Knuckles, Maurice E., Frank Inyang, et Aramandla Ramesh. « Acute and Subchronic Oral Toxicity of Fluoranthene in F-344 Rats ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, n° 1 (septembre 2004): 102-8. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00110-6).

- Ko, H. P., S. T. Okino, Q. Ma, et J. P. Whitlock. « Transactivation Domains Facilitate Promoter Occupancy for the Dioxin-Inducible CYP1A1 Gene in Vivo ». *Molecular and Cellular Biology* 17, n° 7 (juillet 1997): 3497-3507.
- Kobayashi, A., K. Numayama-Tsuruta, K. Sogawa, et Y. Fujii-Kuriyama. « CBP/P300 Functions as a Possible Transcriptional Coactivator of Ah Receptor Nuclear Translocator (Arnt) ». *Journal of Biochemistry* 122, n° 4 (octobre 1997): 703-10.
- Kobayashi, S., H. Okamoto, T. Iwamoto, Y. Toyama, T. Tomatsu, H. Yamanaka, et S. Momohara. « A Role for the Aryl Hydrocarbon Receptor and the Dioxin TCDD in Rheumatoid Arthritis ». *Rheumatology (Oxford, England)* 47, n° 9 (septembre 2008): 1317-22. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken259>.
- Kouri, Richard E., Cindy E. McKinney, Arthur S. Levine, Brenda K. Edwards, Elliot S. Vesell, Daniel W. Nebert, et Theodore L. McLemore. « Variations in Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activities in Mitogen-Activated Human and Nonhuman Primate Lymphocytes ». *Toxicologic Pathology* 12, n° 1 (1 janvier 1984): 44-48. <https://doi.org/10.1177/019262338401200107>.
- Krejci, Lumir, Veronika Altmannova, Mario Spirek, et Xiaolan Zhao. « Homologous recombination and its regulation ». *Nucleic Acids Research* 40, n° 13 (juillet 2012): 5795-5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>.
- Krieger, J. A., J. L. Born, et S. W. Burchiel. « Persistence of Calcium Elevation in the HPB-ALL Human T Cell Line Correlates with Immunosuppressive Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 127, n° 2 (1 août 1994): 268-74. <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1161>.
- Krieger, J. A., D. R. Davila, J. Lytton, J. L. Born, et S. W. Burchiel. « Inhibition of Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA) by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in HPB-All Human T Cells and Other Tissues ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 133, n° 1 (1 juillet 1995): 102-8. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1131>.
- Krüger, Christopher T., Mareike Hofmann, et Andrea Hartwig. « The in Vitro PIG-A Gene Mutation Assay: Mutagenicity Testing via Flow Cytometry Based on the Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Status of TK6 Cells ». *Archives of Toxicology* 89, n° 12 (1 décembre 2015): 2429-43. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1413-5>.
- Kucab, Jill E., Harry van Steeg, Mirjam Luijten, Heinz H. Schmeiser, Paul A. White, David H. Phillips, et Volker M. Arlt. « TP53 Mutations Induced by BPDE in Xpa-WT and Xpa-Null Human TP53 Knock-in (Hupki) Mouse Embryo Fibroblasts ». *Mutation Research* 773 (mars 2015): 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.013>.
- Kurpios-Piec, Dagmara, Emilia Grosicka-Maciąg, Katarzyna Woźniak, Cezary Kowalewski, Ewelina Kiernożek, Maria Szumiło, et Iwonna Rahden-Staroń. « Thiram activates NF-kappaB and enhances ICAM-1 expression in human microvascular endothelial HMEC-1 cells ». *Pesticide Biochemistry and Physiology* 118, n° Supplement C (1 février 2015): 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.003>.
- Labash, Carson, Svetlana L. Avlasevich, Kristine Carlson, Ariel Berg, Dorothea K. Torous, Steven M. Bryce, Jeffrey C. Bemis, James T. MacGregor, et Stephen D. Dertinger. « Mouse Pig-a and Micronucleus Assays Respond to N-Ethyl-N-Nitrosourea, Benzo[a]Pyrene, and Ethyl Carbamate, but Not Pyrene or Methyl Carbamate ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 57, n° 1 (janvier 2016): 28-40. <https://doi.org/10.1002/em.21965>.
- Labash, Carson, Svetlana L. Avlasevich, Kristine Carlson, Dorothea K. Torous, Ariel Berg, Jeffrey C. Bemis, James T. MacGregor, et Stephen D. Dertinger. « Comparison of Male versus Female Responses in the Pig-a Mutation Assay ». *Mutagenesis* 30, n° 3 (mai 2015): 349-57. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu055>.

- Ladics, G. S., T. T. Kawabata, A. E. Munson, et K. L. White. « Evaluation of Murine Splenic Cell Type Metabolism of Benzo[a]Pyrene and Functionality in Vitro Following Repeated in Vivo Exposure to Benzo[a]Pyrene ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 116, n° 2 (octobre 1992): 258-66.
- Lafontaine, M., C. Champmartin, P. Simon, P. Delsaut, et C. Funck-Brentano. « 3-Hydroxybenzo[a]Pyrene in the Urine of Smokers and Non-Smokers ». *Toxicology Letters* 162, n° 2-3 (10 avril 2006): 181-85. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.019>.
- Lagerqvist, Anne, Daniel Håkansson, Cecilia Lundin, Gabriela Prochazka, Kristian Dreij, Dan Segerbäck, Bengt Jernström, et al. « DNA Repair and Replication Influence the Number of Mutations per Adduct of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mammalian Cells ». *DNA Repair* 10, n° 8 (15 août 2011): 877-86. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.06.002>.
- Lahvis, G. P., et C. A. Bradfield. « Ahr Null Alleles: Distinctive or Different? » *Biochemical Pharmacology* 56, n° 7 (1 octobre 1998): 781-87.
- Laios, Michael D., Everett R. Tate, Lori S. Ahrenhoerster, Yuhong Chen, et Demin Wang. « Effects of Developmental Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Long-Term Self-Renewal of Murine Hematopoietic Stem Cells ». *Environmental Health Perspectives* 124, n° 7 (juillet 2016): 957-65. <https://doi.org/10.1289/ehp.1509820>.
- Lamers, C. H., R. J. van de Griend, E. Braakman, C. P. Ronteltap, J. Bénard, G. Stoter, J. W. Gratama, et R. L. Bolhuis. « Optimization of Culture Conditions for Activation and Large-Scale Expansion of Human T Lymphocytes for Bispecific Antibody-Directed Cellular Immunotherapy ». *International Journal of Cancer* 51, n° 6 (30 juillet 1992): 973-79.
- Larsen, Annette K., et Andrzej Skladanowski. « Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1400, n° 1 (1 octobre 1998): 257-74. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00140-7).
- Larsson, Maria, John P. Giesy, et Magnus Engwall. « AhR-Mediated Activities of Polycyclic Aromatic Compound (PAC) Mixtures Are Predictable by the Concept of Concentration Addition ». *Environment International* 73 (décembre 2014): 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.06.011>.
- Latifovic, Lidija, Paul J. Villeneuve, Marie-Élise Parent, Kenneth C. Johnson, Linda Kachuri, Canadian Cancer Registries Epidemiology Group, et Shelley A. Harris. « Bladder Cancer and Occupational Exposure to Diesel and Gasoline Engine Emissions among Canadian Men ». *Cancer Medicine* 4, n° 12 (décembre 2015): 1948-62. <https://doi.org/10.1002/cam4.544>.
- Laupeze, Béatrice, Laurence Amiot, Lydie Sparfel, Eric Le Ferrec, Renée Fauchet, et Olivier Fardel. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Affect Functional Differentiation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *The Journal of Immunology* 168, n° 6 (15 mars 2002): 2652-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2652>.
- LaVoie, E. J., Z. W. Cai, C. L. Meschter, et E. H. Weyand. « Tumorigenic Activity of Fluoranthene, 2-Methylfluoranthene and 3-Methylfluoranthene in Newborn CD-1 Mice ». *Carcinogenesis* 15, n° 10 (octobre 1994): 2131-35.
- Lawrence, B. Paige. « Environmental Toxins as Modulators of Antiviral Immune Responses ». *Viral Immunology* 20, n° 2 (1 juin 2007): 231-42. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0013>.
- Le Beau, M. M., L. A. Carver, R. Espinosa, J. V. Schmidt, et C. A. Bradfield. « Chromosomal Localization of the Human AHR Locus Encoding the Structural Gene for the Ah Receptor to 7p21-->p15 ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 66, n° 3 (1994): 172-76.

- Lecoq, S., M. NíShé, P. L. Grover, K. L. Platt, F. Oesch, et D. H. Phillips. « The in vitro metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene, catalyzed by rat liver microsomes and examined by 32P-postlabelling ». *Cancer Letters* 57, n° 3 (24 mai 1991): 261-69. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(91\)90166-F](https://doi.org/10.1016/0304-3835(91)90166-F).
- Lecureur, Valérie, Eric Le Ferrec, Monique N'diaye, Marc Le Vee, Claire Gardyn, David Gilot, et Olivier Fardel. « ERK-Dependent Induction of TNF $\alpha$  Expression by the Environmental Contaminant Benzo(a)Pyrene in Primary Human Macrophages ». *FEBS Letters* 579, n° 9 (28 mars 2005): 1904-10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.081>.
- Lee, Anthony J., May Xiaoxin Cai, Paul E. Thomas, Allan H. Conney, et Bao Ting Zhu. « Characterization of the Oxidative Metabolites of 17 $\beta$ -Estradiol and Estrone Formed by 15 Selectively Expressed Human Cytochrome P450 Isoforms ». *Endocrinology* 144, n° 8 (août 2003): 3382-98. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0192>.
- Lee, Chen-Chen, Wen-Hao Yang, Ching-Hao Li, Yu-Wen Cheng, Chi-Hao Tsai, et Jaw-Jou Kang. « Ligand Independent Aryl Hydrocarbon Receptor Inhibits Lung Cancer Cell Invasion by Degradation of Smad4 ». *Cancer Letters* 376, n° 2 (01 2016): 211-17. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.052>.
- Lee, Ji-Hoon, et Tanya T. Paull. « ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 308, n° 5721 (22 avril 2005): 551-54. <https://doi.org/10.1126/science.1108297>.
- Levine, B. L., Y. Ueda, A. Faith, et C. H. June. « Signal Transduction Properties of the T Cell Activation Monoclonal Antibody Panel: Ubiquitous Increase in Cellular Substrate Tyrosine Phosphorylation in the Absence of Detectable Calcium Mobilization ». *Tissue Antigens* 48, n° 4 Pt 1 (octobre 1996): 319-24.
- Li, Xueyan, Cha Shen, Xueqing Liu, Junlin He, Yubin Ding, Rufe Gao, Xinyi Mu, Yanqing Geng, Yingxiong Wang, et Xuemei Chen. « Exposure to benzo[a]pyrene impairs decidualization and decidual angiogenesis in mice during early pregnancy ». *Environmental Pollution* 222 (1 mars 2017): 523-31. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.029>.
- Li, D., P. F. Firozi, P. Chang, L. E. Wang, P. Xiong, E. M. Sturgis, S. A. Eicher, M. R. Spitz, W. K. Hong, et Q. Wei. « In Vitro BPDE-Induced DNA Adducts in Peripheral Lymphocytes as a Risk Factor for Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck ». *International Journal of Cancer* 93, n° 3 (1 août 2001): 436-40.
- Li, D., P. F. Firozi, L. E. Wang, C. H. Bosken, M. R. Spitz, W. K. Hong, et Q. Wei. « Sensitivity to DNA Damage Induced by Benzo(a)Pyrene Diol Epoxide and Risk of Lung Cancer: A Case-Control Analysis ». *Cancer Research* 61, n° 4 (15 février 2001): 1445-50.
- Li, D., M. Wang, L. Cheng, M. R. Spitz, W. N. Hittelman, et Q. Wei. « In Vitro Induction of Benzo(a)Pyrene Diol Epoxide-DNA Adducts in Peripheral Lymphocytes as a Susceptibility Marker for Human Lung Cancer ». *Cancer Research* 56, n° 16 (15 août 1996): 3638-41.
- Li, Linhao, Joseph D. Stanton, Antonia H. Tolson, Yuan Luo, et Hongbing Wang. « Bioactive Terpenoids and Flavonoids from Ginkgo Biloba Extract Induce the Expression of Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes through Pregnane X Receptor, Constitutive Androstane Receptor, and Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Pathways ». *Pharmaceutical Research* 26, n° 4 (avril 2009): 872-82. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9788-8>.
- Lichten, M., C. Goyon, N. P. Schultes, D. Treco, J. W. Szostak, J. E. Haber, et A. Nicolas. « Detection of Heteroduplex DNA Molecules among the Products of *Saccharomyces Cerevisiae* Meiosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, n° 19 (octobre 1990): 7653-57.

- Lijinsky, W. « The Formation and Occurrence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Associated with Food ». *Mutation Research* 259, n° 3-4 (avril 1991): 251-61.
- Lim, Chrissie, et Ram Savan. « The Role of the IL-22/IL-22R1 Axis in Cancer ». *Cytokine and Growth Factor Reviews* 25, n° 3 (1 juin 2014): 257-71. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.04.005>.
- Lin, Yi-Cheng, et Fung-Fang Wang. « Mechanisms Underlying the Pro-Survival Pathway of P53 in Suppressing Mitotic Death Induced by Adriamycin ». *Cellular Signalling* 20, n° 1 (janvier 2008): 258-67. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.017>.
- Lipscomb, T. P., R. K. Harris, R. B. Moeller, J. M. Pletcher, R. J. Haebler, et B. E. Ballachey. « Histopathologic Lesions in Sea Otters Exposed to Crude Oil ». *Veterinary Pathology* 30, n° 1 (janvier 1993): 1-11. <https://doi.org/10.1177/030098589303000101>.
- Liu, Jiawang, Jayalakshmi Sridhar, et Maryam Foroozesh. « Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors and Structure-Activity Relationships ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 18, n° 12 (25 novembre 2013): 14470-95. <https://doi.org/10.3390/molecules181214470>.
- Liu, Xuemei, Kieran J. Germaine, David Ryan, et David N. Dowling. « Genetically Modified Pseudomonas Biosensing Biodegraders to Detect PCB and Chlorobenzoate Bioavailability and Biodegradation in Contaminated Soils ». *Bioengineered Bugs* 1, n° 3 (juin 2010): 198-206. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.3.12443>.
- Lloyd, D. R., P. L. Carmichael, et D. H. Phillips. « Comparison of the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Single- and Double-Strand Breaks in DNA Mediated by Fenton Reactions ». *Chemical Research in Toxicology* 11, n° 5 (mai 1998): 420-27. <https://doi.org/10.1021/tx970156l>.
- Lo, Huey-Ming, Tsong-Long Hwang, et Wen-Bin Wu. « A Phenanthrene Derivative, 5,7-Dimethoxy-1,4-Phenanthrenequinone, Inhibits Cell Adhesion Molecule Expression and Migration in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells ». *Pharmacology* 99, n° 5-6 (2017): 291-302. <https://doi.org/10.1159/000457802>.
- Lodovici, Maura, Cristina Luceri, Francesco Guglielmi, Chiara Bacci, Victor Akpan, Maria Luisa Fonnesu, Vieri Boddi, et Piero Dolara. « Benzo(a)Pyrene Diol Epoxide (BPDE)-DNA Adduct Levels in Leukocytes of Smokers in Relation to Polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and MEH ». *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 13, n° 8 (1 août 2004): 1342-48.
- Long, W. P., et G. H. Perdew. « Lack of an Absolute Requirement for the Native Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) and AhR Nuclear Translocator Transactivation Domains in Protein Kinase C-Mediated Modulation of the AhR Pathway ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371, n° 2 (15 novembre 1999): 246-59. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1452>.
- Long, W. P., M. Pray-Grant, J. C. Tsai, et G. H. Perdew. « Protein Kinase C Activity Is Required for Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway-Mediated Signal Transduction ». *Molecular Pharmacology* 53, n° 4 (avril 1998): 691-700.
- Lopes, Antonio Barros, Marcela Metzdorf, Luiza Metzdorf, Marcos Paulo Ramalho, Caroline Kavalco, Arash Etemadi, Natalie R. Pritchett, et al. « Urinary Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in Maté Drinkers in Rio Grande Do Sul, Brazil ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20 décembre 2017. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0773>.
- Lotz, Anne, Beate Pesch, Gerhard Dettbarn, Monika Raulf, Peter Welge, Hans-Peter Rihs, Dietmar Breuer, et al. « Metabolites of the PAH Diol Epoxide Pathway and Other Urinary Biomarkers of Phenanthrene and Pyrene in Workers with and without Exposure to Bitumen Fumes ». *International Archives of Occupational and Environmental Health* 89, n° 8 (novembre 2016): 1251-67. <https://doi.org/10.1007/s00420-016-1160-4>.

- Lou, Zhenkun, Claudia Christiano Silva Chini, Katherine Minter-Dykhouse, et Junjie Chen. « Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1 Regulates BRCA1 Localization and Phosphorylation in DNA Damage Checkpoint Control ». *The Journal of Biological Chemistry* 278, n° 16 (18 avril 2003): 13599-602. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300060200>.
- Lubet. « Induction of neoplastic transformation and DNA single-strand breaks in C3H/10T1/2 clone 8 cells by polycyclic hydrocarbons and alkylating agents. », 1983. <https://watermark.silverchair.com/71-5-991>.
- Luckheeram, Rishi Vishal, Rui Zhou, Asha Devi Verma, et Bing Xia. « CD4<sup>+</sup>T Cells: Differentiation and Functions ». *Clinical & Developmental Immunology* 2012 (2012): 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.
- Ma, Q., et K. T. Baldwin. « 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin-Induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. Role of the Transcription Activator and DNA Binding of AhR ». *The Journal of Biological Chemistry* 275, n° 12 (24 mars 2000): 8432-38.
- Machin, G. A. « Disposal Arrangements for Fetuses Lost in the Second Trimester ». *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 95, n° 12 (décembre 1988): 1337.
- Madapura, Harsha S., Daniel Salamon, Klas G. Wiman, Sonia Lain, George Klein, Eva Klein, et Noémi Nagy. « p53 contributes to T cell homeostasis through the induction of pro-apoptotic SAP ». *Cell Cycle* 11, n° 24 (15 décembre 2012): 4563-69. <https://doi.org/10.4161/cc.22810>.
- Madge, L. A., et J. S. Pober. « TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells ». *Experimental and Molecular Pathology* 70, n° 3 (juin 2001): 317-25. <https://doi.org/10.1006/exmp.2001.2368>.
- Madhavan, N. D., et K. A. Naidu. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Placenta, Maternal Blood, Umbilical Cord Blood and Milk of Indian Women ». *Human & Experimental Toxicology* 14, n° 6 (juin 1995): 503-6. <https://doi.org/10.1177/096032719501400607>.
- Madhukar, B. V., D. W. Brewster, et F. Matsumura. « Effects of in Vivo-Administered 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Receptor Binding of Epidermal Growth Factor in the Hepatic Plasma Membrane of Rat, Guinea Pig, Mouse, and Hamster ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, n° 23 (décembre 1984): 7407-11.
- Maeda, Allyn H., Shinro Nishi, Yuji Hatada, Yasuhiro Ozeki, et Robert A. Kanaly. « Biotransformation of the High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Benzo[k]Fluoranthene by *Sphingobium* Sp. Strain KK22 and Identification of New Products of Non-Alternant PAH Biodegradation by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry ». *Microbial Biotechnology* 7, n° 2 (mars 2014): 114-29. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12102>.
- Mahadevan, Brinda, Channa Keshava, Tamara Musafia-Jeknic, Arta Pecaj, Ainsley Weston, et William M. Baird. « Altered Gene Expression Patterns in MCF-7 Cells Induced by the Urban Dust Particulate Complex Mixture Standard Reference Material 1649a ». *Cancer Research* 65, n° 4 (15 février 2005): 1251-58. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2357>.
- Malik, Amal I., Andrea Rowan-Carroll, Andrew Williams, Christine L. Lemieux, Alexandra S. Long, Volker M. Arlt, David H. Phillips, Paul A. White, et Carole L. Yauk. « Hepatic genotoxicity and toxicogenomic responses in Muta<sup>TM</sup> Mouse males treated with dibenz[a,h]anthracene ». *Mutagenesis* 28, n° 5 (1 septembre 2013): 543-54. <https://doi.org/10.1093/mutage/get031>.
- Mangal, Dipti, Daljit Vudathala, Jong-Heum Park, Seon Hwa Lee, Trevor M. Penning, et Ian A. Blair. « Analysis of 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in Cellular DNA during

- Oxidative Stress ». *Chemical Research in Toxicology* 22, n° 5 (18 mai 2009): 788-97.  
<https://doi.org/10.1021/tx800343c>.
- Mann, K. K., R. A. Matulka, M. E. Hahn, A. F. Trombino, B. P. Lawrence, N. I. Kerkvliet, et D. H. Sherr. « The Role of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Dimethylbenz[a]Anthracene-Induced Pre-B Lymphocyte Apoptosis ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 161, n° 1 (15 novembre 1999): 10-22.  
<https://doi.org/10.1006/taap.1999.8778>.
- Marczynski, Boleslaw, Monika Raulf-Heimsoth, Anne Spickenheuer, Beate Pesch, Benjamin Kendzia, Thomas Mensing, Beate Engelhardt, et al. « DNA Adducts and Strand Breaks in Workers Exposed to Vapours and Aerosols of Bitumen: Associations between Exposure and Effect ». *Archives of Toxicology* 85, n° 1 (1 juin 2011): 53-64.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-011-0682-5>.
- Maréchal, Alexandre, et Lee Zou. « RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response ». *Cell Research* 25, n° 1 (janvier 2015): 9-23. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.147>.
- Marie, Caroline, Michèle Bouchard, Roberto Heredia-Ortiz, Claude Viau, et Anne Maître. « A Toxicokinetic Study to Elucidate 3-Hydroxybenzo(a)Pyrene Atypical Urinary Excretion Profile Following Intravenous Injection of Benzo(a)Pyrene in Rats ». *Journal of Applied Toxicology: JAT* 30, n° 5 (juillet 2010): 402-10. <https://doi.org/10.1002/jat.1511>.
- Marie, Caroline, Anne Maître, Thierry Douki, Mathilde Gateau, Adeline Tarantini, Pascale Guiraud, Alain Favier, et Jean-Luc Ravanat. « 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: JAT* 28, n° 5 (juillet 2008): 579-90.  
<https://doi.org/10.1002/jat.1306>.
- Marques, António, Helena Maria Lourenço, Maria Leonor Nunes, Cristina Roseiro, Carlos Santos, Alejandro Barranco, Sandra Rainieri, Tomaz Langerholc, et Avrelija Cencic. « New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood ». *Food Research International* 44, n° 2 (1 mars 2011): 510-22.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.003>.
- Martin, Bruno, Keiji Hirota, Daniel J. Cua, Brigitta Stockinger, et Marc Veldhoen. « Interleukin-17-Producing Gammadelta T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals ». *Immunity* 31, n° 2 (21 août 2009): 321-30. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.020>.
- Masclet, P., K. Nikolaou, et G. Mouvier. « Identification Des Sources D'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Particulaires Dans L'Atmosphere Urbaine ». In *Physico-Chemical Behaviour of Atmospheric Pollutants*, 616-25. Springer, Dordrecht, 1984.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-009-6505-8\\_64](https://doi.org/10.1007/978-94-009-6505-8_64).
- Mason, G., et S. Safe. « Synthesis, Biologic and Toxic Effects of the Major 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Metabolites in the Rat ». *Toxicology* 41, n° 2 (octobre 1986): 153-59.
- Masopust, David, et Jason M. Schenkel. « The Integration of T Cell Migration, Differentiation and Function ». *Nature Reviews Immunology* 13, n° 5 (mai 2013): 309-20.  
<https://doi.org/10.1038/nri3442>.
- Mass, M. J., A. Abu-Shakra, B. C. Roop, G. Nelson, A. J. Galati, G. D. Stoner, S. Nesnow, et J. A. Ross. « Benzo[b]Fluoranthene: Tumorigenicity in Strain A/J Mouse Lungs, DNA Adducts and Mutations in the Ki-Ras Oncogene ». *Carcinogenesis* 17, n° 8 (août 1996): 1701-4.
- Mass, M. J., A. J. Jeffers, J. A. Ross, G. Nelson, A. J. Galati, G. D. Stoner, et S. Nesnow. « Ki-Ras Oncogene Mutations in Tumors and DNA Adducts Formed by Benz[j]Aceanthrylene

- and Benzo[a]Pyrene in the Lungs of Strain A/J Mice ». *Molecular Carcinogenesis* 8, n° 3 (1993): 186-92.
- Massari, M. E., et C. Murre. « Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms ». *Molecular and Cellular Biology* 20, n° 2 (janvier 2000): 429-40.
- Mastrangelo, G., E. Fadda, et V. Marzia. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Cancer in Man ». *Environmental Health Perspectives* 104, n° 11 (novembre 1996): 1166-70.
- Mathieu, M. C., I. Lapierre, K. Brault, et M. Raymond. « Aromatic Hydrocarbon Receptor (AhR). AhR Nuclear Translocator- and P53-Mediated Induction of the Murine Multidrug Resistance Mdr1 Gene by 3-Methylcholanthrene and Benzo(a)Pyrene in Hepatoma Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 276, n° 7 (16 février 2001): 4819-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008495200>.
- Matthews, Jason, Björn Wihlén, Jane Thomsen, et Jan-Åke Gustafsson. « Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription: Ligand-Dependent Recruitment of Estrogen Receptor  $\alpha$  to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p-Dioxin-Responsive Promoters ». *Molecular and Cellular Biology* 25, n° 13 (7 janvier 2005): 5317-28. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5317-5328.2005>.
- Mayati, Abdullah, Eric Le Ferrec, Jørn A. Holme, Olivier Fardel, Dominique Lagadic-Gossmann, et Johan Øvrevik. « Calcium signaling and  $\beta$ 2-adrenergic receptors regulate 1-nitropyrene induced CXCL8 responses in BEAS-2B cells ». *Toxicology in Vitro* 28, n° 6 (1 septembre 2014): 1153-57. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.05.012>.
- Mayati, Abdullah, Nicolas Levoine, Hervé Paris, Monique N'Diaye, Arnaud Courtois, Philippe Uriac, Dominique Lagadic-Gossmann, Olivier Fardel, et Eric Le Ferrec. « Induction of Intracellular Calcium Concentration by Environmental Benzo(a)pyrene Involves a  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor/Adenylyl Cyclase/Epac-1/Inositol 1,4,5-Trisphosphate Pathway in Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, n° 6 (3 février 2012): 4041-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.319970>.
- McDonnell, W. M., J. M. Scheiman, et P. G. Traber. « Induction of Cytochrome P450IA Genes (CYP1A) by Omeprazole in the Human Alimentary Tract ». *Gastroenterology* 103, n° 5 (novembre 1992): 1509-16.
- McFadyen, Morag C. E., et Graeme I. Murray. « Cytochrome P450 1B1: A Novel Anticancer Therapeutic Target ». *Future Oncology (London, England)* 1, n° 2 (avril 2005): 259-63. <https://doi.org/10.1517/14796694.1.2.259>.
- McHale, Cliona M., Luoping Zhang, Alan E. Hubbard, et Martyn T. Smith. « Toxicogenomic Profiling of Chemically Exposed Humans in Risk Assessment ». *Mutation Research* 705, n° 3 (décembre 2010): 172-83. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.04.001>.
- Meek, David W. « Regulation of the P53 Response and Its Relationship to Cancer ». *Biochemical Journal* 469, n° 3 (1 août 2015): 325-46. <https://doi.org/10.1042/BJ20150517>.
- Melendez-Colon, V. J., A. Luch, A. Seidel, et W. M. Baird. « Cancer Initiation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Results from Formation of Stable DNA Adducts Rather than Apurinic Sites ». *Carcinogenesis* 20, n° 10 (octobre 1999): 1885-91.
- Mestas, Javier, et Christopher C. W. Hughes. « Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology ». *The Journal of Immunology* 172, n° 5 (1 mars 2004): 2731-38. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>.
- Meyer, B. K., et G. H. Perdew. « Characterization of the AhR-Hsp90-XAP2 Core Complex and the Role of the Immunophilin-Related Protein XAP2 in AhR Stabilization ». *Biochemistry* 38, n° 28 (13 juillet 1999): 8907-17. <https://doi.org/10.1021/bi982223w>.
- Miao, Weimin, Lianggao Hu, P. James Scrivens, et Gerald Batist. « Transcriptional Regulation of NF-E2 P45-Related Factor (NRF2) Expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway: Direct Cross-Talk between Phase I and

- II Drug-Metabolizing Enzymes ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n° 21 (27 mai 2005): 20340-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412081200>.
- Michael, Dan, et Moshe Oren. « The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system ». *Seminars in Cancer Biology* 13, n° 1 (1 février 2003): 49-58. [https://doi.org/10.1016/S1044-579X\(02\)00099-8](https://doi.org/10.1016/S1044-579X(02)00099-8).
- Michaels, M. L., C. Cruz, A. P. Grollman, et J. H. Miller. « Evidence That MutY and MutM Combine to Prevent Mutations by an Oxidatively Damaged Form of Guanine in DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, n° 15 (1 août 1992): 7022-25.
- Miller, M. L., A. Andringa, T. Cody, K. Dixon, et R. E. Albert. « Cell Proliferation and Nuclear Abnormalities Are Increased and Apoptosis Is Decreased in the Epidermis of the P53 Null Mouse after Topical Application of Benzo[a]Pyrene ». *Cell Proliferation* 29, n° 10 (octobre 1996): 561-76.
- Mimura, J., K. Yamashita, K. Nakamura, M. Morita, T. N. Takagi, K. Nakao, M. Ema, et al. « Loss of Teratogenic Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) in Mice Lacking the Ah (Dioxin) Receptor ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 2, n° 10 (octobre 1997): 645-54.
- Minsavage, Gary D., Sang-ki Park, et Thomas A. Gasiewicz. « The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Tyrosine 9, a Residue That Is Essential for AhR DNA Binding Activity, Is Not a Phosphoresidue but Augments AhR Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 279, n° 20 (14 mai 2004): 20582-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312977200>.
- Misteli, Tom, et Evi Soutoglou. « The Emerging Role of Nuclear Architecture in DNA Repair and Genome Maintenance ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10, n° 4 (avril 2009): 243-54. <https://doi.org/10.1038/nrm2651>.
- Mohammadi-Bardbori, Afshin, Johanna Bengtsson, Ulf Rannug, Agneta Rannug, et Emma Wincent. « Quercetin, Resveratrol, and Curcumin Are Indirect Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) ». *Chemical Research in Toxicology* 25, n° 9 (17 septembre 2012): 1878-84. <https://doi.org/10.1021/tx300169e>.
- Moita, C., G. Real, I. Antunes, J. P. P. Meijerink, J. T. Barata, L. F. Moita, L. M. Sarmiento, et al. « CHK1 Overexpression in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Is Essential for Proliferation and Survival by Preventing Excessive Replication Stress ». *Oncogene* 34, n° 23 (18 août 2014): 2978. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.248>.
- Möller, Anja-Maria, Corinna Hermsen, Tilman Floehr, Marja H. Lamoree, et Helmut Segner. « Tissue-Specific Metabolism of Benzo[a]Pyrene in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*): A Comparison between the Liver and Immune Organs ». *Drug Metabolism and Disposition* 42, n° 1 (1 janvier 2014): 111-18. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.053777>.
- Moody, R. P., B. Nadeau, et I. Chu. « In Vivo and in Vitro Dermal Absorption of Benzo[a]Pyrene in Rat, Guinea Pig, Human and Tissue-Cultured Skin ». *Journal of Dermatological Science* 9, n° 1 (janvier 1995): 48-58.
- Mordukhovich, Irina, Jan Beyea, Amy H. Herring, Maureen Hatch, Steven D. Stellman, Susan L. Teitelbaum, David B. Richardson, et al. « Vehicular Traffic-Related Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure and Breast Cancer Incidence: The Long Island Breast Cancer Study Project (LIBCSP) ». *Environmental Health Perspectives* 124, n° 1 (janvier 2016): 30-38. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307736>.
- Moreau, Marjory, Pierre Ayotte, et Michèle Bouchard. « Kinetics of Diol and Hydroxybenzo[a]pyrene Metabolites in Relation to DNA Adduct Formation and Gene Expression in Rats ». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 78, n° 12 (18 juin 2015): 725-46. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1028119>.

- Moreau, Marjory, et Michèle Bouchard. « Comparison of the Kinetics of Various Biomarkers of Benzo[a]Pyrene Exposure Following Different Routes of Entry in Rats ». *Journal of Applied Toxicology: JAT* 35, n° 7 (juillet 2015): 781-90. <https://doi.org/10.1002/jat.3070>.
- Moreau, Marjory, Nathalie Ouellet, Pierre Ayotte, et Michèle Bouchard. « Effects of Intravenous Benzo[a]Pyrene Dose Administration on Levels of Exposure Biomarkers, DNA Adducts, and Gene Expression in Rats ». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 78, n° 3 (1 février 2015): 166-84. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.954072>.
- Morton, Lindsay M., Joshua N. Sampson, James R. Cerhan, Jennifer J. Turner, Claire M. Vajdic, Sophia S. Wang, Karin E. Smedby, et al. « Rationale and Design of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph) Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project ». *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 2014, n° 48 (août 2014): 1-14. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgu005>.
- Moserová, Michaela, Věra Kotrbová, Dagmar Aimová, Miroslav Sulc, Eva Frei, et Marie Stiborová. « Analysis of Benzo[a]Pyrene Metabolites Formed by Rat Hepatic Microsomes Using High Pressure Liquid Chromatography: Optimization of the Method ». *Interdisciplinary Toxicology* 2, n° 4 (décembre 2009): 239-44. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0024-0>.
- Motorykin, Oleksii, Jill Schrlau, Yuling Jia, Barbara Harper, Stuart Harris, Anna Harding, David Stone, Molly Kile, Daniel Sudakin, et Staci L. Massey Simonich. « Determination of Parent and Hydroxy PAHs in Personal PM<sub>2.5</sub> and Urine Samples Collected during Native American Fish Smoking Activities ». *The Science of the Total Environment* 505 (1 février 2015): 694-703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.051>.
- Mulero-Navarro, Sonia, Eulalia Pozo-Guisado, Pedro A. Pérez-Mancera, Alberto Alvarez-Barrientos, Inmaculada Catalina-Fernández, Emilia Hernández-Nieto, Javier Sáenz-Santamaria, et al. « Immortalized Mouse Mammary Fibroblasts Lacking Dioxin Receptor Have Impaired Tumorigenicity in a Subcutaneous Mouse Xenograft Model ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n° 31 (5 août 2005): 28731-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504538200>.
- Mürer, E. H., J. Levin, et R. Holme. « Isolation and Studies of the Granules of the Amebocytes of *Limulus Polyphemus*, the Horseshoe Crab ». *Journal of Cellular Physiology* 86, n° 3 Pt 1 (décembre 1975): 533-42. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040860310>.
- Myers, Katie, Mary E. Gagou, Pedro Zuazua-Villar, Rene Rodriguez, et Mark Meuth. « ATR and Chk1 Suppress a Caspase-3-Dependent Apoptotic Response Following DNA Replication Stress ». *PLoS Genetics* 5, n° 1 (2 janvier 2009). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000324>.
- Myers, M. J., R. H. Blanton, et P. H. Bick. « Inhibition of IL-2 Responsiveness Following Exposure to Benzo(a)Pyrene Is Due to Alterations in Accessory Cell Function ». *International Journal of Immunopharmacology* 10, n° 2 (1988): 177-86.
- Myers, M. J., L. B. Schook, et P. H. Bick. « Mechanisms of Benzo(a)Pyrene-Induced Modulation of Antigen Presentation ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 242, n° 2 (août 1987): 399-404.
- Naber, Hildegonda P. H., Yvette Drabsch, B. Ewa Snaar-Jagalska, Peter ten Dijke, et Theo van Laar. « Snail and Slug, Key Regulators of TGF- $\beta$ -Induced EMT, Are Sufficient for the Induction of Single-Cell Invasion ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 435, n° 1 (24 mai 2013): 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.037>.
- Nair, U., et H. Bartsch. « Metabolic Polymorphisms as Susceptibility Markers for Lung and Oral Cavity Cancer ». *IARC Scientific Publications* 154 (2001): 271-90.

- Nakabeppu, Yusaku, Kunihiro Sakumi, Katsumi Sakamoto, Daisuke Tsuchimoto, Teruhisa Tsuzuki, et Yoshimichi Nakatsu. « Mutagenesis and Carcinogenesis Caused by the Oxidation of Nucleic Acids ». *Biological Chemistry* 387, n° 4 (avril 2006): 373-79. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.050>.
- Nam, Edward A., et David Cortez. « ATR Signalling: More than Meeting at the Fork ». *Biochemical Journal* 436, n° 3 (15 juin 2011): 527-36. <https://doi.org/10.1042/BJ20102162>.
- Nau, H., et R. Bass. « Transfer of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) to the Mouse Embryo and Fetus ». *Toxicology* 20, n° 4 (1981): 299-308.
- N'Diaye, Monique, Eric Le Ferrec, Dominique Lagadic-Gossmann, Sébastien Corre, David Gilot, Valérie Lecureur, Patricia Monteiro, Claudine Rauch, Marie-Dominique Galibert, et Olivier Fardel. « Aryl Hydrocarbon Receptor- and Calcium-Dependent Induction of the Chemokine CCL1 by the Environmental Contaminant Benzo[a]Pyrene ». *Journal of Biological Chemistry* 281, n° 29 (21 juillet 2006): 19906-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601192200>.
- Neal, Michael S., Jiping Zhu, et Warren G. Foster. « Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers ». *Reproductive Toxicology* 25, n° 1 (1 janvier 2008): 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.10.012>.
- Nebert, Daniel W., Timothy P. Dalton, Allan B. Okey, et Frank J. Gonzalez. « Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer ». *Journal of Biological Chemistry* 279, n° 23 (6 avril 2004): 23847-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200>.
- Nebert, Daniel W., Amy L. Roe, Matthew Z. Dieter, Willy A. Solis, Yi Yang, et Timothy P. Dalton. « Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis ». *Biochemical Pharmacology* 59, n° 1 (1 janvier 2000): 65-85. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00310-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00310-X).
- Nerurkar, P. V., L. Okinaka, C. Aoki, A. Seifried, A. Lum-Jones, L. R. Wilkens, et L. Le Marchand. « CYP1A1, GSTM1, and GSTP1 Genetic Polymorphisms and Urinary 1-Hydroxypyrene Excretion in Non-Occupationally Exposed Individuals ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 9, n° 10 (octobre 2000): 1119-22.
- Nesnow, S., J. A. Ross, M. J. Mass, et G. D. Stoner. « Mechanistic Relationships between DNA Adducts, Oncogene Mutations, and Lung Tumorigenesis in Strain A Mice ». *Experimental Lung Research* 24, n° 4 (août 1998): 395-405.
- Nesnow, S., J. A. Ross, G. D. Stoner, et M. J. Mass. « Mechanistic Linkage between DNA Adducts, Mutations in Oncogenes and Tumorigenesis of Carcinogenic Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Strain A/J Mice ». *Toxicology* 105, n° 2-3 (28 décembre 1995): 403-13.
- Nikolaou, K., P. Masclet, et G. Mouvier. « Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere — A critical review ». *Science of The Total Environment* 32, n° 2 (13 janvier 1984): 103-32. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(84\)90125-6](https://doi.org/10.1016/0048-9697(84)90125-6).
- Nisbet, Ian C. T., et Peter K. LaGoy. « Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ». *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 16, n° 3 (1 décembre 1992): 290-300. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90009-X).
- Niwa, A., K. Kumaki, D. W. Nebert, et A. P. Poland. « Genetic Expression of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in the Mouse. Distinction between the “Responsive”

- Homozygote and Heterozygote at the Ah Locus ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 166, n° 2 (février 1975): 559-64.
- Oberg, Mattias, Maritta S. Jaakkola, Alistair Woodward, Armando Peruga, et Annette Prüss-Ustün. « Worldwide Burden of Disease from Exposure to Second-Hand Smoke: A Retrospective Analysis of Data from 192 Countries ». *Lancet (London, England)* 377, n° 9760 (8 janvier 2011): 139-46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61388-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61388-8).
- O'Callaghan-Gordo, Cristina, Manolis Kogevinas, Marie Pedersen, Eleni Fthenou, Ana Espinosa, Xristina Tsiapa, Georgia Chalkiadaki, et al. « Maternal Diet during Pregnancy and Micronuclei Frequency in Peripheral Blood T Lymphocytes in Mothers and Newborns (Rhea Cohort, Crete) ». *European Journal of Nutrition*, 21 septembre 2016. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1310-1>.
- O'Donnell, Edmond F., Katerine S. Sali, Daniel C. Koch, Prasad R. Kopparapu, David Farrer, William H. Bisson, Lijoy K. Mathew, et al. « The Anti-Inflammatory Drug Leflunomide Is an Agonist of the Aryl Hydrocarbon Receptor ». *PloS One* 5, n° 10 (1 octobre 2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013128>.
- OECD. *Essai n° 489 : Test des Comètes In Vivo en Conditions Alcalines sur Cellules de Mammifères*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2016. <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264264892-fr>.
- Oh, Sangnam, Hosub Im, Eunha Oh, Joohyun Lee, Jin-young Khim, Joohee Mun, Yanghee Kim, Eunil Lee, Joon Kim, et Donggeun Sul. « Effects of Benzo(a)Pyrene on Protein Expression in Jurkat T-Cells ». *PROTEOMICS* 4, n° 11 (1 novembre 2004): 3514-26. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400981>.
- Ohtake, Fumiaki, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, et Shigeaki Kato. « AhR Acts as an E3 Ubiquitin Ligase to Modulate Steroid Receptor Functions ». *Biochemical Pharmacology* 77, n° 4 (15 février 2009): 474-84. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.034>.
- Ohtake, Fumiaki, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Kaname Kawajiri, et Shigeaki Kato. « Cross-Talk of Dioxin and Estrogen Receptor Signals through the Ubiquitin System ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, n° 1-2 (octobre 2011): 102-7. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.007>.
- Okino, S. T., et J. P. Whitlock. « Dioxin Induces Localized, Graded Changes in Chromatin Structure: Implications for Cyp1A1 Gene Transcription ». *Molecular and Cellular Biology* 15, n° 7 (juillet 1995): 3714-21.
- Onwukeme, V. I., Obijiofor, O. C., Asomugha, R. N. and Okafor, F. A. « Impact of Cooking Methods on the Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Chicken Meat ». *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, avril 2015. <http://iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/vol9-issue4/Version-1/C09412127.pdf>.
- Osgood, Ross S., Brad L. Upham, Pierre R. Bushel, Kalpana Velmurugan, Ka-Na Xiong, et Alison K. Bauer. « Secondhand Smoke-Prevalent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Binary Mixture-Induced Specific Mitogenic and Pro-Inflammatory Cell Signaling Events in Lung Epithelial Cells ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 157, n° 1 (01 2017): 156-71. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx027>.
- Pacheco, K. A., M. Tarkowski, C. Sterritt, J. Negri, L. J. Rosenwasser, et L. Borish. « The Influence of Diesel Exhaust Particles on Mononuclear Phagocytic Cell-Derived Cytokines: IL-10, TGF-Beta and IL-1 Beta ». *Clinical and Experimental Immunology* 126, n° 3 (décembre 2001): 374-83.
- Pacheco, Solange A., Vukosava M. Torres, Henriqueta Louro, Filomena Gomes, Carlos Lopes, Nelson Marçal, Elsa Fragoso, et al. « Effects of Occupational Exposure to Tobacco Smoke: Is There a Link between Environmental Exposure and Disease? » *Journal of*

- Toxicology and Environmental Health. Part A* 76, n° 4-5 (2013): 311-27.  
<https://doi.org/10.1080/15287394.2013.757269>.
- Padula, Amy M., John R. Balmes, Ellen A. Eisen, Jennifer Mann, Elizabeth M. Noth, Frederick W. Lurmann, Borianna Pratt, Ira B. Tager, Kari Nadeau, et S. Katharine Hammond. « Ambient Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Pulmonary Function in Children ». *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 25, n° 3 (mai 2015): 295-302. <https://doi.org/10.1038/jes.2014.42>.
- Paigen, Beverly, Jun Minowada, Hira L. Gurtoo, Kenneth Paigen, Natalie Bejba Parker, Elizabeth Ward, Nancy Thompson Hayner, I. D. J. Bross, Fred Bock, et Ronald Vincent. « Distribution of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Inducibility in Cultured Human Lymphocytes ». *Cancer Research* 37, n° 6 (1 juin 1977): 1829-37.
- Panés, J., M. A. Perry, D. C. Anderson, A. Manning, B. Leone, G. Cepinskas, C. L. Rosenbloom, M. Miyasaka, P. R. Kvietys, et D. N. Granger. « Regional Differences in Constitutive and Induced ICAM-1 Expression in Vivo ». *The American Journal of Physiology* 269, n° 6 Pt 2 (décembre 1995): H1955-1964.
- Panier, Stephanie, et Simon J. Boulton. « Double-Strand Break Repair: 53BP1 Comes into Focus ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, n° 1 (janvier 2014): 7-18.  
<https://doi.org/10.1038/nrm3719>.
- Park, Jong-Heum, Dipti Mangal, Alexander J. Frey, Ronald G. Harvey, Ian A. Blair, et Trevor M. Penning. « Aryl Hydrocarbon Receptor Facilitates DNA Strand Breaks and 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine Formation by the Aldo-Keto Reductase Product Benzo[a]Pyrene-7,8-Dione ». *Journal of Biological Chemistry* 284, n° 43 (23 octobre 2009): 29725-34.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042143>.
- Park, Jong-Heum, Andrea B. Troxel, Ronald G. Harvey, et Trevor M. Penning. « PAH o-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species ». *Chemical research in toxicology* 19, n° 5 (mai 2006): 719-28. <https://doi.org/10.1021/tx0600245>.
- Park, S., E. C. Henry, et T. A. Gasiewicz. « Regulation of DNA Binding Activity of the Ligand-Activated Aryl Hydrocarbon Receptor by Tyrosine Phosphorylation ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 381, n° 2 (15 septembre 2000): 302-12.
- Park, Sun-Young, Sun-Mi Lee, Sang-Kyu Ye, Sun-Hee Yoon, Myung-Hee Chung, et Jinhee Choi. « Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment ». *Toxicology Letters* 167, n° 1 (1 novembre 2006): 27-33.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.011>.
- Parodi, Stefano, Domenico Franco Merlo, Alessandra Ranucci, Lucia Miligi, Alessandra Benvenuti, Roberto Rondelli, Corrado Magnani, Riccardo Haupt, et SETIL Working Group. « Risk of Neuroblastoma, Maternal Characteristics and Perinatal Exposures: The SETIL Study ». *Cancer Epidemiology* 38, n° 6 (décembre 2014): 686-94.  
<https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.09.007>.
- Parvez, Shahid, Chandra Venkataraman, et Suparna Mukherji. « Nature and Prevalence of Non-Additive Toxic Effects in Industrially Relevant Mixtures of Organic Chemicals ». *Chemosphere* 75, n° 11 (juin 2009): 1429-39.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.005>.
- Pastorelli, Roberta, Annalisa Cerri, Maurizio Mezzetti, Erica Consonni, et Luisa Airoidi. « Effect of DNA Repair Gene Polymorphisms on BPDE-DNA Adducts in Human Lymphocytes ». *International Journal of Cancer* 100, n° 1 (1 juillet 2002): 9-13.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.10463>.
- Paulsen, Renee D., et Karlene A. Cimprich. « The ATR Pathway: Fine-Tuning the Fork ». *DNA Repair* 6, n° 7 (1 juillet 2007): 953-66. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.015>.

- Pearce, Sandra Timm, Hong Liu, Ishwar Radhakrishnan, Maen Abdelrahim, Stephen Safe, et V. Craig Jordan. « Interaction of the Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand 6-Methyl-1,3,8-Trichlorodibenzofuran with Estrogen Receptor Alpha ». *Cancer Research* 64, n° 8 (15 avril 2004): 2889-97.
- Peltonen, K., et A. Dipple. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry of DNA Adduct Formation ». *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 37, n° 1 (janvier 1995): 52-58.
- Peng, Weiyi, Chengwen Liu, Chunyu Xu, Yanyan Lou, Jieqing Chen, Yan Yang, Hideo Yagita, et al. « PD-1 BLOCKADE ENHANCES T CELL MIGRATION TO TUMORS BY ELEVATING IFN- $\gamma$  INDUCIBLE CHEMOKINES ». *Cancer research* 72, n° 20 (15 octobre 2012): 5209-18. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1187>.
- Penning, T. M., M. E. Burczynski, C. F. Hung, K. D. McCoull, N. T. Palackal, et L. S. Tsuruda. « Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones ». *Chemical Research in Toxicology* 12, n° 1 (janvier 1999): 1-18. <https://doi.org/10.1021/tx980143n>.
- Penning, T. M., S. T. Ohnishi, T. Ohnishi, et R. G. Harvey. « Generation of Reactive Oxygen Species during the Enzymatic Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Trans-Dihydrodiols Catalyzed by Dihydrodiol Dehydrogenase ». *Chemical Research in Toxicology* 9, n° 1 (février 1996): 84-92. <https://doi.org/10.1021/tx950055s>.
- Penning, Trevor M. « Human Aldo-Keto Reductases and the Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Chemical Research in Toxicology* 27, n° 11 (17 novembre 2014): 1901-17. <https://doi.org/10.1021/tx500298n>.
- Perera, Frederica P., Deliang Tang, Virginia Rauh, Kristin Lester, Wei Yann Tsai, Yi Hsuan Tu, Lisa Weiss, et al. « Relationships among Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts, Proximity to the World Trade Center, and Effects on Fetal Growth ». *Environmental Health Perspectives* 113, n° 8 (août 2005): 1062-67.
- Peter Guengerich, F, Young-Jin Chun, Donghak Kim, Elizabeth M. J Gillam, et Tsutomu Shimada. « Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Dietary and Medicinal Antimutagens and Anticarcinogens: Molecular Mechanisms and Chemopreventive Potential*, 523–524 (février 2003): 173-82. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00333-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00333-0).
- Peters, J. M., M. G. Narotsky, G. Elizondo, P. M. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez, et B. D. Abbott. « Amelioration of TCDD-Induced Teratogenesis in Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)-Null Mice ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 47, n° 1 (janvier 1999): 86-92.
- Petry, Thomas, Peter Schmid, et Christian Schlatter. « The use of toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ». *Chemosphere* 32, n° 4 (1 février 1996): 639-48. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00348-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00348-7).
- Phan, Anh, Rachel Veldman, et Mary Jo Lechowicz. « T-Cell Lymphoma Epidemiology: The Known and Unknown ». *Current Hematologic Malignancy Reports* 11, n° 6 (1 décembre 2016): 492-503. <https://doi.org/10.1007/s11899-016-0353-y>.
- Phang, J. M., C. M. Poore, J. Lopaczynska, et G. C. Yeh. « Flavonol-Stimulated Efflux of 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene in Multidrug-Resistant Breast Cancer Cells ». *Cancer Research* 53, n° 24 (15 décembre 1993): 5977-81.
- Phelan, D. M., W. R. Brackney, et M. S. Denison. « The Ah Receptor Can Bind Ligand in the Absence of Receptor-Associated Heat-Shock Protein 90 ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 353, n° 1 (1 mai 1998): 47-54. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0614>.

- Phelan, D., G. M. Winter, W. J. Rogers, J. C. Lam, et M. S. Denison. « Activation of the Ah Receptor Signal Transduction Pathway by Bilirubin and Biliverdin ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357, n° 1 (1 septembre 1998): 155-63. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0814>.
- Phillips, D. H. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Diet ». *Mutation Research* 443, n° 1-2 (15 juillet 1999): 139-47.
- Piberger, Ann Liza, Christopher T. Krüger, Bettina M. Strauch, Beatrice Schneider, et Andrea Hartwig. « BPDE-Induced Genotoxicity: Relationship between DNA Adducts, Mutagenicity in the in Vitro PIG-A Assay, and the Transcriptional Response to DNA Damage in TK6 Cells ». *Archives of Toxicology*, 7 juin 2017, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2003-0>.
- Pichierri, Pietro, et Filippo Rosselli. « The DNA Crosslink-induced S-phase Checkpoint Depends on ATR–CHK1 and ATR–NBS1–FANCD2 Pathways ». *The EMBO Journal* 23, n° 5 (10 mars 2004): 1178-87. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600113>.
- Pierre, Stéphane, Anne-Sophie Bats, Aline Chevallier, Linh-Chi Bui, Ariane Ambolet-Camoit, Michèle Garlatti, Martine Aggerbeck, Robert Barouki, et Xavier Coumoul. « Induction of the Ras Activator Son of Sevenless 1 by Environmental Pollutants Mediates Their Effects on Cellular Proliferation ». *Biochemical Pharmacology* 81, n° 2 (15 janvier 2011): 304-13. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.10.003>.
- Pina-Canseco, María Del Socorro, Araceli Páez-Arenas, Felipe Massó, Eduardo Pérez-Campos, Ruth Martínez-Cruz, Pedro Hernández-Cruz, Abraham Majluf-Cruz, et al. « Protein C Activation Peptide Inhibits the Expression of ICAM-1, VCAM-1, and Interleukin-8 Induced by TNF- $\alpha$  in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells ». *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50, n° 3 (2012): 407-13. <https://doi.org/10.5603/FHC.2012.0055>.
- Pinel-Marie, Marie-Laure, Lydie Sparfel, Sophie Desmots, et Olivier Fardel. « Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the NADPH oxidase subunit NCF1/p47phox expression leading to priming of human macrophage oxidative burst ». *Free Radical Biology and Medicine* 47, n° 6 (15 septembre 2009): 825-34. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.025>.
- Ping, Lifeng, Qian Guo, Xiaoyang Chen, Xiaoli Yuan, Chunrong Zhang, et Hua Zhao. « Biodegradation of Pyrene and Benzo[a]Pyrene in the Liquid Matrix and Soil by a Newly Identified Raoultella Planticola Strain ». *3 Biotech* 7, n° 1 (mai 2017): 56. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0704-y>.
- Plaza-Bolaños, Patricia, Antonia Garrido Frenich, et José Luis Martínez Vidal. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food and Beverages. Analytical Methods and Trends ». *Journal of Chromatography. A* 1217, n° 41 (8 octobre 2010): 6303-26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.079>.
- Podechard, Normand, Valérie Lecureur, Eric Le Ferrec, Isabelle Guenon, Lydie Sparfel, David Gilot, John R. Gordon, Vincent Lagente, et Olivier Fardel. « Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation ». *Toxicology Letters* 177, n° 2 (15 mars 2008): 130-37. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.01.006>.
- Poirier, Miriam C. « Linking DNA Adduct Formation and Human Cancer Risk in Chemical Carcinogenesis ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 57, n° 7 (août 2016): 499-507. <https://doi.org/10.1002/em.22030>.
- Poland, A., E. Clover, A. S. Kende, M. DeCamp, et C. M. Giandomenico. « 3,4,3',4'-Tetrachloro Azoxybenzene and Azobenzene: Potent Inducers of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase ». *Science (New York, N.Y.)* 194, n° 4265 (5 novembre 1976): 627-30.

- Poland, A., et E. Glover. « Comparison of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin, a Potent Inducer of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase, with 3-Methylcholanthrene ». *Molecular Pharmacology* 10, n° 2 (mars 1974): 349-59.
- Poland, A., et E. Glover. « Variation in the Molecular Mass of the Ah Receptor among Vertebrate Species and Strains of Rats ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 146, n° 3 (14 août 1987): 1439-49.
- Poland, A., et J. C. Knutson. « 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and Related Halogenated Aromatic Hydrocarbons: Examination of the Mechanism of Toxicity ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22 (1982): 517-54.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.002505>.
- Pollenz, R. S., H. R. Sullivan, J. Holmes, B. Necela, et R. E. Peterson. « Isolation and Expression of cDNAs from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) That Encode Two Novel Basic Helix-Loop-Helix/PER-ARNT-SIM (BHLH/PAS) Proteins with Distinct Functions in the Presence of the Aryl Hydrocarbon Receptor. Evidence for Alternative mRNA Splicing and Dominant Negative Activity in the BHLH/PAS Family ». *The Journal of Biological Chemistry* 271, n° 48 (29 novembre 1996): 30886-96.
- Pongratz, I., C. Antonsson, M. L. Whitelaw, et L. Poellinger. « Role of the PAS Domain in Regulation of Dimerization and DNA Binding Specificity of the Dioxin Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 18, n° 7 (juillet 1998): 4079-88.
- Pongratz, I., G. G. Mason, et L. Poellinger. « Dual Roles of the 90-KDa Heat Shock Protein Hsp90 in Modulating Functional Activities of the Dioxin Receptor. Evidence That the Dioxin Receptor Functionally Belongs to a Subclass of Nuclear Receptors Which Require Hsp90 Both for Ligand Binding Activity and Repression of Intrinsic DNA Binding Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 267, n° 19 (5 juillet 1992): 13728-34.
- Powell, J. J., J. Van de Water, et M. E. Gershwin. « Evidence for the Role of Environmental Agents in the Initiation or Progression of Autoimmune Conditions ». *Environmental Health Perspectives* 107 Suppl 5 (octobre 1999): 667-72.
- Prigent, Laurie, Marc Robineau, Stéphane Jouneau, Claudie Morzadec, Laetitia Louarn, Laurent Vernhet, Olivier Fardel, et Lydie Sparfel. « The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Functionally Upregulated Early in the Course of Human T-Cell Activation ». *European Journal of Immunology* 44, n° 5 (1 mai 2014): 1330-40.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201343920>.
- Pulkrabova, Jana, Michal Stupak, Andrea Svarcova, Pavel Rossner, Andrea Rossnerova, Antonin Ambroz, Radim Sram, et Jana Hajslova. « Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk ». *Science of The Total Environment* 562 (15 août 2016): 640-47. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.013>.
- Purcaro, Giorgia, Sabrina Moret, et Lanfranco S. Conte. « Overview on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Occurrence, Legislation and Innovative Determination in Foods ». *Talanta* 105 (15 février 2013): 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.041>.
- Qin, Hongtao, et Jo Anne Powell-Coffman. « The Caenorhabditis Elegans Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR-1, Regulates Neuronal Development ». *Developmental Biology* 270, n° 1 (1 juin 2004): 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.004>.
- Quattrochi, L. C., et R. H. Tukey. « Nuclear Uptake of the Ah (Dioxin) Receptor in Response to Omeprazole: Transcriptional Activation of the Human CYP1A1 Gene ». *Molecular Pharmacology* 43, n° 4 (avril 1993): 504-8.
- Quintana, Francisco J., Alexandre S. Basso, Antonio H. Iglesias, Thomas Korn, Mauricio F. Farez, Estelle Bettelli, Mario Caccamo, Mohamed Oukka, et Howard L. Weiner.  
 « Control of T(Reg) and T(H)17 Cell Differentiation by the Aryl Hydrocarbon

- Receptor ». *Nature* 453, n° 7191 (1 mai 2008): 65-71.  
<https://doi.org/10.1038/nature06880>.
- Raghavan, Arvind, Rachel L. Ogilvie, Cavan Reilly, Michelle L. Abelson, Shalini Raghavan, Jayprakash Vasdewani, Mitchell Krathwohl, et Paul R. Bohjanen. « Genome-Wide Analysis of mRNA Decay in Resting and Activated Primary Human T Lymphocytes ». *Nucleic Acids Research* 30, n° 24 (15 décembre 2002): 5529-38.
- Ramesh, Aramandla, Frank Inyang, Donald D. Lunstra, Mohammad S. Niaz, Prapaporn Kopsombut, Kea M. Jones, Daryl B. Hood, Edward R. Hills, et Anthony E. Archibong. « Alteration of Fertility Endpoints in Adult Male F-344 Rats by Subchronic Exposure to Inhaled Benzo(a)Pyrene ». *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 60, n° 4-5 (août 2008): 269-80.  
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.02.010>.
- Rannug, A., U. Rannug, H. S. Rosenkranz, L. Winqvist, R. Westerholm, E. Agurell, et A. K. Grafström. « Certain Photooxidized Derivatives of Tryptophan Bind with Very High Affinity to the Ah Receptor and Are Likely to Be Endogenous Signal Substances ». *The Journal of Biological Chemistry* 262, n° 32 (15 novembre 1987): 15422-27.
- Reade, A. E., et K. F. Gregory. « High-Temperature Production of Protein-Enriched Feed from Cassava by Fungi ». *Applied Microbiology* 30, n° 6 (décembre 1975): 897-904.
- Reardon, D. B., C. A. Bigger, J. Strandberg, H. Yagi, D. M. Jerina, et A. Dipple. « Sequence Selectivity in the Reaction of Optically Active Hydrocarbon Dihydrodiol Epoxides with Rat H-Ras DNA ». *Chemical Research in Toxicology* 2, n° 1 (février 1989): 12-14.
- Reardon Dean, , A.S.Prakash, , Bruce D.Hilton, , John, M.Roman, , John Patakr, , Ronald G.Harvey, and, Anthony Dipple, et '. « Characterization of 5-methylchrysene-1,2-dihydrodiol-3,4-epoxide-DNA adducts. » Consulté le 14 novembre 2017.  
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1024.4443&rep=rep1&type=pdf>.
- Rehwagen, Martina, Andrea Müller, Laura Massolo, Olf Herbarth, et Alicia Ronco. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Particles in Ambient Air from Urban and Industrial Areas ». *The Science of the Total Environment* 348, n° 1-3 (15 septembre 2005): 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.050>.
- Reid, Britt C., Armen A. Ghazarian, David M. DeMarini, Amir Sapkota, Darby Jack, Qing Lan, Deborah M. Winn, et Linda S. Birnbaum. « Research Opportunities for Cancer Associated with Indoor Air Pollution from Solid-Fuel Combustion ». *Environmental Health Perspectives* 120, n° 11 (novembre 2012): 1495-98.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.1204962>.
- Reisz-Porszasz, S., M. R. Probst, B. N. Fukunaga, et O. Hankinson. « Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Protein (ARNT) ». *Molecular and Cellular Biology* 14, n° 9 (septembre 1994): 6075-86.
- Rendic, Slobodan, et F. Peter Guengerich. « Contributions of Human Enzymes in Carcinogen Metabolism ». *Chemical Research in Toxicology* 25, n° 7 (16 juillet 2012): 1316-83.  
<https://doi.org/10.1021/tx300132k>.
- Revel, A., H. Raanani, E. Younglai, J. Xu, R. Han, J. F. Savouret, et R. F. Casper. « Resveratrol, a Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist, Protects Sperm from DNA Damage and Apoptosis Caused by Benzo(a)Pyrene ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 15, n° 5 (octobre 2001): 479-86.
- Revillard, Jean-Pierre. *Immunologie. 4ème édition*. De Boeck Supérieur, 2001.
- Rieckmann, T., M. Kriegs, L. Nitsch, K. Hoffer, G. Rohaly, S. Kocher, C. Petersen, E. Dikomey, I. Dornreiter, et J. Dahm-Daphi. « P53 Modulates Homologous Recombination at I-SceI-Induced Double-Strand Breaks through Cell-Cycle Regulation ». *Oncogene* 32, n° 8 (21 février 2013): 968-75. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.123>.

- Rodgers, Kasey, et Mitch McVey. « Error-prone repair of DNA double-strand breaks ». *Journal of cellular physiology* 231, n° 1 (janvier 2016): 15-24. <https://doi.org/10.1002/jcp.25053>.
- Rodgman, A., C. J. Smith, et T. A. Perfetti. « The Composition of Cigarette Smoke: A Retrospective, with Emphasis on Polycyclic Components ». *Human & Experimental Toxicology* 19, n° 10 (octobre 2000): 573-95. <https://doi.org/10.1191/096032700701546514>.
- Romero, D. L., B. J. Mounho, F. T. Lauer, J. L. Born, et S. W. Burchiel. « Depletion of Glutathione by Benzo(a)Pyrene Metabolites, Ionomycin, Thapsigargin, and Phorbol Myristate in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, n° 1 (mai 1997): 62-69. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8113>.
- Romero, E. L., M. J. Morilla, J. Regts, G. A. Koning, et G. L. Scherphof. « On the Mechanism of Hepatic Transendothelial Passage of Large Liposomes ». *FEBS Letters* 448, n° 1 (1 avril 1999): 193-96.
- Rønneberg, A., T. Haldorsen, P. Romundstad, et A. Andersen. « Occupational Exposure and Cancer Incidence among Workers from an Aluminum Smelter in Western Norway ». *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 25, n° 3 (juin 1999): 207-14.
- Ross, J. A., G. B. Nelson, K. H. Wilson, J. R. Rabinowitz, A. Galati, G. D. Stoner, S. Nesnow, et M. J. Mass. « Adenomas Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Strain A/J Mouse Lung Correlate with Time-Integrated DNA Adduct Levels ». *Cancer Research* 55, n° 5 (1 mars 1995): 1039-44.
- Rotger, Margalida, Kristen K Dang, Jacques Fellay, Erin L Heinzen, Sheng Feng, Patrick Descombes, Kevin V Shianna, et al. « Genome-Wide mRNA Expression Correlates of Viral Control in CD4+ T-Cells from HIV-1-Infected Individuals », 26 février 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000781>.
- Ruff, Patrick, Roberto A. Donnianni, Eleanor Glancy, Julyun Oh, et Lorraine S. Symington. « RPA Stabilization of Single-Stranded DNA Is Critical for Break-Induced Replication ». *Cell Reports* 17, n° 12 (20 décembre 2016): 3359-68. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.003>.
- Ruggeri, B., M. DiRado, S. Y. Zhang, B. Bauer, T. Goodrow, et A. J. Klein-Szanto. « Benzo[a]Pyrene-Induced Murine Skin Tumors Exhibit Frequent and Characteristic G to T Mutations in the P53 Gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, n° 3 (1 février 1993): 1013-17.
- Sadek, C. M., et B. L. Allen-Hoffmann. « Cytochrome P450IA1 Is Rapidly Induced in Normal Human Keratinocytes in the Absence of Xenobiotics ». *The Journal of Biological Chemistry* 269, n° 23 (10 juin 1994): 16067-74.
- Sagredo, Carlos, Steinar Øvrebø, Aage Haugen, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Rita Baera, Ingrid V. Botnen, et Steen Mollerup. « Quantitative Analysis of Benzo[a]Pyrene Biotransformation and Adduct Formation in Ahr Knockout Mice ». *Toxicology Letters* 167, n° 3 (15 décembre 2006): 173-82. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.09.005>.
- Sams, Craig. « Urinary Naphthol as a Biomarker of Exposure: Results from an Oral Exposure to Carbaryl and Workers Occupationally Exposed to Naphthalene ». *Toxics* 5, n° 1 (6 janvier 2017). <https://doi.org/10.3390/toxics5010003>.
- Sancar, Aziz, Laura A. Lindsey-Boltz, Keziban Unsal-Kaçmaz, et Stuart Linn. « Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints ». *Annual Review of Biochemistry* 73 (2004): 39-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.
- Sanchez, G., et J. F. Alderete. « The Effect of Host Adrenalectomy on the Physiology of Trypanosoma Rhodesiense ». *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 52, n° 4 (1 décembre 1975): 623-26.

- Sarmiento, Leonor M., et João T. Barata. « Checkmate to CHK1 in T-Cell ALL? » *Oncoscience* 2, n° 9 (2015): 735-36. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.186>.
- Schaldach, C. M., J. Riby, et L. F. Bjeldanes. « Lipoxin A4: A New Class of Ligand for the Ah Receptor ». *Biochemistry* 38, n° 23 (8 juin 1999): 7594-7600. <https://doi.org/10.1021/bi982861e>.
- Scheurer, Michael E., Heather E. Danysh, Michele Follen, et Philip J. Lupo. « Association of Traffic-Related Hazardous Air Pollutants and Cervical Dysplasia in an Urban Multiethnic Population: A Cross-Sectional Study ». *Environmental Health: A Global Access Science Source* 13, n° 1 (13 juin 2014): 52. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-52>.
- Schmeits, Peter C. J., Jia Shao, Danique A. van der Krieken, Oscar L. Volger, Henk van Loveren, Ad. A. C. M. Peijnenburg, et Peter J. M. Hendriksen. « Successful Validation of Genomic Biomarkers for Human Immunotoxicity in Jurkat T Cells in Vitro ». *Journal of Applied Toxicology* 35, n° 7 (1 juillet 2015): 831-41. <https://doi.org/10.1002/jat.3079>.
- Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, et C. A. Bradfield. « Characterization of a Murine Ahr Null Allele: Involvement of the Ah Receptor in Hepatic Growth and Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, n° 13 (25 juin 1996): 6731-36.
- Schmoltdt, A., H. F. Bente, et G. Haberland. « Digitoxin Metabolism by Rat Liver Microsomes ». *Biochemical Pharmacology* 24, n° 17 (1 septembre 1975): 1639-41.
- Schubert, Patricia, Michele M. Schantz, Lane C. Sander, et Stephen A. Wise. « Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Molecular Weight 300 and 302 in Environmental-Matrix Standard Reference Materials by Gas Chromatography/Mass Spectrometry ». *Analytical Chemistry* 75, n° 2 (15 janvier 2003): 234-46.
- Schultz, Iman J., Lambertus A. Kiemeny, Rian Roelofs, Yvonne Van Aarssen, Marko Babjuk, Johannes L. Willems, Per-Uno Malmström, Dorine W. Swinkels, J. Alfred Witjes, et Jacques B. De Kok. « The Prognostic Role of the STK15 T91A Polymorphism and of STK15 MRNA Expression in Patients with Urothelial Cell Carcinoma ». *Anticancer Research* 27, n° 2 (avril 2007): 1025-30.
- Selgrade, M. J., M. J. Daniels, G. R. Burleson, L. D. Lauer, et J. H. Dean. « Effects of 7,12-Dimethylbenz[a]Anthracene, Benzo[a]Pyrene and Cyclosporin A on Murine Cytomegalovirus Infection: Studies of Resistance Mechanisms ». *International Journal of Immunopharmacology* 10, n° 7 (1988): 811-18.
- Sellappa, Sudha, Bhuvaneshwari Mani, et Kripa S. Keyan. « Cytogenetic Biomonitoring of Road Paving Workers Occupationally Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 12, n° 3 (2011): 713-17.
- Sevrioukova, I. F., H. Li, H. Zhang, J. A. Peterson, et T. L. Poulos. « Structure of a Cytochrome P450-Redox Partner Electron-Transfer Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, n° 5 (2 mars 1999): 1863-68.
- Shen, Yu-Min, Andrea B. Troxel, Srilakshmi Vedantam, Trevor M. Penning, et Jeffrey Field. « 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 ». *Chemical Research in Toxicology* 19, n° 11 (novembre 2006): 1441-50. <https://doi.org/10.1021/tx0601206>.
- Sheu, H. L., W. J. Lee, S. J. Lin, G. C. Fang, H. C. Chang, et W. C. You. « Particle-Bound PAH Content in Ambient Air ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 96, n° 3 (1997): 369-82.
- Shibazaki, Masahiko, Takahashi Takeuchi, Sohel Ahmed, et Hideaki Kikuchia. « Blockade by SB203580 of Cyp1a1 Induction by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin, and the Possible Mechanism: Possible Involvement of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway

- in Shuttling of Ah Receptor Overexpressed in COS-7 Cells ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030 (décembre 2004): 275-81.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1329.034>.
- Shiizaki, Kazuhiro, Masanobu Kawanishi, et Takashi Yagi. « Dioxin suppresses benzo[a]pyrene-induced mutations and DNA adduct formation through cytochrome P450 1A1 induction and (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inactivation in human hepatoma cells ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 750, n° 1 (20 janvier 2013): 77-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.09.008>.
- Shiloh, Yosef. « ATM and Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity ». *Nature Reviews. Cancer* 3, n° 3 (mars 2003): 155-68. <https://doi.org/10.1038/nrc1011>.
- Shimada, Akihiko, Haruka Ozaki, Takeshi Saito, et Fujii Noriko. « Tryptophanase-Catalyzed L-Tryptophan Synthesis from D-Serine in the Presence of Diammonium Hydrogen Phosphate ». *International Journal of Molecular Sciences* 10, n° 6 (3 juin 2009): 2578-90.  
<https://doi.org/10.3390/ijms10062578>.
- Shimada, T., K. El-Bayoumy, P. Upadhyaya, T. R. Sutter, F. P. Guengerich, et H. Yamazaki. « Inhibition of Human Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations of Xenobiotics and Procarcinogens by Synthetic Organoselenium Compounds ». *Cancer Research* 57, n° 21 (1 novembre 1997): 4757-64.
- Shimada, Tsutomu, Katsuhiko Tanaka, Shigeo Takenaka, Norie Murayama, Martha V. Martin, Maryam K. Foroozesh, Hiroshi Yamazaki, F. Peter Guengerich, et Masayuki Komori. « Structure-Function Relationships of Inhibition of Human Cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 Flavonoid Derivatives ». *Chemical Research in Toxicology* 23, n° 12 (20 décembre 2010): 1921-35. <https://doi.org/10.1021/tx100286d>.
- Shimkin, M. B., et G. D. Stoner. « Lung Tumors in Mice: Application to Carcinogenesis Bioassay ». *Advances in Cancer Research* 21 (1975): 1-58.
- Shin, Soona, Nobunao Wakabayashi, Vikas Misra, Shyam Biswal, Gum Hwa Lee, Elin S. Agoston, Masayuki Yamamoto, et Thomas W. Kensler. « NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling: Influence on Adipogenesis ». *Molecular and Cellular Biology* 27, n° 20 (15 octobre 2007): 7188-97. <https://doi.org/10.1128/MCB.00915-07>.
- Shiple, Jonathan M., et David J. Waxman. « Aryl Hydrocarbon Receptor-Independent Activation of Estrogen Receptor-Dependent Transcription by 3-Methylcholanthrene ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 213, n° 2 (1 juin 2006): 87-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.09.011>.
- Shu, Kun-Xian, Biao Li, et Li-Xiang Wu. « The p53 network: p53 and its downstream genes ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 55, n° 1 (15 mars 2007): 10-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.11.003>.
- Shultz, Carol A., Amy M. Quinn, Jong-Heum Park, Ronald G. Harvey, Judy L. Bolton, Edmund Maser, et Trevor M. Penning. « Specificity of Human Aldo-Keto Reductases, NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase, and Carbonyl Reductases to Redox-Cycle Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Diones and 4-Hydroxyequilenin-o-Quinone ». *Chemical Research in Toxicology* 24, n° 12 (19 décembre 2011): 2153-66. <https://doi.org/10.1021/tx200294c>.
- Silkworth, J. B., T. Lipinskas, et C. R. Stoner. « Immunosuppressive potential of several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) found at a Superfund site: new model used to evaluate additive interactions between benzo[a]pyrene and TCDD ». *Toxicology, Chemical mixtures and quantitative risk assessment*, 105, n° 2 (28 décembre 1995): 375-86. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03235-8](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03235-8).
- Silva, Luiz Fernando Ferraz da, Silvia Regina Dias Médici Saldiva, Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Marisa Dolhnikoff, et Bandeira Científica Project. « Impaired Lung Function in

- Individuals Chronically Exposed to Biomass Combustion ». *Environmental Research* 112 (janvier 2012): 111-17. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.10.012>.
- Sims, R. C., et M. R. Overcash. « Fate of Polynuclear Aromatic Compounds (PNAs) in Soil-Plant Systems ». *Residue Reviews (Germany, F.R.)*, 1983. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE834U374>.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, et E. L. Schneider. « A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells ». *Experimental Cell Research* 175, n° 1 (mars 1988): 184-91.
- Smerhovsky, Z., K. Landa, P. Rössner, M. Brabec, Z. Zudova, N. Hola, Z. Pokorna, J. Mareckova, et D. Hurychova. « Risk of Cancer in an Occupationally Exposed Cohort with Increased Level of Chromosomal Aberrations ». *Environmental Health Perspectives* 109, n° 1 (janvier 2001): 41-45.
- Smith, Joanne, Lye Mun Tho, Naihan Xu, et David A. Gillespie. « Chapter 3 - The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer ». In *Advances in Cancer Research*, édité par George F. Vande Woude et George Klein, 108:73-112. Academic Press, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>.
- Smith, Joanne, Lye Mun Tho, Naihan Xu, et David A. Gillespie. « The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer ». *Advances in Cancer Research* 108 (2010): 73-112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>.
- Sogawa, K., K. Iwabuchi, H. Abe, et Y. Fujii-Kuriyama. « Transcriptional Activation Domains of the Ah Receptor and Ah Receptor Nuclear Translocator ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 121, n° 9-10 (1995): 612-20.
- Sparfel, Lydie, Laurence Huc, Marc Le Vee, Mireille Desille, Dominique Lagadic-Gossmann, et Olivier Fardel. « Inhibition of Carcinogen-Bioactivating Cytochrome P450 1 Isoforms by Amiloride Derivatives ». *Biochemical Pharmacology* 67, n° 9 (1 mai 2004): 1711-19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.01.005>.
- Sparfel, Lydie, Marie-Laure Pinel-Marie, Magali Boize, Serge Koscielny, Sophie Desmots, Alexandre Pery, et Olivier Fardel. « Transcriptional Signature of Human Macrophages Exposed to the Environmental Contaminant Benzo(a)Pyrene ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 114, n° 2 (avril 2010): 247-59. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq007>.
- Sparfel, Lydie, Julien Van Grevenynghe, Marc Le Vee, Caroline Aninat, et Olivier Fardel. « Potent Inhibition of Carcinogen-Bioactivating Cytochrome P450 1B1 by the P53 Inhibitor Pifithrin Alpha ». *Carcinogenesis* 27, n° 3 (mars 2006): 656-63. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi256>.
- Speit, Günter, Petra Schütz, Irina Bonzheim, Kristina Trenz, et Heike Hoffmann. « Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay ». *Toxicology Letters* 146, n° 2 (15 janvier 2004): 151-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.09.010>.
- Spencer, J. P., A. Jenner, O. I. Aruoma, C. E. Cross, R. Wu, et B. Halliwell. « Oxidative DNA Damage in Human Respiratory Tract Epithelial Cells. Time Course in Relation to DNA Strand Breakage ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224, n° 1 (5 juillet 1996): 17-22. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0977>.
- Spryszyńska, Sylwia, Anna Smok-Pięiążek, Magdalena Ferlińska, Joanna Roszak, Marek Nocuń, et Maciej Stępnik. « The influence of ATM, ATR, DNA-PK inhibitors on the cytotoxic and genotoxic effects of dibenzo[def,p]chrysene on human hepatocellular cancer cell line HepG2 ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 791, n° Supplement C (1 septembre 2015): 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.07.008>.

- Srogi, K. « Monitoring of Environmental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review ». *Environmental Chemistry Letters* 5, n° 4 (2007): 169-95.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-007-0095-0>.
- Staal, Yvonne C. M., Dennie G. A. J. Hebels, Van Herwijnen, Marcel H.m, Ralph W. H. Gottschalk, Van Schooten, Frederik J, Van Delft, et Joost H.m. « Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation ». *Carcinogenesis* 28, n° 12 (1 décembre 2007): 2632-40.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgm182>.
- Stampfer, M. R., J. C. Bartholomew, H. S. Smith, et J. C. Bartley. « Metabolism of Benzo[a]Pyrene by Human Mammary Epithelial Cells: Toxicity and DNA Adduct Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, n° 10 (octobre 1981): 6251-55.
- Stanford, Elizabeth A., Zhongyan Wang, Olga Novikov, Francesca Mulas, Esther Landesman-Bollag, Stefano Monti, Brenden W. Smith, David C. Seldin, George J. Murphy, et David H. Sherr. « The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Development of Cells with the Molecular and Functional Characteristics of Cancer Stem-like Cells ». *BMC Biology* 14, n° 1 (16 mars 2016): 20. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0240-y>.
- Stein, J. M. « The Effect of Adrenaline and of Alpha- and Beta-Adrenergic Blocking Agents on ATP Concentration and on Incorporation of <sup>32</sup>Pi into ATP in Rat Fat Cells ». *Biochemical Pharmacology* 24, n° 18 (15 septembre 1975): 1659-62.
- Stockinger, Brigitta, Marc Veldhoen, et Keiji Hirota. « Modulation of Th17 Development and Function by Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor--the Role of Endogenous Ligands ». *European Journal of Immunology* 39, n° 3 (mars 2009): 652-54.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200839134>.
- Sugatani, Junko, Shinichi Nishitani, Kasumi Yamakawa, Kouichi Yoshinari, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, et Masao Miwa. « Transcriptional Regulation of Human UGT1A1 Gene Expression: Activated Glucocorticoid Receptor Enhances Constitutive Androstane Receptor/Pregnane X Receptor-Mediated UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Regulation with Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1 ». *Molecular Pharmacology* 67, n° 3 (mars 2005): 845-55. <https://doi.org/10.1124/mol.104.007161>.
- Sulli, Gabriele, Raffaella Di Micco, et Fabrizio d'Adda di Fagagna. « Crosstalk between Chromatin State and DNA Damage Response in Cellular Senescence and Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 12, n° 10 (octobre 2012): 709-20.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3344>.
- Tanaka, H., H. Arakawa, T. Yamaguchi, K. Shiraishi, S. Fukuda, K. Matsui, Y. Takei, et Y. Nakamura. « A Ribonucleotide Reductase Gene Involved in a P53-Dependent Cell-Cycle Checkpoint for DNA Damage ». *Nature* 404, n° 6773 (2 mars 2000): 42-49.  
<https://doi.org/10.1038/35003506>.
- Tang, D., R. M. Santella, A. M. Blackwood, T. L. Young, J. Mayer, A. Jaretzki, S. Grantham, W. Y. Tsai, et F. P. Perera. « A Molecular Epidemiological Case-Control Study of Lung Cancer ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 4, n° 4 (juin 1995): 341-46.
- Tannheimer, S. L., S. L. Barton, S. P. Ethier, et S. W. Burchiel. « Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Increase Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Cell Proliferation in Primary Human Mammary Epithelial Cells ». *Carcinogenesis* 18, n° 6 (juin 1997): 1177-82.
- Tarantini, Adeline, Anne Maître, Emmanuel Lefèbvre, Marie Marques, Afef Rajhi, et Thierry Douki. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Binary Mixtures Modulate the Efficiency of Benzo[a]Pyrene to Form DNA Adducts in Human Cells ». *Toxicology* 279, n° 1-3 (11 janvier 2011): 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.09.002>.

- Tauchi, Masafumi, Azumi Hida, Takaaki Negishi, Fumiki Katsuoka, Shuhei Noda, Junsei Mimura, Tomonori Hosoya, et al. « Constitutive Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Causes Inflammatory Skin Lesions ». *Molecular and Cellular Biology* 25, n° 21 (novembre 2005): 9360-68. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9360-9368.2005>.
- Tay, Szun S., Ann McCormack, Charlotte Lawson, et Marlene L. Rose. « IFN- $\gamma$  Reverses the Stop Signal Allowing Migration of Antigen-Specific T Cells into Inflammatory Sites ». *The Journal of Immunology* 170, n° 6 (15 mars 2003): 3315-22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3315>.
- Temchura, Vladimir V., Markus Frericks, Wolfgang Nacken, et Charlotte Esser. « Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Thymocyte Emigration in Vivo ». *European Journal of Immunology* 35, n° 9 (septembre 2005): 2738-47. <https://doi.org/10.1002/eji.200425641>.
- Terry, Mary Beth, Marilie D. Gammon, Fang Fang Zhang, Sybil M. Eng, Sharon K. Sagiv, Andrea B. Paykin, Qiao Wang, et al. « Polymorphism in the DNA Repair Gene XPD, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts, Cigarette Smoking, and Breast Cancer Risk ». *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 13, n° 12 (1 décembre 2004): 2053-58.
- Tewari, R. P., J. P. Balint, et K. A. Brown. « Suppressive Effect of 3-Methylcholanthrene on Phagocytic Activity of Mouse Peritoneal Macrophages for *Torulopsis Glabrata* ». *Journal of the National Cancer Institute* 62, n° 4 (avril 1979): 983-88.
- Thakker, D. R., H. Yagi, H. Akagi, M. Koreeda, A. H. Lu, W. Levin, A. W. Wood, A. H. Conney, et D. M. Jerina. « Metabolism of Benzo[a]Pyrene. VI. Stereoselective Metabolism of Benzo[a]Pyrene and Benzo[a]Pyrene 7,8-Dihydrodiol to Diol Epoxides ». *Chemico-Biological Interactions* 16, n° 3 (mars 1977): 281-300.
- Thomsen, J. S., X. Wang, R. N. Hines, et S. Safe. « Restoration of Aryl Hydrocarbon (Ah) Responsiveness in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells by Transient Expression of the Estrogen Receptor ». *Carcinogenesis* 15, n° 5 (mai 1994): 933-37.
- Timmerman, Ilse, Anna E. Daniel, Jeffrey Kroon, et Jaap D. van Buul. « Chapter Five - Leukocytes Crossing the Endothelium: A Matter of Communication ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Kwang W. Jeon, 322:281-329. International Review of Cell and Molecular Biology. Academic Press, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.005>.
- Topinka, J., A. Milcova, H. Libalova, Z. Novakova, P. Rossner Jr., I. Balascak, et R. J. Sram. « Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: Bulky DNA adducts ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 669, n° 1-2 (2 octobre 2009): 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.04.011>.
- Traber, Ghislaine L., Chien-Cheng Chen, Ying-Yu Huang, Marcella Spoor, Jeanine Roos, Maarten A. Frens, Dominik Straumann, et Christian Grimm. « Albino Mice as an Animal Model for Infantile Nystagmus Syndrome ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53, n° 9 (20 août 2012): 5737-47. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10137>.
- Traber, Maret G., Debbie J. Mustacich, Laura C. Sullivan, Scott W. Leonard, Amelia Ahern-Rindell, et Nancy Kerkvliet. « Vitamin E Status and Metabolism in Adult and Aged Aryl Hydrocarbon Receptor Null Mice ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21, n° 12 (décembre 2010): 1193-99. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.10.005>.
- Traven, Ana, et Jörg Heierhorst. « SQ/TQ Cluster Domains: Concentrated ATM/ATR Kinase Phosphorylation Site Regions in DNA-Damage-Response Proteins ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 27, n° 4 (avril 2005): 397-407. <https://doi.org/10.1002/bies.20204>.

- Trickett, Annette E., Yiu Lam Kwan, Barbara Cameron, et John M. Dwyer. « Ex Vivo Expansion of Functional T Lymphocytes from HIV-Infected Individuals ». *Journal of Immunological Methods* 262, n° 1-2 (1 avril 2002): 71-83.
- Trickett, Annette, et Yiu Lam Kwan. « T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads ». *Journal of Immunological Methods* 275, n° 1 (1 avril 2003): 251-55. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00010-3).
- Tripathi, Kaushlendra, Chinnadurai Mani, Ranganatha R. Somasagara, David W. Clark, Venkateshwari Ananthapur, Kambappa Vinaya, et Komaraiah Palle. « Detection and Evaluation of Estrogen DNA-Adducts and Their Carcinogenic Effects in Cultured Human Cells Using Biotinylated Estradiol ». *Molecular Carcinogenesis* 56, n° 3 (mars 2017): 1010-20. <https://doi.org/10.1002/mc.22566>.
- Tsay, Junchieh J., Kam-Meng Tchou-Wong, Alissa K. Greenberg, Harvey Pass, et William N. Rom. « Aryl Hydrocarbon Receptor and Lung Cancer ». *Anticancer Research* 33, n° 4 (avril 2013): 1247-56.
- Tsuji, Gaku, Masakazu Takahara, Hiroshi Uchi, Satoshi Takeuchi, Chikage Mitoma, Yoichi Moroi, et Masutaka Furue. « An Environmental Contaminant, Benzo(a)Pyrene, Induces Oxidative Stress-Mediated Interleukin-8 Production in Human Keratinocytes via the Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway ». *Journal of Dermatological Science* 62, n° 1 (avril 2011): 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.10.017>.
- Turinetto, Valentina, et Claudia Giachino. « Multiple Facets of Histone Variant H2AX: A DNA Double-Strand-Break Marker with Several Biological Functions ». *Nucleic Acids Research* 43, n° 5 (11 mars 2015): 2489-98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv061>.
- Ullman, K. S., J. P. Northrop, C. L. Verweij, et G. R. Crabtree. « Transmission of Signals from the T Lymphocyte Antigen Receptor to the Genes Responsible for Cell Proliferation and Immune Function: The Missing Link ». *Annual Review of Immunology* 8 (1990): 421-52. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.002225>.
- Uno, Shigeyuki, Timothy P. Dalton, Nadine Dragin, Christine P. Curran, Sandrine Derkenne, Marian L. Miller, Howard G. Shertzer, Frank J. Gonzalez, et Daniel W. Nebert. « Oral Benzo[a]Pyrene in Cyp1 Knockout Mouse Lines: CYP1A1 Important in Detoxication, CYP1B1 Metabolism Required for Immune Damage Independent of Total-Body Burden and Clearance Rate ». *Molecular Pharmacology* 69, n° 4 (1 avril 2006): 1103-14. <https://doi.org/10.1124/mol.105.021501>.
- Vamvakas, Spiros, Esther H. Vock, et Werner K. Lutz. « On the Role of DNA Double-Strand Breaks in Toxicity and Carcinogenesis ». *Critical Reviews in Toxicology* 27, n° 2 (1 janvier 1997): 155-74. <https://doi.org/10.3109/10408449709021617>.
- Vandevoorde, C., A. Vral, B. Vandekerckhove, J. Philippé, et H. Thierens. « Radiation Sensitivity of Human CD34(+) Cells Versus Peripheral Blood T Lymphocytes of Newborns and Adults: DNA Repair and Mutagenic Effects ». *Radiation Research* 185, n° 6 (juin 2016): 580-90. <https://doi.org/10.1667/RR14109.1>.
- vanGijssel, Hilde E., Laura J. Schild, Danielle L. Watt, Mark J. Roth, Guo-Qing Wang, Sanford M. Dawsey, Paul S. Albert, et al. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts Determined by Semiquantitative Immunohistochemistry in Human Esophageal Biopsies Taken in 1985 ». *Mutation Research* 547, n° 1-2 (22 mars 2004): 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.11.010>.
- vanGrevenynghe, J. van, M. Bernard, S. Langouet, C. Le Berre, T. Fest, et O. Fardel. « Human CD34-Positive Hematopoietic Stem Cells Constitute Targets for Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314, n° 2 (1 août 2005): 693-702. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084780>.
- vanGrevenynghe, Julien, Sophie Rion, Eric Le Ferrec, Marc Le Vee, Laurence Amiot, Renée Fauchet, et Olivier Fardel. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Inhibit Differentiation of

- Human Monocytes into Macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170, n° 5 (1 mars 2003): 2374-81.
- vanGreevenynghe, Julien, Lydie Sparfel, Marc Le Vee, David Gilot, Bernard Drenou, Renée Fauchet, et Olivier Fardel. « Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, n° 3 (7 mai 2004): 708-16.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.104>.
- Vasianovich, Yulia, Lea A. Harrington, et Svetlana Makovets. « Break-Induced Replication Requires DNA Damage-Induced Phosphorylation of Pif1 and Leads to Telomere Lengthening ». *PLoS Genetics* 10, n° 10 (octobre 2014): e1004679.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004679>.
- Vasilou, V., H. G. Shertzer, R. M. Liu, M. Sainsbury, et D. W. Nebert. « Response of [Ah] Battery Genes to Compounds That Protect against Menadione Toxicity ». *Biochemical Pharmacology* 50, n° 11 (27 novembre 1995): 1885-91.
- Vauhkonen, M., T. Kuusi, et P. K. Kinnunen. « Serum and Tissue Distribution of Benzol[a]Pyrene from Intravenously Injected Chylomicrons in Rat in Vivo ». *Cancer Letters* 11, n° 2 (décembre 1980): 113-19.
- Veldhoen, Marc, Keiji Hirota, Jillian Christensen, Anne O'Garra, et Brigitta Stockinger. « Natural Agonists for Aryl Hydrocarbon Receptor in Culture Medium Are Essential for Optimal Differentiation of Th17 T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 206, n° 1 (16 janvier 2009): 43-49. <https://doi.org/10.1084/jem.20081438>.
- Veldhoen, Marc, Keiji Hirota, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, Laure Dumoutier, Jean-Christophe Renauld, et Brigitta Stockinger. « The Aryl Hydrocarbon Receptor Links TH17-Cell-Mediated Autoimmunity to Environmental Toxins ». *Nature* 453, n° 7191 (1 mai 2008): 106-9. <https://doi.org/10.1038/nature06881>.
- Vial, T., B. Nicolas, et J. Descotes. « Clinical Immunotoxicity of Pesticides ». *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48, n° 3 (28 juin 1996): 215-29.  
<https://doi.org/10.1080/009841096161294>.
- Vial, Thierry, et Jacques Descotes. « Immunosuppressive Drugs and Cancer ». *Toxicology* 185, n° 3 (1 avril 2003): 229-40.
- Vignard, Julien, Gladys Mirey, et Bernard Salles. « Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up ». *Radiotherapy and Oncology* 108, n° 3 (1 septembre 2013): 362-69. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>.
- Vogel, Christoph F. A., et Fumio Matsumura. « Interaction of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) with Induced Adipocyte Differentiation in Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) Involves Tyrosine Kinase c-Src ». *Biochemical Pharmacology* 66, n° 7 (1 octobre 2003): 1231-44.
- Vogel, Christoph Franz Adam, Wen Li, Dalei Wu, Jamie K. Miller, Colleen Sweeney, Gwendal Lazennec, Yasuko Fujisawa, et Fumio Matsumura. « Interaction of Aryl Hydrocarbon Receptor and NF-KB Subunit RelB in Breast Cancer Is Associated with Interleukin-8 Overexpression ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 512, n° 1 (1 août 2011): 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.05.011>.
- Vral, A., H. Thierens, A. Baeyens, et L. De Ridder. « Chromosomal Aberrations and in Vitro Radiosensitivity: Intra-Individual versus Inter-Individual Variability ». *Toxicology Letters* 149, n° 1-3 (1 avril 2004): 345-52. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.044>.
- Wagage, Sagie, Beena John, Bryan L. Krock, Aisling O'Hara Hall, Louise M. Randall, Christopher L. Karp, M. Celeste Simon, et Christopher A. Hunter. « The Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes IL-10 Production by NK Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192, n° 4 (15 février 2014): 1661-70.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300497>.

- Wang, Aijin, Jing Gu, Kimberly Judson-Kremer, K. Leslie Powell, Harsha Mistry, Padmaja Simhambhatla, C. Marcelo Aldaz, Sally Gaddis, et Michael C. MacLeod. « Response of human mammary epithelial cells to DNA damage induced by BPDE: involvement of novel regulatory pathways ». *Carcinogenesis* 24, n° 2 (1 février 2003): 225-34. <https://doi.org/10.1093/carcin/24.2.225>.
- Wang, J. S., et W. F. Busby. « Induction of Lung and Liver Tumors by Fluoranthene in a Prewanling CD-1 Mouse Bioassay ». *Carcinogenesis* 14, n° 9 (septembre 1993): 1871-74.
- Wang, X. W., H. Yeh, L. Schaeffer, R. Roy, V. Moncollin, J.-M. Egly, Z. Wang, et al. « P53 Modulation of TFIID-associated Nucleotide Excision Repair Activity ». *Nature Genetics* 10, n° 2 (1 juin 1995): ng0695-188-188. <https://doi.org/10.1038/ng0695-188>.
- Wang, Xiang, Gloria C. Li, George Iliakis, et Ya Wang. « Ku Affects the CHK1-Dependent G(2) Checkpoint after Ionizing Radiation ». *Cancer Research* 62, n° 21 (1 novembre 2002): 6031-34.
- Ward, Edward C., Michael J. Murray, Lloyd D. Lauer, Robert V. House, et Jack H. Dean. « Persistent suppression of humoral and cell-mediated immunity in mice following exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenz[a]anthracene ». *International Journal of Immunopharmacology* 8, n° 1 (1 janvier 1986): 13-22. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(86\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0192-0561(86)90068-8).
- Ward, Edward C., Michael J. Murray, Lloyd D. Lauer, Robert V. House, Richard Irons, et Jack H. Dean. « Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice. I. Effects on humoral immunity and host resistance ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 75, n° 2 (15 septembre 1984): 299-308. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90212-6](https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90212-6).
- Ware, R. E., C. V. Pickens, C. M. DeCastro, et T. A. Howard. « Circulating PIG-A Mutant T Lymphocytes in Healthy Adults and Patients with Bone Marrow Failure Syndromes ». *Experimental Hematology* 29, n° 12 (décembre 2001): 1403-9.
- Weber, Anika Maria, et Anderson Joseph Ryan. « ATM and ATR as therapeutic targets in cancer ». *Pharmacology & Therapeutics* 149, n° Supplement C (1 mai 2015): 124-38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>.
- Weiss, C., D. Faust, I. Schreck, A. Ruff, T. Farwerck, A. Melenberg, S. Schneider, et al. « TCDD Deregulates Contact Inhibition in Rat Liver Oval Cells via Ah Receptor, JunD and Cyclin A ». *Oncogene* 27, n° 15 (22 octobre 2007): 2198-2207. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210859>.
- Wenzel-Hartung, R., H. Brune, G. Grimmer, P. Germann, J. Timm, et W. Wosniok. « Evaluation of the Carcinogenic Potency of 4 Environmental Polycyclic Aromatic Compounds Following Intrapulmonary Application in Rats ». *Experimental Pathology* 40, n° 4 (1990): 221-27.
- Wernet, Mathias F., Esteban O. Mazzoni, Arzu Çelik, Dianne M. Duncan, Ian Duncan, et Claude Desplan. « Stochastic Spineless Expression Creates the Retinal Mosaic for Colour Vision ». *Nature* 440, n° 7081 (9 mars 2006): 174-80. <https://doi.org/10.1038/nature04615>.
- Weyand, E. H., et D. R. Bevan. « Benzo(a)Pyrene Disposition and Metabolism in Rats Following Intratracheal Instillation ». *Cancer Research* 46, n° 11 (novembre 1986): 5655-61.
- Weyand, E. H., et Y. Wu. « Covalent Binding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Components of Manufactured Gas Plant Residue to Mouse Lung and Forestomach DNA ». *Chemical Research in Toxicology* 8, n° 7 (novembre 1995): 955-62.

- White, K. L., et M. P. Holsapple. « Direct Suppression of in Vitro Antibody Production by Mouse Spleen Cells by the Carcinogen Benzo(a)Pyrene but Not by the Noncarcinogenic Congener Benzo(e)Pyrene ». *Cancer Research* 44, n° 8 (août 1984): 3388-93.
- Whitesell, L., E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers, et L. M. Neckers. « Inhibition of Heat Shock Protein HSP90-Pp60v-Src Heteroprotein Complex Formation by Benzoquinone Ansamycins: Essential Role for Stress Proteins in Oncogenic Transformation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, n° 18 (30 août 1994): 8324-28.
- Whitlock, James P., Herbert L. Cooper, et Harry V. Gelboin. « Aryl Hydrocarbon (Benzopyrene) Hydroxylase Is Stimulated in Human Lymphocytes by Mitogens and Benz[a]Anthracene ». *Science* 177, n° 4049 (18 août 1972): 618-19.  
<https://doi.org/10.1126/science.177.4049.618>.
- Wiesel, Melanie, Josh Crouse, Gregor Bedenikovic, Andrew Sutherland, Nicole Joller, et Annette Oxenius. « Type-I IFN Drives the Differentiation of Short-Lived Effector CD8+ T Cells in Vivo ». *European Journal of Immunology* 42, n° 2 (février 2012): 320-29.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201142091>.
- Wild, S. R., M. L. Berrow, et K. C. Jones. « The Persistence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Sewage Sludge Amended Agricultural Soils ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 72, n° 2 (1991): 141-57.
- Williams, J. A., et D. H. Phillips. « Mammary Expression of Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Their Potential Role in Breast Cancer ». *Cancer Research* 60, n° 17 (1 septembre 2000): 4667-77.
- Wilson. « Evaluation of the generation of genotoxic and cytotoxic metabolites of benzo[a]pyrene, aflatoxin B1, naphthalene and tamoxifen using human liver microsomes and human lymphocytes ». *Human & Experimental Toxicology - AS Wilson, MD Tingle, MD Kelly, BK Park, 1995*. Consulté le 14 novembre 2017.  
[http://journals.sagepub.com/gate2.inist.fr/doi/abs/10.1177/096032719501400608?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/gate2.inist.fr/doi/abs/10.1177/096032719501400608?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed).
- Wilson, Stephen E., Glenn Talaska, Robert S. Kahn, Brenda Schumann, Jane Khoury, Anthony C. Leonard, et Bruce P. Lanphear. « White Blood Cell DNA Adducts in a Cohort of Asthmatic Children Exposed to Environmental Tobacco Smoke ». *International Archives of Occupational and Environmental Health* 84, n° 1 (1 janvier 2011): 19-27. <https://doi.org/10.1007/s00420-010-0529-z>.
- Wojdani, Aristo, et Lawrence J. Alfred. « Alterations in Cell-Mediated Immune Functions Induced in Mouse Splenic Lymphocytes by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Cancer Research* 44, n° 3 (1 mars 1984): 942-45.
- Wood, Alexander W., Wayne Levin, Paul E. Thomas, Dene Ryan, Jean M. Karle, Haruhiko Yagi, Donald M. Jerina, et Allan H. Conney. « Metabolic Activation of Dibenz(a,h)Anthracene and Its Dihydrodiols to Bacterial Mutagens ». *Cancer Research* 38, n° 7 (1 juillet 1978): 1967-73.
- Wormke, Mark, Matthew Stoner, Bradley Saville, Kelcey Walker, Maen Abdelrahim, Robert Burghardt, et Stephen Safe. « The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Degradation of Estrogen Receptor Alpha through Activation of Proteasomes ». *Molecular and Cellular Biology* 23, n° 6 (mars 2003): 1843-55.
- Xing, Xinrong, Hailian Bi, Alan K. Chang, Ming-Xi Zang, Miao Wang, Xiang Ao, Shen Li, Hongming Pan, Qianping Guo, et Huijian Wu. « SUMOylation of AhR Modulates Its Activity and Stability through Inhibiting Its Ubiquitination ». *Journal of Cellular Physiology* 227, n° 12 (décembre 2012): 3812-19. <https://doi.org/10.1002/jcp.24092>.
- Xu, Ming, Weijing Liu, Chao Li, Chun Xiao, Lili Ding, Ke Xu, Jinju Geng, et Hongqiang Ren. « Evaluation of the Treatment Performance and Microbial Communities of a Combined

- Constructed Wetland Used to Treat Industrial Park Wastewater ». *Environmental Science and Pollution Research International* 23, n° 11 (juin 2016): 10990-1.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-6181-8>.
- Xue, Weiling, et David Warshawsky. « Metabolic Activation of Polycyclic and Heterocyclic Aromatic Hydrocarbons and DNA Damage: A Review ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, n° 1 (1 août 2005): 73-93. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.006>.
- Yamaguchi, K., R. A. Matulka, A. M. Shneider, P. Toselli, A. F. Trombino, S. Yang, L. J. Hafer, et al. « Induction of PreB Cell Apoptosis by 7,12-Dimethylbenz[a]Anthracene in Long-Term Primary Murine Bone Marrow Cultures ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 147, n° 2 (décembre 1997): 190-203.  
<https://doi.org/10.1006/taap.1997.8263>.
- Yamane, Arito, Kazuya Shinmura, Noriaki Sunaga, Takayuki Saitoh, Satoru Yamaguchi, Yumi Shinmura, Kimio Yoshimura, et al. « Suppressive activities of OGG1 and MYH proteins against G:C to T:A mutations caused by 8-hydroxyguanine but not by benzo[a]pyrene diol epoxide in human cells in vivo ». *Carcinogenesis* 24, n° 6 (1 juin 2003): 1031-37. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg056>.
- Yan, Chunlan, Jing Lu, Guanglin Zhang, Tier Gan, Qunli Zeng, Zhengping Shao, Penelope J. Duerksen-Hughes, et Jun Yang. « Benzo[a]Pyrene Induces Complex H2AX Phosphorylation Patterns by Multiple Kinases Including ATM, ATR, and DNA-PK ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 25, n° 1 (février 2011): 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.012>.
- Yanagisawa, Rie, Eiko Koike, Tin-Tin Win-Shwe, Takamichi Ichinose, et Hirohisa Takano. « Low-Dose Benzo[a]Pyrene Aggravates Allergic Airway Inflammation in Mice ». *Journal of Applied Toxicology* 36, n° 11 (1 novembre 2016): 1496-1504.  
<https://doi.org/10.1002/jat.3308>.
- Yang, Qiaoyun, Xinghua Qiu, Ran Li, Jin Ma, Keqiu Li, et Guang Li. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Oxidative Stress for a Rural Population from the North China Plain ». *Environmental Science and Pollution Research International* 22, n° 3 (février 2015): 1760-69. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3284-y>.
- Yang, S. K. « Stereoselectivity of Cytochrome P-450 Isozymes and Epoxide Hydrolase in the Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». *Biochemical Pharmacology* 37, n° 1 (1 janvier 1988): 61-70.
- Yeh, G. C., J. Lopaczynska, C. M. Poore, et J. M. Phang. « A New Functional Role for P-Glycoprotein: Efflux Pump for Benzo(Alpha)Pyrene in Human Breast Cancer MCF-7 Cells ». *Cancer Research* 52, n° 23 (1 décembre 1992): 6692-95.
- Yu, Hai-ning, Sheng-rong Shen, et Yao-kang Xiong. « Cytotoxicity of Epigallocatechin-3-Gallate to LNCaP Cells in the Presence of Cu<sup>2+</sup> ». *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6, n° 2 (février 2005): 125-31. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0125>.
- Yu Liangli Shuo Wang Bao-Guo Sun. « Food Safety Chemistry: Toxicant Occurrence, Analysis and Mitigation | Food Safety Chemistry: Toxicant Occurrence, Analysis and Mitigation, Liangli (Lucy) Yu, Shuo Wang, Bao-Guo Sun, CRC Press (Taylor and Francis Group) (2014), 344 Pages, £108.00, ISBN: 9781466597945 - ScienceDirect », 2015. <http://www.sciencedirect.com/passerelle.univ-rennes1.fr/science/article/pii/S002364381500287X>.
- Yuan, Chun-Hui, Xue-Qin Yang, Cheng-Liang Zhu, Shao-Ping Liu, Bi-Cheng Wang, et Fu-Bing Wang. « Interleukin-7 Enhances the in Vivo Anti-Tumor Activity of Tumor-Reactive CD8+ T Cells with Induction of IFN-Gamma in a Murine Breast Cancer Model ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 15, n° 1 (2014): 265-71.
- Zaccaria, Kimberly J., et Peter R. McClure. « Using Immunotoxicity Information to Improve Cancer Risk Assessment for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures ». *International*

- Journal of Toxicology* 32, n° 4 (1 juillet 2013): 236-50.  
<https://doi.org/10.1177/1091581813492829>.
- Zafra, German, et Diana V. Cortés-Espinosa. « Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Trichoderma Species: A Mini Review ». *Environmental Science and Pollution Research International* 22, n° 24 (décembre 2015): 19426-33.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5602-4>.
- Zaher, H., P. M. Fernandez-Salguero, J. Letterio, M. S. Sheikh, A. J. Fornace, A. B. Roberts, et F. J. Gonzalez. « The Involvement of Aryl Hydrocarbon Receptor in the Activation of Transforming Growth Factor-Beta and Apoptosis ». *Molecular Pharmacology* 54, n° 2 (août 1998): 313-21.
- Zhan, D. J., R. H. Heflich, et P. P. Fu. « Molecular Characterization of Mutation and Comparison of Mutation Profiles in the Hprt Gene of Chinese Hamster Ovary Cells Treated with Benzo[a]Pyrene Trans-7,8-Diol-Anti-9,10-Epoxide, 1-Nitrobenzo[a]Pyrene Trans-7,8-Diol-Anti-9,10-Epoxide, and 3-Nitrobenzo[a]Pyrene Trans-7,8-Diol-Anti-9,10-Epoxide ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 27, n° 1 (1996): 19-29.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)27:1<19::AID-EM3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:1<19::AID-EM3>3.0.CO;2-9).
- Zhang, Shu, Chunhua Qin, et Stephen H. Safe. « Flavonoids as Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists/Antagonists: Effects of Structure and Cell Context ». *Environmental Health Perspectives* 111, n° 16 (décembre 2003): 1877-82.
- Zhang, Wuyan, Alicia Carriquiry, Dan Nettleton, et Jack C. M. Dekkers. « Pooling mRNA in microarray experiments and its effect on power ». *Bioinformatics* 23, n° 10 (15 mai 2007): 1217-24. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm081>.
- Zhang, Yun, Xin Ke, Shaofeng Gui, Xiaoqiong Wu, Chunyong Wang, et Haijun Zhang. « Evaluation of AhR-Agonists and AhR-Agonist Activity in Sediments of Liaohe River Protected Areas, China ». *Marine Pollution Bulletin* 115, n° 1-2 (15 février 2017): 292-96. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.064>.
- Zhang, Shirley L., et Avinash Bhandoola. « Trafficking to the Thymus ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 373 (2014): 87-111.  
[https://doi.org/10.1007/82\\_2013\\_324](https://doi.org/10.1007/82_2013_324).
- Zhao, Bin, Danica E. Degroot, Ai Hayashi, Guochun He, et Michael S. Denison. « CH223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 117, n° 2 (octobre 2010): 393-403.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq217>.
- Zhu, Jijiang, Ping Chang, Melissa L. Bondy, Aysegul A. Sahin, Sonja E. Singletary, Satoru Takahashi, Tomoyuki Shirai, et Donghui Li. « Detection of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-b]-Pyridine-DNA Adducts in Normal Breast Tissues and Risk of Breast Cancer ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 12, n° 9 (septembre 2003): 830-37.



## Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as benzo(*a*)pyrene (B[*a*]P), are ubiquitous environmental contaminants generated during organic matter combustion. These compounds have been associated with the development of toxic effects on human health, including carcinogenic and immunotoxic effects, mainly related to Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) activation. Among the immune system cells, T lymphocytes appear as major targets of PAHs. Previous results, obtained in the laboratory, have shown that activation of primary human T lymphocytes leads to a functional AhR expression increase, suggesting their ability to respond to PAH exposure. Our specific aims are: (1) to determine the effects of B[*a*]P on gene expression profiles in human normal lymphocytes by using large-scale approaches such as microarray-based transcriptome analysis, (2) to monitor the genotoxic and immunotoxic effects of B[*a*]P by measuring DNA damage and immunosuppressive actions, respectively and, (3) to analyze the modulation of these effects by the presence of other PAHs. Our work propose primary cultures of activated human T lymphocytes as a good model for studying both genotoxic and immunotoxic effects of environmental contaminants such as PAHs and predicting human health issues. It also gains a comprehensive insight into the immune response regulation after PAH exposure and provides potential new biomarkers of exposure to these environmental contaminants.

**Keywords:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), T lymphocytes, genotoxicity, immunotoxicity, biomarkers

## Résumé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), tels que le benzo(*a*)pyrène (B[*a*]P), sont des contaminants environnementaux ubiquistes générés lors de la combustion de matière organique. Ces composés ont été associés au développement d'effets toxiques sur la santé humaine, notamment des effets cancérigènes et immunotoxiques, principalement liés à l'activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (RAh). Parmi les cellules du système immunitaire, les lymphocytes T apparaissent comme des cibles majeures des HAPs. Des résultats antérieurs, obtenus au laboratoire, ont montré que l'activation des lymphocytes T humains en culture primaire conduit à l'augmentation de l'expression et de la fonction du RAh, suggérant la capacité accrue de ces cellules à répondre à une exposition aux HAPs. Nos objectifs sont : (1) de déterminer les effets du B[*a*]P sur les profils d'expression génique dans les lymphocytes humains normaux en utilisant des approches à haut débit telle que l'analyse transcriptomique sur puce à ADN, (2) d'évaluer les effets génotoxiques et immunotoxiques du B[*a*]P en mesurant respectivement les dommages à l'ADN induits et leurs actions immunosuppressives et (3) d'analyser la modulation de ces effets en présence d'autres HAPs. Notre travail identifie les lymphocytes T humains normaux comme un bon modèle pour étudier les effets génotoxiques et immunotoxiques des HAPs, et pour prédire les problèmes de santé humaine liés à l'exposition à ces contaminants. Il permet également de mieux comprendre la régulation par les HAPs de la réponse immune et propose de nouveaux biomarqueurs potentiels de l'exposition à ces contaminants environnementaux.

**Mots clés :** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), lymphocytes T, génotoxicité, immunotoxicité, biomarqueurs